

Isolation of anaerobic bacteria from atherosclerotic plaques from carotid arteries

Izolacja bakterii beztlenowych z blaszek miażdżycowych występujących w tętnicach szyjnych

Anna Kędzia¹, Marek Ciecierski², Andrzej Kufel², Maria Wierzbowska¹, Ewa Kwapisz¹

¹Department of Oral Microbiology, Medical University of Gdańsk, Poland
(Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej, Katedra Mikrobiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego)

²Department of Vascular Surgery, Mikołaj Kopernik Regional Traumatology Centre, Gdańsk, Poland
(Oddział Chirurgii Naczyniowej, Pomorskie Centrum Traumatologii im. Mikołaja Kopernika w Gdańsku)

Abstract

Background. Recent studies demonstrated a link between oral infections and the presence of atherosclerotic lesions in carotid arteries. Periodontal pathogens, including *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, and *Prevotella nigrescens* have been identified in atherosclerotic plaques. The microorganisms have been detected using PCR technique, DNA hybridization, FISH analysis (fluorescence in situ hybridization), ELISA, by immunohistochemistry, and in transmission or scanning electron microscopy. It is, however, only the FISH technique and culture in media that permit detection of living microorganisms.

The aim of the study was to isolate anaerobic bacteria from atherosclerotic plaques from carotid arteries.

Materials and methods. Atherosclerotic plaques were obtained intraoperatively from 37 patients (22 men and 15 women). The harvested plaques were placed in a transport medium prepared according to the PRAS method. The material was then homogenized and cultured on various enriched or selective media. Incubation was carried out for 10–14 days at 37°C, in anaerobic jars with 10% CO₂, 10% H₂, and 80% N₂ atmosphere, with palladium catalyst and indicator of anaerobiosis. Anaerobic bacteria were identified according to current regulations.

Results. Anaerobic bacteria were isolated from 68% of the analysed atherosclerotic plaques. *Porphyromonas gingivalis* were the dominant species (20% of cases). Gram-positive rods *Propionibacterium acnes* were identified in 18% of the samples, and Gram-negative rods *Prevotella intermedia* in 16% of plaques from carotid arteries. Other anaerobic species, including *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Micromonas*, *Finegoldia*, *Propionibacterium*, and *Actinomyces* genus occurred in rare cases (2–8%).

Conclusions. Anaerobic bacteria were isolated from 68% of the atherosclerotic plaque samples obtained from carotid arteries. The most prevalent Gram-negative rods included *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* species, and Gram-positive rods were most often represented by *Propionibacterium acnes*. *Porphyromonas endodontalis* and *Fusobacterium nucleatum* species were isolated the least often.

Key words: atherosclerotic plaque, carotid artery, anaerobic bacteria, infection

Streszczenie

Wstęp. Ostatnio prowadzone badania wykazały powiązania zakażeń w obrębie jamy ustnej z miażdżycą naczyń szyjnych. Niektóre z drobnoustrojów patogennych dla przyzębia, w tym: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella nigrescens*, wykryto

Address for correspondence:

dr n. med. Marek Ciecierski
Oddział Chirurgii Naczyniowej
Pomorskie Centrum Traumatologii im. Mikołaja Kopernika
ul. Nowe Ogrody 1–6, 80–803 Gdańsk
e-mail: ciecierski.marek@gmail.com

w blaszce miażdżycowej. Obecność tych bakterii została wykazana metodą PCR, hybrydyzacji DNA, techniką FISH (fluorescence in situ hybridization), ELISA, immunohistochemicznymi i w transmisyjnym lub skaningowym mikroskopie elektronowym. Jednak tylko użycie techniki FISH i metody hodowli na podłożach umożliwiają wykrycie żywych drobnoustrojów.

Celem badań była izolacja bakterii beztlenowych z blaszki miażdżycowej tętnic szyjnych.

Materiały i metody. Blaszkę miażdżycową pobrano w czasie zabiegu operacyjnego od 37 pacjentów (22 mężczyzn i 15 kobiet). Materiały były umieszczane w płynie transportowym przygotowanym metodą PRAS. Po ujednoczeniu materiał był posiewany na kilka podłoży wzbogaconych i wybiórczych. Inkubację prowadzono w anaerostatach w atmosferze 10% CO₂, 10% H₂ i 80% N₂, w obecności katalizatora paladowego i wskaźnika warunków beztlenowych, przez 10–14 dni w temp. 37°C. Bakterie beztlenowe były identyfikowane na podstawie obecnie obowiązujących przepisów.

Wyniki. Bakterie beztlenowe zostały wyizolowane z 68% badanych blaszek miażdżycowych. Przeważały szczepy z gatunku *Porphyromonas gingivalis* (20%). Gram-dodatnie pałeczki z gatunku *Propionibacterium acnes* występowały w 18%, a Gram-ujemne pałeczki *Prevotella intermedia* w 16% blaszek miażdżycowych pochodzących z tętnic szyjnych. Inne gatunki bakterii beztlenowych z rodzaju *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Micromonas*, *Finegoldia*, *Propionibacterium* i *Actinomyces* występowały rzadziej (2–8%).

Wnioski. Bakterie beztlenowe wyizolowane zostały z 68% badanych blaszek miażdżycowych pobranych z tętnic szyjnych. Wśród Gram-ujemnych bakterii przeważały gatunki *Porphyromonas gingivalis* i *Prevotella intermedia*, a z Gram-dodatnich pałeczek gatunek *Propionibacterium acnes*. Szczepy *Porphyromonas endodontalis* i *Fusobacterium nucleatum* były najrzadziej izolowane z blaszek miażdżycowych.

Słowa kluczowe: blaszka miażdżycowa, tętnica szyjna, bakterie beztlenowe, zakażenia

Acta Angiol 2012; 18, 2: 59–67

Introduction

Atherosclerosis is a disease affecting big and middle-sized arteries, which become narrowed and can eventually be occluded. The process begins with endothelial damage by various substances, including lipids in the setting of hypercholesterolemia, oxidized low-density lipoproteins (LDL), or carbon monoxide from tobacco smoke [1, 2]. The cellular component is represented by macrophages, lymphocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells [1, 2]. Risk factors for development of atherosclerotic lesions include arterial hypertension, increased body weight, diabetes, smoking habit, lack of physical exercise, increased LDL cholesterol and triglycerides, bad diet, male sex, age, and genetic predisposition [3, 4].

The inflammatory process is currently believed to play a major role in the disease, constantly stimulating the immune system and thus inducing a procoagulative state, increasing production of free radicals and promoting development of plaques [4–7]. Inflammation and activation of the immune system can destabilize atherosclerotic plaques. Data published to date suggest a correlation between inflammatory activity, thickness of intima-media complex (IMT), and the presence and dimensions of atherosclerotic plaques [2, 5]. Furthermore, beneficial anti-inflammatory effect of high-density lipoproteins

Wstęp

Miażdżycę to choroba dotycząca dużych i średnich tętnic, prowadząca do ich zwężenia, a czasem zamknięcia. Jest procesem wieloetapowym, który rozpoczyna się od uszkodzenia śródbłonka przez różne czynniki, w tym między innymi: podwyższone stężenie cholesterolu, zmodyfikowane oksydacyjnie lipoproteiny o małej gęstości (LDL, *low-density lipoproteins*), tlenek węgla obecny w dymie tytoniowym [1, 2]. W procesie tym uczestniczą makrofagi, limfocyty, komórki śródbłonka oraz komórki mięśni gładkich [1, 2]. Wśród czynników ryzyka miażdżycy wymienia się nadciśnienie tętnicze, nadwagę, cukrzycę, palenie tytoniu, brak aktywności fizycznej, podwyższone stężenie cholesterolu frakcji LDL i triglicerydów, niewłaściwą dietę, płeć męską, wiek i obciążenie dziedziczne [3, 4].

Obecnie wskazuje się, że ważnym czynnikiem ryzyka jest proces zapalny, który dzięki stałej stymulacji układu odpornościowego przyczynia się do zwiększenia krzepliwości krwi, wzrostu poziomu wolnych rodników i rozwoju zmian miażdżycowych [4–7]. Stan zapalny, a także uaktywnione procesy immunologiczne, mogą powodować destabilizację blaszki miażdżycowej. Doświadczenia wskazują na istnienie współzależności pomiędzy stanem zapalnym, grubością błony wewnętrznej i środkowej naczyń (INTM, kompleks *intima-media*)

(HDL) on carotid arterial walls was also described [2, 8]. In the 1990s, infection became another important issue in investigations on pathogenesis of atherosclerosis. Chronic and recurrent infections were demonstrated to induce a strong inflammatory response [9–11]. Recently published studies confirmed that chronic bacterial and viral infections might contribute to the development and progression of atherosclerotic lesions. Initial studies were focused on bacteria including *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, and viruses such as *Herpes simplex* or *Cytomegalovirus* [9, 12–14]. Using the PCR technique or in cultures, the presence of *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, and *Cytomegalovirus* could be confirmed [9, 14–21]. Diseases of the periodontium are also related to the development of atherosclerosis. Spahr et al. demonstrated a correlation of total microbial burden in periodontal pockets and incidence of ischaemic heart disease [22]. They detected mainly Gram-negative rods of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* genus and *Prevotella intermedia* [22]. Zaremba et al. used the DNA hybridization technique to detect the presence of eight species of pathogens in both periodontal pockets and in atherosclerotic plaques from coronary arteries. These pathogens were *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia* (formerly known as *Bacteroides forsythus*), *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (formerly *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Campylobacter rectus*, and *Eikenella corrodens* [23]. The presence of pathogens known for their role in diseases of the periodontium was also detected in atherosclerotic plaques with the aid of polymerase chain reaction (PCR) technique [23–31]. Bacteria from atherosclerotic plaques were rarely cultured. Living microorganisms were detected in plaques using different techniques by many authors, including Kozarov, Papapanou, Haraszthy, Dorn, and Schenkein [27, 32–35].

Isolation of living microorganisms from atherosclerotic plaques is not only a method of definitive demonstration of their presence *in situ* but also permits determination of their sensitivity to antibiotics or antiseptic agents. This can be of importance in both prophylaxis and treatment of patients with arterial stenosis due to atherosclerotic plaque accumulation.

The aim of the study was to isolate and culture anaerobic bacteria from atherosclerotic plaques harvested from carotid arteries.

Materials and methods

The study group included 37 patients operated on due to critical stenosis in carotid arteries. All the proce-

a obecnością i rozmiarem blaszki miażdżycowej [2, 5]. Zaobserwowano też korzystne przeciwwzapalne działanie na ściany naczyń tętnic szyjnych lipoprotein o dużej gęstości (HDL, *high-density lipoproteins*) [2, 8]. W latach 90. XX wieku zwrócono uwagę na zakażenia jako kolejny ważny czynnik związany z rozwojem miażdżycy naczyń tętnicznych. Wykazano, że przewlekłe oraz nawracające infekcje są przyczyną nasilonej reakcji zapalnej [9–11]. Ponadto przeprowadzone w ostatnich latach doświadczenia potwierdziły, że przewlekłe zakażenia wywołane zarówno przez bakterie, jak i wirusy, mogą przyczynić się do powstawania lub podtrzymywania rozwoju miażdżycy. Początkowo badania były ukierunkowane na bakterie, czyli: *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* oraz wirusy *Herpes simplex* i *Cytomegalovirus* [9, 12–14]. W blaszce miażdżycowej, głównie metodą PCR (*polymerase chain reaction*), a rzadziej hodowli lub inną, wykryto obecność *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* i wirusa cytomegalii [9, 14–21]. Coraz częściej zwraca się też uwagę na powiązanie chorób przyzębia z rozwojem miażdżycy naczyń tętnicznych. Spahr i wsp. wykazali istnienie zależności między całkowitą liczbą drobnoustrojów obecnych w kieszonekach przyzębnych a częstością występowania choroby niedokrwiennej serca [22]. Dominowały w nich Gram-ujemne pałeczki z gatunku *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* oraz *Prevotella intermedia* [22]. Zaremba i wsp. techniką hybrydyzacji DNA wykazali obecność zarówno w kieszonekach przyzębnych, jak i w blaszce miażdżycowej naczyń wieńcowych, ośmiu drobnoustrojów patologicznych dla tkanek przyzębia, w tym: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia* (dawniej *Bacteroides forsythus*), *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (dawniej *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Campylobacter rectus* i *Eikenella corrodens* [23]. Obecność drobnoustrojów uczestniczących w chorobach przyzębia wykryto też w blaszkach miażdżycowych metodą molekularną PCR [23–31]. Metody hodowli rzadko były wykorzystywane do izolacji bakterii występujących w blaszkach miażdżycowych tętnic. Obecność żywych drobnoustrojów w blaszce miażdżycowej, stosując do ich wykrywania różne metody, wykazali tacy autorzy, jak: Kozarov, Papapanou, Haraszthy, Dorn, Schenkein [27, 32–35].

Wyizolowanie z blaszek miażdżycowych żywych drobnoustrojów nie tylko udowadnia w sposób bezpośredni ich obecność, ale także stwarza możliwość oznaczenia ich wrażliwości na antybiotyki czy środki antyseptyczne. Może to odegrać istotną rolę w profilaktyce i leczeniu chorych z miażdżycowym zwężeniem tętnic.

dures were carried out in the Department of Vascular Surgery of the Regional Traumatology Centre in Gdansk. The patient group included 22 men aged 50–87 years and 15 women aged 53–83 years. Mean patient age was 71 years.

Atherosclerotic plaques were harvested directly after endarterectomy and placed under aseptic conditions in a transport medium prepared according to the PRAS (Pre-Reduced Anaerobically Sterilized) method. Samples were then delivered to the laboratory within one hour of the procedure [36]. The material was homogenized in an eccentric blender and cultured onto anaerobic media enriched with 5% defibrinated sheep blood, menadione, and hemin and onto selective media (35–38). Incubation was carried out at 37°C for 10–14 days in anaerobic jars containing 10% CO₂, 10% H₂, and 80% N₂, with palladium catalyst and indicator of anaerobiosis. Species identification was performed according to the current regulations [36–38]. For identification, the following features were analysed: biochemical characteristics (API 20A tests, bio Merieux), ability to produce glucose from fatty acids (from C₁ to C₆) as well as ability to produce succinic acid, and fumaric acid and lactic acid assessed by gas chromatography. The fluorescent properties of the colonies were also assessed in ultraviolet light.

Results

Table I presents a summary of the study results. The presence of anaerobic bacteria was detected in 25 out of 37 analysed atherosclerotic plaques, representing 68% of the tested samples. Gram-negative bacteria were isolated more often (22 samples, 59% of the analysed plaques) than Gram-positive ones (15 samples, 41% of plaques). Altogether, 51 different anaerobic strains were isolated during the study. These included 28 strains of Gram-negative rods (55%), 8 strains of Gram-positive cocci (16%), and 15 strains of Gram-positive rods (29%).

Among the Gram-negative rods, *Porphyromonas gingivalis* species (10 strains) and *Prevotella intermedia* species (8 strains) were most often identified, making up 20% and 16% of bacterial species in this group.

Second most common were Gram-positive rods, isolated from 12 samples (from 32% of patients). These included mainly *Propionibacterium acnes* strains. Nine strains of *Propionibacterium acnes* were also isolated, representing 18% of all bacterial strains identified in patient samples during the study.

Gram-positive cocci were found in 8 patients (22% of analysed plaques). These included mainly *Micromonas micros* and *Finegoldia magna* species.

Between one and four different species of anaerobic bacteria could be isolated from each sample (Table II).

Celem omawianych badań była izolacja i hodowla bakterii beztlenowych z blaszek miażdżycowych występujących w tętnicach szyjnych.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono u 37 chorych operowanych na Oddziale Chirurgii Naczyniowej Pomorskiego Centrum Traumatologii w Gdańsku, z powodu krytycznego zwężenia tętnic szyjnych w przebiegu miażdżycy. W grupie tej operowano 22 mężczyzn w wieku 50–87 lat i 15 kobiet w wieku 53–83 lat. Średnia wieku operowanych chorych wynosiła 71 lat.

Blaszki miażdżycowe bezpośrednio po wykonaniu endarterektomii umieszczano aseptycznie w pojemniku z płynem transportowym, przygotowanym metodą PRAS, który w ciągu godziny dostarczano do laboratorium [36]. Po homogenizacji materiału (mieszalnik mimośrodowy) próbkę posiewano na wiele podłoży dla beztlenowców, zarówno wzbogaconych dodatkiem 5-procentowej krwi baraniej, menadionu i heminy, jak i podłoży wybiórczych [35–38]. Inkubacje posiewów prowadzono w temp. 37°C przez 10–14 dni, w anaerostatach zawierających 10-procentowy CO₂, 10% H₂ i 80% N₂, z katalizatorem palladowym i wskaźnikiem warunków beztlenowych. Wyhodowane szczepy beztlenowców identyfikowano zgodnie z obecnie obowiązującymi zasadami [36–38]. W identyfikacji uwzględniano cechy biochemiczne (testy API 20A, bioMerieux), zdolność do wytwarzania z glukozy kwasów tłuszczowych (od C₁ do C₆) oraz kwasu bursztynowego, fumarowego i mlekowego metodą chromatografii gazowej. Oceniano także zdolność kolonii do fluorescencji w promieniach UV.

Wyniki

Uzyskane wyniki badań zestawiono w tabeli I. Występowanie bakterii beztlenowych stwierdzono w 25 spośród 37 blaszek miażdżycowych. Stanowiło to aż 68% blaszek poddanych badaniu. Z materiałów częściej były izolowane bakterie Gram-ujemne (22 materiały, co stanowi 59% badanych blaszek) niż Gram-dodatnie (15 materiałów, co stanowi 41% blaszek). Łącznie z badanych blaszek miażdżycowych wyizolowano aż 51 różnych szczepów beztlenowców. Wśród nich stwierdzono: 28 szczepów Gram-ujemnych pałeczek (55%), 8 szczepów Gram-dodatnich ziarniaków (16%) i 15 szczepów Gram-dodatnich pałeczek (29%).

W grupie Gram-ujemnych pałeczek dominowały szczepy z gatunku *Porphyromonas gingivalis* — 10 szczepów i *Prevotella intermedia* — 8 szczepów. Stanowiły one odpowiednio 20 i 16% bakterii tej grupy.

Na drugim miejscu pod względem liczebności uplasowały się pałeczki Gram-dodatnie, które występowały

Table I. Prevalence of anaerobic bacteria in 37 analysed atherosclerotic plaques**Tabela I.** Częstość izolacji bakterii beztlenowych z 37 blaszek miażdżycowych

Anaerobic bacteria Bakterie beztlenowe		Number of samples (percentage) Liczba materiałów (odsetki)*
Gram-negative rods Gram-ujemne pałeczki	<i>Prevotella oralis</i>	3
	<i>Prevotella buccalis</i>	3
	<i>Prevotella intermedia</i>	8
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	10
	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	1
	<i>Tannerella forsythia</i>	2
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1
	Gram-negative rods, total Gram-ujemne pałeczki łącznie	28 (55%)
Gram-positive cocci Gram-dodatnie ziarniaki	<i>Micromonas micros</i>	4
	<i>Finegoldia magna</i>	4
	Gram-positive cocci, total Gram-dodatnie ziarniaki łącznie	8 (16%)
Gram-positive rods Gram-dodatnie pałeczki	<i>Propionibacterium acnes</i>	9
	<i>Propionibacterium propionicus</i>	2
	<i>Propionibacterium granulosum</i>	2
	<i>Actinomyces israelii</i>	2
	Gram-positive rods, total Gram-dodatnie pałeczki łącznie	15 (29%)
Anaerobic bacteria, total Bakterie beztlenowe ogółem		51 (100%)

*Odsetki odnoszą się do ogólnej liczby bakterii beztlenowych wyizolowanych z blaszek miażdżycowych.

Źródło: Badania własne

Table II. Number of anaerobic bacterial strains in a single analysed atherosclerotic plaque in the presented study**Tabela II.** Liczba szczepów bakterii beztlenowych występujących w 1 blaszce miażdżycowej

Anaerobic bacteria Bakterie beztlenowe	Number of anaerobic strains isolated from a single atherosclerotic plaque Liczba szczepów beztlenowców wyizolowanych z 1 blaszki miażdżycowej				
	0	1	2	3	4
Number of samples (n = 37) Liczba materiałów (n = 37)	12	7	12	4	2
Percentage Odsetki (%)	32	19	32	11	6

Źródło: Badania własne

A single anaerobic strain was found in 7 plaques, two strains in 12 samples, three strains were identified in 4 plaques, and four strains in 2 samples.

Discussion

Chronic inflammatory state, occurring among others in diseases of the periodontium, contributes to the development and progression of atherosclerotic plaques. Treatment of these ailments is considered important for patients with cardiovascular diseases. This

in 12 materials (u 32% badanych chorych). Dominowały wśród nich szczepy z gatunku *Propionibacterium acnes*. Wyizolowano 9 szczepów bakterii *Propionibacterium acnes*, co stanowi 18% wszystkich szczepów zidentyfikowanych w blaszkach miażdżycowych tej grupy chorych.

Gram-dodatnie ziarniaki występowały u 8 chorych (22% badanych blaszek miażdżycowych). Były one reprezentowane przez gatunki *Micromonas micros* i *Finegoldia magna*.

has been demonstrated by Tonetti et al., who carried out a study of six-month intensive treatment of acute periodontitis.

The authors observed decreasing levels of Il-6, acute phase proteins, and von Willebrand factor as well as improved function of vascular endothelial cells [38]. Dashpande et al. studied *in vitro* *Porphyromonas gingivalis* rods, and noted an adverse effect of these bacteria on endothelial cells [24]. Other authors used electron scanning microscopes and found that *Porphyromonas gingivalis* and *Porphyromonas endodontalis* rods can invade endothelium and smooth muscle cells in coronary arteries and aorta [24, 25, 39, 40]. Other experiments demonstrated that the fragments of cell membrane from *Porphyromonas gingivalis* rods and lipopolysaccharides (LPS) contained therein stimulate monocyte transformation into macrophages and foam cells, which contribute to development of early atherosclerotic lesions [6, 41]. Desvarieux et al. found correlations between the thickness of the intima-media complex and the presence of periodontal pathogens in periodontal pockets [42]. Moreover, patients with vascular diseases characterized by thickening of intima-media complex have been observed to have a high titer of antibodies directed against *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* species, and other periodontal pathogens as well as antibodies against cardiolipin and oxidized LDL [4, 42, 43]. Fewer publications reported the presence of anaerobic bacteria in atherosclerotic plaques [6, 23, 27, 31, 44]. The presence of these pathogens was verified using various methods including molecular techniques (PCR), DNA hybridization, and scanning electron microscopy. Culturing on media was, however, seldom applied for this purpose.

In the presented study, anaerobic bacteria were cultured from atherosclerotic plaque samples. Two species were dominant in the isolated anaerobic flora: *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*, representing 20% and 16% of all isolated microorganisms, respectively. Grossi et al. identified *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Tannerella forsythia* rods in atherosclerotic plaques from coronary arteries using PCR technique [44]. Halaszthy et al. also used PCR to detect periodontal pathogens in 44% of analysed plaques, of which *Tannerella forsythia* (30%) and *Porphyromonas gingivalis* (26%) were the most prevalent [27].

Nakamo et al. demonstrated the presence of *Porphyromonas gingivalis* with fimbria A genotype (fim) in patients with cardiovascular diseases. The rods were found simultaneously in 30% of samples from heart valves and plaques and in 35.7% of samples from dental plaques in the same patients [31].

Z ocenianych blaszek miażdżycowych wyizolowano od 1 do 4 różnych szczepów bakterii beztlenowych (tab. II).

Jeden szczep beztlenowca był obecny w 7 blaszkach miażdżycowych, 2 szczepy występowały w 12 materiałach, 3 szczepy w 4 materiałach, a 4 szczepy w 2 materiałach.

Dyskusja

Do rozwoju miażdżycy przyczynia się przewlekły stan zapalny, związany między innymi z chorobami przyzębia. Uważa się, że leczenie chorób przyzębia odgrywa istotną rolę w przypadku chorób sercowo-naczyniowych. Wskazują na to między innymi wyniki badań, które przeprowadzili Tonetti i wsp., podczas 6-miesięcznego intensywnego leczenia ostrego zapalenia przyzębia.

Autorzy zaobserwowali obniżenie stężenia Il-6, białek ostrej fazy (CRP, *C-reactive protein*) oraz czynnika Willebranda, a także poprawę czynności śródbłonna naczyń [38]. Dashpande i wsp. w badaniach *in vitro* pałeczek z gatunku *Porphyromonas gingivalis* potwierdzili, że oddziałują one niekorzystnie na komórki śródbłonna [24]. Inni autorzy, przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego, wykazali zdolność pałeczek *Porphyromonas gingivalis* i *Porphyromonas endodontalis* stymulacji do inwazji komórek śródbłonna, mięśni gładkich naczyń wieńcowych a także aorty [24, 25, 39, 40]. Inne doświadczenia udowodniły, że zarówno fragmenty błony komórkowej pałeczek *Porphyromonas gingivalis*, jak i obecne w niej lipopolisacharydy (LPS), prowadzą do zmiany morfologii monocytów w kierunku makrofagów oraz komórek piankowatych, które z kolei przyczyniają się do powstawania wczesnych zmian miażdżycowych [6, 41]. Natomiast Desvarieux i wsp. zaobserwowali istnienie zależności między grubością INTM a występowaniem w kieszonkach przyzębnych bakterii uczestniczących w chorobach przyzębia [42]. Zwrócono też uwagę, że u osób z chorobami naczyń, u których stwierdzono obecność pogrubionej warstwy intima-media, równocześnie występował wzrost miana przeciwciał skierowanych przeciw pałeczkom *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* i innym patogenom przyzębia oraz kardiolinie i ox-LDL [4, 42, 43]. W nielicznych publikacjach opisano drobnoustroje beztlenowe występujące w blaszkach miażdżycowych [6, 23, 27, 31, 44]. Do wykrycia ich obecności stosowano różne metody, w tym techniki molekularne PCR, metodę hybrydyzacji DNA, skaningowy mikroskop elektronowy, natomiast rzadko metodę hodowli na podłożach.

W omawianych badaniach do wykazania obecności drobnoustrojów w blaszkach miażdżycowych zastosowano metodę izolacji i hodowli bakterii beztlenowych.

Zaremba et al. studied the presence of periodontal pathogens in atherosclerotic plaques harvested from 20 patients under procedures of patency restoration in coronary arteries. The authors used DNA hybridization for their experiments. Various periodontal pathogens were identified in 15 samples from periodontal pockets and in 9 atherosclerotic plaques. These included *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*. It was emphasized that *Porphyromonas gingivalis* was the most commonly identified species in plaques. The same bacterial species were identified in atherosclerotic plaques and in dental plaques in 6 of all 15 analysed patients [23].

Ford et al. performed immunohistochemical studies of samples from 29 patients and detected bacterial colonization of plaques obtained under carotid endarterectomy.

Among the anaerobic bacteria, *Porphyromonas gingivalis* (52%), *Prevotella intermedia* (41%), *Fusobacterium nucleatum*, and *Tannerella forsythia* (34% for each species) were identified [6]. Further studies by these authors also revealed the presence of periodontal pathogens *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, and *Tannerella forsythia*, as demonstrated by PCR technique [45].

The above presented data suggest that *Porphyromonas* rods can be identified in patient samples more often than in the current study (26–45% identified strains versus 20% in the current paper) [6, 23, 27, 45].

The presence of *Prevotella intermedia* in 15–41% of analysed atherosclerotic plaques was described by Ford et al., Gossi et al., and Zaremba et al. [6, 23, 44]. The results of the presented study (16%) are close to the figure reported by Zaremba et al. (15%) [23].

Other anaerobic rods were also identified in cultures from analysed atherosclerotic plaques, including *Fusobacterium nucleatum* and *Tannerella forsythia* species. These pathogens were also detected by Zaremba, Halaszthy, Grossi, and Ford [6, 23, 27, 44]. *Fusobacterium nucleatum* species was present in 15–34% and *Tannerella forsythia* in 30–35% of cases, respectively. In our study, both *F. nucleatum* and *T. forsythia* rods were detected only rarely, in 2% and 4% of cases, respectively. Other identified microorganisms included *Prevotella oralis*, *Prevotella buccalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Micromonas micros*, *Finexgoldia magna*, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium granulosum*, and *Actinomyces israelii*, present in 4–18% of cases.

All the above-mentioned microorganisms detected in analysed atherosclerotic plaques are categorized as periodontal pathogens causing oral and periodontal infections.

Wśród wyizolowanych przez autorów niniejszej pracy bakterii beztlenowych dominowały 2 gatunki: *Porphyromonas gingivalis* i *Prevotella intermedia*, które stanowiły odpowiednio 20 i 16% ogółu wyizolowanych drobnoustrojów. Grossi i wsp. techniką PCR wykazali obecność w blaszkach miażdżycowych naczyń wieńcowych pałeczek *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* i *Tannerella forsythia* [44]. Halaszthy i wsp., także posługując się metodą PCR, wykryli drobnoustroje patogenne dla przyzębia w 44% ocenianych blaszek miażdżycowych. Dominowały w nich pałeczki z gatunku *Tannerella forsythia* (30%) oraz *Porphyromonas gingivalis* (26%) [27].

Nakamo i wsp. udowodnili obecność *Porphyromonas gingivalis* z genotypem fimbrii fim A u pacjentów z chorobami sercowo-naczyniowymi. Wykazali oni jednoczesną obecność tych pałeczek w 30% materiałów pobranych z zastawek serca i blaszek miażdżycowych oraz w 35,7% próbkach, pobranych z płytek nazębnych tych samych chorych [31].

Z kolei Zaremba i wsp. oceniali obecność patologicznych dla przyzębia bakterii w blaszkach miażdżycowych pobranych od 20 pacjentów, operowanych z powodu niedrożności naczyń wieńcowych. Badania przeprowadzono, wykorzystując metodę hybrydyzacji DNA. W 15 materiałach pobranych z kieszonki przyzębnej i w 9 blaszkach miażdżycowych wykryto obecność różnych bakterii patogennych dla przyzębia. Wykazano występowanie następujących drobnoustrojów: *Porphyromonas gingivalis* i *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia* i *Treponema denticola*. Autorzy zwracają uwagę na fakt, że najczęściej z blaszek miażdżycowych był izolowany gatunek *Porphyromonas gingivalis* oraz że te same gatunki bakterii występowały zarówno w blaszkach miażdżycowych, jak i bakteryjnych płytek nazębnych u 6 spośród 15 ocenianych osób [23].

Natomiast Ford i wsp., posługując się metodami immunohistologicznymi, w grupie 29 chorych, wykazali kolonizację drobnoustrojami materiałów uzyskanych podczas endarterektomi tętnic szyjnych.

Wśród bakterii beztlenowych były obecne gatunki *Porphyromonas gingivalis* (52%), *Prevotella intermedia* (41%), *Fusobacterium nucleatum* i *Tannerella forsythia* (po 34%) [6]. W kolejnych badaniach ci sami autorzy, wykorzystując technikę PCR, potwierdzili obecność bakterii patogennych dla przyzębia, czyli *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* i *Tannerella forsythia* [45].

Z powyższych danych wynika, że w większości badań pałeczki z gatunku *Porphyromonas* występowały w wyższych odsetkach niż w badaniach autorów (20%), gdyż stanowiły od 26 do 45% wykrywanych szczepów [6, 23, 27, 45].

Conclusions

1. Anaerobic bacteria were isolated from atherosclerotic plaques in 68% of patients operated on due to carotid artery stenosis.
2. The most prevalent species were *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* among Gram-negative rods, and *Propionibacterium acnes* among Gram-positive rods.
3. *Porphyromonas endodontalis* and *Fusobacterium nucleatum* were the least often isolated species in the presented study.

References

1. Ross R (1999) Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340: 115–126.
2. Kaźmierski R (2009) Udział czynników zapalnych i zakaźnych w patogenezie miażdżycy tętnic szyjnych. *Pol Przegl Neurol*, 5 (4): 166–176.
3. Schneiderman N (1987) Psychophysiologic factors in atherogenesis and coronary artery disease. *Circulation*, 76 (suppl. 1): 41–46.
4. Demmer RT, Desvarieux M (2006) Periodontal infections and cardiovascular disease. *JADA*, 137 (suppl.): 14S–20S.
5. Hansson GK (2009) Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *J Thromb Haemost*, 7 (suppl. 1): 328–331.
6. Ford PJ, Gemmell E, Chan A et al. (2006) Inflammation, heart shock proteins and periodontal pathogens in atherosclerosis: an immunohistologic study. *Oral Microbiol Immunol*, 21: 206–211.
7. Galkina E., Ley K (2009) Immune and inflammatory mechanisms of human atherosclerosis. *Ann Rev Immunol*, 27: 165–177.
8. Mathiesen EB, Bonna KH, Johimsen O (2001) Low levels of high-density lipoprotein cholesterol are associated with echolucent carotid artery plaques: The Tiromso Study. *Stroke*, 32: 1960–1965.
9. Ameriso SF, Fridman EA, Leiguarda RC, Sevlever GE (2001) Detection of *Helicobacter pylori* in human carotid atherosclerotic plaques. *Stroke*, 32: 385–391.
10. Elkind MSV, Luna JM, Moon YP et al. (2010) Infections burden and carotid plaque thickness: The Northern Manhattan Study. *Stroke*, 41 (3): 117–122.
11. Kiechl S, Egger G, Mayr M et al. (2001) Chronic infections and the risk of carotid atherosclerosis: Perspective results from a large populations study. *Circulation*, 103: 1064–1070.
12. Bartels C, Mass M, Bein G, Brill N, Bechtel JF, Leyh R, Sievers HH (2000) Association of serology with the endovascular presence of *Chlamydia pneumonia* and Cytomegalovirus in coronary artery and vein graft disease. *Circulation*, 101: 137–141.
13. Ridker PM, Hennekens CH, Stamper MJ, Wang F (1998) Prospective study of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and the risk of future myocardial infarction and stroke. *Circulation*, 98: 2796–2799.
14. Farsak B, Yildirim A, Akyon Y et al. (2000) Detection of *Chlamydia pneumonia* and *Helicobacter pylori* DNA in human atherosclerotic plaques by PCR. *J Clin Microbiol*, 38 (12): 4408–4411.
15. Blasi F, Denti F, Erba M et al. (1996) Detection of *Chlamydia pneumonia* but not *Helicobacter pylori* in atherosclerotic plaques of aortic aneurysms. *J Clin Microbiol*, 34 (11): 2766–2769.
16. Esposito G, Blasi F, Allegra A et al. (1999) Demonstration of viable *Chlamydia pneumonia* in atherosclerotic plaques of carotid arteries by revertase transcriptase polymerase chain reaction. *Ann Vasc Surg*, 13 (4): 421–425.
17. Jackson LA, Campbell LA, Kuo CC, Rodriguez DJ, Lee A, Grayson JT (1997) Isolation of *Chlamydia pneumonia* from a carotid endarterectomy specimen. *J Int Dis*, 176: 292–295.

Obecność w blaszkach miażdżycowych *Prevotella intermedia* w odsetkach wynoszących od 15 do 41% obserwowali tacy autorzy jak: Ford i wsp., Gossi i wsp., Zaremba i wsp. [6, 23, 44]. Uzyskane przez nas wyniki (16%) są najbardziej zbliżone do danych Zaremby i wsp. (15%) [23].

Z badanych blaszek miażdżycowych udało się wyhodować jeszcze pałeczki beztlenowe z gatunku *Fusobacterium nucleatum* i *Tanarella forsythia*. Drobnoustroje te zostały wykryte także w badaniach przeprowadzonych przez Zarembę, Halaszthy, Grossi i Forda [6, 23, 27, 44]. Szczepy z gatunku *Fusobacterium nucleatum* występowały z częstością 15–34%, a *Tanarella forsythia* od 30 do 35%. W badanych przez nas blaszkach miażdżycowych zarówno pałeczki *F. nucleatum*, jak i *T. forsythia* występowały w bardzo niskich odsetkach, wynoszących odpowiednio: 2 i 4%. Poza wymienionymi drobnoustrojami, w ocenianych w Pomorskim Centrum Traumatologii materiałach, stwierdzono obecność także innych drobnoustrojów: *Prevotella oralis*, *Prevotella buccalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Micromonas micros*, *Finegoldia magna*, *Propionibacterium acnes*, *Proionibacterium granulosum* i *Actinomyces israelii*. Występowały one z częstością od 4 do 18%.

Warto podkreślić, że wszystkie wymienione drobnoustroje, które zostały wyizolowane z badanych przez autorów blaszek miażdżycowych, są zaliczane do patogenów przyzębia i często uczestniczą w innych zakażeniach w obrębie jamy ustnej oraz w zakażeniach zębopochodnych.

Wnioski

1. Bakterie beztlenowe zostały wyizolowane z blaszek miażdżycowych aż u 68% chorych operowanych z powodu miażdżycowego zwężenia tętnic szyjnych.
2. W blaszkach miażdżycowych najczęściej występowały beztlenowe Gram-ujemne pałeczki z gatunku *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* i Gram-dodatnie pałeczki z gatunku *Propionibacterium acnes*.
3. Z analizowanych blaszek miażdżycowych najrzadziej były izolowane szczepy z gatunku *Porphyromonas endodontalis* i *Fusobacterium nucleatum*.

18. Grayson JT, Cuo CC, Coulson AS et al. (1995) Chlamydia pneumonia (TWAR) in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation* 92: 3397–3400.
19. Kaplan M., Yavuz S.S., Cinar B et al. (2006) Detection of Chlamydia pneumonia and Helicobacter pylori in atherosclerotic plaques of carotid artery by polymerase chain reaction. *Int J Infect Dis*, 10 (2): 116–123.
20. Kędzia A, Ciecierski M, Wierzbowska M, Kufel A, Kwapisz E (2010) Isolation of Helicobacter pylori from femoral or iliac atherosclerotic plaques. *Acta Angiol* 16 (3): 129–134.
21. Melnic JL, Hu C, Burek J, Adam E, Debakey ME (1994) Cytomegalovirus DNA in arteria walls of patients with atherosclerosis. *J Med Virol*, 42: 170–174.
22. Spahr A, Klein E, Khuseyinova N et al. (2006) Periodontal infections and coronary heart disease. *Arch Intern Med*, 166: 544–559.
23. Zaremba M, Górka R, Suwalski P (2005) Ocena występowania bakterii związanych z chorobą przyzębia w blaszce miażdżycowej naczyń wieńcowych. *Czas Stomatol* 58 (5): 293–311.
24. Deshpande RG, Khan MB, Genco CA (1998) Invasion of aortic and heart endothelial cells by Porphyromonas gingivalis. *Infect Immunol*, 66 (11): 5337–5343.
25. Bochniak M, Sadlak-Nowicka J (2004) Zapalenie przyzębia a choroby układu sercowo-naczyniowego – przegląd piśmiennictwa. *Przegl Lek*, 61 (5): 518–522.
26. Naruszewicz MA (2009) Patogenetyczne mechanizmy wpływu chorób przyzębia na progresję miażdżycy. *Czas Stomatol*, 62 (7): 549–553.
27. Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ (2000) Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol*, 71: 1554–1560.
28. Chiu B (1999) Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. *Am Heart J*, 138: S534–S536.
29. Carvini F, Sambhi V, Moter A et al. (2005) Molecular detection of Treponema denticola and Porphyromonas gingivalis in carotid and aortic atheromatous plaques by FISH: report of two cases. *J Med Microbiol*, 54: 93–96.
30. Mehendra J, Mehendra L, Kurian VM, Jaishankar K (2010) Detection of Porphyromonas gingivalis (fim A) in coronary plaque. *4: 2607–2613*.
31. Nakano K, Inaba H, Nomura R et al. (2008) Distribution of Porphyromonas gingivalis fim A genotypes in cardiovascular specimens from Japanese patients. *Oral Microbiol Immunol*, 23: 170–172.
32. Kozarov EV, Dorn BR, Shelburne CE, Dunn WA Jr, Progul-ska-Fox A (2005) Human atherosclerotic plaque contains viable invasive Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, 25: 17–18.
33. Papapanou PN, Niderrud AM, Papadimitriou A, Sandras J, Dahlen G (2000) Checker-board assessments of periodontal microbiota and serum antibody responses: a case-control study. *J Periodontol*, 71: 885–897.
34. Dorn BR, Dunn WA Jr, Progul-ska-Fox A (1999) Invasion of human coronary artery cells by periodontal pathogens. *Infect Immunol*, 67: 5792–5798.
35. Schenkein HA, Barbour SE, Berry CR, Kipps, Tew JG (2000) Invasion of human vascular endothelial cells by Actinobacillus actinomycetemcomitans via the receptor for platelet-activation factor. *Infect Immunol*, 68: 5416–5419.
36. Kałowski M, Kędzia A (1990) Nieprzetrwalnikujące bakterie beztlenowe. W: Diagnostyka mikrobiologiczna w medycynie. (Kędzia W. red.) PZWL Warszawa.
37. Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC (1977) Anaerobe Laboratory Manual VPI 4th ed. Blacksburg, Virginia.
38. Forbes BA, Sahn DF, Weissfeld AS (2007) Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Mosby Elsevier, St. Louis.
39. Dorn BR, Harris LJ, Wujick CT, Vertucci FJ, Progul-ska-Fox A (2002) Invasion of vascular cells in vitro by Porphyromonas endodontalis. *Int Endodontol J*, 35 (4): 366–371.
40. Progul-ska-Fox A, Kozarov E, Dorn B, Dunn W Jr, Burks J, Wu Y (1999) Porphyromonas gingivalis virulence factors and invasion of cells of the cardiovascular system. *J Periodontol Res*, 34: 393–399.
41. Kuramitsu HK, Kang IC, Qi M (2003) Interactions of Porphyromonas gingivalis with host cells: implications for cardiovascular disease. *J Periodontol*, 74: 85–89.
42. Desvarieux M, Demmer RT, Rundek T et al. (2005) Periodontal microbiota and carotid intima-media thickness: The Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). *Circulation*, 111: 576–582.
43. Buhlin K, Hultin M, Norderyd O et al. (2009) Periodontal treatment influences risk markers for atherosclerosis in patients with severe periodontitis. *Atherosclerosis*, 206: 518–522.
44. Grossi SG (2007) Oral inflammation and cardio-vascular diseases. *Stomatol. Współczesna*, 14: 47–51.
45. Ford PJ, Gemmell E, Hamlet SM, Hasan A, Walker PJ, West MJ (2005) Cross-reactivity of GroEL antibodies with human heart shock protein 60 and quantification of pathogens in atherosclerosis. *Oral Microbiol Immunol*, 20: 296–302.