

26. Miyasaka Y., Tsujimoto S., Maeba H. et al. Left atrial volume by three-dimensional echocardiography: validation by 64-slice multidetector computed tomography. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 2011; 24: 680–6.
27. Aune E., Baekkevar M., Roislien J. et al. Normal reference range for left and right atrial volume indexes and ejection fractions obtained with real-time three-dimensional echocardiography. *Eur. J. Echocardiogr.* 2009; 10: 738–44.

Поступила 26.12.2014 г.

ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ КАРДИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.132.2:578.825.11:616.127-005.8-036.88

Исследование герпесвирусной ДНК в коронарных артериях пациентов, умерших в острой стадии инфаркта миокарда

Е.А. Никитская¹, Ж.-Ш. Гривель², О.И. Иванова¹, А.М. Лебедева¹, А.В. Шпектор¹, Л.Б. Марголис^{1,2}, Е.Ю. Васильева¹

¹Кафедра кардиологии ФПДО ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава РФ; Делегатская ул., 20, стр. 1, Москва, 127473, Российская Федерация;

²Национальный институт детского здоровья и развития человека имени Юнис Кеннеди Шрайвер; Сентэр Драйв, 31, Бетесда, США

Никитская Елизавета Андреевна, аспирант, лаборант;

Гривель Жан-Шарль, вед. научн. сотр.;

Иванова Оксана Ивановна, кардиолог, лаборант;

Лебедева Анна Михайловна, ординатор, лаборант;

Шпектор Александр Вадимович, доктор мед. наук, профессор, заведующий кафедрой;

Марголис Леонид Борисович, доктор биол. наук, профессор, руководитель отдела;

Васильева Елена Юрьевна, доктор мед. наук, профессор, e-mail: vasilievahelena@gmail.com

Введение. Разрыв или изъязвление атеросклеротических бляшек может приводить к развитию таких осложнений атеросклероза, как острый инфаркт миокарда. Механизмы, приводящие к развитию воспалительной реакции в атеросклеротической бляшке и в итоге — к ее разрыву, нуждаются в дальнейшем исследовании.

Цель — выявление герпесвирусной ДНК и ее количественная оценка в различных участках коронарных артерий у пациентов, умерших вследствие острого инфаркта миокарда.

Материал и методы. В исследование было включено 30 пациентов, умерших вследствие острого инфаркта миокарда и его осложнений. На основании макроскопической оценки характера поражения коронарных артерий было выделено три группы образцов: 1) чистые участки без макроскопических признаков атеросклероза; 2) неповрежденные атеросклеротические бляшки; 3) поврежденные атеросклеротические бляшки (с признаками тромбоза, эрозии или изъязвления). С использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени проводилось определение ДНК 8 типов вирусов герпеса человека в данных образцах.

Результаты. Наиболее распространенным вирусом герпеса человека (ВГЧ), выявленным в коронарных артериях пациентов, умерших в острой стадии инфаркта миокарда, являются ВГЧ 1-го и 2-го типов (определялись совместно), а также ВГЧ 3-го типа. Эти вирусы были выявлены более чем в 80% случаев в данной выборке. Реже встречались ВГЧ 4, 7 и 8-го типов (49–55% случаев). При анализе

распределения ВГЧ между тремя группами образцов, достоверной разницы при сравнении среднего количества копий вирусного генома получено не было.

Заключение. ДНК всех типов ВГЧ была выявлена в различных участках коронарных артерий. Однако взаимосвязи между наличием герпесвирусной ДНК, а также числом копий вирусного генома, с одной стороны, и статусом атеросклеротической бляшки в коронарных артерий – с другой, выявлено не было. Возможно, не само наличие ВГЧ, выявленных в настоящем исследовании, а всплески их размножения в атеросклеротических бляшках могут влиять на прогрессирование атеросклероза и процесс дестабилизации атеросклеротической бляшки. Это предположение требует проверки в ходе дальнейшей работы.

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца; острый коронарный синдром; вирусы герпеса человека; полимеразная цепная реакция в реальном времени.

Detection of human herpes viruses DNA in coronary artery in patients who died in acute stage of myocardial infarction

E.A. Nikitskaya¹, J.-C. Grivel², O.I. Ivanova¹, A.M. Lebedeva¹, A.V. Shpektor¹, L.B. Margolis^{1,2}, E.Yu. Vasil'eva¹

¹Cardiology Chair for Post-Diploma Education Faculty of A.I. Evdokimov Moscow State Medical-Stomatological University of Ministry of Health of the Russian Federation; Delegatskaya ulitsa, 20, stroenie 1, Moscow, 127473, Russian Federation;

²The Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development; Center Drive, Building 31, Bethesda, United States

Nikitskaya Elizaveta Andreevna, Postgraduate, Assistant;

Grivel' Jean-Charles, Leading Research Associate;

Ivanova Oksana Ivanovna, Cardiologist, Assistant;

Lebedeva Anna Mikhaylovna, Resident Physician, Assistant;

Shpektor Aleksandr Vadimovich, MD, DM, Professor, Chief of Chair;

Margolis Leonid Borisovich, Doctor of Biological Sciences, Professor, Chief of Department;

Vasil'eva Elena Yur'evna, MD, DM, Professor, e-mail: vasilievaelena@gmail.com

Introduction. Vulnerable atherosclerotic plaque can readily rupture and lead to myocardial infarction (MI). The causes of plaques' maturation and rupture are thought to be associated with inflammation and local and/or systemic immune activation. The mechanisms responsible for this activation are not fully understood, in particular the role of infectious agents in plaque stability remains to be investigated.

Objective. Here, we quantified human herpes viruses (HHV) DNA in coronary arteries of patients with MI and evaluated the association of HHV presence with plaque instability.

Material and methods. We included in this study 30 patients who died from MI or it's complications. Samples of coronary arteries were obtained during autopsy. According to macroscopic observations, the tissue samples were classified into 3 groups: 1) clean coronary artery samples, without macroscopic signs on atherosclerosis; 2) non-ruptured plaques; 3) ruptured plaques, usually MI-triggering vulnerable plaques with thrombus or ulceration. Total DNA extracted from tissues and the amount of HHVs DNA was measured by quantitative real-time-PCR (Q-PCR). HHVs genome copy numbers were normalized by cellular genomes and are reported as HHVs copies per million cells.

Results. Q-PCR results showed that in MI patients, more than 93% of samples contained DNA of at least one HHV. HHV-1&2, HHV-3, HHV-5, were found in more than 80% of the samples. HHV-4, HHV-6 and HHV-7 were less frequent and were found in 49–55% of the samples. Also HHV8 DNA was frequently revealed. Comparison of HHVs distribution or the amounts of viral DNA between the three sample groups did not reveal any significant differences.

Conclusion. We found that all HHVs are present in artery samples of patients, who died in acute phase of MI. The higher viral DNA load in arterial tissues did not correlate with the presence of plaque or the stability thereof. Probably detection of viral activity will help us to estimate whether HHVs influence on atherosclerosis progression.

Key words: coronary artery disease; acute coronary syndrome; human herpesviruses; real-time PCR.

Введение

Образование, рост и последующий разрыв или изъязвление атеросклеротической

бляшки – сложный и до сих пор не полностью охарактеризованный процесс. Его изучение началось еще в XIX столетии, во времена Рудольфа Вирхова [1], который

указал на связь этих процессов с воспалением. Воспалительная теория атерогенеза в последнее время стала доминирующей [2]. Согласно этой теории, возникновение и прогрессирование атеросклеротических поражений связано с активацией хронического воспаления, а развитие атеросклеротической бляшки является реакцией человеческого организма на отложение в сосудистой стенке инородной для него субстанции – модифицированных липопротеинов. Предполагается, что вначале иммунная система пытается уничтожить чужеродный объект, в частности путем его фагоцитоза макрофагами. Макрофаги фагоцитируют липопротеиды, однако это приводит к гибели самих фагоцитов [3], сопровождаемой формированием капсулы.

Воспалительные процессы в сосудистой стенке не только связаны с формированием бляшек, но и способствуют дисфункции эндотелия, что, в свою очередь, может приводить к развитию таких клинических проявлений атеросклероза, как острый коронарный синдром. Механизмы дестабилизации бляшки также могут быть связаны с локальным иммунным ответом. Такой ответ могут вызвать инфекционные агенты в сосудистой стенке [4].

В настоящее время существует обширный список таких агентов, которые, по разным данным, ассоциированы с развитием атеросклероза и его осложнений. К ним относятся многие бактериальные агенты: *S. pneumonia* – первый патоген бактериального происхождения, выявленный в атеросклеротической бляшке; бактерии, типичные для полости рта: *P. gingivalis*, *T. denticola*, *S. mutans*, наличие которых ассоциировано с риском развития сердечно-сосудистых заболеваний [5]; *H. pylori*, а также *M. pneumoniae* и *E. histolytica*, которые были найдены в атеросклеротических бляшках человека [6]. Также, по данным ряда исследователей, большое количество различных вирусов ассоциировано с атеросклерозом: вирусы гепатита А, В и С, вирус гриппа, вирус им-

мунодефицита человека [7], энтеровирусы, респираторно-синцитиальный вирус, парвовирус и многие другие [8].

К сожалению, результаты многих подобных исследований противоречивы: хотя в ряде работ исследователям удается выявить взаимосвязь между различными патогенами и атеросклерозом или его прогрессированием, в других работах, наоборот, подобной взаимосвязи не выявляют. Таким образом, в настоящее время не существует данных, которые окончательно подтвердили бы или опровергли влияние инфекционных агентов на разрыв или изъязвление атеросклеротических бляшек.

Одними из вирусов, которые, по различным данным [8], ассоциированы с патогенезом атеросклероза, являются вирусы герпеса человека (ВГЧ) – древние и широко распространенные в человеческой популяции. Особенно часто встречаются: вирусы простого герпеса (1-го и 2-го типов), вирус опоясывающего лишая (3-й тип), вирус Эпштейна–Барр, цитомегаловирус (5-й тип) и ВГЧ 6-го и 7-го типов. Последние, хотя и очень широко распространены, но малопатогенны, поэтому изучены хуже патогенных. Реже встречается в популяциях ВГЧ 8-го типа, который обнаруживается преимущественно у больных саркомой Капоши и считается этиологическим агентом, вызывающим эти опухоли.

Как и в случае других патогенов, вклад ВГЧ в развитие атеросклероза и его осложнений изучен недостаточно и результаты опубликованных исследований противоречивы [9]. По разным данным, частота встречаемости различных герпесвирусов у пациентов с ишемической болезнью сердца может варьировать от 0 до 100% [10, 11].

Для ответа на вопрос, существует ли взаимосвязь между герпесвирусной инфекцией и ишемической болезнью сердца, нами была исследована выборка пациентов с острым инфарктом миокарда (ОИМ). Задачей данной работы было выявление герпесвирусов и определение количества копий вирусной ДНК этих вирусов в различ-

ных участках коронарных артерий пациентов, умерших вследствие ОИМ и его осложнений.

Материал и методы

В исследование было включено 30 пациентов, умерших вследствие острого инфаркта миокарда и его осложнений: 13 мужчин и 17 женщин, средний возраст составил 75 лет, квартильный интервал 71–80,5 года (25-й и 75-й квартили соответственно). Критериями исключения из исследования являлись острые инфекции или обострение хронических, а также онкологические заболевания. Забор аутопсийного материала проводили в стерильных условиях в течение 24 ч после летального исхода по описанным ранее методикам. На основании макроскопической оценки характера поражения коронарных артерий было выделено три группы образцов: 1) чистые участки коронарных артерий – без макроскопических признаков атеросклероза; 2) неповрежденные бляшки; 3) поврежденные атеросклеротические бляшки (с признаками тромбоза, эрозии, изъязвления). Забор поврежденных атеросклеротических бляшек производили из инфарктсвязанных коронарных артерий, неповрежденные атеросклеротические бляшки, чистые участки коронарных артерий забирали из инфарктнесвязанных коронарных артерий.

Выделение геномной ДНК

Из участков коронарных артерий в стерильных условиях были приготовлены небольшие блоки кубической формы размерами 2×2×2 мм, которые для каждого участка артерии объединяли в аликвоты по 25 мг. В среднем вес каждого образца составлял около 100 мг. Выделение ДНК проводилось с использованием гомогенизатора с системой ротор/статор «PowerGen» 125 («Fisher Scientific», USA), протеиназы К («Qiagen», Germany) и набора реагентов и колонок для выделения ДНК из тканей («Qiagen», Germany). Концентрация и качество ДНК оценивались с помощью

спектрофотометра NanoDrop 2000 («Thermo Scientific», USA).

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (RT-PCR)

После выделения образцов и их оценки с использованием спектрофотометра проводилась полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени на амплификаторе «CFX Connect Real-Time PCR Detection System» («Bio-Rad», США). Данный эксперимент показал высокую воспроизводимость полученных результатов при сравнении результатов ПЦР и спектрометрии.

Исходя из концентрации ДНК, проводилась оценка количества геном-эквивалентов. В клетке человека один геном-эквивалент имеет массу в среднем 6,55 Пг [12].

Количество геномов в каждом образце было оценено методом RT-PCR с измерением числа копий эндогенного ретровируса человека 3 (ERV-3: последовательность прямого праймера: CATGGGAAGCAAGGGAACATAATG; последовательность обратного праймера CCCAGCGAGCAATACAGAATTT). Количество копий геномной ДНК, определенное исходя из количества копий человеческого ERV-3, было использовано для нормирования и выражения количества копий герпесвирусов человека на 10⁶ геном-эквивалентов [13].

При этом использовались различные разведения образцов для определения оптимальной концентрации человеческой ДНК, позволяющей проводить амплификацию без ингибирования реакции ПЦР. В большинстве случаев образцы ДНК были разведены в 5 раз.

Амплификация образцов ДНК проводилась в присутствии комбинации праймеров и соответствующих стандартов к различным герпесвирусам человека, разработанных нами и другими исследователями с использованием смеси для проведения RT-PCR с красителем PerfeCta SYBR Green FastMix for iQ («Quanta Bioscience», США).

Таблица 1

Последовательности праймеров, использованных для амплификации различных типов ВГЧ, и эффективность проведенной реакции ПЦР

Тип ВГЧ	Последовательность праймеров		Эффективность ПЦР-реакции, %
	Обратный	Прямой	
1-й			
2-й	GCTCGCACACGCGA	CGCATCAAGACCACCTCCTC	101,6
3-й	TCGCGTGCTGCGGC	CGGCATGGCCCCGTCTAT	101,4
4-й	CAGCCCCTCCACCATAGGT	GACTGTGTCAGCTTTGACGA	110,0
5-й	CGGCCGGATTGTGGATT	TCGCGCCCGAAGAGG	101,2
6-й	CAAAGCCAAATTATCCAGAGCG	CGCTAGGTTGAGGATGATCGA	101,9
7-й	AACAGAAACGCCACCTCGAT	AGCGGTACCTGTAAAATCATCCA	101,9
8-й	ACTCCAAAATATCGGCCGG	GTCCAGACGATATGTGCG	102,9

Для детекции ВГЧ 1-го и 2-го типов использовалась одна пара праймеров. Последовательности прямых и обратных праймеров к герпесвирусам, а также эффективность ПЦР-реакции представлены в таблице 1.

Протокол RT-PCR

Использовался 3-ступенчатый протокол RT-PCR:

1-й шаг – денатурация цепей ДНК 95° С в течение 5 мин;

2-й шаг – 95° С, 20 с;

3-й шаг – 60° С, 40 с;

4-й шаг – считывание сигнала флуоресценции.

Шаги 2–4 повторялись в течение 45 циклов. Флуоресценция, детектируемая после 37-го цикла, считалась неспецифичной.

График детекции флуоресценции при проведении RT-PCR представлен на рисунке 1.

Результаты оценивались в зависимости от цикла ПЦР, во время которого была де-

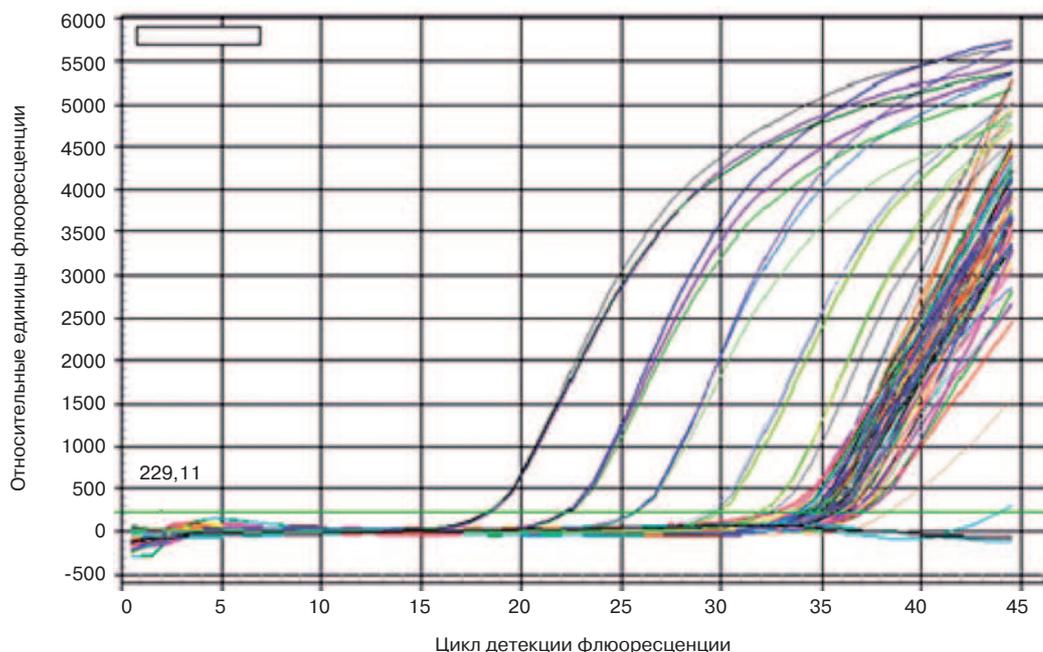


Рис. 1. Циклы детекции флуоресценции при определении ДНК ВГЧ 5-го типа

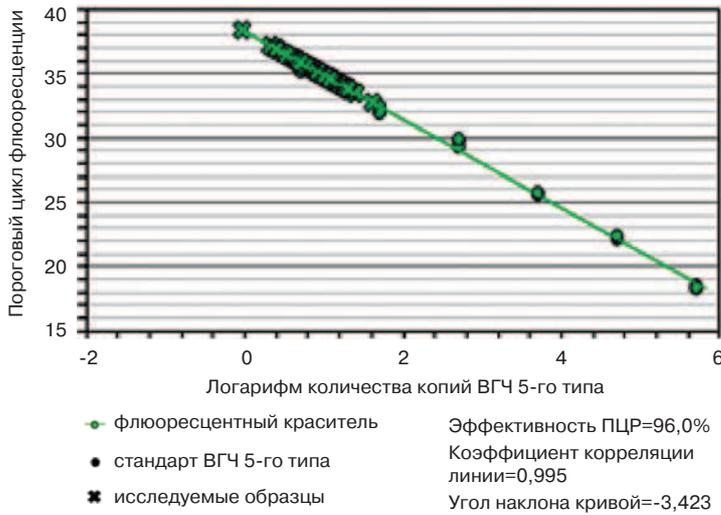


Рис. 2. Оценка кривой стандартов и эффективности реакции ПЦР при детекции ДНК ВГЧ 5-го типа

тектирована флюоресценция. Поскольку мы использовали различные разведения стандартов к герпесвирусам, мы оценивали наши результаты с учетом калибровочной кривой, полученной при детекции флюоресценции стандартов, по этой же кривой оценивалась и эффективность проведенной амплификации (рис. 2, 3).

В ряде случаев для оценки специфичности проведенной амплификации дополнительно проводили оценку кривой плавления. Учитывая наличие всего одного высо-

коамплитудного пика, амплификация была достаточно специфична (см. рис. 3).

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы «Stat Soft» 6,0. Нормальность и гомоскедастичность полученных данных была проверена с помощью теста нормальности Колмогорова–Смирнова, Пирсона, омнибус. Для исследования наличия корреляционных взаимосвязей между ДНК герпесвиру-

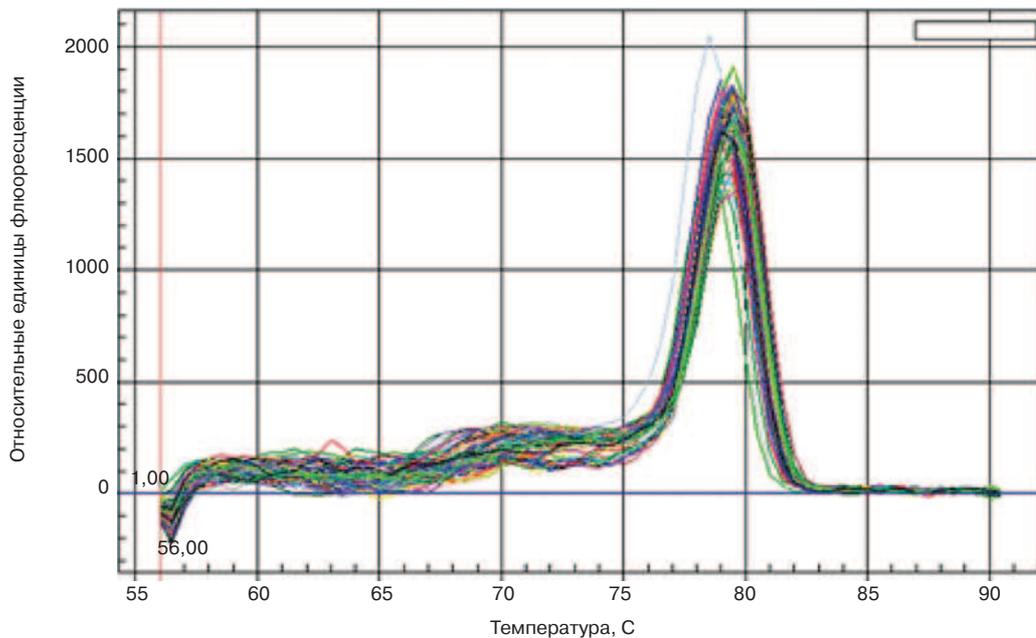


Рис. 3. Кривая плавления при проведении ПЦР ВГЧ 4-го типа

сов и типом образца использовали мультипараметрический анализ с расчетом коэффициента корреляции Спирмена. Статистическая значимость определялась как уровень $p \leq 0,05$. Поскольку распределение количества копий ДНК герпесвирусов не являлось гауссовским, результаты представлены в виде медианы и 25–75% квартильных интервалов; сравнение групп между собой производили с использованием ранговых тестов: теста множественных сравнений и теста Краскела–Уоллиса.

Результаты

Наиболее распространенными вирусами герпеса человека, выявленными в участках коронарных артерий пациентов, умерших вследствие острого инфаркта миокарда и его осложнений, являются ВГЧ 1, 2 (анализировались вместе) и 3-го типов. Каждый из них был выявлен более чем в 80% случаев в данной выборке. Коэкспрессия ВГЧ 3-го типа и вирусов простого герпеса (1-й и 2-й типы) была выявлена в 92,4% образцов. Менее часто встречались в данной выборке ВГЧ 4, 7 и 8-го типов (49–55% случаев). Коэкспрессия ВГЧ 4, 7 и 8-го типов была выявлена в 42,4% образцов, при этом ДНК ВГЧ 4-го и 8-го типов одновременно выявлялась в 57,6%, а 7-го и 8-го – в 68,2%.

Второй параметр, который мы оценивали, помимо самого присутствия вируса, было количество копий вирусного генома.

Количество копий вирусного генома (в 106 клетках) было нормировано на количество клеточной геномной ДНК, определенной по количеству копий гена ERV-3. Количественная оценка выборки включала логарифмирование, и проводилось сравнение логарифмов среднего количества копий вирусного генома. Наибольшее количество копий вирусного генома в коронарных артериях было получено для ВГЧ 3-го и 7-го типов (3,9 [3,51–4,39] и 3,27 [2,52–3,79] соответственно). Столь же высоким было и число копий ДНК ВГЧ 1-го и 2-го типов (3,05 [2,51–3,81] соответственно). Хотя мы нашли в стенке сосудов ДНК ВГЧ 8-го типа и оценили его наличие по тем же критериям, однако в отсутствие в нашей выборке доноров с диагностированной саркомой Капоши наличие ВГЧ 8-го типа требует подтверждения по экспрессии белков, специфичных для ВГЧ 8-го типа. Количество копий ДНК ВГЧ 4, 6-го и особенно ВГЧ 5-го типа было наименьшим (2,83 [2,22–3,29]; 1,79 [1,05–2,94]; 2,05 [1,48–3,25]). На рис. 4 представлено среднее количество копий генома ВГЧ во всех образцах коронарных артерий пациентов с острым инфарктом миокарда.

На следующем этапе исследования мы рассмотрели распределение ВГЧ отдельно в трех группах образцов, полученных от пациентов, умерших вследствие острого инфаркта миокарда. Исследовались 8 типов ВГЧ, при этом ДНК ВГЧ 1-го и 2-го типов

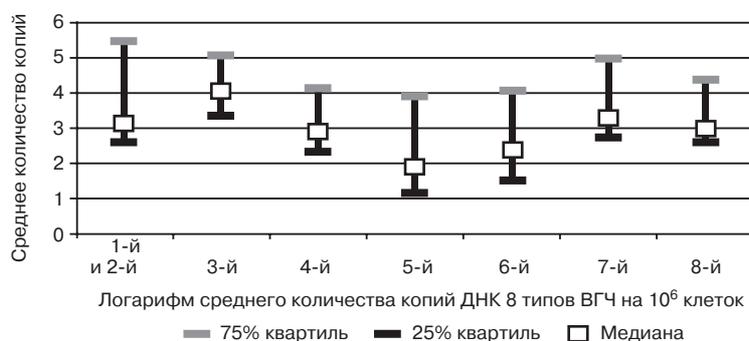


Рис. 4. Среднее количество копий выделенной герпесвирусной ДНК на 106 клеток коронарных артерий пациентов, умерших вследствие острого инфаркта миокарда. Среднее количество копий ДНК ВГЧ между собой достоверно не различались, $p > 0,05$

Таблица 2

Количество копий вирусной ДНК у пациентов, умерших вследствие ОИМ, с различным поражением коронарных артерий (представлено в виде логарифма)

Группа	Тип ВГЧ [Ме, 25%; 75% квантили], $p>0,05$						
	1-й и 2-й	3-й	4-й	5-й	6-й	7-й	8-й
1-я	2,83 [2,6; 3,3]	4,2 [3,2; 4,4]	2,73 [1,88; 2,99]	1,72 [1,45; 2,64]	2,04 [1,36; 2,90]	3,49 [2,41; 4,09]	2,9 [2,48; 3,56]
2-я	3,35 [2,4; 4,14]	4,03 [3,35; 4,6]	2,49 [2,29; 3,34]	2,5 [0,47; 3,4]	2,94 [1,76; 3,32]	3,33 [2,54; 3,87]	2,97 [2,49; 3,39]
3-я	3,36 [2,4; 4,17]	3,8 [3,37; 4,2]	3,26 [2,38; 3,49]	1,7 [0,88; 2,79]	1,69 [1,29; 2,56]	3,1 [2,55; 3,75]	3,03 [2,71; 3,43]

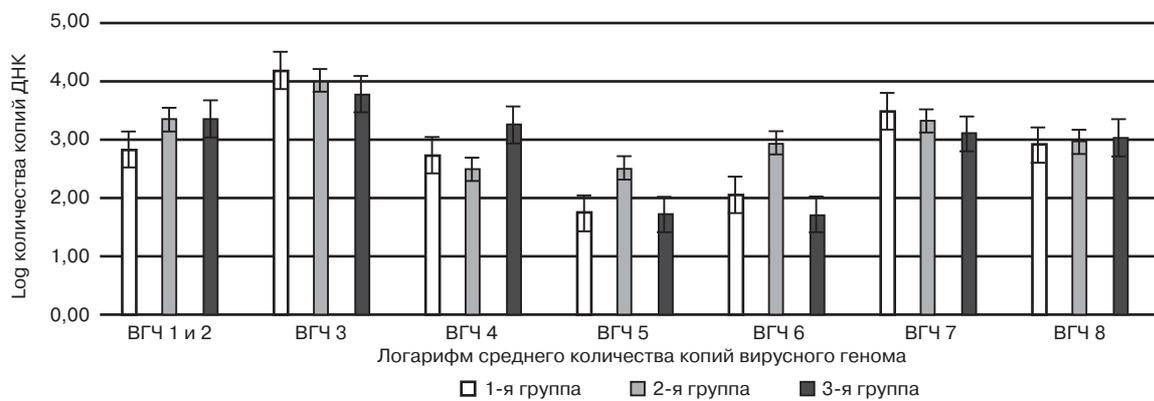


Рис. 5. Сравнительный анализ количества копий вирусного генома на 10^6 клеток по группам. Среднее количество копий вирусного генома при сравнении трех групп попарно между собой достоверно не отличалось ($p>0,05$)

анализировали вместе. В 1-ю группу были включены участки макроскопически «чистых» коронарных артерий, во 2-ю – участки коронарных артерий с неповрежденными атеросклеротическими бляшками, в 3-ю – участки коронарных артерий с поврежденными атеросклеротическими бляшками. Достоверной разницы при сравнении среднего количества копий вирусного генома получено не было ($p>0,05$). Результаты представлены в таблице 2 и на рисунке 5.

Обсуждение

Герпесвирусы – одни из наиболее распространенных и изученных вирусов человека. Однако вопрос о влиянии ВГЧ на течение атеросклероза все еще остается открытым, и многие авторы пишут о необходимости проведения дальнейших исследо-

ваний. Взаимосвязь между наличием герпесвирусной инфекции и атеросклерозом была впервые предположена еще в 1980 г, когда С.С. Fabricant и соавт., исследуя сосуды кур с болезнью Марек (нейролимфоматоз птиц, вызываемый герпесвирусом galli-2), обнаружили изменения сосудов, похожие на атеросклероз. Эти данные были подтверждены и другими исследователями, использовавшими различные животные модели [14].

В 1984 г. F. Gyorky и соавт. при помощи электронной микроскопии участков пункционной биопсии проксимальной аорты показали, что встречаемость герпесвирусной инфекции у пациентов с атеросклерозом невысока: вирионы вирусов герпеса были выявлены в 10 из 60 случаев – в ряде случаев в гладкомышечных клетках и крайне редко в эндотелиальных клетках. Кон-

трольной группы в данном исследовании не было [15]. При исследовании аутопсийных образцов молодых жертв дорожно-транспортных происшествий ДНК ВГЧ 5-го типа выявлена всего в 10% случаях, ДНК ВГЧ 1-го и 2-го типов выявлена в 25 и в 10% случаев соответственно, а ДНК ВГЧ 4-го типа выявлена не была. Количество копий вирусного генома эти авторы не оценивали [12]. Также и по данным других авторов, при исследовании тканей аорты человека, полученной при аутопсии или во время хирургических операций, было показано, что ВГЧ 1, 4 и 5-го типов встречаются в 1–8 случаев из 33, при этом чаще в участках артерий с атеросклеротическими бляшками (40–80%), чем без них (5–15%). В целом, однако, встречаемость различных герпесвирусов в атеросклеротически измененных сосудах настолько сильно варьирует (например, ДНК ВГЧ 1-го и 2-го типов встречалась в 0–22% образцов [11, 16]), что даже теоретически получить статистически значимые различия между образцами атеросклеротических и контрольных сосудов весьма проблематично. В целом большинство исследований ограничивались определением ВГЧ 1-го и 2-го типов, а наличие вирусов герпеса 3, 6, 7 и 8-го типов в большинстве работ не оценивали. В одной из немногих работ, где предпринимали попытки выделить ДНК ВГЧ 3-го типа из церебральных артерий, она обнаружена не была [17].

В проведенном нами исследовании обнаружено, что вирусы герпеса присутствуют в коронарных артериях пациентов, умерших вследствие ОИМ весьма часто. Например, ВГЧ 1-го и 2-го типов обнаружены в 90% образцов. Встречаемость ВГЧ 3-го типа также была весьма высока — более 80%.

По результатам нашего исследования, ВГЧ в стенках сосудов встречаются чаще, чем в описанных ранее работах. Это объясняется тем, что наше исследование проведено на образцах коронарных артерий пациентов, умерших вследствие острого ин-

фаркта миокарда, то есть в более старшей возрастной группе, чем в большинстве цитированных выше работ. По-видимому, с возрастом у людей выявляется большее количество ВГЧ.

В целом ряде экспериментальных работ *in vitro* по заражению культур эндотелиальных клеток и гладкомышечных клеток животных и человека ВГЧ 1-го и 2-го типов показано, что такое заражение может быть ассоциировано с адгезией к эндотелию гранулоцитов и дальнейшим изменением свойств эндотелия, приводящим к нарушению связывания клеток эндотелия с матриксными белками субстрата. Кроме того, отмечалось изменение характера обмена веществ в инфицированных культурах гладкомышечных клеток, а также активное отложение в культивируемых эндотелиальных клетках иммунных комплексов [18]. Экстраполяция этих результатов на ситуацию требует дальнейшего анализа.

Наши данные не подтверждают выводы многих работ об ассоциации вирусов герпеса с атеросклеротически измененными стенками. Скорее всего, различные вирусы герпеса могут присутствовать в стенке сосуда вне зависимости от степени проявления атеросклероза и даже в сосудах без признаков атеросклероза.

Это косвенно подтверждает работа J.L. Melnick и соавт., которые культивировали клетки, морфологически напоминающие гладкомышечные, выделенные из атеросклеротически измененных сосудов 132 пациентов (аорта или сонные артерии). Последующий иммунофлюоресцентный анализ выявил антигены ВГЧ 5-го типа в 25% случаев, причем как в атеросклеротически измененных участках сонных артерий, так и в участках аорты без признаков атеросклероза [19].

В отличие от большинства опубликованных работ, мы оценивали не только наличие или отсутствие ВГЧ, но и определяли число копий вирусного генома. При сопоставлении с остальными типами вирусов число копий генома ВГЧ 3-го типа было

одним из самых высоких и составило 3,9 [3,51–4,39]. Однако и по этому параметру нормальные участки стенок аорты не отличались от измененных. Среднее количество копий ВГЧ 4-го типа оказалось выше количества копий ВГЧ 5-го типа и в участках макроскопически чистых коронарных артерий, и в поврежденных атеросклеротических бляшках. В то же время количество копий вирусного генома ВГЧ 4-го и 5-го типов было практически одинаковым в неразорванных атеросклеротических бляшках. Эти количественные данные, как и наши результаты о наличии или отсутствии ВГЧ в стенках сосудов, не подтверждают гипотезу о связи ВГЧ с образованием атеросклеротических изменений. По нашим данным, во всех трех группах коронарных артерий были выявлены сопоставимые количества герпесвирусного генома вне зависимости от характера поражения артерии.

Во многих работах оценивался титр антител к различным типам ВГЧ, хотя эти данные говорят больше о вирусной репликации в прошлом и не обязательно свидетельствуют о присутствии вирусов в момент исследования. Поэтому сравнение этих данных с результатами анализа ДНК не вполне корректно. Тем не менее в соответствии с нашими данными при оценке титра антител к ВГЧ 1-го и 2-го типов у 340 пар пациентов из исследования ARIC: с признаками раннего атеросклероза (утолщение стенок сонной артерии) и без них – достоверных различий получено не было, отмечалась лишь тенденция к увеличению титра антител к цитомегаловирусу в группе пациентов с признаками атеросклероза [20, 21].

Некоторая связь с патологией была выявлена в исследовании Y.F. Zhou, в которой была выявлена взаимосвязь между исходно повышенным титром антител к ВГЧ 5-го типа и частотой развития рестенозов (по данным ангиографии) в течение 6 мес после прямой коронарной атерэктомии у 75 пациентов с симптоматической ишемической болезнью сердца [20].

В целом анализ антител к ВГЧ подтверждает наш вывод о том, что ВГЧ 1-го и 2-го типов являются самыми распространенными в популяции (ДНК ВГЧ 1-го и 2-го типов выявлялась в 90% случаев).

Многие ВГЧ, например ВГЧ 8-го типа, персистируют у пациентов с иммунодефицитом; ВГЧ 8-го типа считают этиологическим агентом саркомы Капоши, вирусом, ассоциированным с этим заболеванием. Существует всего несколько работ, посвященных исследованию ВГЧ 8-го типа у пациентов с ишемической болезнью сердца и острым инфарктом миокарда. Еще в 1997 г. D. Ye и соавт. исследовали, может ли ВГЧ 8-го типа вносить свой вклад в патогенез атеросклероза. При исследовании эндотелия коронарных артерий и веретенообразных клеток саркомы Капоши у 38 пациентов ВГЧ 8-го типа выявлен не был [22]. По данным I. Kaklikkaа, N. Kaklikkaа, исследовавших различные сосуды на наличие ДНК ВГЧ 8-го, а также 6-го и 7-го типов у 28 пациентов с макроскопически выраженным атеросклерозом (IV степени) и у 25 пациентов без него, ДНК ВГЧ 7-го и 8-го типов обнаружена не была. Однако в трех случаях (один из которых – контроль) авторами была выявлена ДНК ВГЧ 6-го типа [12].

В нашей работе была выявлена ДНК 6, 7 и 8-го типов вирусов герпеса во всех трех группах образцов коронарных артерий, хотя мы не включали в нашу выборку пациентов с доказанным иммунодефицитом или саркомой Капоши. Можно предположить, что ВГЧ 8-го типа может существовать не только в веретенообразных клетках саркомы Капоши, но и в сосудистой стенке, и атеросклеротических бляшках. Однако для подтверждения этого факта требуется дальнейшее более детальное исследование и подтверждение наличия этого вируса по экспрессии вирусных белков.

Вирусы герпеса человека после первого инфицирования могут длительное время оставаться в латентном состоянии, а впоследствии реактивироваться под воздействием

различных факторов и в ответ на активацию подавляться иммунной системой человека [10]. Хотя нами были получены данные, что ДНК вирусов герпеса выявляется и в макроскопически не измененных сосудах, возможно, критическим для возникновения изменений является не наличие вируса как такового, а его состояние латентности или размножения. Так, в работе Е.А. Venditt и соавт. [23] с помощью гибридизации *in situ* РНК было показано размножение ВГЧ 1-го типа (но не 4-го или 5-го) в гладкомышечных клетках артерий грудной аорты с признаками раннего атерогенеза.

Возможно, с локальными всплесками размножения вирусов связана и локальная активация лимфоцитов в бляшках: по данным, ранее опубликованным нашей группой: в атеросклеротических бляшках, взятых при эндатерэктомии, выявлены различные субтипы активированных Т-лимфоцитов, активация которых коррелировала с выявлением герпесвирусов 1, 4 и 7-го типов [24, 25]. Размножение вирусов герпеса в атеросклеротических бляшках может играть важную роль в прогрессировании воспаления в пораженных атеросклерозом сосудах и в дальнейшем приводить к возникновению изъязвлений и эрозий атеросклеротических бляшек.

Таким образом, для оценки вклада герпесвирусной инфекции в патогенез атеросклероза необходимо дальнейшее изучение данного вопроса с определением не только самой герпесвирусной ДНК, но и изучение активности/латентности вирусов герпеса в крови и в тканях пациентов с острым инфарктом миокарда.

В заключение отметим, что данное исследование проведено на большой выборке пациентов с острым инфарктом миокарда. Полученные результаты доказывают, что вирусы герпеса могут присутствовать в сосудистой стенке. Кроме того, проведен сравнительный анализ частоты встречаемости и анализа количества копий ДНК ВГЧ в различных участках коронарных артерий. Однако количество ДНК как этого,

так и других типов не связано с характером поражения коронарных артерий. Не исключено, что важно не само наличие ВГЧ в сосудистой стенке, а то, происходит их репликация или нет.

Выводы

1. Показано, что ДНК всех типов вирусов герпеса человека может находиться в коронарных артериях у пациентов с острым инфарктом миокарда.

2. Впервые при проведении сравнительного анализа было выявлено, что ДНК различных типов вирусов герпеса человека выявляется в инфарктсвязанных и инфарктнесвязанных коронарных артериях.

3. ДНК вирусов герпеса человека выявляется как в образцах поврежденных, так и неповрежденных атеросклеротических бляшек, а также коронарных артерий без макроскопических признаков атеросклероза; статистических различий в содержании герпесвирусной ДНК между этими образцами не обнаружено.

4. Наши данные не подтверждают связи между присутствием ДНК вирусов герпеса и признаками дестабилизации атеросклеротических бляшек. Однако увеличение размера исследуемых когорт может выявить такую зависимость в дальнейшем. Также возможна связь между размножением вирусов герпеса и атеросклеротическими изменениями в стенках сосудов, не исследованная в настоящей работе. Выявление такой зависимости требует анализа вирусной РНК, которое будет проведено на следующем этапе исследований.

Конфликт интересов

Исследование выполнено при поддержке гранта правительства РФ (Договор № 14.В25.31.0016 от 15.07.2013 г.).

Литература

1. Вирхов Р. Целлюлярная патология. М.: Медицина; 1859.
2. Van Berkel T.J., Out R., Hoekstra M., Kuiper J., Biessen E., van Eck M. Scavenger receptors: friend

- or foe in atherosclerosis? *Curr. Opin. Lipidol.* 2005; 16: 525–35.
3. Geng Y.J., Libby P. Progression of atheroma: A struggle between death and procreation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22: 1370–80.
 4. Zhu J., Nieto J., Horne B.D. et al. Prospective study of pathogen burden and risk of myocardial infarction or death. *Circulation.* 2001; 103: 45–51.
 5. Padilla C., Lobos O., Hubert E., Gonzalez C., Matus S., Pereira M. et al. Periodontal pathogens in atheromatous plaques isolated from patients with chronic periodontitis. *J. Periodontal. Res.* 2006; 41: 350–3.
 6. Rafferty B., Dolgilevich S., Kalachikov S., Morozova I., Ju J., Whittier S. et al. Cultivation of *Enterobacter hormaechei* from human atherosclerotic tissue. *J. Atheroscler. Thromb.* 2011; 18: 72–81.
 7. Lo J., Abbara S., Shturman L., Soni A., Wei J., Rocha-Filho et al. Increased prevalence of subclinical coronary atherosclerosis detected by coronary computed tomography angiography in HIV-infected men. *AIDS.* 2010; 24: 243–53.
 8. Pesonen E., Hallman M., Sarna S., Andsberg E., Haataja R., Meri S. Infections as a stimulus for coronary occlusion, obstruction, or acute coronary syndromes. *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* 2009; 3: 447–54.
 9. Chatzidimitriou D., Kirmizis D., Gavrilaki E., Chatzidimitriou M., Malisiovas N. Atherosclerosis and infection: is the jury still not in? *Future Microbiol.* 2012; 7 (10): 1217–30.
 10. Pesonen E., Andsberg E. Dual role of infections as risk factors for coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 2007; 192 (2): 370–5.
 11. Jha H.C., Srivastava P. Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* is higher in aorta and coronary artery than in carotid artery of coronary artery disease patients. *APMIS.* 2009; 117 (12): 905–11.
 12. Kaklikkaya I., Kaklikkaya N. Detection of human herpesvirus 6 DNA but not human herpesvirus 7 or 8 DNA in atherosclerotic and nonatherosclerotic vascular tissues. *Heart Surg. Forum.* 2010; 13 (5): 345–9.
 13. Сухих Т.Р., Калимагамбетов А.М., Бродский И.Я., Хоменкова С.А. Фотографический микрофлуориметрический метод определения содержания ДНК в индивидуальных хромосомах человека. *Цитология.* 1989; 31 (11): 1329–37.
 14. Fabricant C.G., Fabricant J., Litrenta M.M., Minick C.R. Virus-induced atherosclerosis. *J. Exp. Med.* 1978; 148: 335–40.
 15. Gyorkey F., Melnick J.L., Guinn G.A., Gyorkey P., DeBakey M.E. Herpesviridae in the endothelial and smooth muscle cells of the proximal aorta in atherosclerotic patients. *Exp. Molec. Pathol.* 1984; 40: 328–39.
 16. Ibrahim A.I., Obeid M.T. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA in atherosclerotic plaques and in unaffected bypass grafts. *J. Clin. Virol.* 2005; 32 (1): 29–32.
 17. Nagel M.A., Choe A., Khmeleva N., Overton L., Rempel A., Wyborny A. et al. Search for varicella zoster virus and herpes simplex virus-1 in normal human cerebral arteries. *J. Neurovirol.* 2013; 19 (2): 181–5.
 18. Visser M.R., Jacob H.S., Goodman J.L., McCarthy J.B., Furcht L.T., Vercellotti G.M. Granulocyte-mediated injury to herpes simplex virus-infected human endothelium. *Lab. Invest.* 1989; 60 (2): 296–304.
 19. Melnick J.L., Dreesman G.R., McCollum C.H., Petrie B.L., Burek J., DeBakey M.E. Cytomegalovirus antigen within human arterial smooth muscle cells. *Lancet.* 1983; 2: 644–7.
 20. Zhou Y.F., Leon M.B., Waclawiw M.A., Popma J.J., Yu Z.X., Finkel T. et al. Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of restenosis after coronary atherectomy. *N. Engl. J. Med.* 1996; 335 (9): 624–30.
 21. Sorlie P.D., Adam E., Melnick S.L., Folsom A., Skelton T., Chambless L.E. et al. Cytomegalovirus/herpesvirus and carotid atherosclerosis: the ARIC Study. *J. Med. Virol.* 1994; 42 (1): 33–7.
 22. Ye D., Nichols T.C., Dehmer G.J., Tate D.A., Wehbie R.S., Quinlivan E.B. Absence of human herpesvirus 8 genomes in coronary atherosclerosis in immunocompetent patients. *Am. J. Cardiol.* 1997; 79 (9): 1245–7.
 23. Benditt E.A., Barrett T., McDougall J.K. Viruses in the etiology of atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983; 80: 6386–9.
 24. Grivel J.C., Ivanova O.I., Nikitskaya E.A. et al. Activation of T-lymphocytes and herpes viruses in atherosclerotic plaques. *EHJ.* 2013. Available at: http://eurheartj.oxfordjournals.org/content/34/suppl_1/P2395.abstract?sid=556a2372-ade4-425a-86b9-778d44010b97/ (Accessed 28 November 2013).
 25. Grivel J.C., Ivanova O.I., Nikitskaya E.A. et al. Comparison amount of human herpes viruses DNA in vessels from different group of patients. *EHJ.* 2013. Available at: http://eurheartj.oxfordjournals.org/content/34/suppl_1/P2405.abstract?sid=d87b6250-b89a-4862-b40f-42f714c90bc5/ (Accessed 28 November 2013).

References

1. Virkhov R. Cellular pathology. M.: Meditsina; 1859 (in Russian).
2. Van Berkel T.J., Out R., Hoekstra M., Kuiper J., Biessen E., van Eck M. Scavenger receptors: friend or foe in atherosclerosis? *Curr. Opin. Lipidol.* 2005; 16: 525–35.
3. Geng Y.J., Libby P. Progression of atheroma: A struggle between death and procreation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22: 1370–80.
4. Zhu J., Nieto J., Horne B.D. et al. Prospective study of pathogen burden and risk of myocardial infarction or death. *Circulation.* 2001; 103: 45–51.

5. Padilla C., Lobos O., Hubert E., Gonzalez C., Matus S., Pereira M. et al. Periodontal pathogens in atheromatous plaques isolated from patients with chronic periodontitis. *J. Periodontal. Res.* 2006; 41: 350–3.
6. Rafferty B., Dolgilevich S., Kalachikov S., Morozova I., Ju J., Whittier S. et al. Cultivation of *Enterobacter hormaechei* from human atherosclerotic tissue. *J. Atheroscler. Thromb.* 2011; 18: 72–81.
7. Lo J., Abbata S., Shurman L., Soni A., Wei J., Rocha-Filho et al. Increased prevalence of subclinical coronary atherosclerosis detected by coronary computed tomography angiography in HIV-infected men. *AIDS.* 2010; 24: 243–53.
8. Pesonen E., Hallman M., Sarna S., Andberg E., Haataja R., Meri S. Infections as a stimulus for coronary occlusion, obstruction, or acute coronary syndromes. *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* 2009; 3: 447–54.
9. Chatzidimitriou D., Kirmizis D., Gavriilaki E., Chatzidimitriou M., Malisiovas N. Atherosclerosis and infection: is the jury still not in? *Future Microbiol.* 2012; 7 (10): 1217–30.
10. Pesonen E., Andberg E. Dual role of infections as risk factors for coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 2007; 192 (2): 370–5.
11. Jha H.C., Srivastava P. Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* is higher in aorta and coronary artery than in carotid artery of coronary artery disease patients. *APMIS.* 2009; 117 (12): 905–11.
12. Kaklikkaya I., Kaklikkaya N. Detection of human herpesvirus 6 DNA but not human herpesvirus 7 or 8 DNA in atherosclerotic and nonatherosclerotic vascular tissues. *Heart Surg. Forum.* 2010; 13 (5): 345–9.
13. Sukhikh T.R., Kalimagabetov A.M., Brodskiy I.Ya., Khomenkova S.A. Photo immunofluorescence as a method of detection DNA in human chromosomes. *Tsitologiya.* 1989; 31 (11): 1329–37 (in Russian).
14. Fabricant C.G., Fabricant J., Litrenta M.M., Minick C.R. Virus-induced atherosclerosis. *J. Exp. Med.* 1978; 148: 335–40.
15. Gyorkey F., Melnick J.L., Guinn G.A., Gyorkey P., DeBakey M.E. Herpesviridae in the endothelial and smooth muscle cells of the proximal aorta in atherosclerotic patients. *Exp. Molec. Pathol.* 1984; 40: 328–39.
16. Ibrahim A.I., Obeid M.T. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA in atherosclerotic plaques and in unaffected bypass grafts. *J. Clin. Virol.* 2005; 32 (1): 29–32.
17. Nagel M.A., Choe A., Khmeleva N., Overton L., Rempel A., Wyborny A. et al. Search for varicella zoster virus and herpes simplex virus-1 in normal human cerebral arteries. *J. Neurovirol.* 2013; 19 (2): 181–5.
18. Visser M.R., Jacob H.S., Goodman J.L., McCarthy J.B., Furcht L.T., Vercellotti G.M. Granulocyte-mediated injury to herpes simplex virus-infected human endothelium. *Lab. Invest.* 1989; 60 (2): 296–304.
19. Melnick J.L., Dreesman G.R., McCollum C.H., Petrie B.L., Burek J., DeBakey M.E. Cytomegalovirus antigen within human arterial smooth muscle cells. *Lancet.* 1983; 2: 644–7.
20. Zhou Y.F., Leon M.B., Waclawiw M.A., Popma J.J., Yu Z.X., Finkel T. et al. Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of restenosis after coronary atherectomy. *N. Engl. J. Med.* 1996; 335 (9): 624–30.
21. Sorlie P.D., Adam E., Melnick S.L., Folsom A., Skelton T., Chambless L.E. et al. Cytomegalovirus/herpesvirus and carotid atherosclerosis: the ARIC Study. *J. Med. Virol.* 1994; 42 (1): 33–7.
22. Ye D., Nichols T.C., Dehmer G.J., Tate D.A., Wehbie R.S., Quinlivan E.B. Absence of human herpesvirus 8 genomes in coronary atherosclerosis in immunocompetent patients. *Am. J. Cardiol.* 1997; 79 (9): 1245–7.
23. Benditt E.A., Barrett T., McDougall J.K. Viruses in the etiology of atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983; 80: 6386–9.
24. Grivel J.C., Ivanova O.I., Nikitskaya E.A. et al. Activation of T-lymphocytes and herpes viruses in atherosclerotic plaques. *EHJ.* 2013. Available at: http://eurheartj.oxfordjournals.org/content/34/suppl_1/P2395.abstract?sid=556a2372-ade4-425a-86b9-778d44010b97/ (Accessed 28 November 2013).
25. Grivel J.C., Ivanova O.I., Nikitskaya E.A. et al. Comparison amount of human herpes viruses DNA in vessels from different group of patients. *EHJ.* 2013. Available at: http://eurheartj.oxfordjournals.org/content/34/suppl_1/P2405.abstract?sid=d87b6250-b89a-4862-b40f-42f714c90bc5/ (Accessed 28 November 2013).

Поступила 26.12.2014 г.