

В.Н. Царев,

д.м.н., профессор, зав. кафедрой
микробиологии, вирусологии,
иммунологии, директор НИМСИ

Е.Н. Николаева,

д.м.н., профессор, г.н.с. лаборатории
молекулярно-биологических исследований
НИМСИ

М.В. Витович,

аспирант кафедры микробиологии,
вирусологии, иммунологии

М.И. Митерева,

к.м.н., доцент кафедры эндодонтии

М.С. Подпорин,

м.н.с. лаборатории молекулярно-
биологических исследований НИМСИ

МГМСУ им. А.И. Евдокимова

Биопленкообразующие бактерии в атеросклеротических бляшках у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и хроническим пародонтитом

Реферат. Идентификация жизнеспособных, ранее не определяемых видов микробов в атеросклеротических бляшках сосудов представляет новые доказательства прямого и опосредованного участия микробиоты в этиопатогенезе неинфекционных заболеваний человека. **Цель исследования:** выделение и определение состава жизнеспособных микробов в клиническом материале из атеросклеротических бляшек и сравнительный анализ с микробиотой ротовой жидкости у больных хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП) и ишемической болезнью сердца (ИБС). **Материалы и методы.** Фрагменты атеросклеротических бляшек, выделенных при аортокоронарном шунтировании у 12 больных ХГП легкой и средней степени тяжести и ИБС, культивировали в системе текучих сред в анаэробных условиях. Выделенные микробы идентифицировали с помощью бактериологических методов исследований и полимеразной цепной реакции. Наличие биопленок оценивали сканирующей электронной микроскопией. **Результаты.** Из всех бляшек выделены биопленки, содержащие генетические маркеры хотя бы одного вида микробиоты. Биопленки включали ДНК пародонтопатогенов, некоторых возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний, вирусов семейства *Herpesviridae* и *Candida spp.*, а также жизнеспособные микробы. Выполнен сравнительный анализ состава выделенной микробиоты из атеросклеротических бляшек и микробов ротовой жидкости у обследованных пациентов. **Выводы.** Способ моделирования биопленок на основе технологии текучих сред позволяет выявлять ранее не определяемые виды микробиоты в стенках кровеносных сосудов и атеросклеротических бляшках в достаточных количествах для идентификации и изучения их свойств.

Ключевые слова: атеросклеротическая бляшка, биопленкообразующие микробы, пародонтопатогены, возбудители нозокомиальных инфекций, технология текучих сред

V.N. Tsarev,

Grand PhD in Medical sciences, professor,
head of the Microbiology, virology,
immunology department, director of the
Medico-dental research Institute

E.N. Nikolaeva,

Grand PhD in Medical sciences, professor,
principal scientist in the Molecular biology
research laboratory of the Medico-dental
research Institute

M.V. Vitovich,

Postgraduate of the Microbiology, virology,
immunology department

M.I. Mitereva,

PhD in Medical sciences, associate professor
of the Periodontology department

M.S. Podporin,

Junior researcher at the Molecular biology
research laboratory of the Medico-dental
research Institute

Moscow State University of Medicine and
Dentistry, Moscow, Russia

Biofilm-forming bacteria in atherosclerotic plaques in patients with cardiovascular diseases and chronic periodontitis

Abstract. The identification of viable, previously undetectable types of microbes in human atherosclerotic plaques provides new evidence of direct and indirect participation of microbiota in the etiopathogenesis of non-infectious human diseases. **Purpose of the study.** Isolation and determination of the composition of viable microbes in atherosclerotic plaques and comparative analysis with the microbiota of the oral fluid in patients with chronic generalized periodontitis (CP) and coronary artery disease (CAD). **Materials and methods.** Fragments of atherosclerotic plaques isolated during coronary artery bypass grafting in patients with coronary artery disease and chronic periodontitis were cultured in a fluid system under anaerobic conditions. Isolated microbes were identified using bacteriological methods of research and polymerase chain reaction. The presence of biofilms was evaluated by scanning electron microscopy. **Results.** Twelve patients with CP and CAD were examined. Biofilms containing genetic markers of at least one type of microbiota were isolated from all atherosclerotic plaques after cultivation in a fluid system and anaerobic conditions. They included DNA of periodontal pathogens, some pathogens of purulent-inflammatory diseases, herpesviruses and *Candida spp.*, as well as viable microbes. In the examined patients, a comparative analysis of the composition of the isolated microbiota from atherosclerotic plaques and oral fluid microbes was performed. **Conclusions.** A method for modeling biofilms based on fluid technology allows detecting previously undetectable types of microbiota in the walls of blood vessels and atherosclerotic plaques in sufficient quantities to identify and study their properties.

Key words: atherosclerotic plaque, chronic periodontitis, biofilm-forming microbes, periodontal pathogens, causative agents of nosocomial infections, fluid technology

В последние годы все больше данных накапливается о том, что пародонтит, обусловленный пародонтопатогенными видами бактерий, является важным фактором развития коморбидной патологии и, в частности, атеросклероза. Во многих работах показано присутствие ДНК пародонтопатогенных бактерий в участках атеросклеротического повреждения [1–4]. Метагеномные исследования свидетельствуют о наличии в атеросклеротических бляшках генетических маркеров не только возбудителей воспалительных заболеваний полости рта, но и других клинически важных инфекций, в том числе кишечной и мочеполовой систем [5, 6]. Однако наличие ДНК не позволяет судить о клинической значимости. Только культивирование и идентификация живых бактериальных видов из участков повреждения при инфекционном заболевании соответствуют постулатам Коха и оправдывают дальнейшие исследования [7]. В последнее время некоторые авторы продемонстрировали наличие живых микробов в клинических образцах, предоставив доказательства того, что важным сегментом микробиома человека может быть атеросклеротический микробиом [8–10]. Предполагается, что смешанные биопленки, формирующиеся на слизистой оболочке полости рта и кишечника, респираторного тракта, мочевыводящих путей, раневых поверхностей, обеспечивают синергизм действия патогенов, что особенно важно при развитии вторичной инфекции в послеоперационном периоде и при внутрибольничных инфекциях, которые получают все большее распространение [11, 12].

Цель исследования — выделение и определение состава жизнеспособных микробов в клиническом материале из атеросклеротических бляшек и ротовой жидкости больных ишемической болезнью сердца (ИБС) и хроническим пародонтитом с помощью бактериологических и молекулярно-генетических методов исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено культивирование в системе текучих сред и анаэробных условиях фрагментов атеросклеротических бляшек, выделенных у 12 больных ИБС и хроническим генерализованным пародонтитом в возрасте от 54 до 74 лет, находившихся на хирургическом лечении в Институте коронарной и сосудистой хирургии Государственного научного центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева [11]. Участки сосудов с атеросклеротическими повреждениями, отобранные при аортокоронарном шунтировании, немедленно помещали в стерильные транспортные системы со средой Amies Transport. Перед операцией получали смывы ротовой жидкости. Образцы для исследования доставляли в лабораторию молекулярно-биологических исследований МГМСУ им. А.И. Евдокимова.

Стоматологическое обследование пациентов включало оценку состояния гигиены полости рта, выраженности воспалительной реакции, рецессии десны, деформации пародонта и резорбции кости зубных альвеол

согласно требованиям МКБ-10, Государственного стандарта и методических рекомендаций по обследованию стоматологических пациентов с заболеваниями пародонта [13]. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании, проведение которого одобрено этическим комитетом МГМСУ им. А.И. Евдокимова.

Первичный посев для выделения потенциальной микробиоты проводили на питательные среды производства HiMedia Laboratories (Индия): M863, M832 и M521 для селективного выделения неспоровых анаэробов (FD001), M029 (агар Эндо), M304 (селективный агар для стрептококков), M1297A (хромогенную среду для выделения и идентификации грибов рода *Candida*) и M1293 (хромогенную среду для предварительной идентификации *E. coli* и других колиформных бактерий). Одну часть исследуемого образца помещали в стерильную пробирку Эппендорфа для ПЦР-диагностики. Другую часть использовали для получения отпечатка на плотной питательной среде M832, а затем помещали в жидкую питательную среду M863 для моделирования биопленки в условиях анаэробноза и движения жидкой фазы. Анаэроостат HiAnaerobic System Mark VI, заполненный бескислородной газовой смесью (10% H₂, 10% CO₂ и 80 N₂), с посевами устанавливали в орбитальный шейкер-инкубатор ES-20 (Biosan, Латвия) и инкубировали при температуре 36,9°C, скорости вращения 90 об/мин от 2 до 14 дней как описано в патенте [14].

Стерильность забора исследуемого материала и условий культивирования контролировали с помощью посева транспортной среды, в которой были доставлены образцы в лабораторию, на плотную питательную среду M832 и инкубирования исходных питательных сред без посева. Учет результатов культивирования в жидкой питательной среде (оценка оптической плотности, визуальный и микроскопический метод); выделение и идентификацию чистых культур в аэробных и анаэробных условиях выполняли в соответствии со стандартным протоколом [12]. Биохимическую идентификацию выделенных видов бактерий проводили с помощью наборов Biochemical Identification Test Kits (HiMedia Labs, Индия).

Сканирующую электронную микроскопию (СЭМ) проводили согласно методике, описанной Е.В. Ипполитовым и соавт., с помощью сканирующего двухлучевого электронного микроскопа Quanta 200 3D (FEI Company, США) в режиме высокого вакуума, при ускоряющем напряжении 5 кВ [11].

ДНК из фрагментов сосудов выделяли с помощью набора реагентов «Пробоподготовка Универсальная» (НПФ «Генлаб», Россия) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Генетические маркеры пародонтопатогенных бактерий *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* и *Treponema denticola* определяли с помощью ПЦР-набора «Мультидент-5» (НПФ «Генлаб»). Для пародонтопатогенов *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*, *Campylobacter rectus*,

Eubacterium nodatum, *Eikenella corrodens* и *Campylobacter spp.* (*S. gingivalis*, *C. ochraceus*, *C. sputigena*) использовали систему Micro-IDent plus компании HainLifescience (Германия). ДНК других возбудителей клинически значимых инфекций *Streptococcus spp.*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis/faecium*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia pneumoniae*, а также грибов рода *Candida* определяли с помощью наборов НПФ «Литех» (Россия). ДНК вирусов семейства *Herpesviridae* выявляли с помощью набора реактивов «Генлаб». Амплификацию ДНК проводили в термоциклере Терцик («ДНК-технология», Россия) и анализировали гель-электрофорезом

в 1,6% агарозе на трансиллюминаторе TCP-25M (Vilber Lourmat, Франция) после окрашивания бромистым этидием (1 мкг/мл) или методом обратной гибридизации [12].

Исследование являлось предварительным и не носило сравнительного характера, поэтому для анализа результатов использованы методы описательной статистики (данные представляли в виде частот наблюдений и относительных долей).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено обследование 12 человек с хроническими заболеваниями сердечно-сосудистой системы и тканей пародонта, ранее (от нескольких месяцев до 10 лет) перенесших острый инфаркт миокарда. У всех пациентов диагностированы постинфарктный кардиосклероз, стенокардия напряжения 2–3 или 3–4 ФК (согласно классификации стабильной стенокардии Канадского сердечно-сосудистого общества), у 2 (16%) человек — мультифокальный атеросклероз, у 1 (8%) — постинфарктная аневризма. Большинство пациентов имели сопутствующие заболевания желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы.

На стоматологическом осмотре установлено, что 5 (42%) человек имели хронический генерализованный пародонтит легкой степени и 7 (58%) — хронический генерализованный пародонтит средней степени тяжести. Гигиена полости рта у 1/3 пациентов была удовлетворительной, у 8 (67%) пациентов — неудовлетворительной. Средний возраст больных составил $63,6 \pm 1,6$ года.

Для улучшения кровотока, направленного к сердечной мышце, всем пациентам проведено аортокоронарное шунтирование в Институте коронарной и сосудистой хирургии. Во время операции отобраны участки сосудов с атеросклеротическими поражениями. Рост бактерий в контрольных посевах отсутствовал. Однако во флаконах с фрагментами атеросклеротических бляшек наблюдалось помутнение питательной среды и наличие осадка на дне пробирки уже через 24 часа культивирования.

При использовании методики моделирования микробных биопленок в жидкой фазе и условиях анаэробнобиоза на поверхности культивируемых биоплатов также наблюдался рост микробов, образующих сплошную биопленку (рис. 1). большей частью поверхность сосуда была покрыта биопленкой с выраженной мантией, на поверхности которой видны отдельные группы микроорганизмов кокковой и овоидной морфологии (рис. 2).

В отпечатках атеросклеротических бляшек на стекле после культивирования в условиях текучих сред в течение 24 часов и более при световой микроскопии были обнаружены грамотрицательные и грамположительные бактерии, а также дрожжевые грибы (рис. 3).

На плотных питательных средах с отпечатками атеросклеротических бляшек наблюдался рост различных по форме и консистенции колоний бактерий (рис. 4).

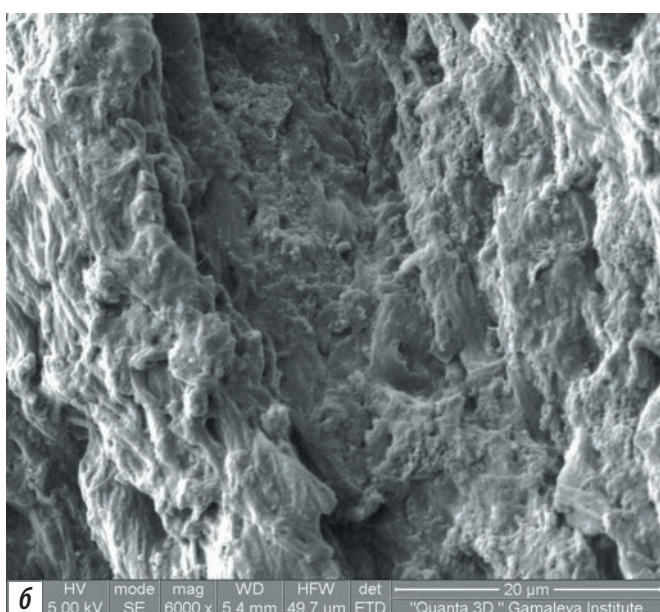


Рис. 1. Поверхность образца после культивирования в системе текучих сред в течение 24 часов: а) общий вид фрагмента сосуда на СЭМ, ув. 100; б) рельеф поверхности сосуда на СЭМ, ув. 6000

Из отпечатков на плотных питательных средах и планктонных культур повторно делали посевы на питательные среды M521, M832, M029, M304, M1297A, M1293. Чашки Петри со средами M832 и M304 помещали в анаэроустат и культивировали в течение 14 дней; чашки со средами M521, M029, M1297A и M1293 культивировали в аэробных условиях в течение 24 часов.

В жидкой питательной среде из всех образцов после культивирования фрагментов атеросклеротических бляшек в анаэробных условиях в системе текучих сред был выявлен рост грамотрицательных и грамположительных бактерий (рис. 5).

При этом выделены и идентифицированы 4 штамма пародонтопатогенов (*A. actinomycetemcomitans* и *P. gingivalis*), 21 штамм возбудителей гнойно-воспалительных инфекций (*S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *E. coli*, *Proteus spp.*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis/faecium*, *Enterobacter spp.*) и 6 штаммов *Candida spp.*, всего 31 штамм.

С помощью ПЦР были идентифицированы ДНК 14 штаммов пародонтопатогенных видов микробов I и II порядков, 5 штаммов возбудителей нозокомиальных инфекций и 9 штаммов *Candida spp.*, всего 28 штаммов.

В исходном материале из атеросклеротических бляшек до культивирования были выявлены ДНК пигментообразующих пародонтопатогенных бактерий *T. forsythia* у 3 (25%), а *P. gingivalis* — у 2 (17%) пациентов. ДНК *A. actinomycetemcomitans* определили в 1 (8%) образце. Кроме того, в 2 (17%) атеросклеротических бляшках выявлены маркеры пародонтопатогенных бактерий II порядка *F. nucleatum*, по 1 (8%) из образцов содержали ДНК *Capnocytophaga* (*C. spp.*) и *E. corrodents*. В данном исследовании мы не выявили ДНК *T. denticola*, *P. intermedia*, *P. micra*, *C. rectus* и *E. nodatum*.

Частота встречаемости в атеросклеротических бляшках ДНК *Candida albicans* составила 4 (33%), *Candida krusei* — 1 (8%), *Candida parapsilosis* — 5 (41%) образцов. *Candida glabrata* и *Candida guilliermondii* не выявлены. При этом в 4 (33%) образцах выявлено по 1 виду, а в 3 (25%) — по 2 вида из 5 определяемых нами грибов рода *Candida*. Среди возбудителей внутрибольничных

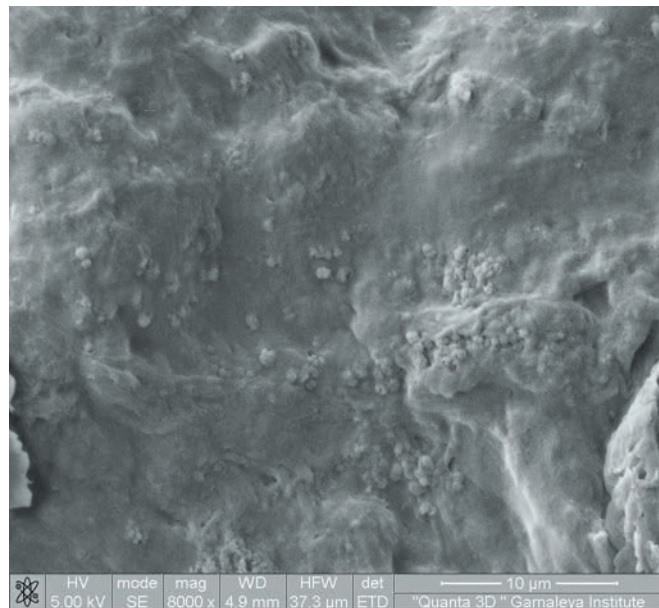


Рис. 2. Поверхность образца с микробной биопленкой после культивирования в системе текучих сред в течение 24 часов в биореакторе (СЭМ, ув. 8000)

инфекций идентифицированы ДНК *E. faecalis* в 1 (8%), *E. faecium* — в 4 (33%), *S. aureus* — в 2 (17%) случаях. ДНК EBV определена в 2 (17%), CMV — в 5 (41%) и HSV1,2 — в 3 (25%) образцах.

В то же время в ротовой жидкости был выявлен генетический материал *T. forsythia* у 3 (25%), а *P. gingivalis* — у 4 (33%) обследованных пациентов. *A. actinomycetemcomitans* идентифицировали в 1 (8%) случае.

ДНК *F. nucleatum* и *C. spp.* выявили у половины обследованных больных, у 2 (17%) — *E. corrodents* или *C. rectus*, по 1 (8%) человеку имели *T. denticola* или *P. intermedia*. ДНК пародонтопатогенов *P. micra* и *E. nodatum* в ротовой жидкости не выявили. *Streptococcus spp.* определили у 10 (83%) человек, *P. anaerobius* — у 3 (25%) человек. Из возбудителей нозокомиальных инфекций у 1 (8%) человека определили *S. aureus*, *E. faecium* — у 3 (25%) человек.

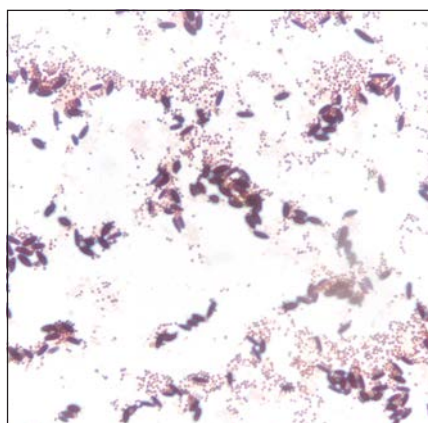
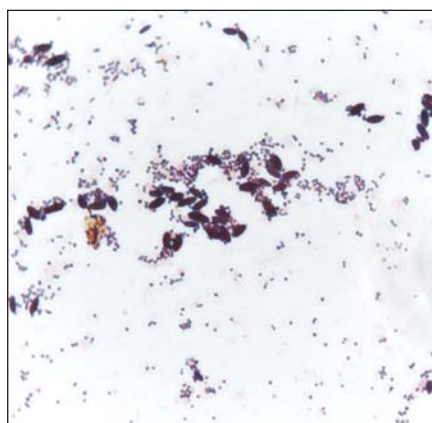


Рис. 3. Отпечатки на стекле фрагментов атеросклеротических бляшек после культивирования в жидкой питательной среде в течение 24 часов. Окраска по Граму, ув. 1000

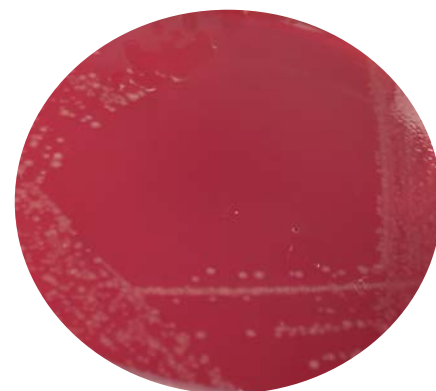
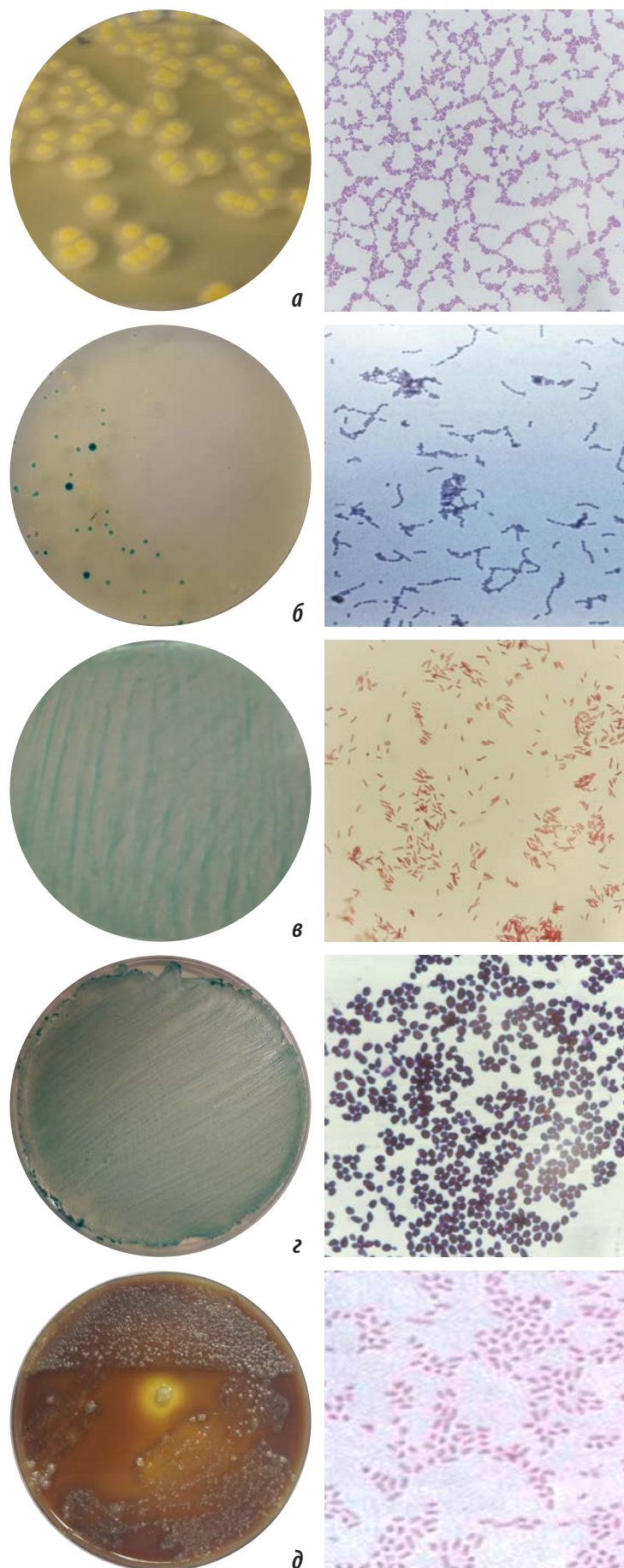


Рис. 4. Отпечатки фрагментов атеросклеротических бляшек, выделенных из кровеносных сосудов в асептических условиях



Таким образом, установлено, что в содержимом атеросклеротических бляшек можно выявить не только генетический материал, но и живых представителей микробиоты человека, которые, возможно, могут играть роль в этиопатогенезе атеросклероза. Полученные нами данные не противоречат результатам других исследователей [9, 15]. Тем не менее, с помощью моделирования биопленок установлено, что видовой состав идентифицированной микробиоты во фрагментах атеросклеротических бляшек более разнообразен и индивидуален у каждого пациента и не полностью совпадает с видовым составом, выявленным в ротовой жидкости.

С помощью СЭМ было показано, что во фрагментах артериальных сосудов и участках атеросклеротических бляшек можно выявить единичные бактерии, которые при культивировании в системе текучих сред *in vitro* образуют участки смешанной биопленки с характерной ультраструктурой, представленные разнообразными морфологическими вариантами микробиоты: бактериями палочковидной и кокковой форм. Предложенный нами способ получения биопленок позволяет получать образцы «атеросклеротической микробиоты», достаточные для изучения ее состава и свойств, долгосрочных эффектов, связанных с влиянием микробиоты на характер развития и прогрессирования атеросклеротических процессов, а также противовоспалительной, в том числе пародонтальной, терапии на течение сердечно-сосудистых заболеваний [14]. В связи с этим пациентов с умеренными и тяжелыми формами пародонтита с сопутствующими системными и воспалительными заболеваниями необходимо информировать о возможном увеличении риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, как и об их обратном влиянии на течение и прогрессирование воспалительных заболеваний полости рта.

ВЫВОДЫ

1. Разработан и апробирован способ моделирования биопленок на основе технологии текучих сред, позволяющий выявлять ранее не определяемые виды микробиоты в стенках кровеносных сосудов и атеросклеротических бляшках, на сосудистых стентах и катетерах в достаточных количествах для идентификации и изучения их свойств.

Рис. 5. Рост бактерий на плотных селективных питательных средах и мазки из чистых культур: а) колонии *S. aureus* на среде M521 (стафилококковый агар N110); б) колонии на среде M304 (селективный агар для стрептококков); в) колонии *E. coli* на хромогенной среде M1293 (HiCrome™ ECC Agar); г) колонии на хромогенной среде 1297A для *Candida*; д) колонии *A. actinomycetemcomitans* на колумбийском кровяном агаре. Справа — мазок из чистой культуры, окраска по Граму, ув. 1000

2. Во всех образцах, выделенных из атеросклеротических бляшек, идентифицирован генетический материал хотя бы одного вида, микробиоты, включая ДНК пародонтопатогенных видов бактерий, некоторых возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний, вирусов семейства *Herpesviridae* и *Candida spp.*
3. Выделение жизнеспособных, ранее не определяемых видов микробиоты в стенках кровеносных сосудов

и атеросклеротических бляшках человека вследствие ограничения их распространения факторами неспецифической резистентности и иммунной системы организма человека *in vivo* представляет новые доказательства прямого и опосредованного участия микробиоты в этиопатогенезе неинфекционных заболеваний человека.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES:

.....

1. **Алишбая М.М., Витович М.В., Николаева Е.Н., Царев В.Н.** Пародонтопатогенная микрофлора в атеросклеротических бляшках у пациента с сердечно-сосудистым заболеванием. — *Атеросклероз и дислипидемии*. — 2019; 4 (37): 64—8 [Alshibaya M.M., Vitovich M.V., Nikolaeva E.N., Tsarev V.N. Parodontopathogenic microflora in atherosclerotic plaque in patient with cardiovascular disease. — *The Journal of atherosclerosis and dyslipidemias*. — 2019; 4 (37): 64—8 (In Russ.)].

DOI: 10.34687/2219-8202.JAD.2019.04.0007

2. **Бокерия Л.А., Муратов Р.М., Шамсиев Г.А., Царев В.Н., Саркисян М.А., Лукина Г.И., Николаева Е.Н.** Разработка молекулярно-генетических методов диагностики и антибактериальной профилактики инфекционного эндокардита одонтогенной природы. — *Dental Forum*. — 2011; 37 (1): 6—9 [Bokeria L.A., Muratov R.M., Shamsiev G.A., Tsarev V.N., Sarkisyan M.A., Lukina G.I., Nikolaeva E.N. Development of molecular-biological diagnostic methods and antibacterial prophylaxis of odontogenic infective endocarditis. — *Dental Forum*. — 2011; 37 (1): 6—9 (In Russ.)].

3. **Царев В.Н., Николаева Е.Н., Саркисян М.А.** Выявление маркеров пародонтопатогенных бактерий у пациентов с инфекционным эндокардитом. — *Российский стоматологический журнал*. — 2009; 2: 32—4 [Tsaryov V.N., Nikolayeva Ye.N., Sarkisyan M.A. Detection of parodontopathogenic bacterial markers in patients with infective endocarditis. — *Russian Dental Journal*. — 2009; 2: 32—4 (In Russ.)].

4. **Kozarov E.** Bacterial Invasion of Vascular Cell Types: Vascular Infectology and Atherogenesis. — *Future Cardiol.* — 2012; 8(1): 123—38. PMID: 22185451

5. **Mitra S., Drautz-Moses D.I., Alhede M., Maw M.T., Liu Y., Purbojati R.W., Yap Z.H., Kushwaha K.K., Gheorghe A.G., Bjarnsholt T., Hansen G.M., Sillesen H.H., Hougen H.P., Hansen P.R., Yang L., Tolker-Nielsen T., Schuster S.C., Givskov M.** In Silico Analyses of Metagenomes From Human Atherosclerotic Plaque Samples. — *Microbiome*. — 2015; 3: 38. PMID: 26334731

6. **Ziganshina E.E., Sharifullina D.M., Lozhkin A.P., Khayrullin R.N., Ignatyev I.M., Ziganshin A.M.** Bacterial Communities Associated With Atherosclerotic Plaques From Russian Individuals With Atherosclerosis. — *PLoS One*. — 2016; 11 (10): e0164836. PMID: 27736997

7. **Kozarov E.** (Re)viewing atherosclerosis as an infectious disease — *a key to personalized medicine*. — *Journal of Bacteriology and Parasitology*. — 2012; 3: e103. DOI: 10.4172/2155-9597.1000e103

8. **Витович М.В.** Выделение и идентификация биофилмообразующих микробов в атеросклеротических бляшках. — *Материалы V Национального конгресса бактериологов*. — М.: Династия, 2019. — С. 22—23 [Vitovich M.V. Isolation and identification of biofilm-forming microbes in atherosclerotic plaques. — *Materials of the V National Congress of Bacteriologists*. — Moscow: Dynasty, 2019. — P. 22—23 (In Russ.)].

9. **Lanter B.B., Sauer K., Davies D.G.** Bacteria present in carotid arterial plaques are found as biofilm deposits which may contribute to enhanced risk of plaque rupture. — *mBio*. — 2014; 5 (3): e01206—14. PMID: 24917599

10. **Rafferty B., Dolgilevich S., Kalachikov S., Morozova I., Ju J., Whittier S., Nowygrad R., Kozarov E.** Cultivation of *Enterobacter Hormaechel* from human atherosclerotic tissue. — *J Atheroscler Thromb.* — 2011; 18 (1): 72—81.

PMID: 20972353

11. **Ипполитов Е.В., Диденко Л.В., Царев В.Н.** Особенности морфологии биофилмы пародонта при воспалительных заболеваниях десен (хронический катаральный гингивит, хронический пародонтит, кандидо-ассоциированный пародонтит) по данным электронной микроскопии. — *Клиническая лабораторная диагностика*. — 2015; 60 (12): 59—64

[Ippolitov E.V., Didenko L.V., Tsarev V.N. The characteristics of morphology of biofilm of periodontium under inflammatory diseases of gums (chronic catarrhal gingivitis, chronic periodontitis, Candida-associated periodontitis) according results of electronic microscopy. — *Klin Lab Diagn.* — 2015; 60 (12): 59—64 (In Russ.)].

12. **Царев В.Н.** Микробиология, вирусология, иммунология полости рта. — 2-е изд. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. — С. 522—526 [Tsarev V.N. Microbiology, virology, immunology of the oral cavity. 2nd ed. — Moscow: GEOTAR-Media, 2019. — P. 522—526 (In Russ.)].

13. **Кузьмина Э.М., Янушевич О.О., Кузьмина И.Н.** Стоматологическая заболеваемость населения России. Эпидемиологическое стоматологическое обследование населения России. — М.: МГМСУ, 2019. — 304 с.

[Kuzmina E.M., Yanushevich O.O., Kuzmina I.N. Dental morbidity in the Russian population. Epidemiological dental examination of the population of Russia. — Moscow: Moscow State University of Medicine and Dentistry, 2019. — 304 p. (In Russ.)].

14. **Ипполитов Е.В., Царев В.Н., Арутюнов С.Д., Степанов А.Г., Подпорин М.С., Шишова В.Г., Малазония Т.Т.** Способ формирования смешанной биофилмы пародонтопатогенных анаэробных бактерий в условиях текущих сред *in vitro*. — Патент RU № 2619169, действ. с 20.11.2015 [Ippolitov E.V., Tsarev V.N., Arutyunov S.D., Stepanov A.G., Podporin M.S., Shishova V.G., Malazoniya T.T. Method for forming of combined periodontal anaerobic bacteria biofilm under fluid conditions *in vitro*. — Patent RU № 2619169, effective from 20.11.2015 (In Russ.)].

15. **Шарифуллина Д.М., Васильева Р.М., Яковлева Т.И., Николаева Е.Г., Поздеев О.К., Ложкин А.П., Хайруллин Р.Н.** Микробный пейзаж биоптатов атеросклеротических бляшек. — *Казанский медицинский журнал*. — 2015; 96 (6): 979—82 [Sharifullina D.M., Vasil'eva R.M., Yakovleva T.I., Nikolaeva E.G., Pozdееv O.K., Lozhkin A.P., Khayrullin R.N. Microbial landscape of atherosclerotic plaques biopsy samples. — *Kazan Journal of Medicine*. — 2015; 96 (6): 979—82 (In Russ.)].