

Oliver Krohn

**SEPELVALTIMOIDEN ATEROMAN
BAKTEERITULEHDUKSEN KUVANTAMINEN
FLUORESOIVALLA IN SITU
HYBRIDISAATIOMENETELMÄLLÄ (FISH)
PEPTIDI NUKLEIINIhapPO (PNA) LEIMAA
KÄYTTÄEN**

lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta
Syventävät opinnot
Helmikuu 2023

TIIVISTELMÄ

Oliver Krohn: Sepelvaltimoiden ateroman bakteeritulehduksen kuvantaminen fluoresoivalla in situ hybridisaatiomenetelmällä (fish) peptidi nukleinihappo (pna) leimaa käyttäen
Tampereen yliopisto
Lääketieteen lisensiaatin tutkinto-ohjelma
Helmikuu 2023

Ateroskleroosi on maailmanlaajuisesti merkittävin syy verisuonisairauksiin. Ateroskleroosi on valtimoiden krooninen tulehdus, joka johtaa niiden seinämän kovettumiseen. Käsitys oksidoituneen LDL:n roolista kroonisen tulehduksen ylläpitäjänä ateroskleroosin patogeenisissä on nykyisin vakiintunut teoria. Bakteerien mahdollista roolia inflammaation ylläpitäjänä on kuitenkin jo pitkään epäilty.

Tämän tutkimuksen päämääränä oli selvittää, voisiko aterooman tulehdusta ja bakteerien mahdollista osuutta siihen kuvantaa fluoresoivalla in situ hybridisaatio -menetelmällä (FISH), jossa tavanomaisen fluoresoivan DNA-koettimen asemasta käytetään kemiallisesti muokattua, stabiilimpaa ja paremmin hybridisoituvaa peptide nucleic acid (PNA) -koetinta. FISH-menetelmän lisäksi samat leikkeet immunovärjättiin leukosyytti- sekä streptokokkispesifillä vasta-aineella ja tuloksia verrattiin keskenään.

Aineistona tutkimukseen olivat Tampere Vascular Study -tutkimuksen kliiniset kaulavaltimoiden endarterektomianäytteet. Hybridisoidut leikkeet kuvattiin Hamamatsu S60 -mikroskooppiskannerilla sekä Zeiss LSM 780 -konfokaalimikroskoopilla. Hybridisoituja leikkeitä verrattiin CD45 -vasta-aineella sekä streptokokkispesifillä vasta-aineella värjättyihin leikkeisiin. CD45 -vasta-aine on yleismarkkeri leukosyyteille.

Kun tarkastellaan universaalibakteerikoettimella hybridisoituja sekä streptokokkivasta-aineilla värjättyjä endarterektomianäytteitä, nähdään, että tulehtuneen plakin sisällä sekä ympäristössä on suuria bakteerikolonisaatioita. Nähdään myös, että universaalibakteerikoetinta kiinnittyy tulehdussolujen sisälle viitaten siihen, että joukossa on leukosyyttejä, jotka ovat fagosytoineet bakteereja. Tämä osoittaa, että plakin ympäristössä on ollut aktiivinen tulehdusreaktio plakin repeämisen aikana. Tutkimuksen esteeksi muodostui bakteerien sekä kudoksen autofluoresenssi, jonka takia PNA-koettimen kiinnittymistä ei voitu varmuudella varmistaa. Mikäli tutkimus toistetaan, tulisi käyttää CY5.5 -markkeria, joka emittoi valoa 694 nanometrin aallonpituudella. Näin vältetään sekä kudoksen, että bakteerien autofluoresenssin häiriöitä.

Avainsanat: Ateroskleroosi, bakteeri, fluoresoiva in situ hybridisaatio, tulehdus.

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -ohjelmalla.

SISÄLLYS

1 Johdanto	4
2 Tutkimuksen tavoitteet	6
3 Materiaali ja metodit	7
4 Tulokset	9
5 Pohdinta	11
6 Lähteet	21

1 JOHDANTO

Ateroskleroosi on maailmanlaajuisesti merkittävin syy verisuonisairauksiin. Tyypillisimpiä oireita ovat sepelvaltimotauti, aivoinfarktut sekä alaraajaiskemiat. [1] Tautitaakka globaalisti on suuri. Vuonna 2016 arvioitiin, että sepelvaltimotautia sairastaisi 150 miljoonaa ihmistä maailmanlaajuisesti. [2] Alaraajaiskemiaa puolestaan sairastaa yli 230 miljoonaa ihmistä maailmanlaajuisesti. [3] Sepelvaltimotautiin sekä aivoinfarktiin menehtyy vuosittain noin 15 miljoonaa henkeä. [4] Tunnetuimmat riskitekijät taudille ovat korkea verenpaine, tupakointi, veren korkea kolesterolipitoisuus, tyypin 2 diabetes sekä liikalihavuus. [1]

Ateroskleroosin kehittyminen liittyy edellä mainittuihin riskitekijöihin, jotka johtavat kolesterolin kertymiseen valtimon seinämään, mutta sitä voidaan myös pitää valtimoiden kroonisena tulehduksena, joka johtaa niiden seinämän kovettumiseen. Tämä puolestaan johtaa kovettuneen valtimon ruokkiman elimen iskemiaan, ääritapauksessa infarktiin. [5]

Nykyisen käsityksen mukaan ateroskleroosissa valtimon endoteelin läpi intimaan siirtyy kolesterolia, tarkemmin apoB:tä sisältävää LDL-kolesterolia. ApoB:n positiivisesti varautuneet rakenteet kiinnittyvät intiman negatiivisesti varautuneisiin proteoglykaaneihin, jolloin LDL-hiukkaset

takertuvat verisuonen intimaan. Intimakerroksessa LDL-hiukkaset oksidoidut. Oksidaation tarkka mekanismi ei ole selvillä. Oksidoituneet LDL-hiukkaset houkuttelevat paikalle makrofageja syömään kasaantunutta kolesterolia. Seuraa monimutkainen inflammatorinen prosessi, jonka lopputuloksena valtimon seinämään kasaantuneet makrofagit, kolesteroli, kalkki sekä sidekudos muodostavat plakin, ns. aterooman. Valtimon sisäpuolelle aterooman päälle muodostuu sileästä lihaksesta ja sidekalvosta koostuva rakenne, joka muodostaa aterooman katon. [6]

Osa plakeista on epästabiileja, sillä niissä tulehdusprosessi on heikentänyt suojaavaa kattorakennetta. Epästabiili plakki on suuremmissa riskissä repeytyä. Tällöin repeämäkohtaan muodostuu verihyytymä, joka tukkii verisuonen. Tämänhetkinen tieto ateroomien patogeneesistä ei selitä, mitkä tekijät määräävät tuleeko plakista stabiili, vai epästabiili. [7]

Käsitys oksidoituneen LDL:n roolista kroonisen tulehduksen ylläpitäjänä ateroskleroosin patogeneesissä on vakiintunut. [8] Bakteerien mahdollista roolia inflammaation ylläpidossa on kuitenkin jo pitkään epäilty. [9,10] Teoria kannusti useisiin hoitokokeiluihin antibiooteilla, mutta niissä ei nähty merkittävää vähennystä sairauskohtauksissa tai kuolemissa. [11,12,13]

Vuonna 2005 tutkimusryhmämme kävi läpi ruumiinavauksissa kerättyjä sepelvaltimo ateroomia hyödyntäen herkkää 16-S rDNA PCR:ää, jota seurasi kloonaukset ja sekvensointi. Näytteistä löytyi useiden suun normaaliflooraan kuuluvien bakteerien perimää, muun muassa viridans-ryhmän streptokokkien DNA:ta. [14] Löydön innoittamana tutkimme kudospäätteitä revenneistä aivoaneurysmista sekä sydäninfarkti-, aivoinfarkti- ja alaraajaiskemiapotilailta poistetuista trombeista. Suurimmasta osasta näytteistä löytyi kyseisen viridans-ryhmän streptokokkien DNA:ta. [15, 16, 17,18] Useissa muissakin tutkimuksissa on sittemmin varmistettu viridans-ryhmän streptokokkien perimän olemassaolo ateroomissa. [19, 20,21]

2 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tutkimuksen päämääränä oli selvittää, voisiko aterooman tulehdusta ja bakteerien mahdollista osuutta siihen kuvantaa fluoresoivalla *in situ* hybridisaatio -menetelmällä (FISH), jossa tavanomaisen fluoresoivan DNA-koettimen asemasta käytetään kemiallisesti muokattua, stabiilimpaa ja paremmin hybridisoituvaa peptide nucleic acid (PNA) -koetinta. PNA-koetin kiinnittyy bakteerin 16S rRNA geenin nukleotidisekvenssiin. [22] Koska potilaiden ateroomista on aiemmissa tutkimuksissa onnistuttu monistamaan eri bakteerilajien DNA:ta. [20,23], tarkoituksenamme oli tutkia kaulavaltimoiden endarterektomianäytteistä bakteerien esiintymistä ja lokalisaatiota kyseisellä FISH-menetelmällä käyttäen PNA-universaalibakteerikoetinta, joka tunnistaa kaikille bakteereille yhteisen 16S rRNA sekvenssin. FISH-menetelmän lisäksi samat leikkeet immunovärjättiin leukosyytti- sekä streptokokkispesifillä vasta-aineella ja tuloksia verrattiin keskenään. Samoja bakteerilajeja, kuin ateroomissa, on löytynyt myös potilaiden suusta ja suolistosta, mikä saattaisi selittää niiden alkuperän. [23] Lisäksi on viitteitä siitä, että bakteerit

onnistuvat muodostamaan biofilmin ateroomissa. [24] Biofilmi suojaa bakteereita antibiooteilta sekä immuunivasteen soluilta ja käynnistää kudoksessa reaktion, joka johtaa tulehduksen välittäjäaineiden tuotantoon. [25]

FISH-menetelmän etu perinteiseen värjäykseen on, että siinä voidaan hyödyntää kehittyneempää fluoresenssimikroskopiaa, jolloin päästään tarkempiin tuloksiin. Lisäksi FISH-menetelmällä voidaan yhdellä käsittelykerralla hybridisoida sama näyte usealla eri värikoodatulla koettimella. On kuitenkin epäselvää, pystyykö PNA koetin läpäisemään bakteeribiofilmin ja tarttumaan sen sisällä lepotilassa olevien bakteerien 16S rRNA geenin sekvenssiin.

3 MATERIAALI JA METODIT

Tutkittavat näytteet. Aineistona tutkimukseen olivat Tampere Vascular Study -tutkimuksen kliiniset kaulavaltimoiden endarterektomianäytteet. Näytteet tutkittiin Tampereella.

Fluorescence in situ hybridization. Hybridisointi suoritettiin kahdella eri PNA-universaalibakteerikoettimella. Koettimissa käytettiin emäsketjua OO-CTG CCT CCC GTA GGA, jonka spesifisyys bakteereihin tarkistettiin BLAST-tietokannan avulla. Koettimet fluoresoitiin CY2 ja CY5 -markkereilla. CY2 emittoi vihreää valoa 506 nanometrin aallonpituudella. CY5 emittoi punaista valoa 670 nanometrin aallonpituudella. Eurogentec Ltd toimitti koettimet.



Hybridisoidut leikkeet kuvattiin Hamamatsu S60 -mikroskooppiskannerilla sekä Zeiss LSM 780 -konfokaalimikroskoopilla. Hybridisoituja leikkeitä verrattiin CD45 -vasta-aineella (klooni 2B11&PD7/26) värjättyihin leikkeisiin. CD45 -vasta-aine on yleismarkkeri leukosyyteille. Värjäyksen suoritti BioSiteHisto Ltd.

FISH protokollaa testattiin eri menetelmin. Näytteitä käsiteltiin sekä pepsiinillä, että mutanolysiinillä. Molemmat ovat entsyymejä, jotka hajottavat solukalvoja ja mahdollisesti myös biofilmiä. Hybridisoinnin inkubaatioaikaa vaihdeltiin välillä 10min-24h. Emme kuitenkaan raportoineet merkittävää eroa tuloksissa mainituilla toimenpiteillä.

FISH protokolla suoritettiin seuraavan ohjeen mukaan.

Leikelasien deparanifointi: Xylene 2x4min, ABS 2min, 94 % alkoholi 2min, 70 % alkoholi 1min, pestiin dH2O

Kuumennusesikäsitely: Keitettiin 98 asteisessa puskurissa 15min. Huuhdeltiin TBS-Tween® liuoksessa, jonka jälkeen kylvetettiin 2min dH2O.

Solujen hajotus: Kylvetettiin 5-20min 0,2M HCl, 5min dH2O, 10min pepsiinidigestio, 5min dH2O, 10min 5 % formaliini, 5min dH2O.

Dehydrointi: 70 % alkoholi 2min, 94 % alkoholi 2min, ABS 2min, jonka jälkeen ilmakeivattiin.

Hybridisointi: levitettiin 25 µl 200nM koetinta leikelaseille. Peitettiin peitinlasilla ja liimattiin reunat kiinni Fixogumilla. Inkuboitiin lämpölevylle 10min 85 asteessa.

Pesut: Poistettiin peitinlasit. Liutettiin 55–60 asteisessa pesuaineessa 10min, jonka jälkeen liutettiin 1min huoneenlämpöisessä pesuaineessa. Lopuksi levitettiin näytteille Dapi-Vectashield® kiinnitysainetta ja peitettiin lasit.

Puskuri: TE-puskuri pH 9+0,05 % Tween®

Pesuaine: 2xSSC+0,1 % Tween-20®.

Streptokokkivärjäys. Vasta-aineet *Streptococcus mitistä*, *Streptococcus gordonii*ä sekä *Streptococcus sanguinis*ä vastaan saatiin immunisoimalla hiiriä standardilla immunisaatioprotokollalla. Vasta-aineet sekoitettiin keskenään 1:1:2 suhteessa ja laimennettiin Dako RAEL antibody® diluent (S2022) -liuokseen immunohistokemiallista värjäystä varten. Negatiiviset kontrollit värjättiin pelkästään Dako REAL antibody® diluent:illa sekä diaminobenzidiinillä (DAB).

Streptokokkivärjäys suoritettiin seuraavan protokollan mukaan:

Laimennettu vasta-aineseos levitettiin värjättäville lasseilla 50 minuutiksi.

Lasit pestiin 2x5min TBS-Tween® liuoksella.

Sekundaarivärjäys: Dako REAL EnVision Detection System ®

Visualisointi: Diaminobenzidiini (DAB) kitin protokollan mukaan.

4 TULOKSET

Hybridisoiduissa kaulavaltimoendarterektomianäytteissä nähdään, että fluoresoiva PNA universaalibakteerikoetin kiinnittyy ateroskelroottisen plakin ympäristöön (kuvat 1, 2). Leukosyyttiyleismarkkeri värjää universaalibakteerikoettimen hybridisoiman alueen ympäristön

(kuva 3). Streptokokki vasta-aine ja universaalibakteerikoetin kiinnittyvät samoille alueille (kuvat 4,5).

Kun tarkastellaan universaalibakteerikoettimella hybridisoituja sekä streptokokkivasta-aineilla värjättyjä endarterektomianäytteitä (kuvat 4,5), nähdään, että revenneen plakin sisällä sekä ympäristössä on suuria bakteerikolonisaatioita.

Näytteissä bakteerit sekä leukosyytit sijaitsevat samoilla alueilla (kuva 3). Nähdään myös, että universaalibakteerikoetinta kiinnittyy solujen sisälle eli joukossa on leukosyyttejä, jotka ovat fagosytoineet bakteereja (kuva 1). Tämä on merkki siitä, että plakin ympäristössä on ollut aktiivinen tulehdusreaktio plakin repeämisen aikana.

Bakteerit ovat kolonisoineet laajoja yhtenäisiä alueita plakista muodostaen homogeenisen massan (kuva 2), mikä sopii bakteerien muodostaman biofilmin ulkoasuun. Leukosyytit ympäröivät biofilmiä eivätkä ole pystyneet tunkeutumaan sen sisälle (kuva 3). Biofilmille onkin tyypillistä, ettei kehon immuunipuolustus kykene hajottamaan sitä, vaan bakteerit ovat ikään kuin turvassa biofilmin sisällä. [10]

Tutkimuksessa hybridisoitiin universaalibakteerikoettimella lisäksi *arteria thoracica interna*-näytteitä, jotka toimivan kontrollinäytteinä. Ennestään tiedetään, että kyseinen valtimo säästyy ateroskleroosilta. Näin ollen näitä näytteitä pystyttiin käyttämään negatiivisena kontrollina. Universaalibakteerikoetin ei kiinnity näytteeseen, eli kudoksesta ei synny vääriä positiivisia tuloksia. (kuva 6).

Tutkimuksen esteeksi muodostui bakteerien, sekä kudoksen autofluoresenssi. CY2-markkeri (vihreä) emittoi valoa samalla aallonpituudella kuin itse kudoksen. CY5-markkeri säästyy kudoksen

autofluoresenssilta, mutta osa bakteereista sekä kroonisen tulehduksen johdosta syntyneistä rakenteista autofluoresoi CY5-markkerin emittoimilla punaisilla aallonpituuksilla. Näin ollen negatiivisessa kontrollissa nähdään punaisena värinä samat bakteerit, kuin universaalilla bakteerikoettimella hybridisoiduissa näytteissä (kuva 7). Silmämääräisesti voidaan kuitenkin arvioida, että negatiivisessa kontrollissa on huomattavasti vähemmän CY5 markkerin aallonpituuden punaista väriä. Tämä selittyy sillä, että universaalibakteerikoettimella hybridisoiduissa näytteissä koetin todellakin kiinnittyy bakteereihin, jolloin ne näkyvät näytteessä vahvempana signaalina.

5 POHDINTA

PNA-koetin eroaa DNA-koettimesta rakenteensa suhteen. PNA-koettimessa runkona ei ole fosforihappoa ja sokereita, vaan varautumaton polyamidi. Tämän takia PNA-koetin on stabiilimpi ja spesifimpi. Kemiallinen stabiliteetti mahdollistaa myös lyhyempiä koettimien valmistamisen, jolloin koetin voidaan kohdistaa lyhyempään nukleotidisekvenssiin. Ominaisuuksiensa ansiosta PNA-koetin soveltuu bakteerien hybridisoimiseen näytteissämme. Vaihtoehtoiset koettimet vaativat näytteen käsittelyä niin, että usein haluamatta hajotetaan bakteerien muodostaman biofilmin morfologia. [22]

Kudoksen autofluoresenssi on tutkimusryhmissä tunnistettu ongelma. Tärkeimmät autofluoresoivat aineet kudoksissa ovat lipofuskiini, seroidi sekä hemosideriini. Usein autofluoresoivat aineet esiintyvät kudoksessa ryppäinä, jotka muistuttavat morfologialtaan bakteerien muodostamaa

biofilmiä. [26] Lipofuskiinin ja seroidin kertyminen ateroomiin on ollut jo pitkään tiedossa ja niiden roolia tulehduksen ylläpitäjinä on epäilty. [27,28] Tutkimuksen tuloksia tarkasteltaessa onkin siis otettava huomioon mahdollisuus, että tutkimuksessa hybridisoiduissa kaulavaltimon endarterektomianäytteissä nähty ”biofilmi” on todellisuudessa autofagosytoosin tuloksena syntyneitä autofluoresoivia partikkeleita. Tätä vastaan tosin puhuu se, että streptokokki vasta-aine ja universaalibakteerikoetin kiinnittyvät samoille alueille (kuvat 4,5).

Suun bakteeriflooran tiedetään autofluoresoivan punaisen ja vihreän valon spektreillä. Osa näistä bakteereista itsessään autofluoresoi molempia värejä, mutta esimerkiksi streptokokkiryhmän bakteerit eivät autofluoresoi punaisen värin spektrejä, vaan autofluoresoivat vihreää väriä. Bakteerit muodostavat hampaiden pinnalle biofilmin, jota kutsutaan plakiksi. [29,30] Plakin rakentuminen vaatii useiden eri bakteerilajien symbioosin ja se noudattaa tiettyjä bakteerilajispesifisiä kaavoja, joissa uuden bakteerilajin kolonisaatio mahdollistaa tietyn seuraavan bakteerilajin kiinnittymisen biofilmiin. [31] Osa näistä bakteerilajeista ei yksinään autofluoresoi, mutta niiden muodostama biofilmi autofluoresoi valoa laajalla spektrillä. Hammaslääketieteessä karies diagnosoidaan tutkimalla hampaiston fluoresenssin intensiteettiä. [29,30] Biofilmin lisääntynyt autofluoresenssi on siis merkki bakteerien pitkittyneestä kolonisaatiosta. Eräissä tutkimuksissa huomattiin hampaiden biofilmin punaisen spektrin autofluoresenssin intensiteetin kasvaneen niillä potilailla, joilla oli ientulehdus. [32] Tämä viittaisi siihen, että vahvasti punaisen valon spektrillä autofluoresoiva biofilmi on merkki ympäröivän kudoksen tulehduksesta. Tutkimissamme kaulavaltimoiden endarterektomianäytteissä biofilmi autofluoresoi hyvin laajalla valon spektrillä. Kyseessä saattaisi siis olla kypsä biofilmi, jossa useat eri bakteerilajit elävät symbioosissa. Ateroomaan on saattanut päätyä, todennäköisesti verenkierron mukana, toistuvasti bakteereja, jotka ovat kolonisoineet biofilmiä entisestään kiihdyttäen tulehdusreaktiota. Kehon immuunipuolustus ei ole kyennyt estämään tätä prosessia.

Todennäköisimmin tutkimissamme näytteissä nähty positiivinen signaali on sekä autofagosytoosin tuloksena syntyneitä autofluoresoivia partikkeleita, autofluoresoivia bakteereja sekä bakteerin 16s rRNA:han kiinnittyneen PNA-koettimen aikaansaama todellista fluoresenssia.

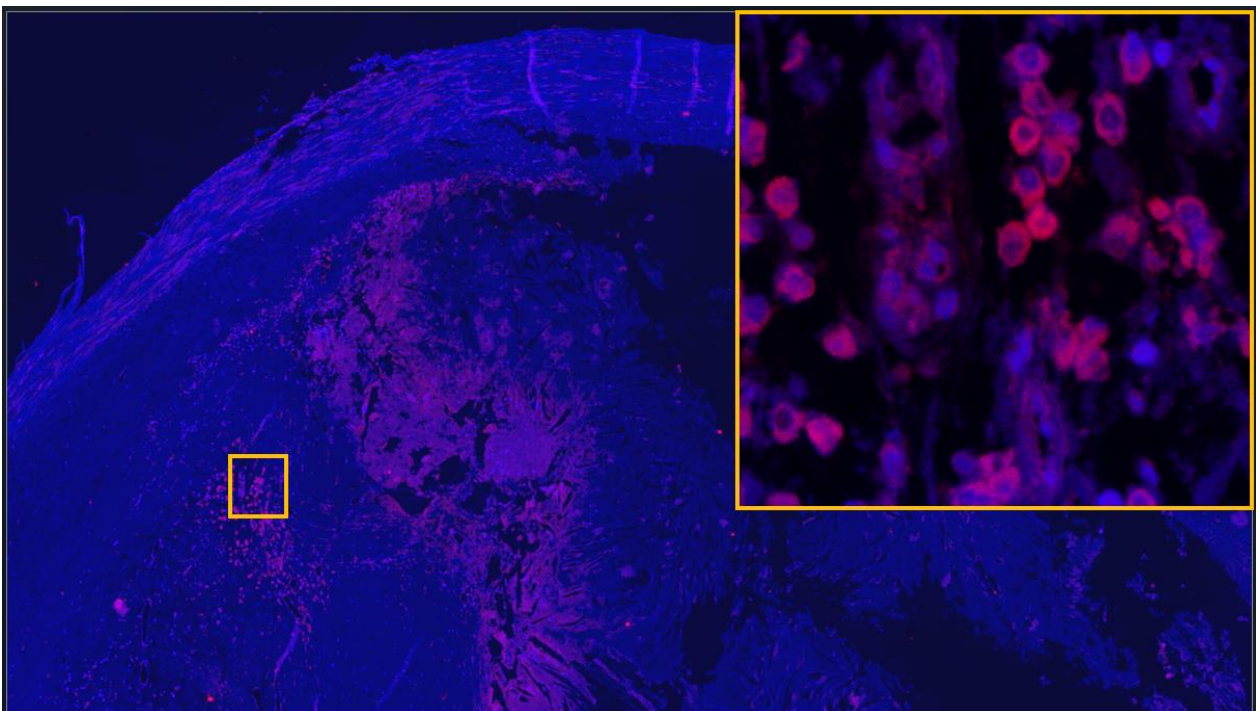
Autofluoresenssia yritettiin peittää Sudan Black B väriaineella, tämä kuitenkin johti myös PNA-koettimen signaalin peittoon. Muut tutkimusryhmät ovat törmänneet vastaavaan ongelmaan. [26] Konfokaalimikroskoopin sensitiivisyyttä pyrittiin muuttamaan niin, että mikroskooppi ei olisi havainnut autofluoresenssin signaalia ja universaalibakteerikoettimen vahvempi signaali olisi säilynyt. Emme kuitenkaan löytäneet tarpeeksi tarkkaa sensitiivisyytä, jossa autofluoresenssi peittyisi ja universaalibakteerikoettimen signaali säilyisi.

Mikäli tutkimus toistetaan, tulisi käyttää CY5.5 markkeria, joka emittoi valoa 694 nanometrin aallonpituudella. Näytteitä kuvattiin konfokaalimikroskoopilla kyseisellä aallonpituudella ja huomattiin, ettei autofluoresenssi tai CY5 markkerin signaali yllä tälle alueelle. Näin välttyttäisiin autofluoresenssin aiheuttamasta väärästä positiivisesta tuloksesta.

Tutkimuksen perusteella ei voida poissulkea bakteerien osuutta ateroskleroosin patogeneesissä. Vahvasti laajalla valon spektrillä autofluoresoiva biofilmi saattaa olla merkki pitkälle edenneestä useiden bakteerilajien kolonisaatiosta. [29,30] Värjätyistä ja hybridisoiduista näytteistä nähdään, että kehon immuunipuolustus pyrkii leukosyyteillä tuhoamaan aterooman ja sen ympäristön bakteerikolonisaation siinä onnistumatta. Biofilmi näyttää suojaavan bakteereja, jolloin seuraa krooninen tulehdus. Biofilmin punaisen valon autofluoresenssi tukee teoriaa kroonisesta tulehduksesta. [32] Tämä krooninen tulehdus voisi ajan saatossa heikentää aterooman päälle muodostunutta suojaavaa kattorakennetta, jolloin aterooman repeytymisen riski kasvaa.

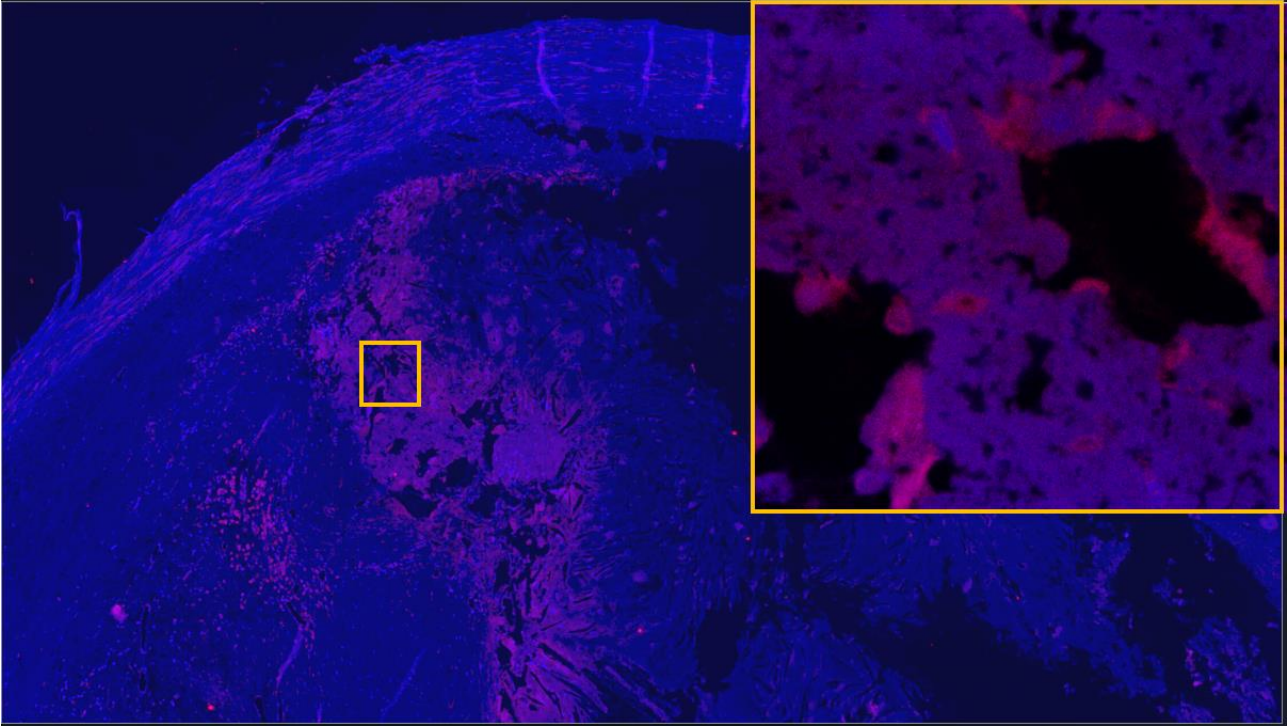
Mikäli bakteerien rooli ateroskleroosin patogeneesissä tulevaisuudessa varmentuu, pystyttäisiin kehittämään tarkempia hoitoja estämään plakkien repeämistä. Koettimien avulla tulehtuneet plakit voitaisiin tunnistaa ja hoitaa ennaltaehkäisevästi lääkkeellisesti tai kirurgisesti. Lukuisia satunnaistettuja hoitokokeiluja antibiooteilla on tehty, niissä toivottua vastetta ei kuitenkaan saavutettu. [11,12,13] Mahdollinen selitys huonoille hoitotuloksille on bakteerien muodostama biofilmi, jota antibiootit eivät kykene läpäisemään. [25]

Mahdollisesti ateroomien luontaista autofluoresenssia voitaisiin hyödyntää ateroskleroosin diagnostiikassa, kuten hammaslääketieteessä kariksen diagnostiikassa. Tutkimuksessamme ateroomat fluoresoivat vahvasti punaisen valon spektrillä, toisin kuin ateroskleroosilta säästynyt verisuoni (kuva 7). Mikäli potilaan ateroomia hoidetaan invasiivisesti, ei ole oleellista mitkä tekijät ylläpitävät kroonista tulehdusta vaan tärkeämpää on löytää vahvasti tulehtuneet ateroomat. Hiirimallissa on jo osoitettu, että fluoresenssi emissio tietokonekerroskuvaus tunnistaa tulehtuneen ateroomaplakin sisäisen verenvuodon autofluoresenssin perusteella. [33] Mikäli tulehtuneen aterooman repeytymisherkän alueen lähettämä punainen autofluoresenssi voitaisiin tunnistaa angiografian yhteydessä, menetelmästä olisi myös apua suuren riskin ateroomaplakkien tunnistamisessa ja seulonnassa.

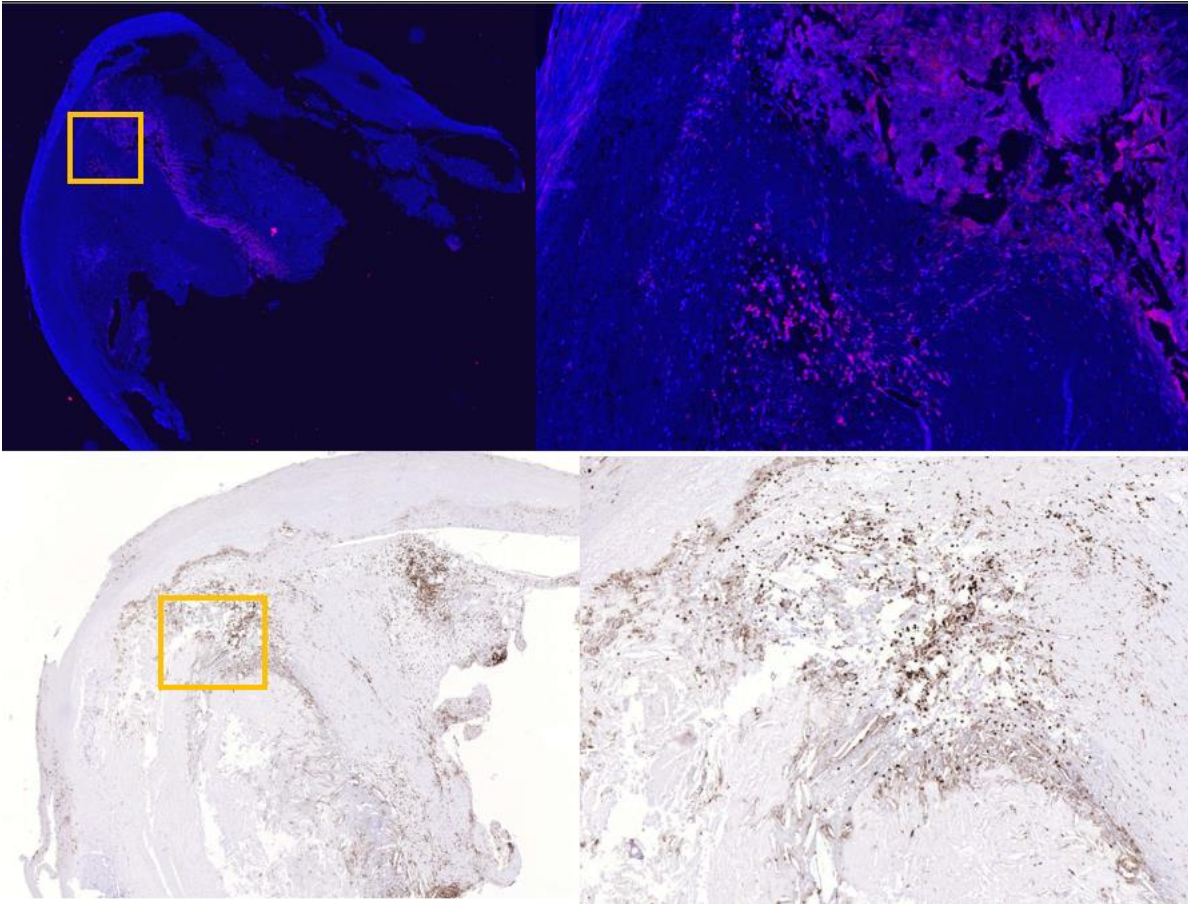


Kuva 1. Kaulavaltimoendarterektomianäyte, joka on hybridisoitu CY5 leimatulla PNA-universaalibakteerikoettimella (punainen väri) sekä DAPI-tumavärillä (sininen väri. 63 kertainen

suurennos konfokaalimikroskoopilla. Koetin värjää punaiseksi leukosyyttien sisällä olevaa materiaalia. Kuvan kirkkautta korotettu 40 %.

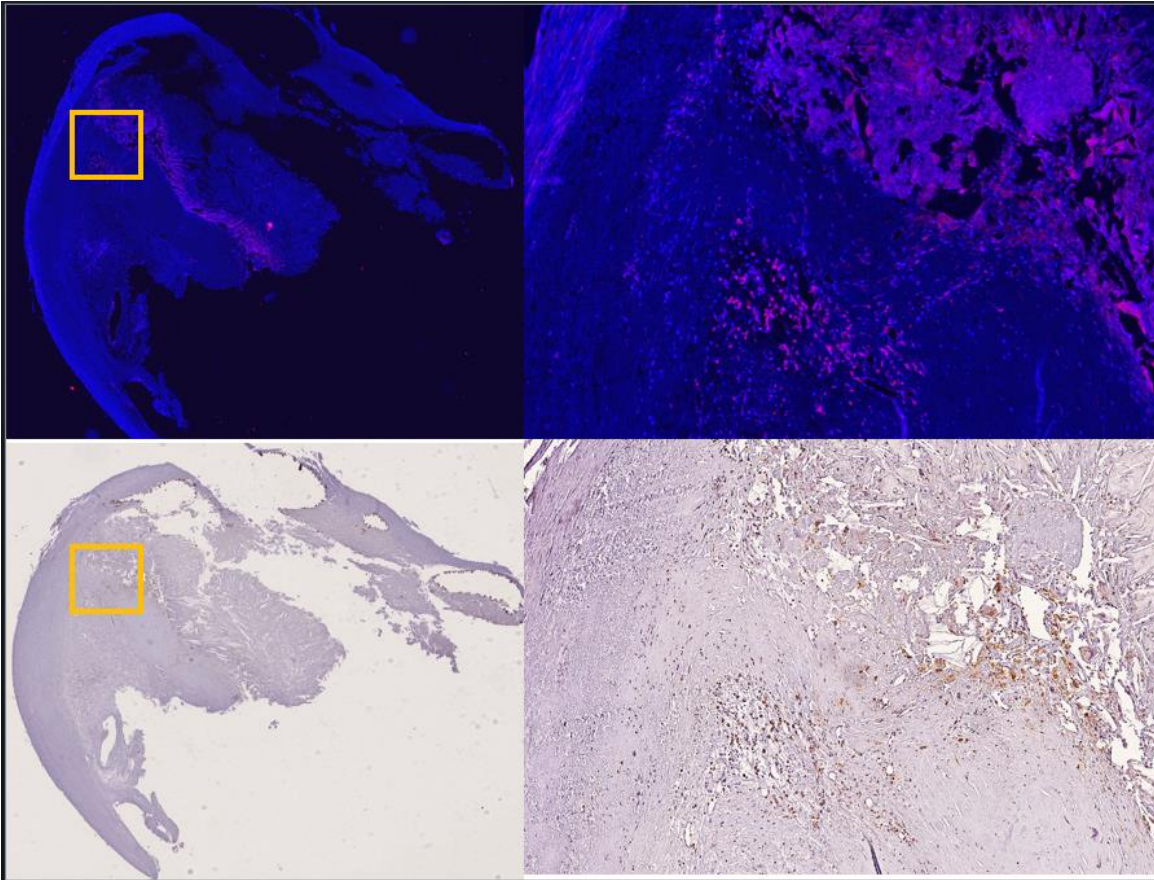


Kuva 2. Kaulavaltimoendarterektomianäyte, joka on hybridisoitu CY5 leimatulla PNA-universaalibakteerikoettimella (punainen väri) sekä DAPI-tumavärillä (sininen väri). 63-kertainen suurennos konfokaalimikroskoopilla. Aterooman reunalla nähdään immunopositiivisia alueita biofilmiksi sopien. Kuvan kirkkautta korotettu 40 %.



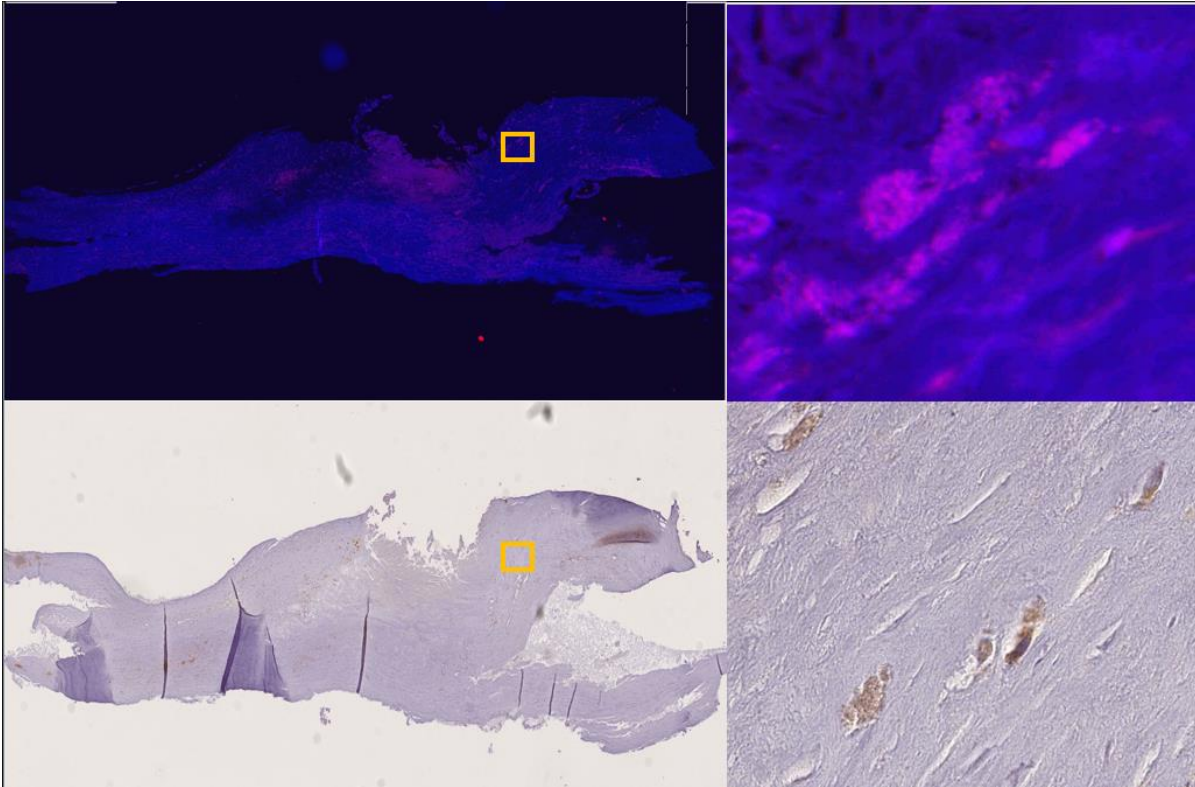
Kuva 3. Yläriivi: Kaulavaltimoendarterektomianäyte, joka hybridisoitu CY5 leimatulla PNA-universaalibakteerikoettimella (punainen väri) sekä DAPI-tumavärillä (sininen väri). Kuvan kirkkautta korotettu 40 %.

Alarivi: Kaulavaltimoendarterektomianäyte, joka värjätty CD45 vasta-aineella (ruskea väri). CD45 on yleismarkkeri leukosyyteille. Vasta-aine värjää samat alueet kuin PNA koetin.



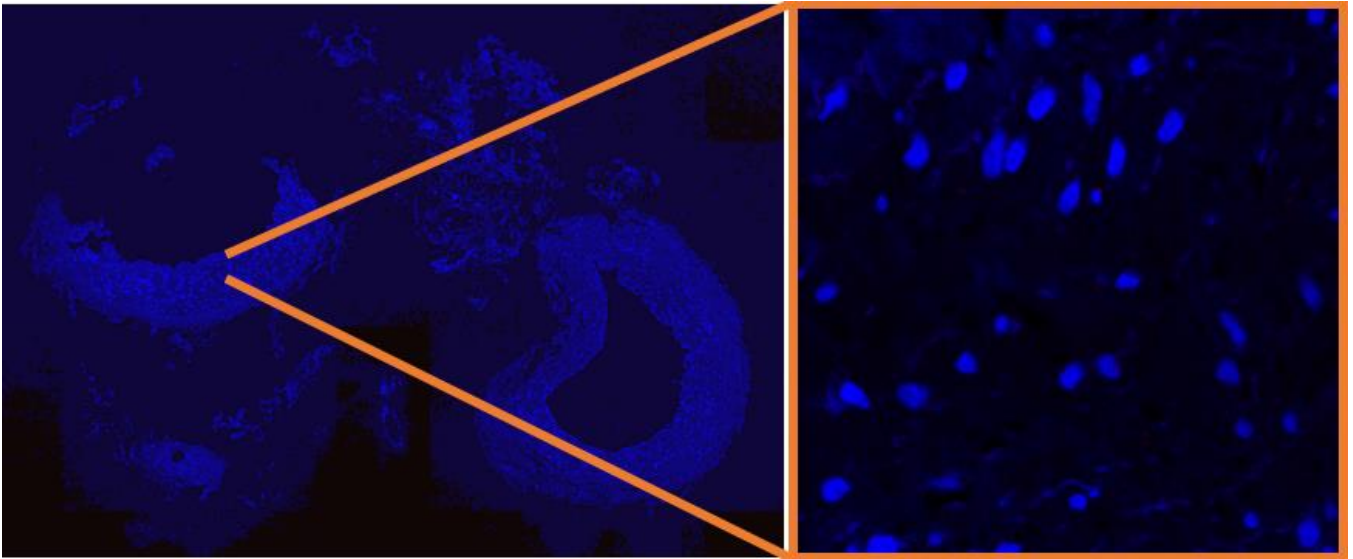
Kuva 4. Yläriivi: Kaulavaltimoendarterektomianäyte, joka hybridisoitu CY5 leimatulla PNA-universaalibakteerikoettimella (punainen väri) sekä DAPI-tumavärillä (sininen väri). Kuvan kirkkautta korotettu 40 %.

Alarivi: Kaulavaltimoendarterektomianäyte, joka värjätty *Streptococcus mitis*, *sanguinis* ja *gordonii* vasta-ainecoctaililla (ruskea väri). Streptokokki vasta-aine ja universaalibakteerikoetin kiinnittyvät samoille alueille

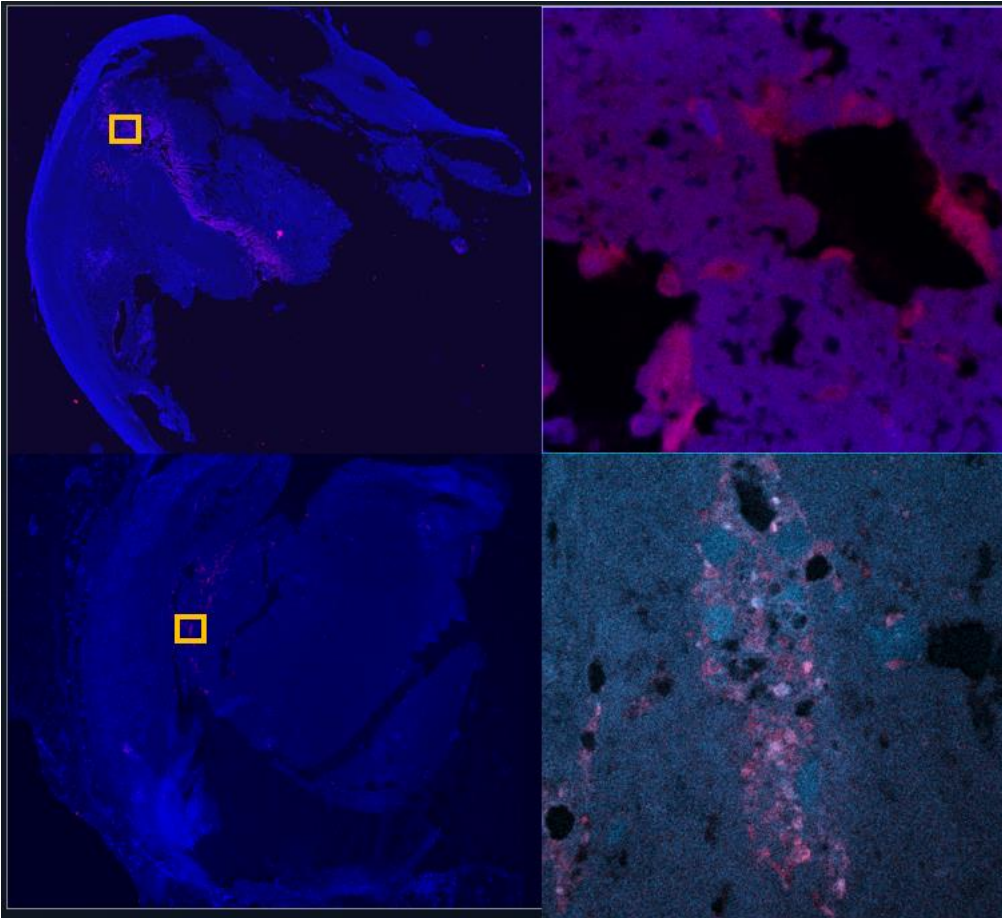


Kuva 5. Yläriivi: Kaulavaltimoendarterektomianäyte, joka hybridisoitu CY5 leimatulla PNA-universaalibakteerikoettimella (punainen väri) sekä DAPI-tumavärillä (sininen väri). 63 kertainen suurennos konfokaalimikroskoopilla. Kuvan kirkkautta korotettu 40 %.

Alariivi: Kaulavaltimoendarterektomianäyte, joka värjätty *Streptococcus mitis*, *sanguinis* ja *gordonii* vasta-aineella (ruskea väri). 63 kertainen suurennos.



Kuva 6. Arteria thoracica interna -näyte, joka hybridisoitu CY5 leimatulla PNA-universaalibakteerikoettimella (punainen väri) sekä DAPI-tumavärillä (sininen väri. 63 kertainen suurennos konfokaalimikroskoopilla.



Kuva 7. Yläriivi: Kaulavaltimoendarterektomianäyte, joka hybridisoitu CY5 leimatulla PNA-universaalibakteerikoettimella (punainen väri) sekä DAPI-tumavärillä (sininen väri). 63 kertainen suurennos konfokaalimikroskoopilla. Kuvan kirkkautta korotettu 40 %.

Alarivi: Negatiivinen kontrolli. Kaulavaltimoendarterektomianäyte, joka hybridisoitu DAPI-tumavärillä (sininen väri). Bakteerien autofluoresenssi nähtävissä kuvassa (punainen väri). 63 kertainen suurennos konfokaalimikroskoopilla. Kuvan kirkkautta korotettu 40 %.

LÄHTEET

1. Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res.* 2016 Feb 19;118(4):535-46. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307611. PMID: 26892956.
2. Bauersachs R, Zeymer U, Brière JB, Marre C, Bowrin K, Huelsebeck M. Burden of Coronary Artery Disease and Peripheral Artery Disease: A Literature Review. *Cardiovasc Ther.* 2019 Nov 26;2019:8295054. doi: 10.1155/2019/8295054. PMID: 32099582; PMCID: PMC7024142.
3. Criqui MH, Matsushita K, Aboyans V, Hess CN, Hicks CW, Kwan TW, McDermott MM, Misra S, Ujueta F; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention; Council on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health; Council on Peripheral Vascular Disease; and Stroke Council. Lower Extremity Peripheral Artery Disease: Contemporary Epidemiology, Management Gaps, and Future Directions: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation.* 2021 Aug 31;144(9):e171-e191. doi: 10.1161/CIR.0000000000001005. Epub 2021 Jul 28. Erratum in: *Circulation.* 2021 Aug 31;144(9):e193. PMID: 34315230.
4. Katan M, Luft A. Global Burden of Stroke. *Semin Neurol.* 2018 Apr;38(2):208-211. doi: 10.1055/s-0038-1649503. Epub 2018 May 23. PMID: 29791947.
5. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999 Jan 14;340(2):115-26. doi: 10.1056/NEJM199901143400207. PMID: 9887164.
6. Kovanen P et Pentikäinen M. Miten sepelvatimoiden ateroskleroosi kehittyy? *Kardiologia. Duodecim* 2016.
7. Linton MF, Yancey PG, Davies SS, et al. The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., eds. *Endotext.* South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; January 3, 2019.
8. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* 2011 May 19;473(7347):317-25. doi: 10.1038/nature10146. PMID: 21593864.
9. Beck JD, Pankow J, Tyroler HA, Offenbacher S. Dental infections and atherosclerosis. *Am Heart J.* 1999 Nov;138(5 Pt 2):S528-33. doi: 10.1016/s0002-8703(99)70293-0. PMID: 10539866.
10. Beck JD, Offenbacher S. The association between periodontal diseases and cardiovascular diseases: a state-of-the-science review. *Ann Periodontol.* 2001 Dec;6(1):9-15. doi: 10.1902/annals.2001.6.1.9. PMID: 11887476.
11. Song Z, Brassard P, Brophy JM. A meta-analysis of antibiotic use for the secondary prevention of cardiovascular diseases. *Can J Cardiol.* 2008;24(5):391-395. doi:10.1016/s0828-282x(08)70603-2
12. Illoh KO, Illoh OC, Feseha HB, Hallenbeck JM. Antibiotics for vascular diseases: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis.* 2005 Apr;179(2):403-12. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.10.034. Epub 2004 Dec 18. PMID: 15777560.

13. Andraws R, Berger JS, Brown DL. Effects of antibiotic therapy on outcomes of patients with coronary artery disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA*. 2005 Jun 1;293(21):2641-7. doi: 10.1001/jama.293.21.2641. PMID: 15928286.
14. Lehtiniemi J, Karhunen PJ, Goebeler S, Nikkari S, Nikkari ST. Identification of different bacterial DNAs in human coronary arteries. *Eur J Clin Invest*. 2005 Jan;35(1):13-6. doi: 10.1111/j.1365-2362.2005.01440.x. PMID: 15638814.
15. Pessi T, Karhunen V, Karjalainen PP, Ylitalo A, Airaksinen JK, Niemi M, Pietila M, Lounatmaa K, Haapaniemi T, Lehtimäki T, Laaksonen R, Karhunen PJ, Mikkelsen J. Bacterial signatures in thrombus aspirates of patients with myocardial infarction. *Circulation*. 2013 Mar 19;127(11):1219-28, e1-6. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001254. Epub 2013 Feb 15. PMID: 23418311.
16. Pyysalo MJ, Pyysalo LM, Pessi T, Karhunen PJ, Öhman JE. The connection between ruptured cerebral aneurysms and odontogenic bacteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013 Nov;84(11):1214-8. doi: 10.1136/jnnp-2012-304635. Epub 2013 Jun 12. PMID: 23761916.
17. Damir Vakhitov, Sari Tuomisto, Mika Martiskainen, Janne Korhonen, Tanja Pessi, Juha-Pekka Salenius, Velipekka Suominen, Terho Lehtimäki, Pekka J. Karhunen, Niku Oksala, Bacterial signatures in thrombus aspirates of patients with lower limb arterial and venous thrombosis, *Journal of Vascular Surgery*, Volume 67, Issue 6, 2018, Pages 1902-1907, ISSN 0741-5214.
18. Patrakka O, Pienimäki JP, Tuomisto S, Ollikainen J, Lehtimäki T, Karhunen PJ, Martiskainen M. Oral Bacterial Signatures in Cerebral Thrombi of Patients With Acute Ischemic Stroke Treated With Thrombectomy. *J Am Heart Assoc*. 2019 Jun 4;8(11):e012330. doi: 10.1161/JAHA.119.012330. PMID: 31117858; PMCID: PMC6585368.
19. Koren O, Spor A, Felin J, Fåk F, Stombaugh J, Tremaroli V, Behre CJ, Knight R, Fagerberg B, Ley RE, Bäckhed F. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 15;108 Suppl 1(Suppl 1):4592-8. doi: 10.1073/pnas.1011383107. Epub 2010 Oct 11. PMID: 20937873; PMCID: PMC3063583.
20. Ott SJ, El Mokhtari NE, Musfeldt M, et al. Detection of diverse bacterial signatures in atherosclerotic lesions of patients with coronary heart disease. *Circulation*. 2006;113(7):929-937. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.579979
21. Mitra, S , Drautz-Moses, DI, Alhede, M et al. (2015) In silico analyses of metagenomes from human atherosclerotic plaque samples. *Microbiome*, 3 (1). 38. ISSN 2049-2618
22. Malic S, Hill KE, Hayes A, Percival SL, Thomas DW, Williams DW. Detection and identification of specific bacteria in wound biofilms using peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization (PNA FISH). *Microbiology (Reading)*. 2009 Aug;155(Pt 8):2603-2611. doi: 10.1099/mic.0.028712-0. Epub 2009 May 28. PMID: 19477903.
23. Koren O, et al.. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis.*Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108 (suppl 1):4592–4598.
24. Lanter BB, Sauer K, Davies DG. 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.
25. Høiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35 322–332
26. Eickhardt S, Kragh KN, Schrøder S, Poulsen SS, Sillesen H, Givskov M, Høiby N, Bjarnsholt T, Alhede M. Autofluorescence in samples obtained from chronic biofilm infections--"all that glitters is not gold". *Pathog Dis*. 2015 Jun;73(4):ftv012. doi: 10.1093/femspd/ftv012. Epub 2015 Feb 5. PMID: 25663346.
27. Mitchinson MJ, Hothersall DC, Brooks PN, De Burbure CY. The distribution of ceroid in human atherosclerosis. *J Pathol*. 1985 Feb;145(2):177-83. doi: 10.1002/path.1711450205. PMID: 3973770.
28. Perrotta I. Occurrence and characterization of lipofuscin and ceroid in human atherosclerotic plaque. *Ultrastruct Pathol*. 2018 Nov-Dec;42(6):477-488. doi: 10.1080/01913123.2018.1544953. Epub 2018 Nov 22. PMID: 30465462.

29. Lennon AM, Buchalla W, Brune L, Zimmermann O, Gross U, Attin T. The ability of selected oral microorganisms to emit red fluorescence. *Caries Res.* 2006;40(1):2-5. doi: 10.1159/000088898. PMID: 16352873.
30. van der Veen MH, Thomas RZ, Huysmans MC, de Soet JJ. Red autofluorescence of dental plaque bacteria. *Caries Res.* 2006;40(6):542-5. doi: 10.1159/000095655. PMID: 17063027.
31. Tolker-Nielsen T. Biofilm Development. *Microbiol Spectr.* 2015 Apr;3(2):MB-0001-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014. PMID: 26104692.
32. Volgenant CM, Hoogenkamp MA, Krom BP, Janus MM, Ten Cate JM, de Soet JJ, Crielaard W, van der Veen MH. Red and Green Fluorescence from Oral Biofilms. *PLoS One.* 2016 Dec 20;11(12):e0168428. doi: 10.1371/journal.pone.0168428. PMID: 27997567; PMCID: PMC5173178.
33. Htun NM, Chen YC, Lim B, Schiller T, Maghzal GJ, Huang AL, Elgass KD, Rivera J, Schneider HG, Wood BR, Stocker R, Peter K. Near-infrared autofluorescence induced by intraplaque hemorrhage and heme degradation as marker for high-risk atherosclerotic plaques. *Nat Commun.* 2017 Jul 13;8(1):75. doi: 10.1038/s41467-017-00138-x. PMID: 28706202; PMCID: PMC5509677.