

ВРОДЖЕНИЙ ІМУНІТЕТ ТА СТАН МІКРОБІОМ У ХВОРИХ НА АКНЕ.

Фоміна Л.В.

Харківський Національний Медичний Університет

Ключові слова: акне, імунітет, мікробіом.

В останні роки з'являються роботи, які вивчають людський мікробіом (мікроорганізми, які живуть на шкірі, слизових оболонках, в просвіті кишечника) і його роль в розвитку хронічних запальних захворювань шкіри, таких як акне, розацеа, atopічний дерматит, себорейний дерматит [1]. У статті представлені нові дані про мікробіома шкіри, природженому імунітет і нові патофізіологічні механізми запального процесу при вульгарному акне. В кінці наведені результати *in vitro*, *ex vivo* і *in vivo* досліджень впливів на мікробіом і мікробіопленку патогенних риботіпов *P. acnes*, що призвели до істотного поліпшення стану 34 пацієнтів з вульгарним акне.

Шкіра являє собою складну середовище проживання для величезної кількості мікроорганізмів (близько 1 млн на 1 см²) - бактерій, вірусів, грибів і навіть кліщів, таких як *Demodex*. Це друга за чисельністю мікробіота після травного тракту і набагато менш вивчена. Мікробіота формується при народженні, залежить від фізіологічних особливостей господаря, адаптується до різних типів шкіри і навіть до різних ділянок шкіри: вологим (наприклад, пахви, пахощі складки), жирним, з великою кількістю сальних залоз (лоб, крила носа) і сухим (таким як руки і ноги).

25% мікробіоти мешкає глибоко в товщі шкіри. Тут вміст кисню становить всього лише 3%, що сприяє розвитку мікроаерофільних або анаеробних бактерій, таких як *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*). *P. acnes* належить до сімейства *Propionibacterium*, яке включає 13 видів, з них 4 вважаються основними. Це створюють спор та є пептидогліканові грам-позитивні бактерії. Палички нерухомі і не мають капсули. Залежно від штаму *P. acnes* вельми сильно розрізняються по переносимості кисню. В анаеробних умовах, наприклад, в сально-волосяному фолікулі, утворюють пропіонову кислоту.

У геномі of *P. acnes* міститься велика кількість гуаніну і цитозину G-C - до 60%. Детальне вивчення генотипу *P. acnes* дозволило виділити 4 їх філотипа: IA, IB, II і III. До типу IA відносять більшість штамів, асоційованих з помірними і тяжкими формами акне [1, 2], що змушує задуматися про те, чи не має зв'язку між певними штамми і тяжкістю перебігу акне.

P. acnes може надавати і захисну дію на шкіру. Наприклад, утворення пропіонової кислоти знижує рН і таким чином захищає

сально-волосяний фолікул від патогенів. Але *P. acnes* може бути і умовно патогеним мікроорганізмом, як при акне, гнійному гідроденіті, остеомієліті або синдромі SAPHO (синовіїт, акне, пустульоз, гіперостоз, остит).

Послідовність подій у розвитку вульгарного акне включає гіперпродукцію шкірного сала, поступового ве обсіменіння мікроорганізмами сально-волосяного фолікула, що приводить до закупорки сальної залози. Падіння вмісту кисню посилює розмноження

P. acnes з розвитком запалення і навіть рубцюванням. Це явище пов'язане як з біоплівки, так і з продукцією вірулентних факторів.

Патогенетична активація *P. acnes* залежить від екзогенних факторів, таких як демографічні (вік, стать та ін.), Генетичні, фактори навколишнього середовища, а також від поведінкових особливостей (особиста гігієна та ін.). Більш того, андрогени впливають на контроль освіти себума. Велику роль відіграють також ендогенні чинники, оскільки бактерії спілкуються між собою за допомогою сигналів.

Це називається quorum sensing - дистанційні мікроб-мікробні взаємодії. Так, *P. acnes* утворює свій аутоіндукторів-2 (AI-2), який, схоже, залучений в освіту біоплівки. Грампозитивні бактерії теж, як правило, спілкуються за допомогою пептид- посередників, хоча для *P. acnes* це поки не доведено.

Вірулентність *P. acnes* виникає з цих комунікаційних систем, при цьому не важливо, чи йде мова про контактної вірулентності або про секретується фактор вірулентності. Вироблення Sec- і Tat-опосередковуваних протеїнів *P. acnes* призводить до дифузії факторів вірулентності, таких як гідролітичні ензими, токсини і адгезини. Аналіз секретома *P. acnes* дозволяє вивчати його дифундує вірулентність. Кількість білків в ньому змінюється і залежить від типу *P. acnes*. Тим не менше 8 білків притаманні всіх штамів, а ще 20 секретуються більшістю з них. Серед цих загальних білків найбільш потужним фактором вірулентності є тріацілгліцеролліпаза (GehA), когемолітичні ензими (cAMP), необхідні для утворення пір в мембрані бактерій, і гліцеральгід-3-фосфатдегідрогенази (GAPDH), впливають на адгезію. Культуральне середовище та мікрооточення роблять значний вплив на природу і кількість синтезованих білків.

Іншою формою вірулентності *P. acnes* служить поява біоплівки. В кінцевому підсумку вона може служити причиною формування антибіотикорезистентності.

P. acnes відрізняється істотним генетичним різноманіттям. Її різні типи IA, IB, II і III мають велику стабільну основну частину генома, загальну для всіх штамів, і 8 змінних кластерів: BCN (синтез бактеріоцини); Нуа (гіалуронідаза); Thio (синтез тіо Петілія); NRPS (нерибосомальна пептид-синтетаза); Phage (профаг); Sugar

(поглинання і руйнування цукру); CRISPR (короткі паліндромні повтори, регулярно розташовані групами); TAD (щільна адгезія). За деякими з цих кластерів, наприклад CRISPR, можна судити про зміни *P. acnes*, які можуть швидко за рахунок часткової делеції перейти з II в III тип, а також в I шляхом делеції.

У метагеномного дослідженні вивчали характеристики мікробіоти волоссяних фолікулів носа у 49 пацієнт з вульгарним акне і 52 здорових людей. Було виявлено, що *P. acnes* домінує у пацієнтів з вульгарне акне (87% клонів) [3]. У той же час ніяких статистично значущих відмінностей в концентрації *P. acnes* у пацієнтів з вульгарним акне в порівнянні зі здоровими людьми не виявлено. Виникає питання, чи не пов'язані можливі відмінності з самими штамами швидше, ніж з їх кількістю. Аналіз риботіпов (РТ) дозволив виділити 10 основних риботіпов серед 60 клонів, при цьому деякі клони асоціювалися з нормальною шкірою або шкірою з вульгарним акне.

У наступних індивідуальних дослідженнях визначалося процентну кількість кожного риботіпа в мікробіома *P. acnes*. З'ясувалося, що у пацієнтів з вульгарним акне переважають РТ4 і РТ5 [1-3]. Повне секвенування генома 71 штаму *P. acnes* показало, що РТ4 і РТ5 різні і асоціюються з фенотипом вуль- гарних акне [3].

Для визначення значущих для бактерій факторів, що впливають на зростання, формування біоплівки, вірулентність і сприйнятливість до активних компонентів, штами *P. acnes* з невстановленими риботіпами вивчали методом конфокальної мікроскопії з фарбуванням кристалвіолетом. Цим же способом визначали вплив оригінального полісахариду, отриманого біотехнологічним методом, на зростання штамів в середовищі ВНІ. Показано відсутність дії полісахариду на ріст і вірулентність, дозозалежне пригнічення утворення біоплівки і відсутність цитотоксичності *P. acnes* на кератиноцити HaCaT.

В іншому дослідженні [4] штами *P. acnes* РТ4 і РТ5 піддавалися впливу і полісахариду, і термальної води Урьяж в різних концентраціях. Суттєвого впливу на ріст бактерій не виявлено. Вивчення утворення біоплівки за допомогою фарбування кристалвіолету, навпаки, показало, що культуральне середовище грає тут важливу роль.

Поява біоплівки *P. acnes* РТ4 і РТ5 зменшується в присутності термальної води Урьяж. Застосування змінного лазерного конфокального мікроскопа дозволило показати значне зменшення товщини, біомаси і поверхні біоплівки *P. acnes* РТ4. Такі ж результати були отримані для РТ5.

Нарешті, дослідження цитотоксичності РТ4 і РТ5 в присутності термальної води Урьяж, полісахариду і їх комбінації, показало, що *P. acnes* філотипу ІА РТ4 і РТ5 насправді не цитотоксичне, і що ні термальна вода Урьяж, ні полісахарид не впливають на цю

цитотоксичність. Результати цих різних досліджень дозволяють зробити висновок, що PT4 і PT5 філотіпа IA *P. acnes* розвиваються під біоплівки в сально-волосяному фолікулу. Ці штами, чітко пов'язані з розвитком акне, відрізняються високими метаболічними потребами, і їх здатність утворювати біоплівки може бути істотно і специфічно зменшена термальною водою Урьяж.

Вроджений імунітет при вульгарних вуграх

Вульгарні вугри - поширене захворювання, яким страждають від 5 до 6 млн осіб у Європі. Воно також є найчастішою причиною звернення до дер-матологу.

У порівнянні з іншими захворюваннями шкіри вульгарні вугри можуть здатися досить тривіальним захворюванням, але воно порушує якість життя і стає важким тягарем для 20% пацієнтів. У 15% з'являються ознаки депресії, хоча кореляції між тяжкістю акне і розвитком депресії немає. Нарешті, 30% пацієнтів вважають вульгарне акне своїм головною проблемою - за цим критерієм акне випереджає багато хронічних захворювань, такі як, наприклад, астма [4].

У дослідженні [5] вивчали фактори ризику розвитку вульгарних вугрів. Спадкова схильність посіла перше місце, збільшуючи ризик захворювання в 3 і в 9 разів, якщо один або обоє батьків страждали вульгарним акне відповідно. Аналіз дієти пацієнтів виявив зв'язок між вульгарним акне і вживанням молока, шоколаду і цукру. Куріння, мабуть, знижує ризик захворювання вульгарним акне.

На поверхні шкіри живе безліч мікроорганізмів. Утворюється складна система, де взаємодії шкірний бар'єр, мікробіота і вроджений імунітет. *P. acnes* воліє жирні ділянки шкіри, що відповідає найбільш схильним до акне місцях, особливо спину і особа у чоловіків і підборіддя у дорослих жінок.

Патофізіологія акне - результат складного взаємодії дії між сально-волосяних фолікулом, гіперкератинізацією (відповідальної за утворення комедонів і мікрокіст), гіперсебореєю (підсилює проліферацію *P. acnes*) і вродженим імунітетом, який запускає запалення шляхом викиду інтерлейкінів.

Ключовою ланкою у взаємодії між мікробіотою і вродженим імунітетом є toll-подібні рецептори (TLR). Це трансмембранні протеїни, присутністю в організмі з давніх часів. З 13 типів TLR, що знаходяться в шкірі людини, TLR2 і TLR4 особ але задіяні в розвитку вульгарного акне.

TLR2 розпізнають глікопептиди (продукти життєдіяльності *P. acnes*), активуються і запускають запальну реакцію, клінічно виявляється елементом вульгарного акне: папулами, пустулами, вузликами і кістами. Інші бактерії, гриби, віруси також можуть активувати TLR, хоча кожен раз ця активація про- виходить специфічним для типу рецепторів і мікроорганізму чином. *P. acnes*

активує TLR2 на кератиноцит, приводячи до викиду інтерлейкінів (IL-1 β , IL-8) і TNF α , запускаючи каскад запальних реакцій. У той же час посилюється синтез антимікробних пептидів, справжніх природних антибіотиків - β -дефенсин і кателіцидинів.

TLR2 беруть участь в регуляції IL-1 β в присутності *P. acnes*. При наявності блокуючих TLR2 моноклональних антитіл секреція IL-1 β і запалення пригнічуються, що може в майбутньому стати поштовхом до нових терапевтичних підходах в лікуванні вульгарного акне.

Утворюється при цьому інфламасоми також має свої особливості: це складний запальний каскад. *P. acnes* індукує експресію генів інфламасом NLRP1 і NLRP3 в моноцитах людини.

Таким чином, вульгарне акне є складним запальним захворюванням з участю специфічного мікробіома, PT4 і PT5 *P. acnes*, особливу агрес-пасивного і адгезивну мікробіопленку, TLR2, інфламасому і IL-1 β , а також антимікробні пептиди.

Нові терапевтичні підходи в дерматокосметології

Всі мікроорганізми тіла людини, мікробіота шкіри, слизові оболонки ротової порожнини, геніталій, очей, слини, секрету залоз статевих органів і навіть травного тракту живуть в особливому середовищі - мікробіома. З 2005 року, коли був секвенірований геном *P. acnes*, встановлено, що філотип IA і його PT4 і PT5 домінують в мікробіоплівці пацієнтів з акне. PT4 і PT5 мають більшу вірулентність і адгезивними властивостями.

Зміни в природних бар'єрах шкіри - будь то мікробіом, система вродженого імунітету або структурний бар'єр - грають ключову роль в патофізіологічних механізмах акне. Зміни в мікробіомі *P. acnes* веде до формування агресивної біоплівки, що відповідає за стійкість і адгезивні властивості бактерій. Це в свою чергу взаємодіє, з одного боку, з процесами гіперкератинізацію і гіперсеборею із запальною відповіддю вродженого імунітету з іншого.

У дослідженнях *in vitro*, *ex vivo* і в клінічному дослідженні оцінювали різні активні комплекси MPA- Regul™, TLR2-Regul™ і Iseac 3-Regul® [4]. Мета дослідження були подвійні:

- спостереження за освітою мікробіоплівки *P. acnes* PT4 і PT5;
- оцінка ефекту активного компонента природного походження, MPA-Regul™ (рослинний полісахарид, багатий глюконовою кислотою + термальна вода Ур'яж) на цитотоксичність і адгезивні властивості *P. acnes* PT4 і PT5.

Мікробіоплівку штамів *P. acnes*, отриману із сально-волосяних фолікулів нелікованих пацієнтів з акне (контрольна група) або отримували MPA- Regul™ в різних концентраціях (0,1; 0,5 і 1%), поміщали на предметне скло і вивчали через 24, 48 і 72 ч методом флюоресцентної конфокальної мікроскопії. Зростання штамів *P. acnes* PT4 і PT5 оцінювали в культурі на мікрочашках за допомогою

терморегулюючого мультифокального датчика. Нарешті, цитотоксичність *P. acnes* PT4 і PT5 досліджували на кератиноцитах HaCat, вимірюючи вміст дегідрогенази в культуральному середовищі після загибелі клітин, викликаній бактеріальними штамами. Цитотоксичність PT4 і PT5 оцінювали також в присутності активного комплексу MPA-Regul™ в різних концентраціях.

Результати показують дозозалежне придушення мікробіоплівки *P. acnes* PT4 і PT5 в присутності MPA-Regul™ в концентраціях 0,1; 0,5 і 1% (рис. 5, см. На стор. 276). При використанні методу флюоресценції в мікрочашках інтенсивність покриття поверхні зменшувалася через 24, 48 і 72 ч (при цьому товщина біоплівки залишалася колишньою). Цитотоксичність і вірулентність *P. acnes* PT4 і PT5 не змінювалися. Хоча *P. acnes* типу IA риботіпов PT4 і PT5 здатні утворювати великі мікробіоплівки (ці риботіпи домінують при найбільш важких формах вульгарного акне), вони не виявляють значну цитотоксичність *in vitro* на кератиноцитах HaCat в порівнянні з іншими типами *P. acnes*. Така відмінність у *in vivo* - *in vitro* вірулентності (культуральні середовища ВНІ і RCM) може бути пов'язано з додатковими факторами *in vivo*: множе-недержавні взаємодії в мікробіомі, метаболічні зміни («життя планктону») в цій біоплівці; вимірювання кількості і якості шкірного сала; взаємодія з TLR2 і TLR4, дія антимікробних пептидів, особливо β-дефенсин 2 (hBD2).

Ex vivo. Перше дослідження *ex vivo* фокусувалося на TLR і було направлено на оцінку модулюючого впливу наслідком на TLR2 і на визначення концентрації IL-8 і β-дефенсин 2 (hBD2) на експлантованій шкірі людини в присутності *P. acnes* і TLR2-Regul™ комплексу. Цей комплекс складається з натурального рослинного екстракту (сімейство зонтичних) і амфільних ліпідів (C18-Н39-NO3).

У другому дослідженні *ex vivo* в центрі уваги була гіперсеборея і оцінка ефектів Iсеак 3-Regul® на секрецію шкірного сала на експлантованій шкірі, стимульованих розиглітазоном. Аналіз результатів, проведений з допомогою оптичного мікроскопа в 1-й і 8-й дні експериментальних та показав зниження кількості себума (червоного кольору) в порівнянні з контролем.

В останньому подвійному сліпому рандомізованому клінічному дослідженні порівнювали клінічну ефективність і переносимість двох емульсій «масло у воді» в групі з 34 пацієнтів з акне (21 жінка і 13 чоловіків), середній вік 27 років:

- Iсеак 3-Regul® крем: MPA-Regul™ 1% + АНА + TLR2-Regul™ + тву: емульсія А;
- дерматокосметичний крем з АНА + заспокійливі агенти: емульсія В.

Пацієнти відповідали наступним критеріям: дорослі пацієнти (старше 18 років) з помірним поліморфним акне (2-3 бали за шкалою

GEA). Емульсію А чи В наносили 2 рази на день протягом 2 міс. Оцінка включала клінічне обстеження з підрахунком загальної кількості і типуванням елементів акне, себометрію (на 1-й, 28-й і 56-й дні) і вимір жирного блиску шкіри чола, а також аналіз фотографій. Тест на переносимість та самооцінку проводили на 28-й і 56-й дні.

Представлені результати підрахунку загальної кількості елементів акне, ретенційних і запальних елементів. Клінічне дослідження показало зниження на 86% жирного блиску на лобі при застосуванні крему Ісеак 3-Regul® в період між початком і 28-м днем дослідження.

При вимірі глоссіметром той же параметр зменшився на 18% через 4 години після одноразового нанесення, а себометрія показувала зниження на 23% до 56-го дня. Розміри пір скоротилися на 42% до 28-го дня і на 75% до 56-го дня дослідження.

Підводячи підсумок різноманітних досліджень, можна зробити висновок про дозозалежне зниження мікробіоплівки, утвореної *P. acnes* PT4 і PT5 під дією активного комплексу МРА-Regul™. Клінічне дослідження показує перевагу крему Ісеак 3-Regul® порівняно з кремом, що містить тільки АНА. Ці результати ставлять Ісеак 3-Regul® в ряд засобів першого вибору при акне або разом з антибіотиками, або в якості підтримуючого догляду при помірному поліморфному акне.

Література.

1. Lomholt H.B., Kilian M. Population genetic analysis of *Propionibacterium acnes* identifies a subpopulation and epidemic clones associated with acne. *PLoS One*. 2010; 5(8): e12277. doi: 10.1371/journal.pone.0012277.
2. Brzuszkiewicz E., Weiner J., Wollherr A., Thurmer A., Hupeden J., Lomholt H.B., et al. Comparative genomics and transcriptomics of *Propionibacterium acnes*. *PLoS One*. 2011; 6(6):e21581. doi: 10.1371/journal.pone.0021581.
3. Fitz-Gibbon S., Tomida S., Chiu B.H., Nguyen L., Du C., Liu M., et al. *Propionibacterium acnes* strain populations in the human skin microbiome associated with acne. *J. Invest. Dermatol.* 2013; 133(9): 2152–60. doi: 10.1038/jid.2013.21.
4. Wolkenstein P., Grob J.J., Bastuji-Garin S., Ruzsyczynski S., Roujeau J.C., Revuz J.; Société Française de Dermatologie. French people and skin diseases: results of a survey using a representative sample. *Arch. Dermatol.* 2003; 139(12): 1614–9.
5. Di Landro A., Cazzaniga S., Parazzini F., Ingordo V., Cusano F., Atzori L., et al.; GISED Acne Study Group. Family history, body mass index, selected dietary factors, menstrual history, and risk of moderate to severe acne in adolescents and young adults. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2012; 67(6): 1129–35. doi: 10.1016/j.jaad.2012.02.018.

ВРОЖДЕННЫЙ ИММУНИТЕТ И СОСТОЯНИЕ МИКРОБИОМЫ У БОЛЬНЫХ С АКНЕ.

Фомина Л.В.

В данной статье представлены новые данные о микробиоме кожи с вульгарным акне, врожденном иммунитете при дерматозе и некоторые новые патофизиологические механизмы воспалительного процесса, а также результаты *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* исследований воздействий на молекулярные структуры микробиома и микробиопленки патогенных риботипов *P. acnes*, приведших к существенному улучшению состояния 34 пациентов с вульгарным акне.

INHERENCE IMMUNITY AND MICROBIOMA CONDITION IN PATIENTS WITH ACNE.

Fomina LV

This article presents new data on the microbiome of skin with acne vulgaris, innate immunity in dermatosis and some new pathophysiological mechanisms of the inflammatory process, as well as the results of *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* studies of the molecular structures of the microbiome and biofilms of pathogenic ribotypes *P. acnes*, which led to a significant improvement in 34 patients with acne vulgaris.