

## Роль антителогенеза в формировании резистентности к препаратам ботулотоксина А в эстетической практике

Т.Н. Королькова<sup>1</sup>, В.О. Матыцин<sup>1</sup>, А.М. Иванов<sup>2</sup>, Т.Г. Довбешко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Кафедра косметологии (зав. — проф. Т.Н. Королькова) ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург; <sup>2</sup>кафедра клинической биохимии и лабораторной диагностики (зав. — проф. А.М. Иванов) ГБОУ ВПО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

*Инъекции препаратов ботулотоксина А в эстетической медицине являются одной из наиболее часто выполняемых процедур. Ботулотоксин А — протеин, основным механизмом элиминации которого из организма является антителогенез. Поэтому образование антител, специфичных к препаратам ботулотоксина А, может стать причиной неэффективности ботулинотерапии. Однако не все авторы связывают развитие резистентности к ботулинотерапии с антителогенезом. В работе применен оригинальный метод определения антител к препаратам ботулотоксина А, основанный на иммуоферментном анализе. Антитела к препаратам ботулотоксина А обнаружены у 64% лиц из 119 обследованных пациентов (114 женщины и 5 мужчин), средний возраст 40 ± 9 лет, получавших ботулинотерапию по эстетическим показаниям в низких дозах (диспорт от 60 до 200 ЕД, ботокс от 20 до 100 ЕД). При этом антитела у пациентов были выявлены как при наличии хорошего эффекта терапии, так и при его отсутствии. Также антитела к препаратам ботулотоксина А были обнаружены у 24% здоровых доноров, ни разу не контактировавших с ботулотоксином. Результаты исследования показали, что антителогенез может влиять на эффективность ботулинотерапии, снижая ее. Однако влияние антителогенеза, вероятно, является не основным и может быть взаимосвязано с иными факторами, требующими дальнейшего изучения.*

Ключевые слова: ботулотоксин А, антитела, антителогенез, резистентность к ботулотоксину

### ROLE OF ANTIBODY PRODUCTION IN THE FORMATION OF RESISTANCE TO BOTULOTOXIN A DRUGS

T.N. Korolkova<sup>1</sup>, V.O. Matytsin<sup>1</sup>, A.M. Ivanov<sup>2</sup>, T.G. Dovbeshko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cosmetology, I.I. Metchnikov North Western State Medical University, S. Petersburg, Russia; <sup>2</sup>Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnosis, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia

*Injections of botulotoxin A are among the most frequently used procedures in esthetic medicine. Botulotoxin A is a protein, the main mechanism of its elimination is antibody production. Hence, the production of antibodies specific to botulotoxin drugs can become the cause of botulin therapy inefficiency. However, some authors claim that the development of botulin therapy resistance is not caused by antibody production. An original method for detection of antibodies to botulotoxin A drugs is suggested, based on enzyme immunoassay. Antibodies to botulotoxin A were found in 64% of 119 patients (114 women and 5 men, mean age 40 ± 9 years), who received low-dose botulin therapy for esthetic indications (disport 60—200 Units, botox 20—100 Units). Antibodies were found in patients with good effect and with failure of therapy. Antibodies to botulotoxin A were also found in 24% donors without history of contacts with botulotoxin. The results indicate that antibody production is a factor essential for the efficiency of botulin therapy, as it can reduce its efficiency. However, antibody production is presumably not the main factor and not the only one, and further studies are needed to detect these other factors.*

Key words: botulotoxin A; antibodies; antibody production; botulotoxin therapy

Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (Food and Drug Administration, FDA) в 2002 г. одобрило использование препарата ботулотоксина А для применения в косметологии "с целью временного улучшения морщин, от умеренных до выраженных, появившихся в области надпереносья, связанных с активностью *musculus corrugator* и/или *m. procerus* у взрослых пациентов". С тех пор

в эстетической медицине ботулинотерапия все более активно применяется и спектр ее применения расширяется [1, 2].

Однако каждый раз косметолог не совсем уверен в ожидаемом результате лечения, особенно в его продолжительности. Случаи отсутствия результатов ботулинотерапии встречаются во врачебной практике. Так, из 995 косметических случаев с легкими побочными эффектами или осложнениями недостаточ-

Сведения об авторах:

Королькова Татьяна Николаевна — доктор мед. наук, профессор; Матыцин Вячеслав Олегович — кандидат мед. наук (matitsin@list.ru); Иванов Андрей Михайлович — доктор мед. наук, профессор; Довбешко Татьяна Григорьевна — ассистент.

ный косметический эффект отмечался у 623 (63%) пациентов [2].

Считается, что к неэффективности применения ботулотоксина А могут приводить: нечеткое определение цели лечения, ошибки при оценке показаний к проведению терапии у конкретного пациента, при выборе мышц-мишеней, а также другие технические погрешности, связанные с нарушениями в технике выполнения инъекции, поведение пациента (несоблюдение рекомендаций после проведения процедуры); использование недостаточной дозы токсина; несоблюдение условий хранения и транспортировки; индивидуальная редуцированная чувствительность к ботулотоксину [2, 3].

Проведенные Е. Ravichandran и соавт. [4] фармакокинетические исследования показали, что кровь с ее основными клетками и протеазами не связывает и не метаболизирует ботулотоксин. В крови не выявлено компонентов, каким-либо образом секвестрирующих токсин, доказано, что форменные элементы не способны связывать и накапливать ботулотоксин. Поэтому наиболее очевидным путем элиминации данного нейротоксина белковой природы представляется связывание его специфическими антителами.

Молекула ботулотоксина является крупным протеином, имеющим достаточное количество линейных и конформационных эпитопов. Многие, а возможно и все, эти эпитопы являются потенциальными сайтами связывания антител, способствующих удалению токсина из кровотока [5].

Таким образом, иммуногенные свойства токсина могут способствовать стимуляции продукции антител, потенциально приводя к дальнейшей неэффективности лечения. Минимальные дозы и режим проведения инъекций, способствующие развитию антителообразования, до конца не выяснены. Иммуногенность может зависеть от дозы, вводимой однократно; от накопленной дозы и от частоты инъекций; качества препарата; индивидуальных особенностей иммунной системы пациента [6]. Некоторые авторы указывают на развитие серорезистентности как на существенный недостаток ботулинотерапии, снижающий ее эффективность и заставляющий искать иные терапевтические подходы [7].

Однако не все авторы согласны с данным положением, существуют указания, что роль антител в формировании резистентности к ботулотоксину А является значимой, но не ведущей [8], что препараты ботулотоксина А обладают весьма низкой иммуногенностью [9], а частота образования антител к ботулотоксину А очень низка и чрезвычайно редко антителогенез может стать причиной неэффективности терапии [3].

Таким образом, вопрос о роли антителогенеза в формировании резистентности к препаратам ботулотоксина А, назначаемым по эстетическим показаниям, остается до конца не решенным.

Цель работы — анализ антителогенеза к препаратам ботулотоксина А у пациентов, резистентных к ботулинотерапии.

## Материалы и методы

В исследовании принимали участие 119 пациентов (114 женщин, 5 мужчин) в возрасте от 22 до 64 лет (средний возраст  $40 \pm 9$  лет), получавших ботулинотерапию по эстетическим показаниям, которым провели исследование на содержание в сыворотке крови антител к препаратам ботулотоксина А — ботоксу и диспорту. При анализе эффективности терапии выделили случаи ее низкой эффективности, исключив случаи некорректного введения препаратов ботулотоксина А.

Из сопутствующих заболеваний у пациентов в анамнезе преобладали аллергические реакции и некоторые хронические заболевания (гипотиреоз, гинекологические заболевания). Таким образом, испытуемые основной группы были практически здоровыми, более половины из них вели активный образ жизни, регулярно занимались физкультурой, алкоголем не злоупотребляли, лишь некоторые пациенты курили.

Пациентам выполняли инъекции препаратов ботулотоксина А в мимические мышцы проблемных зон, используя низкие дозы: диспорт от 60 до 200 ЕД и ботокс от 20 до 100 ЕД.

Клинический эффект ботулинотерапии оценивали по международной шкале GAIS (Global Aesthetic Improvement Scale), разработанной для объективной и субъективной оценки результатов косметических процедур (табл. 1).

Для удобства обработки результатов оценку эффективности модифицировали: пациентов с отсутствием эффекта (0 баллов) и со слабым непродолжительным эффектом (1 балл) объединили в общую группу и присвоили 1 балл. Таким образом, все пациенты были разделены на 3 группы:

- группа с высокой эффективностью ботулинотерапии — 70 человек (3 балла);
- группа с умеренной эффективностью ботулинотерапии — 27 человек (2 балла);
- группа с низкой эффективностью либо отсутствием эффекта ботулинотерапии — 22 человека (1 балл).

Группа контроля состояла из 33 человек (32 женщины, 1 мужчина) в возрасте от 23 до 60 лет (средний возраст  $31 \pm 8$  лет), никогда не получавших инъекции препаратов ботулотоксина А. Данные лица были практически здоровыми.

У всех пациентов основных и контрольной групп выявляли наличие антител к препаратам ботулотоксина (ботокс и диспорт) методом твердофазного иммуноферментного анализа. Данный метод был разработан в НИИ передовых технологий Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург) и апробирован в настоящей работе. Определяли экстинкцию сыворотки пациента, инкубированной в лунке с фиксированным соответствующим препаратом ботулотоксина, после чего рассчитывали коэффициент позитивности (P/N), представляющий собой отношение экстинкции изучаемой сыворотки к экстинкции отрицательного контроля. Положительными на наличие антител к препаратам ботулотоксина считали исследуемые образцы сывороток при значениях P/N не менее 2.

Статистический анализ результатов исследования выполняли с использованием пакетов Microsoft Excel и статистических программ Statistica 6. Обработка результатов включала в себя первичный статистический анализ, непараметрические тесты сравнения выборок (критерий Манна—Уитни), а также непараметрическую гамма-корреляцию.

## Результаты и обсуждение

В современной медицинской практике применяется ряд препаратов ботулотоксина А, выпускаемых разными производителями. Эти препараты отличаются процессами их производства, штаммами используемых бактерий, степенью очистки, способами стабилизации, биологической активностью, а следовательно, различаются и свойства препаратов, в частности их биологическая активность. Соответственно, различаются иммунологические характеристики препаратов, в первую очередь антигенность и/или иммуногенность. Поэтому не ис-

Таблица 1

## Международная эстетическая шкала по улучшению внешнего вида (GAIS)

Балл	Оценка врачом	Оценка пациентом
3	Оптимальный косметический результат для данного пациента	Полностью удовлетворен результатом
2	Значительное улучшение, но не полная коррекция	Доволен результатом, но хотелось бы немного улучшить его
1	Улучшение, но необходима дополнительная коррекция	Улучшение незначительное, желательна дополнительная коррекция
0	Нет изменений, состояние такое же, как и до процедуры	Без изменений
-1	Ухудшение по сравнению с исходным состоянием	Состояние хуже, чем до проведения процедуры

ключено, что препараты ботулотоксина А от разных производителей будут стимулировать выработку разных антител, обладающих неодинаковой специфичностью к разным коммерческим препаратам. Соответственно, и вырабатываемые антитела могут по-разному влиять на активность разных препаратов ботулотоксина.

Данный этап работы посвящен выявлению антителогенеза к наиболее часто применяемым в эстетической медицине препаратам ботулотоксина А — ботоксу ("Allergan", США) и диспорту ("Ipsen", Франция).

Результаты обследования испытуемых на антитела к препаратам ботулотоксина представлены в **табл. 2**. Показано, что как у пациентов, получавших ботулинотерапию ранее, так и у лиц, ни разу не контактировавших с препаратами ботулотоксина, возможно наличие антител в крови. Причем антитела обнаружены у 24% обследуемых контрольной груп-

пы, не имевших ранее контакта с ботулотоксином. Среди получавших ботулинотерапию впервые антитела отсутствовали только у 6 (19%) из 32 пациентов, у остальных же имелись антитела как минимум к одному препарату. В целом же среди пациентов, получавших ботулинотерапию, антитела в крови присутствовали у 65%, такая же тенденция (наличие антител к препаратам ботулотоксина А более чем у половины пациентов) прослеживается в каждой группе. Следует отметить, что чаще всего выявляли антитела к обоим препаратам.

Возможно, что обнаружение антител к обоим препаратам свидетельствует о том, что иммунная система обследованного продуцирует антитело к активным цепям токсина, которые являются постоянными как в любом препарате, так и в нативном молекулярном комплексе природного происхождения. Однако антитела способны вырабатываться не только к активным цепям токсина, универсальным для всех препаратов, но и к каким-либо цепям, специфичным только для определенного препарата. Поэтому при выявлении антител даже к одному препарату нельзя отрицать наличие возможности связывания ботулотоксина.

Изучение антителогенеза к ботулотоксину А и его препаратам ботоксу и диспорту показало, что антитела к ботулотоксину обнаруживаются у большинства пациентов, получавших ботулотоксин ранее по эстетическим показаниям. Более того, даже у лиц, никогда не получавших препараты ботулотоксина, антитела к нему не являются редкой находкой.

Вызывает интерес изменение количественных параметров антителогенеза у пациентов, получающих препараты ботулотоксина А в эстетических целях. В **табл. 3** представлены средние значения количественных характеристик антителогенеза — коэффициентов позитивности P/N к ботоксу и диспорту. Показано, что по группам в зависимости от выраженности эффекта статистически значимых различий по этим показателям нет, имеются различия только от-

## Антителогенез к препаратам ботокс и диспорт

Таблица 2

Распределение по кратности введения и результатам терапии	Всего пациентов		Антитела							
			нет		к ботоксу		к диспорту		к обоим препаратам	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Препарат применяли:										
впервые	32	27	6	5	6	5	9	8	11	9
повторно	38	32	19	16	4	3	3	3	12	10
более 2 раз	49	41	17	14	4	3	13	11	15	13
<b>Всего пациентов</b>	<b>119</b>	<b>100</b>	<b>42</b>	<b>35</b>	<b>14</b>	<b>12</b>	<b>25</b>	<b>21</b>	<b>38</b>	<b>32</b>
Эффект:										
отсутствовал	22	18	3	3	1	1	8	7	10	8
умеренный	27	23	12	10	2	2	4	3	9	8
хороший	70	59	27	23	12	10	12	10	19	16
<b>Всего пациентов</b>	<b>119</b>	<b>100</b>	<b>42</b>	<b>35</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>24</b>	<b>20</b>	<b>38</b>	<b>32</b>
Контроль	33	100	27	76	1	3	1	3	6	18

Таблица 3  
Средние значения показателей антителогенеза у пациентов в зависимости от эффекта ботулинотерапии

Группа обследованных	Коэффициент позитивности (P/N)	
	ботокс	диспорт
Контроль ( $n = 33$ )	$1,45 \pm 0,11$	$1,42 \pm 0,63$
Основная:		
слабый эффект ( $n = 22$ )	$2,12 \pm 0,23^*$	$2,71 \pm 0,19^*$
умеренный эффект ( $n = 27$ )	$2,16 \pm 0,24^*$	$2,23 \pm 0,17^*$
хороший эффект ( $n = 70$ )	$1,96 \pm 0,11^*$	$2,22 \pm 0,10^*$

Примечание. \* —  $p < 0,05$ , статистически значимые различия с показателями группы контроля;  $p < 0,05$  — относительно значений группы со слабым эффектом (статистически значимых различий не получено).

носителем показателей антителогенеза у пациентов контрольной группы.

Проведен корреляционный анализ уровня антител к препаратам ботулотоксина А с ранжированными показателями выраженности и продолжительности лечебного эффекта у 64 наиболее полно обследованных пациентов. Использовали непараметрическую гамма-корреляцию (<http://mathemlib.ru/mathenc/item/f00/s00/e0000994/index.shtml>), удобную для обработки ранжированных значений. Статистически значимые ( $p < 0,05$ ) результаты корреляционного анализа представлены в табл. 4.

Оказалось, что только уровень антител к диспорту слабо коррелирует с изученными показателями ( $p < 0,05$ ), содержание антител к ботоксу не имеет корреляционной связи ни с одним из параметров, за исключением антител к диспорту (см. табл. 4). Таким образом, по результатам корреляционного анализа можно сделать вывод, что имеется тенденция к более высокому уровню антител к диспорту у лиц с менее выраженным и продолжительным клиническим эффектом, а также неоднократным применением ботулинотерапии. Ответ на вопрос, почему антитела именно к диспорту, а не к ботоксу в большей степени связаны с чувствительностью к ботулинотерапии, пока не ясен. Возможно, что иммунная система продуцирует не моноспецифичное антитело, а комплекс антител со специфичностью к нескольким эпитопам ботулотоксина А. И молекулярный комплекс препарата диспорт может иметь большее количество эпитопов, чем молекулярный комплекс препарата ботокс (возможно, в силу разных размеров?).

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что антителогенез может влиять на эффективность ботулинотерапии, снижая ее. Однако это влияние оказывается не основным и оно может быть взаимосвязано с другими факторами. Так, примечательно, что содержание антител обратно коррелирует с уровнем интерлейкина-1 $\beta$ . Не исключено, что этот ключевой регулятор реакций иммунной системы способен принимать участие в развитии эффекта препаратов ботулотоксина А, а его низкий уровень, напротив, способствовать формированию

Таблица 4  
Результаты корреляционного анализа у 64 пациентов, получавших ботулинотерапию

Первая переменная	Вторая переменная	Коэффициент гамма	$p$
Антитела к диспорту	Кратность процедуры	0,2482	0,0207
	Объективная оценка эффекта	-0,3292	0,0039
	Субъективная оценка эффекта	-0,3466	0,0027
	Продолжительность эффекта	-0,2207	0,0167
	Интерлейкин-1 $\beta$	-0,2806	0,0011
	Антитела к ботоксу	0,4183	0,0000

резистентности (прямо или опосредованно — пока на этот вопрос ответа нет). Ответить на этот вопрос, возможно, поможет углубленное изучение, помимо антителогенеза, и состояния системы цитокинов.

Также не до конца ясно, почему именно антитела к диспорту, а не к ботоксу влияют на эффективность терапии. Возможно, антитела к диспорту имеют большее сродство к активным цепям токсина, как нативного, так и полученного в лаборатории производителя.

Исследования по выявлению антителогенеза к ботулотоксину А показали, что у лиц, ни разу не контактировавших с препаратами ботулотоксина и не болевших ботулизмом, также могут иметься антитела. У взрослых здоровых лиц, участвовавших в исследовании, антитела к ботулотоксину либо к его препаратам обнаружены в 24% случаев. Встает вопрос о причине формирования антител у людей, не получавших препараты ботулотоксина А. *Clostridium botulinum* иногда обнаруживают в кишечнике, также известно, что ботулотоксин способен хорошо проникать через эпителиальные клетки слизистых оболочек, в связи с чем предпринимаются попытки использовать его как трансмембранный носитель лекарственных препаратов [10, 11]. Поэтому можно сделать предположение, что потенциально организм каждого человека в течение своей жизни, начиная с детства, может встретиться с ботулотоксином эндогенного происхождения, при этом его доза скорее всего может оказаться достаточной для формирования нейтрализующих антител, но недостаточной для развития болезни. Данное предположение требует четких доказательств и более глубокого изучения.

Процессы формирования антител к препаратам ботулотоксина А требуют дальнейшего глубокого изучения.

#### REFERENCES [ЛИТЕРАТУРА]

1. American Society for Aesthetic Plastic Surgery. ASAPS Statistics—Cosmetic Procedures. <http://www.surgery.org/media/statistics>.

2. Cote T.R., Mohan A.K., Polder J.A., Walton M.K., Braun M.M. Botulinum toxin type A injections: adverse events reported to the US Food and Drug Administration in therapeutic and cosmetic cases. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2005; 53(3): 407—15.
3. Timerbaeva S.L. Problem of ineffective treatment and иммуно-резистентности in botulinum toxin therapy. *Injection Methods in Cosmetology* (Timerbaeva S.L. Problema nejeffektivnosti lechenija i immunorezistentnosti v botulinoterapii. In'ekcionnye Metody v Kosmetologii). 2012; 1: 3—14.  
[Тимербаева С.Л. Проблема неэффективности лечения и иммунорезистентности в ботулинотерапии. Инъекционные методы в косметологии. 2012; 1: 3—14]. (in Russian)
4. Ravichandran E., Gong Y., Fetweh H., Ancharski D.M., Joshi S.G., Simpson L.L. An initial assessment of the systemic pharmacokinetics of botulinum toxin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006; 318(3): 1343—51.
5. Atassi M.Z., Oshima M. Structure, activity, and immune (T and B Cell) recognition of botulinum neurotoxins. *Crit. Rev. Immunol.* 1999; 19(3): 219—60.
6. Dressler D. Clinical relevance of botulinum toxin antibodies. *Nervenarzt.* 2008; 79(Suppl. 1): 36—40.
7. Schrader C., Benecke R., Deuschl G., Hilker R., Kupsch A., Lange M., et al. Deep brain stimulation for dystonia: consensus recommendations of the German Deep Brain Stimulation Association. *Nervenarzt.* 2009; 80(6): 656—61.
8. Lange O., Bigalke H., Dengler R., Wegner F., deGroot M., Wohlfarth K. Neutralizing antibodies and secondary therapy failure after treatment with botulinum toxin type A: much ado about nothing? *Clin. Neuropharmacol.* 2009; 32(4): 213—8.
9. Brin M.F., Comella C.L., Jankovic J., Lai F, Naumann M.; CD-017 BoNTA Study Group. Long-term treatment with botulinum toxin type A in cervical dystonia has low immunogenicity by mouse protection assay. *Mov. Disord.* 2008; 23(10): 1353—60.
10. Simpson L.L., Maksymowych A.B., Kiyatkin N. Botulinum toxin as a carrier for oral vaccines. *Cell Mol. Life Sci.* 1999; 56(1—2): 47—61.
11. Zdanovskaia M.V., Los G., Zdanovsky A.G. Recombinant derivatives of clostridial neurotoxins as delivery vehicles for proteins and small organic molecules. *J. Protein Chem.* 2000; 19(8): 699—707.

Поступила 06.02.13

© С.А. МОНАХОВ, 2013  
УДК 616.53-002.25-085

## Рациональная терапия акне

С.А. Монахов

Кафедра дерматовенерологии и дерматоонкологии (зав. — проф. В. А. Молочков) ГБУЗ МО МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского

*Приведены сведения о патогенезе акне и современной терапии этого заболевания. Обобщены данные относительно молекулярных механизмов действия ретиноидов, а также собственные предположения об их влиянии на развитие ретиноидного дерматита. Рассмотрен комплексный подход к терапии заболевания с учетом тяжести и распространенности высыпаний с применением раствора Зеркалин. Основное внимание уделено наиболее эффективному противоугревому препарату Акнекутан.*

Ключевые слова: акне,  $RAR_{\alpha}$ ,  $RXR_{\alpha}$ , ретиноиды, изотретиноин, Акнекутан, раствор Зеркалин

### RATIONAL THERAPY OF ACNE

S.A. Monakhov

M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia

*Data on the pathogenesis of acne and its modern therapy are presented. The molecular mechanisms of retinoid activity are reviewed and the authors' hypotheses on their impact for the development of retinoid dermatitis are discussed. A comprehensive approach to disease therapy making use of Zerkalin solution with consideration for the severity and prevalence of eruptions is discussed. Special attention is paid to acnecutan, an acne control drug.*

Key words: acne,  $RAR_{\alpha}$ ,  $RXR_{\alpha}$ , retinoids, isotretinoin, acnecutan, Zerkalin solution

Среди хронических воспалительных дерматозов неинфекционного генеза вульгарные угри занимают исключительное положение. Акне является одной из наиболее частых патологий кожи среди подростков

(заболеваемость до 85%). Заболевание характеризуется прогрессивным течением, формированием нозогенных психоэмоциональных расстройств преимущественно депрессивного ряда примерно у

Сведения об авторе:

Монахов Сергей Анатольевич — доктор мед. наук, профессор (samskin@yandex.ru).