

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016
УДК 616.53-002.25-092:612.017.1

Ионеску М.А.¹, Фейолей М.², Эно Д.², Волькенштейн П.³, Роберт Ж.⁴, Лефёвр Л.⁴

АКНЕ, МИКРОБИОМ И ВРОЖДЕННЫЙ ИММУНИТЕТ

¹Дерматологическая поликлиника, Университетский госпиталь «Сен-Луи», Парижский университет VII, г. Париж, Франция;

²Микробиологическая лаборатория EA 4312, Университет Руана, Франция;

³Кафедра дерматологии, Университетский госпиталь «Генри Мондор», Парижский университет XII, Кретеи, Франция;

⁴Научно-исследовательское отделение Дерматологической лаборатории Урьяж, Нейи-сюр-Сен, Франция

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 74 пациентов с вульгарным акне.

Ключевые слова: акне; микробиом; врожденный иммунитет.

Для цитирования: Ионеску М.А., Фейолей М., Эно Д., Волькенштейн П., Роберт Ж., Лефёвр Л. Акне, микробиом и врожденный иммунитет. *Российский журнал кожных и венерических болезней*. 2016; 19(5): 279-282. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1560-9588-2016-19-5-279-282>

Marius-Anton Ionescu¹, Marc Feuiolley², Jeremy Enault², Pierre Wolkenstein³, Géraldine Robert⁴, Luc Lefevre⁴

ACNE, THE MICROBIOME AND INNATE IMMUNITY

¹Dermatology Outpatient Clinic, University Hospital Saint-Louis, University Paris VII, Paris;

²Laboratoire de microbiologie, signaux et microenvironnement EA 4312, Université de Rouen;

³Dermatology Department, University Hospital Henry Mondor, University Paris XII, Créteil;

⁴R&D, Laboratoires Dermatologiques d'Uriage, Neuilly-sur-Seine, France

In the last years several articles focalized on human microbioma – the microorganisms from skin, mucosae, bowel – and on its role in chronic inflammatory diseases of the skin as acne, rosacea, atopic dermatitis, seborrheic dermatitis. In this article the authors present an update on particular acne skin's microbioma, on innate immunity in acne and new physiopathology mechanisms described in inflammatory process in acne, and at the end we present in vitro, ex vivo and in vivo studies on the microbioma modulation and microbiofilm of pathogenic ribotypes of P.acnes leading to a significant improvement of acne in a series of 74 acne patients.

Key words: acne; the microbiome; innate immunity.

For citation: Marius-Anton Ionescu, Marc Feuiolley, Jeremy Enault, Pierre Wolkenstein, Géraldine Robert, Luc Lefevre. Acne, the microbiome and innate immunity. *Russian Journal of Skin and Venereal Diseases (Rossiyskii Zhurnal Kozhnykh i Venericheskikh Bolezney)*. 2016; 19(5): 279-282. (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1560-9588-2016-19-5-279-282>

Received 16 Sept 2016

Accepted 20 Sept 2016

В последние годы появляются работы, изучающие человеческий микробиом (микроорганизмы, живущие на коже, слизистых оболочках, в просвете кишечника) и его роль в развитии хронических воспалительных заболеваний кожи, таких как акне, розацеа, атопический дерматит, себорейный дерматит [1]. В статье представлены новые данные о микробиоме кожи, врожденном иммунитете и новые патофизиологические механизмы воспалительного процесса при вульгарном акне. В конце приведены резуль-

таты *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* исследований воздействий на микробиом и микробиопленку патогенных риботипов *P. acnes*, приведших к существенному улучшению состояния 74 пациентов с вульгарным акне.

Риботипы *Propionibacterium acnes*, микробиопленка и воспаление

Кожа представляет собой сложную среду обитания для огромного количества микроорганизмов (около 1 млн на 1 см²) – бактерий, вирусов, грибов и даже клещей, таких как *Demodex*. Это вторая по численности микробиота после пищеварительного тракта и гораздо менее изученная. Микробиота формируется при рождении, зависит от физиологических особенностей хозяина, адаптируется к разным типам кожи и даже к различным участкам кожи: влажным (например, подмышки, паховые складки), жирным, с большим количеством сальных желез (лоб, крылья носа) и сухим (таким как руки и ноги).

Для корреспонденции:

Dr Marius-Anton Ionescu, MD, PhD, Dermatology Outpatient Clinic University Hospital "Saint-Louis" Paris VII, 1, Avenue Claude Vellefaux, 75745 Paris cedex 10, France. E-mail: dr.toni.ionescu@gmail.com

Corresponding author:

Dr Marius-Anton Ionescu, MD, PhD, Dermatology Outpatient Clinic University Hospital Saint-Louis, Paris VII, 1, Avenue Claude Vellefaux, 75745, Paris cedex 10, France. E-mail: dr.toni.ionescu@gmail.com

25% микробиоты обитает глубоко в толще кожи. Здесь содержание кислорода составляет всего лишь 3%, что способствует развитию микроаэрофильных или анаэробных бактерий, таких как *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*).

P. acnes принадлежит к семейству *Propionibacterium*, которое включает 13 видов, из них 4 считаются основными. Это неспорообразующие пептидогликановые грамположительные бактерии. Плеоморфные палочки неподвижны и не имеют капсулы. В зависимости от штамма *P. acnes* весьма сильно различаются по переносимости кислорода. В анаэробных условиях, например, в сально-волосном фолликуле, образуют пропионовую кислоту.

В геноме *P. acnes* содержится большое количество гуанина и цитозина G-C – до 60%. Детальное изучение генотипа *P. acnes* позволило выделить 4 их фило типа: IA, IB, II и III. К типу IA относят большинство штаммов, ассоциированных с умеренными и тяжелыми формами акне [1, 2], что заставляет задуматься о том, нет ли связи между определенными штаммами и тяжестью течения акне.

P. acnes может оказывать и защитное действие на кожу. Например, образование пропионовой кислоты понижает pH и таким образом защищает сально-волосной фолликул от патогенов. Но *P. acnes* может быть и условно патогенным микроорганизмом, как при акне, гнойном гидрадените, остеомиелите или синдроме SAPHO (синовиит, акне, пустулез, гиперостоз, остит).

Последовательность событий в развитии вульгарного акне включает гиперпродукцию кожного сала, постепенное обсеменение микроорганизмами сально-волосного фолликула, приводящее к закупорке сальной железы. Падение содержания кислорода усиливает размножение *P. acnes* с развитием воспаления и даже рубцеванием. Это явление связано как с биопленкой, так и с продукцией вирулентных факторов.

Патогенетическая активация *P. acnes* зависит от множества экзогенных факторов, таких как демографические (возраст, пол и др.), генетические, факторы окружающей среды, а также от поведенческих особенностей (личная гигиена и пр.). Более того, андрогены влияют на контроль образования себума. Большую роль играют также эндогенные факторы, поскольку бактерии общаются между собой посредством сигналов.

Это называется *quorum sensing* – дистанционные микроб-микробные взаимодействия. Так, *P. acnes* образует свой аутоиндуктор-2 (AI-2), который, похоже, вовлечен в образование биопленки. Грамположительные бактерии тоже, как правило, общаются посредством пептидов-посредников, хотя для *P. acnes* это пока не доказано.

Вирулентность *P. acnes* проистекает из этих коммуникационных систем, при этом не важно, идет ли речь о контактной вирулентности или о секретируемых факторах вирулентности. Выработка Sec- и Tat-опосредуемых протеинов *P. acnes* приводит к диффузии факторов вирулентности, таких как гидролитические энзимы, токсины и адгезины. Анализ секрета *P. acnes* позволяет изучать его диффундирующую вирулентность. Количество белков в нем меняется и зависит от типа *P. acnes*. Тем не менее 8 белков присущи всем штаммам, а еще 20 секретируются большинством из них. Среди этих общих белков наиболее мощным фактором вирулентности являются триацилглицероллипаза (GehA), когемолитические энзимы (CAMP), необходимые для образования пор в мембране бактерий, и глицеральгид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), влияющей на адгезию. Культуральная среда и микроокружение оказывают значительное влияние на природу и количество синтезируемых белков.

Другой формой вирулентности *P. acnes* служит образование биопленки. В конечном итоге она может служить

причиной формирования антибиотикорезистентности (рис. 1, см. на стр. 273).

P. acnes отличается существенным генетическим разнообразием. Ее различные типы IA, IB, II и III имеют большую стабильную основную часть генома, общую для всех штаммов, и 8 переменных кластеров: BCN (синтез бактериоцина); Hya (гиалуронидаза); Thio (синтез тиопетитов); NRPS (нерибосомальная пептид-синтетаза); Phage (профаг); Sugar (поглощение и разрушение сахара); CRISPR (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами); TAD (плотная адгезия). По некоторым из этих кластеров, например CRISPR, можно судить об изменениях *P. acnes*, которые могут быстро за счет частичной делеции перейти из II в III тип, а также в I путем делеции.

В метагеномном исследовании изучали характеристики микробиоты волосных фолликулов носа у 49 пациентов с вульгарным акне и 52 здоровых людей. Было обнаружено, что *P. acnes* доминирует у пациентов с вульгарным акне (87% клонов) [3]. В то же время никаких статистически значимых различий в концентрации *P. acnes* у пациентов с вульгарным акне по сравнению со здоровыми людьми не выявлено. Возникает вопрос, не связаны ли возможные различия с самими штаммами скорее, чем с их количеством. Анализ риботипов (РТ) позволил выделить 10 основных риботипов среди 60 клонов, при этом некоторые клоны ассоциировались с нормальной кожей или кожей с вульгарным акне.

В последующих индивидуальных исследованиях определялось процентное количество каждого риботипа в микробиомах *P. acnes*. Выяснилось, что у пациентов с вульгарным акне преобладают РТ4 и РТ5 [1–3]. Полное секвенирование генома 71 штамма *P. acnes* показало, что РТ4 и РТ5 различны и ассоциируются с фенотипом вульгарного акне [3].

Для определения значимых для бактерий факторов, влияющих на рост, формирование биопленки, вирулентность и восприимчивость к активным косметическим компонентам, штаммы *P. acnes* с неустановленными риботипами изучали методом конфокальной микроскопии с окрашиванием кристалвиолетом. Этим же способом определяли воздействие оригинального полисахарида, полученного биотехнологическим методом, на рост штаммов в среде ВНИ. Показано отсутствие действия полисахарида на рост и вирулентность, дозозависимое подавление образования биопленки и отсутствие цитотоксичности *P. acnes* на кератиноциты HaCaT.

В другом исследовании [4] штаммы *P. acnes* РТ4 и РТ5 подвергались воздействию полисахарида, и термальной воды Урьяж в различных концентрациях. Существенного влияния на рост бактерий не выявлено. Изучение образования биопленки с помощью окрашивания кристалвиолетом, напротив, показало, что культуральная среда играет здесь важную роль.

Образование биопленки *P. acnes* РТ4 и РТ5 уменьшается в присутствии термальной воды Урьяж (рис. 2, см. на стр. 274). Применение переменного лазерного конфокального микроскопа позволило показать существенное уменьшение толщины, биомассы и поверхности биопленки *P. acnes* РТ4. Такие же результаты были получены для РТ5 (рис. 3, см. на стр. 274).

Наконец, исследование цитотоксичности РТ4 и РТ5 в присутствии термальной воды Урьяж, полисахарида и их комбинации, показало, что *P. acnes* фило типа IA РТ4 и РТ5 в действительности не цитотоксичны, и что ни термальная вода Урьяж, ни полисахарид не влияют на эту цитотоксичность.

Результаты этих различных исследований позволяют сделать вывод, что PT4 и PT5 фило типа IA *P. acnes* развиваются под биопленкой в сально-волосном фолликуле. Эти штаммы, четко связанные с развитием акне, отличаются высокими метаболическими потребностями, и их способность образовывать биопленку может быть существенно и специфично уменьшена термальной водой Урьяж.

Врожденный иммунитет при вульгарных угрях

Вульгарные угри – распространенное заболевание, которым страдают от 5 до 6 млн человек во Франции. Оно также является самой частой причиной обращения к дерматологу.

По сравнению с другими заболеваниями кожи вульгарные угри могут показаться достаточно тривиальным заболеванием, но оно нарушает качество жизни и становится тяжким бременем для 20% пациентов. У 15% обнаруживаются признаки депрессии, хотя корреляции между тяжестью акне и развитием депрессии нет. Наконец, 30% пациентов считают вульгарное акне своей главной проблемой – по этому критерию акне опережает многие хронические заболевания, такие как, например, астма [4].

В исследовании [5] изучали факторы риска развития вульгарных угрей. Наследственная предрасположенность заняла первое место, увеличивая риск заболевания в 3 и в 9 раз, если один или оба родителя страдали вульгарным акне соответственно. Анализ диеты пациентов выявил связь между вульгарным акне и употреблением молока, шоколада и сахара. Курение, по-видимому, снижает риск заболевания вульгарным акне.

На поверхности кожи живет великое множество микроорганизмов. Образуется сложная система, где взаимодействуют кожный барьер, микробиота и врожденный иммунитет. *P. acnes* предпочитает жирные участки кожи, что соответствует наиболее подверженным акне местам, особенно спину и лицо у мужчин и подбородок у взрослых женщин.

Патофизиология акне – результат сложного взаимодействия между сально-волосным фолликулом, гиперкератинизацией (ответственной за образование комедонов и микрокист), гиперсебореей (усиливающей пролиферацию *P. acnes*) и врожденным иммунитетом, который запускает воспаление путем выброса интерлейкинов (рис. 4, см. на стр. 275).

Ключевым звеном во взаимодействии между микробиотой и врожденным иммунитетом являются toll-подобные рецепторы (TLR). Это трансмембранные протеины, присутствующие в организме с древних времен. Из 13 типов TLR, находящихся в коже человека, TLR2 и TLR4 особенно задействованы в развитии вульгарного акне.

TLR2 распознают гликопептиды (продукты жизнедеятельности *P. acnes*), активируются и запускают воспалительную реакцию, клинически проявляющуюся элементами вульгарного акне: папулами, пустулами, узелками и кистами. Другие бактерии, грибы, вирусы также могут активировать TLR, хотя каждый раз эта активация происходит специфическим для типа рецепторов и микроорганизма образом. *P. acnes* активирует TLR2 на кератиноцитах, приводя к выбросу интерлейкинов (IL-1 β , IL-8) и TNF α , запуская каскад воспалительных реакций. В то же время усиливается синтез антимикробных пептидов, подлинных естественных антибиотиков – β -дефензинов и кателицидинов.

TLR2 участвуют в регуляции IL-1 β в присутствии *P. acnes*. При наличии блокирующих TLR2 моноклональных антител секреция IL-1 β и воспаление подавляются,

что может в будущем дать толчок к новым терапевтическим подходам в лечении вульгарного акне.

Образующаяся при этом инфламма-сома также обладает своими особенностями: это сложный воспалительный каскад. *P. acnes* индуцирует экспрессию генов инфламма-сом NLRP1 и NLRP3 в моноцитах человека.

Таким образом, вульгарное акне представляет собой сложное воспалительное заболевание с участием специфического микробиома, PT4 и PT5 *P. acnes*, особую агрессивную и адгезивную микробиопленку, TLR2, инфламма-сому и IL-1 β , а также антимикробные пептиды.

Новые терапевтические подходы в дерматокосметологии

Все микроорганизмы тела человека, микробиота кожи, слизистые оболочки ротовой полости, гениталий, глаз, слюны, секрета желез половых органов и даже пищеварительного тракта живут в особой среде – микробиоме. С 2005 г., когда был секвенирован геном *P. acnes*, установлено, что фило тип IA и его PT4 и PT5 доминируют в микробиопленке пациентов с акне. PT4 и PT5 обладают большей вирулентностью и адгезивными свойствами.

Изменения в естественных барьерах кожи – будь то микробиом, система врожденного иммунитета или структурный барьер – играют ключевую роль в патофизиологических механизмах акне. Изменения в микробиоме *P. acnes* ведет к формированию агрессивной биопленки, отвечающей за устойчивость и адгезивные свойства бактерий. Это в свою очередь взаимодействует, с одной стороны, с процессами гиперкератинизации и гиперсеборей и с воспалительным ответом врожденного иммунитета с другой.

В исследованиях *in vitro*, *ex vivo* и в клиническом исследовании оценивали разные активные комплексы MPA-RegulTM, TLR2-RegulTM и Исеак 3-Regul[®] [4]. Цели исследований были двойными:

- наблюдение за образованием микробиопленки *P. acnes* PT4 и PT5;
- оценка эффекта активного компонента естественного происхождения, MPA-RegulTM (растительный полисахарид, богатый глюконовой кислотой + термальная вода Урьяж) на цитотоксичность и адгезивные свойства *P. acnes* PT4 и PT5.

Микробиопленку штаммов *P. acnes*, полученную из сально-волосных фолликулов нелеченных пациентов с акне (контрольная группа) или получавших MPA-RegulTM в разных концентрациях (0,1; 0,5 и 1%), помещали на предметное стекло и изучали через 24, 48 и 72 ч методом флуоресцентной конфокальной микроскопии. Рост штаммов *P. acnes* PT4 и PT5 оценивали в культуре на микрочашках с помощью терморегулируемого мультифокального датчика. Наконец, цитотоксичность *P. acnes* PT4 и PT5 исследовали на кератиноцитах HaCat, измеряя содержание дегидрогеназы в культуральной среде после гибели клеток, вызванной бактериальными штаммами. Цитотоксичность PT4 и PT5 оценивали также в присутствии активного комплекса MPA-RegulTM в различных концентрациях.

Результаты показывают дозозависимое подавление микробиопленки *P. acnes* PT4 и PT5 в присутствии MPA-RegulTM в концентрациях 0,1; 0,5 и 1% (рис. 5, см. на стр. 276). При использовании метода флуоресценции в микрочашках (рис. 6, см. на стр. 276) интенсивность покрытия поверхности уменьшалась через 24, 48 и 72 ч (при этом толщина биопленки оставалась прежней). Цитотоксичность и вирулентность *P. acnes* PT4 и PT5 не изменялись.

Хотя *P. acnes* типа IA риботипов PT4 и PT5 способны образовывать большие микробиопленки (эти риботипы доминируют при наиболее тяжелых формах вульгарного акне), они не проявляют значительную цитотоксичность *in vitro* на кератиноцитах HaCat по сравнению с другими типами *P. acnes*. Такое различие в *in vivo* – *in vitro* вирулентности (культуральные среды BHI и RCM) может быть связано с дополнительными факторами *in vivo*: множественные взаимодействия в микробиоме, метаболические изменения («жизнь планктона») в этой биопленке; изменения количества и качества кожного сала; взаимодействия с TLR2 и TLR4, действие антимикробных пептидов, особенно β -дефенсин 2 (hBD2).

Ex vivo

Первое исследование *ex vivo* фокусировалось на TLR и было направлено на оценку модулирующего воздействия на TLR2 и на определение концентраций IL-8 и β -дефенсина 2 (hBD2) на эксплантах кожи человека в присутствии *P. acnes* и TRL2-Regul™ комплекса. Этот комплекс состоит из натурального растительного экстракта (семейство зонтичных) и амфифильного липида (C18-N39-NO3). На **рис. 7 и 8** (см. на стр. 277) показано уменьшение концентрации IL-8 и увеличение hBD2.

Во втором исследовании *ex vivo* в центре внимания была гиперсеборея и оценка эффектов Исеак 3-Regul® на секрецию кожного сала на эксплантах кожи, стимулированных розиглитазоном. Анализ результатов, проведенный с помощью оптического микроскопа в 1-й и 8-й дни эксперимента показал снижение количества себума (красного цвета) по сравнению с контролем (**рис. 9**, см. на стр. 277).

В последнем двойном слепом рандомизированном клиническом исследовании сравнивали клиническую эффективность и переносимость двух эмульсий «масло в воде» в группе из 74 пациентов с акне (61 женщина и 12 мужчин), средний возраст 26 лет:

- Исеак 3-Regul® крем: MPA-Regul™ 1% + АНА + TLR2-Regul™ + TBV: эмульсия А;
- дерматокосметический крем с АНА + успокаивающие агенты: эмульсия В.

Пациенты отвечали следующим критериям: взрослые пациенты (старше 18 лет) с умеренным полиморфным акне (2–3 балла по шкале GEA). Эмульсию А или В наносили 2 раза в день в течение 2 мес. Оценка включала клиническое обследование с подсчетом общего количества и типированием элементов акне, себометрию (на 1-й, 28-й и 56-й дни) и измерение жирного блеска кожи лба, а также анализ фотографий. Тест на переносимость и самооценку проводили на 28-й и 56-й дни.

На **рис. 10–12** (см. на стр. 278) представлены результаты подсчета общего количества элементов акне, ретенционных и воспалительных элементов. Клиническое исследование показало снижение на 86% жирного блеска на лбу при применении крема Исеак 3-Regul® в период между началом и 28-м днем исследования.

При измерении глоссиметром тот же параметр уменьшался на 18% через 4 ч после однократного нанесения, а себометрия показывала снижение на 23% к 56-му дню. Размеры пор сократились на 42% к 28-му дню и на 75% к 56-му дню исследования.

Подводя итог разнообразных исследований, можно сделать вывод о дозозависимом снижении микробиопленки, образованной *P. acnes* PT4 и PT5 под действием активного комплекса MPA-Regul™. Клиническое исследование показывает превосходство крема Исеак 3-Regul® по сравнению с кремом, содержащим только АНА. Эти результаты ставят Исеак 3-Regul® в ряд средств первого выбора при акне либо вместе с антибиотиками, либо в качестве поддерживающего ухода при умеренном полиморфном акне.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

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., Ruszczynski 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.

Поступила 16.09.16

Принята к печати 20.09.16