

## **Микроэкология организма человека при себорее, атопическом дерматите и акне.**

*И.В.Полеско, Н.В.Малинина, Г.А.Осинов, Т.И.Кабаева*

Методом газовой хроматографии масс-спектрометрии показано, что у больных себореей и акне на коже и в области волосяных фолликулов обнаруживаются три основные группы микроорганизмов: *Propionibacterium acnes* и другие актинобактерии, *Staphylococcus epidermidis* и другие кокковые формы, а также *Malassezia (Pityrosporum)* и другие микроскопические грибы.

Одновременно в крови (кишечнике) выявляется повышение содержания маркеров клостридий, бацилл, хеликобактера, некоторых актиномицетов и *Eubacterium lentum* при дефиците маркеров других (основных) видов *Eubacterium*, лактобацилл и коринебактерий. При анализе состава кожного сала обнаружено относительное снижение концентрации линолевой кислоты и повышение уровня себалеата, нарушение соотношения жирных кислот с низким (C10-C20) и высоким (C20-C30) количеством углеродных атомов. Впервые были выявлены липидные маркеры дрожжей рода *Malassezia (Pityrosporum)*, которые определялись во всех изученных образцах кожного сала, однако, их количество варьировало.

На основании полученных результатов выдвигается гипотеза патогенеза себореи и акне, а также способы коррекции нарушенного микроэкологического статуса, как средство сокращения сроков лечения этих заболеваний.

Ключевые слова: микроорганизмы, инфекция, себорея, акне, газовая хроматография, масс-спектрометрия, жирные кислоты, дисбиоз

Key words: microorganisms, infection, seborrhea, acne vulgaris, gas chromatography, mass spectrometry, fatty acids, disbiosis

Увеличение распространенности себореи и акне, их значительное влияние на психо-эмоциональную сферу, социальный статус и общественную адаптацию больных обуславливают актуальность данной проблемы и необходимость дальнейшего изучения патофизиологических механизмов развития этих дерматозов, что может помочь в создании более эффективных препаратов для его лечения. Ключевыми факторами в сложном процессе патогенеза себореи и акне являются: возрастание активности сальных желез, фолликулярный гиперкератоз, бактериальная колонизация, воспаление и иммунный ответ. Имеются данные, что дисбиоз кишечника играет немаловажную роль в развитии кожных заболеваний. Изменение качественного состава кожного сала приводит к значительному нарушению барьерной функции эпителия, что создает условия для роста микроорганизмов на поверхности кожи и внутри фолликулов.

Себорейный дерматит (себорея) характеризуется эритематозными, экзематозными пятнами на желтоватой, сальной коже и представляет собой хроническое заболевание кожи, локализованное в областях с высокой концентрацией сальных желез (1). Поражая примерно 3-5% населения, преимущественно мужчин, это заболевание превалирует среди подростков и молодых людей. Его можно рассматривать как спектр заболеваний от умеренной перхоти с одной стороны и тяжелой себореи - с другой.

Вульгарные угри (ВУ), или акне – хроническое плеiomорфное полиэтиологическое заболевание волосяных фолликулов и сальных желез. Несмотря на имеющиеся эффективные средства лечения акне, за последние 10 лет отмечен рост заболеваемости, как среди подростков, так и среди взрослого населения. Данное заболевание поражает до 95 % лиц юношеского возраста и более 50 % лиц старше 25 лет. Кроме того, увеличилась и частота персистирующих форм болезни (2).

Важными факторами патогенеза как себореи, так и угревой болезни являются повышение продукции сальными железами кожного сала измененного химического состава, нарушение пролиферации и дифференцировки кератиноцитов, а также микробная колонизация сально-волосяных фолликулов (3). Как видно, оба заболевания этиологически

близки, что создает концептуальную перспективу их совместного рассмотрения и использования групп пациентов как групп сравнения.

Преобладающими группами микроорганизмов, составляющими до 99% микрофлоры здоровой кожи, являются пропионовые бактерии, стафилококки и дрожжи рода *Malassezia* (4). Чаще всего в связи с себореей и акне упоминаются *P.acnes*, хотя данные об этиологической роли этих микроорганизмов в их развитии противоречивы: не всегда отмечают корреляцию частоты встречаемости и обсемененности с наличием заболевания (5). Очевидна необходимость периодического *мониторинга микробного пейзажа* в группах больных и клинически здоровых людей с применением современных диагностических методов.

Новое направление в микробиологии – диагностика инфекции, дисбиозов и воспалительных процессов по специфическим маркерам (жирным кислотам, альдегидам и спиртам) с помощью хромато-масс-спектрометрии позволяет быстро и надежно определять малые доли веществ микробного происхождения в любых биологических средах организма. Этот метод микробиологического исследования быстр и универсален, поскольку не требует выращивания отдельных микроорганизмов на специальных средах и проведения для каждого из них специальных биохимических тестов с целью определения вида возбудителя (6). Точное обнаружение микроорганизмов также может способствовать назначению целенаправленной антибактериальной терапии. Ранее у больных, страдающих себореей и вульгарными угрями, исследования с использованием хромато-масс-спектрометрического анализа, не проводились.

Изучение колонизации кожи анаэробами показало наиболее частое обнаружение видов *Peptostreptococcus*, особенно *P. magnus* и *P. assaccharolyticus*, а также *Bacteroides fragilis* (7).

*P.acnes* обитают внутри пилосебацейной ячейки в составе биопленки. Иначе говоря, они живут в сообществе бактерий, окруженных экстраклеточной полисахаридной оболочкой, которую микроорганизмы образуют после прикрепления к поверхности. Этот гликокаликсный полимер действует в качестве экзоскелета и создает физический барьер, снижающий концентрацию антибиотиков внутри компартмента. Представление сообщества микроорганизмов в качестве биопленки позволяет объяснить как их иммуногенность, так и особенности клинического проявления заболевания. Модель биопленки *P.acnes* объясняет многие аспекты патогенеза и терапии акне: например – почему необходимо продолжительное

лечение антибиотиками, почему предварительная оценка чувствительности к антибиотикам не является гарантией излечения. Учет принципов существования микроорганизмов в виде биопленки в применении к акне предлагает новые пути практических подходов в лечении этого заболевания (8). Отмечается, что в инфицировании кожи участвует смешанное аэробно-анаэробное микробное сообщество (9). Кроме того, давно подозревается, но редко подтверждается связь кожных заболеваний с состоянием микробиоты кишечника. По сравнению со здоровыми новорожденными младенцы с аллергией имели на три порядка выше колонизацию толстого кишечника клостридиями и втрое выше уровень содержания стафилококков. При этом обнаруживалось замедление темпов колонизации кишечника энтерококками и бифидобактериями (10). По данным другого исследования (114 пациентов с вульгарными угрями) культуральным методом у 61 (54%) обнаружен дисбактериоз первого (21%) или второго (78,7%) типа. Найдено, что коррекция дисбиоза в сочетании с традиционной терапией вдвое сокращает период лечения (11).

В связи с вышеизложенным представляется актуальным проведение комплексного исследования состояния секреции кожного сала, колонизации кожи больных и состояния микробиоценоза кишечника у больных этиологически близкими заболеваниями кожи - себореей и акне. Использование молекулярного метода масс-спектрометрии микробных маркеров дает перспективу получения более полного и точного представления о составе и динамике изменения микробиоты и себума кожи за счет включения некультивируемых в условиях лабораторий клинической микробиологии микроорганизмов и широкого спектра липидных веществ кожного сала в норме, патологии и в процессе лечения. Метод масс-спектрометрии, в отличие от применяемого в обычной практике посева фекалий на культуральные среды, позволяет получить информацию действительно о микробиоте кишечной стенки, с участием которой проходят реальные физиологические процессы, в том числе – продукция химических веществ, имеющих мишенью клетки кожи. Для получения такой информации достаточно анализа микробных маркеров в крови пациентов, поскольку показано, что их состав преимущественно адекватен составу пристеночной микробиоты тощей кишки (12).

Расчет состава микробного сообщества кожи и пристеночного слоя кишечника проводили по методике, опубликованной ранее (13).

Ошибка количественных измерений состава кожного сала и численности микроорганизмов из-за погрешности в подготовке проб и анализа, несоответствия состава жирных кислот чистых культур банка данных и изучаемого сообщества *in situ* (биологическая воспроизводимость) может составлять до 20 % относительных.

Результаты измерения концентраций микробных маркеров в крови и последующей реконструкции микробного сообщества пристеночного слоя кишечника показало, что оно заметно отличается от среднестатистической нормы (табл 1). Данные представлены в количестве клеток, эквивалентных концентрации маркеров, на мл крови. Их сумма представляет собой сумму клеток микроорганизмов, информация о которых дошла до крови – это  $3.3 \times 10^9$  кл/мл (для нормы, первая колонка табл 1), то есть на порядок меньше, чем в мукозном слое тонкого кишечника ( $7.6 \times 10^{10}$  кл/г). Если считать, как это принято, что в организме человека обитает  $10^{14}$  микробов, а объем крови взрослого человека составляет 5л, то в нем содержится информация о  $5000 \times 3.3 \times 10^9$  кл/мл =  $1.6 \times 10^{13}$  микробов. Информацию о порядке величины мы теряем по сравнению с измерениями микробиоты непосредственно в кишечной стенке за счет ухода части отмерших микробов в фекалии и утилизации части микробных жирных кислот для обновления клеток организма – хозяина.

#### Табл.1

**Результаты анализа состава микробиоты пристеночного слоя кишечника у больных себорей (N=16) в сравнении с нормой. Данные в размерности [клеток/мл  $\times 10^5$ ]**

| №     | Микроорганизм               | Норма |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|-------|-----------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|       |                             | крови | Seb-19 | Seb-20 | Seb-21 | Seb-22 | Seb-23 | Seb-24 | Seb-25 | Seb-26 | Seb-27 | Seb-28 | Seb-29 | Seb-30 | Seb-31 | Seb-32 | Seb-33 | Seb-34 |
| 1     | Streptococcus               | 249   | 44     | 0      | 0      | 95     | 0      | 0      | 0      | 139    | 318    | 201    | 292    | 97     | 0      | 126    | 360    | 489    |
| 2     | Eubacterium lentum          | 68    | 320    | 495    | 349    | 603    | 336    | 500    | 680    | 779    | 474    | 177    | 211    | 186    | 226    | 181    | 255    | 369    |
| 3     | Bacillus cereus             | 23    | 31     | 0      | 0      | 88     | 0      | 0      | 32     | 39     | 47     | 30     | 0      | 0      | 0      | 30     | 0      | 61     |
| 4     | Peptostreptococcus anaerobi | 0     | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 5     | Clostridium histolyticum    | 95    | 24     | 59     | 18     | 152    | 89     | 51     | 17     | 56     | 7      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 6     | Nocardia, 14:1d11           | 262   | 314    | 532    | 106    | 1854   | 319    | 244    | 331    | 669    | 1380   | 263    | 81     | 805    | 0      | 588    | 232    | 847    |
| 8     | Acinetobacter               | 0     | 0      | 7      | 0      | 7      | 4      | 2      | 3      | 23     | 3      | 6      | 5      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 9     | Pseudomonas aeruginosa      | 0     | 0      | 11     | 0      | 7      | 6      | 10     | 2      | 13     | 5      | 5      | 4      | 6      | 0      | 8      | 0      | 0      |
| 12    | Clostridium propionicum     | 288   | 25     | 175    | 19     | 369    | 203    | 64     | 0      | 34     | 0      | 3      | 42     | 24     | 66     | 35     | 27     | 0      |
| 15    | Актиномицеты                | 77    | 47     | 63     | 45     | 103    | 60     | 65     | 42     | 50     | 52     | 39     | 24     | 28     | 47     | 29     | 37     | 29     |
| 16    | Pseudonocardia              | 70    | 28     | 34     | 22     | 60     | 34     | 32     | 21     | 32     | 26     | 20     | 17     | 14     | 24     | 18     | 20     | 16     |
| 17    | Streptomyces                | 62    | 157    | 168    | 200    | 381    | 167    | 140    | 136    | 105    | 311    | 114    | 105    | 134    | 154    | 167    | 190    | 253    |
| 18    | Clostridium ramosum         | 2000  | 8061   | 5824   | 2595   | 6373   | 4799   | 2766   | 5562   | 3123   | 3977   | 2474   | 1814   | 3306   | 473    | 4174   | 5417   | 4292   |
| 19    | Fusobacterium/Haemophylu    | 0     | 6      | 16     | 6      | 9      | 10     | 6      | 2      | 17     | 3      | 10     | 7      | 2      | 16     | 6      | 3      | 2      |
| 20    | Alcaligenes                 | 48    | 37     | 28     | 47     | 57     | 27     | 74     | 38     | 40     | 46     | 39     | 31     | 37     | 138    | 34     | 33     | 23     |
| 22    | Flavobacterium              | 0     | 7      | 10     | 0      | 14     | 8      | 8      | 7      | 8      | 6      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 23    | Rhodococcus                 | 423   | 353    | 479    | 383    | 775    | 404    | 536    | 304    | 380    | 382    | 283    | 261    | 218    | 478    | 274    | 408    | 239    |
| 25    | Porphyromonas               | 0     | 6      | 11     | 0      | 14     | 9      | 8      | 8      | 9      | 9      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 26    | Cofineform                  | 605   | 207    | 254    | 232    | 455    | 282    | 277    | 227    | 160    | 330    | 176    | 117    | 191    | 266    | 246    | 302    | 332    |
| 27    | Lactobacillus               | 6613  | 5542   | 5188   | 3417   | 4734   | 6038   | 7393   | 4260   | 3918   | 4392   | 3034   | 3618   | 3886   | 4508   | 4886   | 4846   | 3765   |
| 28    | Campylobacter mucosalis     | 99    | 40     | 69     | 1      | 110    | 45     | 38     | 1      | 1      | 34     | 1      | 1      | 45     | 4      | 1      | 1      | 42     |
| 29    | Mycobacterium/Candida       | 549   | 490    | 824    | 249    | 1210   | 548    | 383    | 391    | 497    | 578    | 318    | 150    | 538    | 185    | 562    | 520    | 550    |
| 30    | E.coli                      | 0     | 0      | 0      | 0      | 0      | 25     | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 31    | Eubacterium moniliforme     | 0     | 232    | 114    | 105    | 80     | 85     | 0      | 97     | 713    | 102    | 43     | 53     | 34     | 0      | 0      | 122    | 73     |
| 32    | Cl.difficile                | 385   | 222    | 232    | 176    | 235    | 183    | 241    | 231    | 151    | 250    | 154    | 146    | 111    | 299    | 188    | 294    | 235    |
| 34    | Prevotella                  | 38    | 33     | 39     | 42     | 34     | 30     | 40     | 22     | 88     | 36     | 50     | 40     | 40     | 121    | 71     | 51     | 30     |
| 35    | Eubacterium sp              | 6912  | 8574   | 15248  | 6815   | 13219  | 11397  | 17176  | 14510  | 26644  | 13453  | 10536  | 7212   | 6660   | 5625   | 6075   | 7494   | 8287   |
| 36    | Bacteroides fragilis        | 0     | 0      | 0      | 0      | 0      | 7      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 37    | Staphylococcus              | 120   | 327    | 277    | 221    | 382    | 195    | 271    | 234    | 238    | 266    | 147    | 115    | 145    | 213    | 197    | 234    | 232    |
| 38    | Bifidobacterium             | 5067  | 4654   | 6449   | 4764   | 7133   | 6010   | 4725   | 5109   | 8402   | 5142   | 5636   | 3632   | 4309   | 4736   | 4667   | 4992   | 3131   |
| 39    | Helicobacter pylori         | 14    | 18     | 55     | 0      | 35     | 62     | 28     | 11     | 73     | 22     | 38     | 12     | 12     | 52     | 17     | 25     | 48     |
| 40    | Clostridium perfringens     | 12    | 36     | 39     | 131    | 32     | 24     | 140    | 11     | 21     | 23     | 24     | 25     | 29     | 733    | 37     | 30     | 35     |
| 41    | Enterococcus                | 290   | 359    | 385    | 0      | 535    | 0      | 311    | 308    | 239    | 309    | 285    | 0      | 286    | 370    | 410    | 323    | 191    |
| 43    | Eubacterium sp              | 4480  | 3165   | 4601   | 2356   | 3998   | 1544   | 3632   | 5464   | 7263   | 8381   | 1673   | 1961   | 976    | 2541   | 1672   | 2163   | 1975   |
| 44    | Streptococcus               | 229   | 701    | 449    | 647    | 565    | 493    | 731    | 394    | 518    | 484    | 188    | 185    | 225    | 2083   | 162    | 232    | 256    |
| 45    | Herpes                      | 59    | 1553   | 130    | 170    | 97     | 52     | 306    | 29     | 178    | 59     | 69     | 74     | 60     | 22     | 113    | 37     | 39     |
| 46    | Микр грибы, кампестерол     | 842   | 509    | 194    | 229    | 251    | 396    | 244    | 292    | 545    | 485    | 165    | 261    | 523    | 0      | 306    | 316    | 327    |
| 47    | Nocardia asteroides         | 274   | 471    | 359    | 487    | 677    | 567    | 501    | 526    | 223    | 595    | 282    | 393    | 240    | 406    | 336    | 371    | 615    |
| 48    | Цитомегаловирус             | 166   | 204    | 271    | 55     | 97     | 173    | 97     | 44     | 100    | 167    | 79     | 0      | 0      | 0      | 0      | 148    | 0      |
| 49    | Микр грибы, ситостерол      | 384   | 303    | 169    | 158    | 186    | 255    | 208    | 226    | 389    | 336    | 149    | 205    | 306    | 122    | 167    | 214    | 256    |
| 50    | Propionibacterium acnes     | 101   | 115    | 174    | 0      | 128    | 48     | 57     | 879    | 352    | 89     | 83     | 40     | 207    | 39     | 69     | 108    | 43     |
| 51    | Ruminicoccus                | 640   | 954    | 1313   | 608    | 1303   | 740    | 974    | 1262   | 1075   | 856    | 470    | 231    | 500    | 313    | 614    | 794    | 652    |
| 52    | Actinomycetes 10Me14        | 309   | 229    | 472    | 171    | 402    | 326    | 223    | 177    | 846    | 230    | 155    | 136    | 0      | 0      | 0      | 225    | 90     |
| 53    | E.lentum 7741               | 0     | 86     | 0      | 0      | 0      | 6      | 16     | 0      | 319    | 0      | 33     | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 34     |
| 54    | Enterococcus faecalis       | 231   | 196    | 242    | 177    | 152    | 240    | 244    | 184    | 77     | 159    | 91     | 0      | 272    | 304    | 101    | 386    | 380    |
| 55    | Actinomyces viscosus        | 1190  | 1103   | 1468   | 634    | 1175   | 1057   | 1135   | 0      | 2079   | 853    | 720    | 527    | 842    | 1884   | 864    | 1239   | 822    |
| 56    | Eubacterium spp.            | 194   | 0      | 263    | 94     | 174    | 52     | 195    | 2325   | 189    | 215    | 58     | 137    | 163    | 37     | 72     | 163    | 90     |
| 57    | Helicobacter mustelae       | 140   | 275    | 169    | 149    | 199    | 242    | 202    | 0      | 623    | 289    | 278    | 269    | 209    | 102    | 177    | 208    | 186    |
| Сумма |                             | 33610 | 40057  | 47362  | 25877  | 48558  | 37596  | 44293  | 44397  | 61439  | 45182  | 28596  | 22433  | 25668  | 26586  | 27679  | 32821  | 29336  |

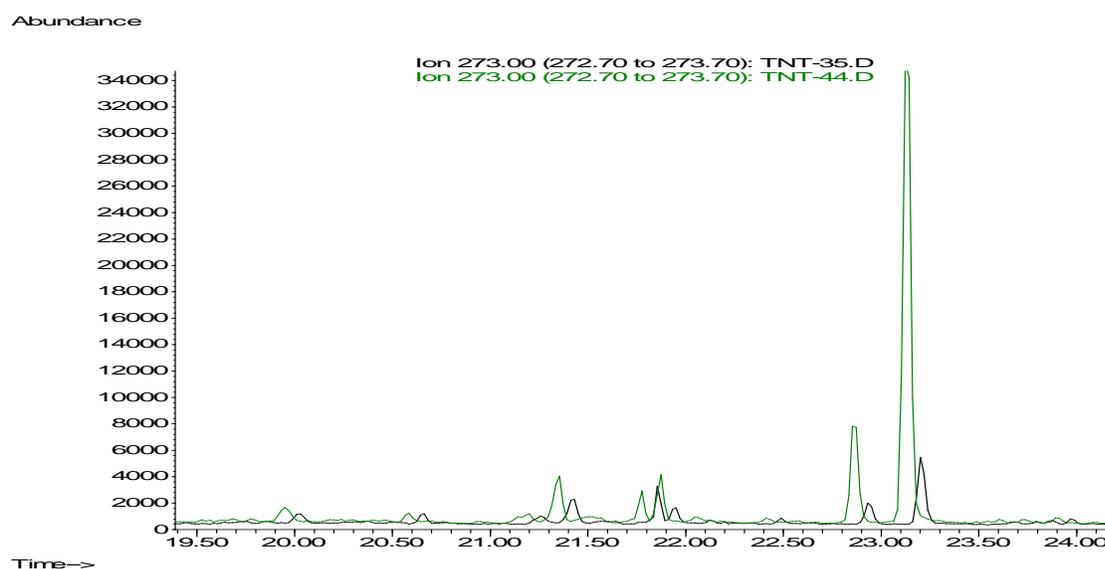
По выработанному ранее статистическому критерию (14) отклонения от нормы приобретают клиническую значимость, когда численность микроорганизмов изменяется вдвое по сравнению с нормой. В таблице 1 такие случаи выделены цветом. Превышение нормы более чем вдвое – желтым, уменьшение более чем наполовину – бирюзовым. В этом случае таблица приобретает полосатый вид, в котором желтые полосы отмечают регулярный избыточный рост бактерий в организме, а бирюзовые – дефицит.

Как видно, общие изменения микробиологического статуса организма при себорее связаны с пятикратным ростом концентрации, более чем двадцатикратным увеличением концентрации фузобактерий и *Eubacterium moniliforme*. *Eubacterium* – родственные

кlostридиям микроорганизмы, являющиеся одними из основных обитателей кишечника. Условные патогены с развитой системой видов и штаммов с универсальными свойствами. В том числе для них характерно индуцирование продукции провоспалительных цитокинов и TNF-alfa, а также противовоспалительного цитокина IL-10 (как ЛПС или клеточные токсины Грам+ патогенов). Это обуславливает их участие в патологии тяжелых заболеваний, таких как, средиземноморская семейная лихорадка, эндокардит, врожденный порок сердца, кожные и кишечные заболевания, связанные со сложным изменением концентрации их видов в биотопах.

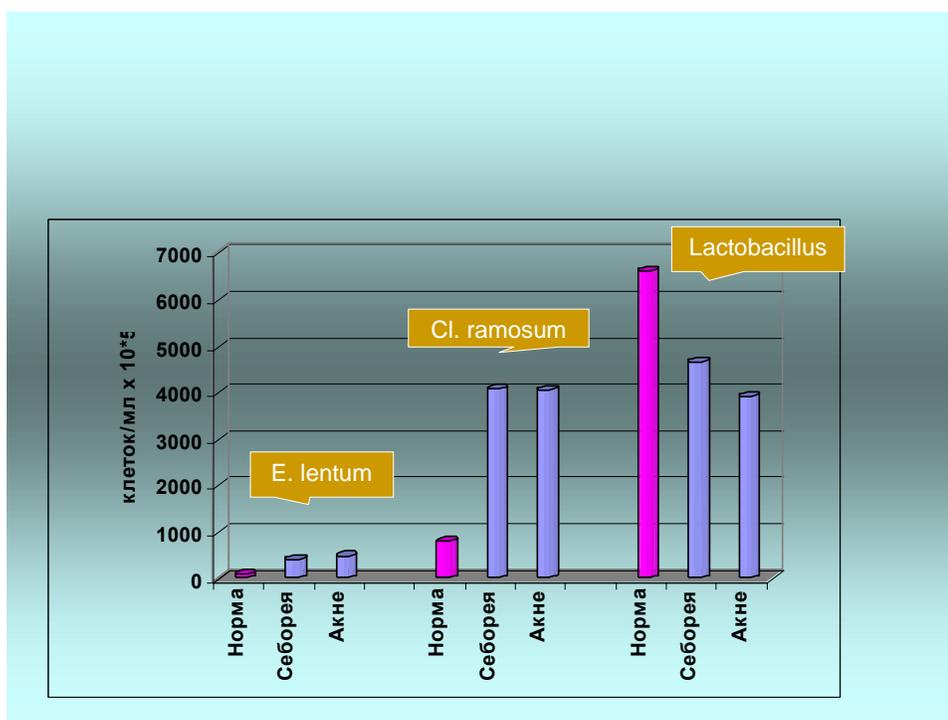
Более чем вдвое растет концентрация маркеров *Clostridium ramosum* и актинобактерий *Streptomyces*, почти у всех больных возрастает количество *Clostridium perfringens*, - до 10 и 100 раз в двух случаях (рис 1). Хотя этот микроб не дает существенного абсолютного вклада в изменение микроэкологии больных себорей в целом, его нельзя недооценивать в патологическом плане: *Clostridium perfringens* образует как минимум 12 токсинов и энтеротоксин. Мишени для основных токсинов – биологические мембраны в различных тканях. Поражения обуславливают ферментативные процессы, катализирующие гидролитическое расщепление и нарушение клеточной проницаемости с последующим отеком и автолизом тканей, характерными для газовой гангрены.

**Рис. 1 Маркеры *Clostridium perfringens* в крови (следовательно – на кишечной стенке) больных себорей на порядок выше нормы (хроматографические пики в районе отметки 23.00 – время в мин)**



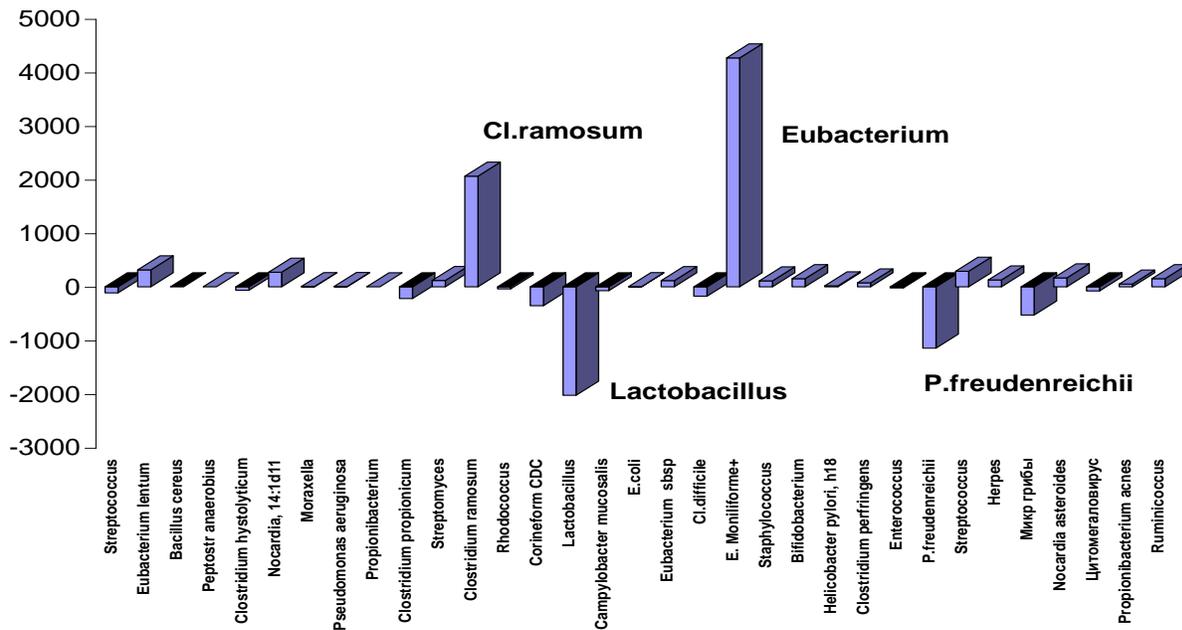
В части изменений микробиоты кишечника наблюдается аналогия с родственным себорее заболеванием – акне (вульгарные угри). Оба эти состояния сопровождаются ростом числа *Clostridium perfringens*, *Eubacterium lentum*, *Clostridium ramosum* при дефиците лактобацилл (рис 2). Но при угревой болезни более выражен рост колонизации кишечника бактериями *Helicobacter pylori*. Этот микроорганизм, хорошо известный участием в микробной этиологии язвенной болезни, в последнее время обнаруживается и в других органах – полости рта, печени, прямой кишке, атеросклеротических бляшках. На этом фоне обнаружение *H. pylori* в других отделах пищеварительного тракта в норме и патологии не выглядит необычным. Патогенность *H. pylori* известна: проникая через слизь, бактерии прикрепляются к эпителиальным клеткам, проникают в железы слизистой оболочки. ЛПС микроорганизмов способствует миграции нейтрофилов и развитию острого воспаления. Под действием бактериальной уреазы мочевины превращается в аммиак, повреждающий слизистую оболочку.

**Рис 2.** При себорее (как и при акне) наблюдается избыточный рост *Eubacterium lentum* и *Clostridium ramosum* на кишечной стенке при дефиците лактобацилл



Несмотря на частичное сходство себорея сопровождается иными изменениями кишечной микрофлоры, чем при атопическом дерматите, или акне, которые легче проследить на диаграммах дисбиоза (рис 3,4,5). При себорее растет численность видов главных анаэробов кишечника *Eubacterium*, клостридий группы *C. ramosum*, актинобактерий *Nocardia* и *Streptomyces* при дефиците *Lactobacillus*, *P. freudenreichii* и *Corynebacterium*.

**Рис 3.** Избыточный рост в кишечнике больных себореей видов *Eubacterium*, клостридий группы *C. Ramosum*, актинобактерий *Nocardia* и *Streptomyces* при дефиците *Lactobacillus*, *P. freudenreichii* и *Corynebacterium*. Нулевое сечение в центре рисунка – норма. Отклонение в плюсовую сторону – избыточный рост, в минусовую – дефицит.



**Рис 4.** Избыточный рост в кишечнике больных акне стрептококков, клостридий группы *C. Ramosum*, бифидобактерий, актинобактерий *Nocardia* и *Streptomyces* при дефиците видов *Lactobacillus* и *Corynebacterium*.

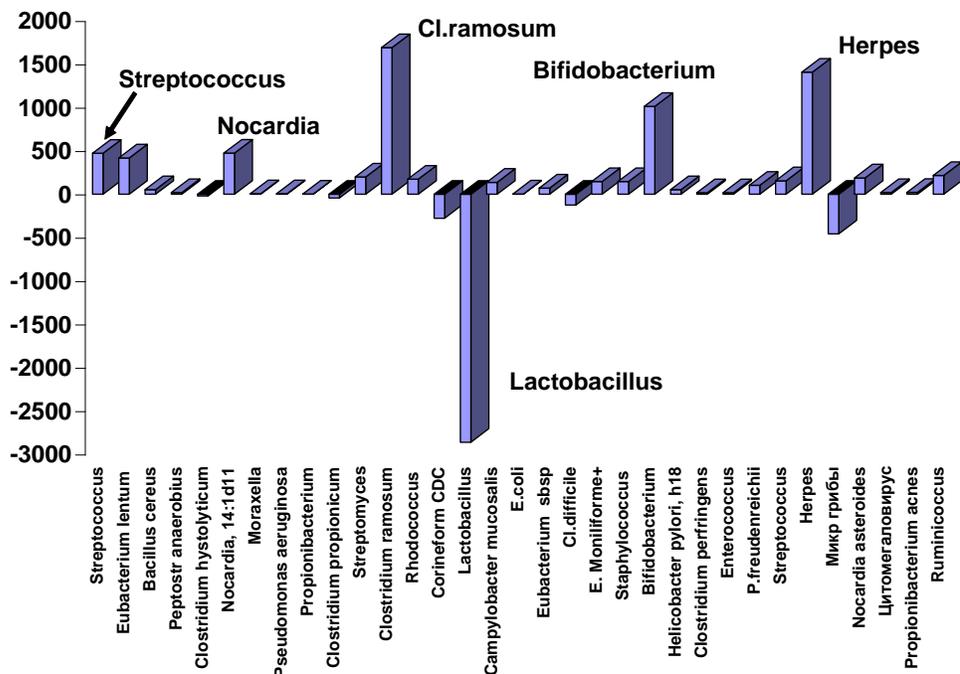
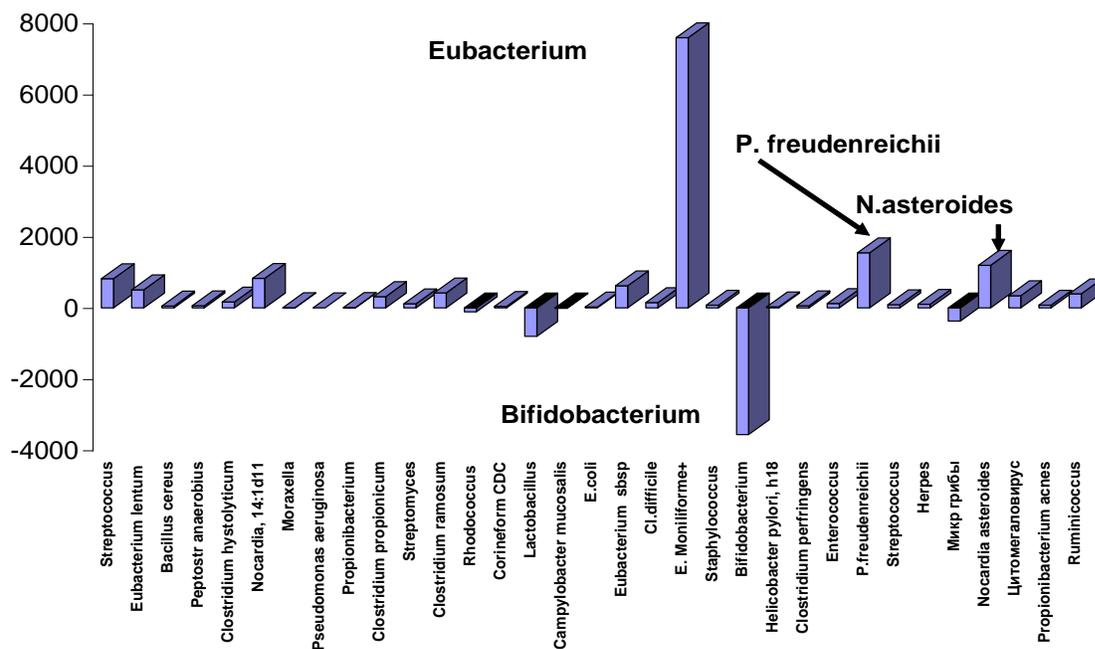


Рис 5. Избыточный рост в кишечнике больных атопическим дерматитом видов Eubacterium, актинобактерий Nocardia и P. freudenreichii при дефиците бифидобактерий



Данные измерений состава микробиоты кишечника при акне и атопическом дерматите представлены в качестве группы сравнения для доказательства специфичности обнаруженного дисбиоза.

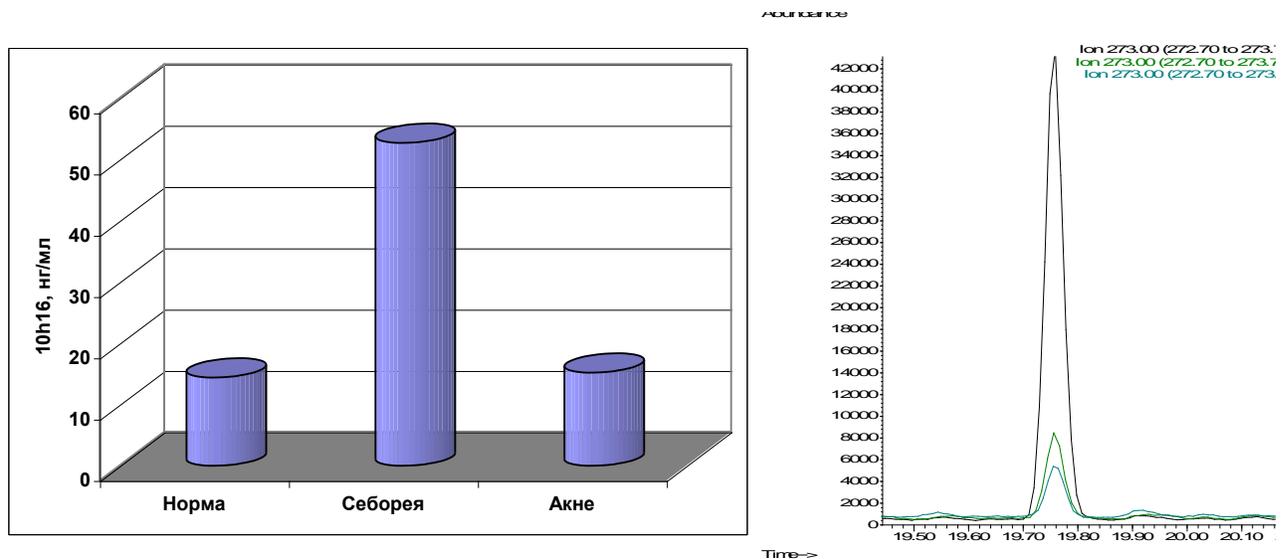
Для выяснения участия дрожжеподобных грибов *Malassesia* в инфицировании кожи при себорейном дерматите была предпринята попытка поиска его маркеров при культивировании на искусственной твердой среде с различными липидными добавками. При первом анализе в биомассе гриба, полученной при использовании стандартной среды с желчью, были обнаружены не характерные для грибов, но специфичные для желчи, холанговые кислоты и их производные (совместно с д.б.н. Арзумян В.Г., Институт вакцин и сывороток им Мечникова). Олеиновая кислота и холестерин доминируют в липидных профилях культур гриба, если они использовались в качестве добавок при культивировании. Разнообразие ЖК и алифатических жирных спиртов, характерных для себума, обнаруживается в его клетках при росте на среде, содержащей кожное сало.

В результате можно сделать вывод о том, что *Malassesia* использует материал субстрата для построения собственных липидов. Вряд ли компоненты таких липидов могут быть использованы в качестве его молекулярных маркеров при исследовании его содержания в пробах при угревой болезни. Маркеры были найдены при анализе содержимого комедона. Оказалось, что оно представляет собой в основном кожное сало. Уровень содержания в нем арахидоновой кислоты соответствует норме себума, что не допускает наличия заметного количества лейкоцитов. Однако уровень содержания ряда микробных маркеров превышает норму. Кроме компонентов себума в комедоне обнаруживаются маркеры стафилококков, пропионобактерий, стрептококков (оральных или *S.pyogenes*), коринебактерий, клебсиелл и бифидобактерий, а также высокая концентрация гидроксидов с 18 атомами углерода (2h18, 3h18, 10h16 и 10h18). Оказалось, что и в самой культуре дрожжей *Malassezia* эти вещества присутствуют в большой концентрации, особенно 10h16 (10-гидроксипальмитиновая) кислота, содержание которой достигает 10 мг/г биомассы. Она и была принята в качестве основного маркера при исследовании концентрации *Malassezia* в различных биоматериалах и ее изменения при заболеваниях кожи. В результате было найдено, что концентрация 10h16 на коже в норме у доноров (n=15) составляет в среднем 14,4 нг/мл кожного сала, в крови – 6, ногтях – 2, фекалиях – 33 нг/мл. При акне (n=50) содержание малассезии не отличается от нормы и составляет 15,2 нг/мл, при алопеции (n=30)

– 5-8 нг/мл. При этом, как у доноров, так и у больных отмечены единичные случаи высоких концентраций маркера *Malassezia* – до 200 нг/мл. Однако при себорее в капиллярной крови с кожи головы (n=10), равно как и в кожном сале (n=15), получен устойчиво повышенный уровень его содержания 52,7 нг/мл в среднем. Измерения проведены одним методом в количественно сопоставимом режиме при биологической воспроизводимости 20% относительных. Этот опыт убедительно показывает, что только в случае себорейного дерматита дрожжи *Malassezia* можно рассматривать в качестве одного из инфекционных агентов (рис.6)

**Рис 6.**

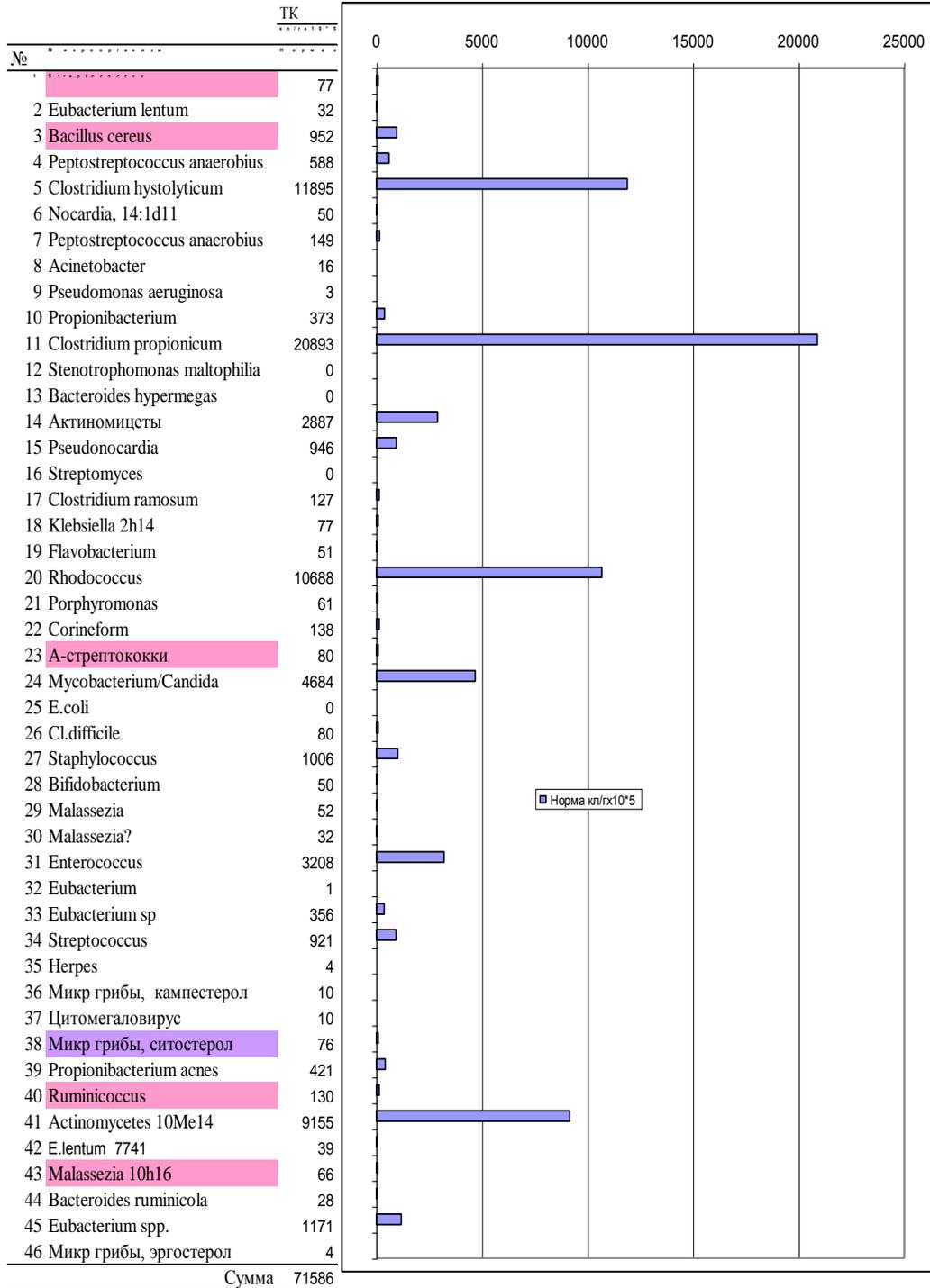
**Среднее значение маркера дрожжей *Malassezia* в кожном сале при себорее и акне**  
**Справа – вид селективной хроматограммы 10h16 (10-гидроксипальмитиновой кислоты), маркера *Malassezia*, при тяжелой форме заболевания**



Методы микробиологии, связанные с необходимостью выращивания живых микроорганизмов, мало пригодны (если не сказать, - не пригодны) для достоверного анализа микрофлоры кожи в мазках или смывах с ее поверхности. «На кожных покровах микроорганизмы подвержены действию бактерицидных факторов сального секрета,

повышающих кислотность. В подобных условиях живут преимущественно *Staphylococcus epidermidis*, микрококки, сарцины, аэробные и анаэробные дифтероиды. .... Основные зоны колонизации – эпидермис (особенно роговой слой), кожные железы (сальные и потовые) и верхние отделы волосяных фолликулов..... Обычно на 1 см<sup>2</sup> выявляют 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> микроорганизмов; на участках с повышенной влажностью их число может достигать 10<sup>6</sup> .» (15). В другом источнике сообщается, что видовой состав кожи включает более 300 видов анаэробных и аэробных бактерий (для сравнения - в кишечнике – около 500). «Они присутствуют преимущественно в толще эпителия, сальных желез, воронкообразных расширениях волосяных фолликулов». При этом «Значительная плотность микробных популяций отмечена в области лба и волосистой части головы (до 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> КОЕ/см<sup>2</sup>)» (16). Если сравнить эти оценки с приведенными в начале раздела данными 10<sup>9</sup> – 10<sup>10</sup> / см<sup>2</sup> (17), то приходится признать, что культуральный метод выявляет менее тысячной доли кожных микробов. Поскольку масс-спектрометрия опирается на анализ молекулярных микробных маркеров микроорганизмов, для которых кожное сало является нейтральной транспортной средой, то ее данные следует считать наиболее близкими к реальным как по видовому составу, так и количеству клеток каждого вида. Последнее определено по порядку величины с использованием внутреннего инварианта биологических жидкостей человека и животных – маргариновой кислоты, содержание которой известно и составляет 1-1,5 % от суммы жирных кислот. Вычисленные таким образом концентрации микроорганизмов кожи приведены в таблице 2 и отдельно на рис 5а. Их сумма составляет 10<sup>9</sup> – 10<sup>10</sup> / мл, что в точности соответствует оценке Нобла. Поэтому масс-спектрометрический метод следует считать оптимальным для сопоставительных оценок изменения состава микрофлоры при патологических состояний и эффекта лечения.

**Рис. 5а. Состав микроорганизмов кожи в норме по данным измерений микробных молекулярных маркеров методом масс-спектрометрии.**



Во всяком случае, методом масс-спектрометрии нами получены новые данные, позволяющие рассматривать себорейный дерматит как своеобразную форму хронической инфекции, обусловленную ассоциацией различных условно-патогенных бактерий и грибов.

Это заключение сделано на том основании, что у всех больных себореей и акне в зоне поражения обнаружен чрезмерный рост отдельных организмов и создаются благоприятные условия для образования множества токсических метаболитов, которые по общепринятым представлениям, несомненно, оказывают повреждающее действие на биологические мембраны. Кроме того, аналогичные изменения возникают и в биоценозе кишечника, формируется пролонгированное состояние эндотоксемии с фиксацией эндотоксинов на клетках кожи, что в конечном итоге приводит к хроническому воспалению, в том числе и за счет включения кожи в иммунопатологический процесс. В ранее опубликованных работах нами было уже показано, что у больных себорейным дерматитом обнаруживаются все признаки иммунного воспаления: активация нейтрофильных гранулоцитов, CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и NK-клеток, гиперплазия ростка цитолитических CD8<sup>+</sup> Т-клеток, а также значительное нарастание синтеза IgG и IgA (18).

На основании полученных нами результатов можно выделить в патогенезе себорейного дерматита и акне следующие ведущие звенья:

- хроническая персистирующая инфекция (*Malassezia*, *Eubacterium*, клостридии группы *C. ramosum*, актинобактерии *Nocardia* и другая условно-патогенная флора),
- дисбактериоз кожи и кишечника,
- образование бактериальных токсинов с фиксацией на биологических мембранах кожи в связи с генетической предрасположенностью,
- включение кожи в иммунопатологический процесс.

Придавая большое значение иммунопатологическим реакциям, приходится все же признать, что главное ведущее значение в патогенезе себорейного дерматита и акне имеет инфекция. Однако попытки обнаружить конкретного возбудителя не увенчались успехом. Очевидно, что в качестве этиологического фактора могут выступать многие микроорганизмы от стафилококков до грибов *Malassezia* или даже микробных ассоциаций в условиях дисбиотических нарушений.

Представленные нами данные несомненно должны учитываться при построении терапии. В программу лечения себорейного дерматита и акне должны обязательно включаться этиотропные препараты, мероприятия на нормализацию дисбиотических нарушений, средства снижающие эндотоксемию, препараты на подавление иммунопатологических реакций, проводится иммунокоррекция и иммунореабилитация.

Основными функциями эубактерий в организме человека являются: образование водорода, высвобождение гистамина, биотрансформация желчных кислот, индуцирование продукции провоспалительных цитокинов и TNF- $\alpha$ , а также противовоспалительного цитокина IL-10 (как ЛПС или клеточные токсины Грам+ патогенов) и другие. Эубактерии чувствительны к амоксиклаву или ампициллин-сулбактаму.

Патогенность клостридий более известна в клинической практике. Они обладают широким набором экзотоксинов. У *C. perfringens* их насчитывается двенадцать. *C. ramosum* обладает близкой активностью, в том числе также может вызывать газовую гангрену, язвенный и некротизирующий колиты. Они известны как агенты септицемии, нефропатии, бактериемии и даже менингита.

По литературным данным амоксилав, ампициллин-сулбактам, пиперациллин-тазобактам, а также метронидазол являются эффективными препаратами в отношении *C. ramosum* (9 JCM).

Выбор антибиотиков при лечении по данным масс-спектрометрии микробных маркеров имеет свои особенности. По опыту предыдущих и настоящих исследований надо отметить, что отнесение дисбиоза за счет антибиотикотерапии следует рассматривать во вторую очередь, отдавая предпочтение другим стрессовым факторам. Самым красноречивым подтверждением в этом плане является опыт по воздействию экстремальных доз ампициллина на микробиоту крыс (10 Осипов, 2006). Она (микробиота) оказалась устойчивой к этому препарату. Так же, как устойчива биопленка псевдомонад к действию антибиотиков *in vitro* (11 конф по Антибиотикам и химиотерапии). Молекулярный метод диагностики инфекции и дисбиозов не требует выделения микробов в чистой культуре – это его преимущество. Оно имеет свою отрицательную сторону. Нельзя определить привычную для врача чувствительность к антибиотикам штаммов микроорганизмов, выделенных от данного больного. Но ведь метод определяет по большей части некультивируемые микроорганизмы – значит это естественный недостаток. Его преимущество – обнаружение в количественном измерении реально действующих микроорганизмов инфекционного процесса – стоит большего. Данные по чувствительности надо брать из литературы. Все «некультивируемые» микроорганизмы на самом деле когда-то были выделены в чистом виде и описаны по всем правилам микробной таксономии. Более того, производители антибиотиков и идентификационных систем регулярно выращивают эти микроорганизмы в своих лабораториях, а данные по антибиотикочувствительности и методам культивирования

публикуют в научной и фирменной периодике. Пока клинические лаборатории не ввели в практику посев материала на определение лактобацилл, эубактерий, клостридий, пропионбактерий, актинобактерий и других основных представителей микробиоза человека следует пользоваться данными других лабораторий. Они оперативно доступны через сеть Интернет. Часть этих сведений приведены выше при обсуждении свойств выявленных у конкретных больных инфекционных агентов. Как видно, моноэтиологических случаев, то есть, воспалений, вызванных одним агентом, как это часто звучит в результатах клинических бактериологических лабораторий, на самом деле нет. До двадцати микробов из 47, выявленных в настоящем исследовании, участвуют в патологическом состоянии больного (например, анализ № 544). Сейчас нет реальной возможности в короткий срок выделить все эти двадцать микробов и пересеять культуры на антибиотикочувствительность и при этом успеть помочь больному. Надо полагаться на данные лабораторий, специально занимающихся анаэробами или актинобактериями. Непривычным для врача является также задача расстановки приоритетов в списке агентов инфекции и выбора тактики нормализации измененного стрессовым воздействием микробиологического статуса пациента.

Коррекция дисбиоза также требует модификации, так как отсутствуют методические разработки по коррекции дисбиозов с учетом полного спектра основных микробов кишечника. Поэтому уместно изложить в рамках настоящей работы опыт немногочисленных врачей, использующих данные ГХ-МС в своей работе. Как отмечалось, часть обследованных лиц были пациентами восстановительных отделений, в меньшей степени обремененными инфекцией по сравнению с частичным или полным дефицитом микробиоты. Как видно из экспериментальных данных и данных работы (З Осипов, Парфенов 2003), дисбактериоз кишечной стенки при СРК носит преимущественно дефицитный характер. Но при этом не только удерживаются на прежнем уровне, но и растут анаэробы *Bacteroides fragilis*, *Porphyromonas*, *Propionobacterium acnes*, а также *Campylobacter mucosalis*, энтерококки, псевдомонады, *Acinetobacter*, бациллы и стрептококки. Эта группа микробов вероятно является источником токсинов, поддерживающих заболевание при дефиците противодействия со стороны основных представителей нормальной микробиоты. В переводе на общепринятый язык ее можно определить как группу условно-патогенных микроорганизмов. В таком случае разумно говорить об антибиотикотерапии при СРК, хотя это выглядит на первый взгляд абсурдным. В действительности, в отделении патологии

тонкого кишечника ЦНИИГ, где проходили лечение больные, им назначали полусинтетические пенициллины и сульфамилаиды параллельно с сухими пробиотиками. Однако выборочные контрольные анализы после лечения показывают, что микробиота кишечника восстанавливается лишь на 50%. Не хватает в этой ситуации метронидазола, который дополнил бы комбинацию препаратов действием на бактериоды. Эффективность пары амоксициллин-метронидазол отмечена в справочнике (12 Видаль-1999) в статье Metronidazole, где его вместе с амоксициллином рекомендуют для лечения, например, вульгарных угрей (акне). Действительно, даже монотерапия метронидазолом стимулирует рост нормальной микрофлоры тонкого кишечника как было показано по маркерам в крови больного до и после курса метронидазола. Дефицит бифидобактерий и пропионобактерий, обнаруженный у больного был преодолен, но сохранился первоначальный избыточный рост *Clostridium ramosum*, стрептомицетов и грибов кандиды. Действительно, назначение амоксициллина, к которому у клостридий чувствительность на порядок выше, чем к метронидазолу, особенно в его комбинации с клавулановой кислотой (амоксиклавом), привело к положительному эффекту в снижении концентрации клостридий группы *C. ramosum*. В тоже время прием этого препарата в течение времени и доз, указанных в аннотации, не показал по данным ГХ-МС анализа угнетения остальной части полезной микробиоты кишечника. Как следует из литературных данных, анаэробы не восприимчивы к обычно применяемым антибиотикам резерва: ванкомицину и амикацину. Эти препараты эффективны в случае участия в инфекционном процессе аэробных актинобактерий: стрептомицетов, нокардий, родококков (13 McNeil MM), которые довольно часто включаются в микст-инфекцию обследованных нами больных.

Что касается действия сухих пробиотиков, то в практике терапии в ЦНИИГ положительная динамика в клиническом течении заболевания начинала появляться со 2–3-го дня лечения бифиформом, а дисбиотические изменения кишечника восстанавливались более медленно.

Вероятно, во-первых, одного пробиотика, даже бинарного и при десятикратной дозе не достаточно для быстрой стимуляции роста всех бактерий, находящихся в дефиците (тем более инородных пробиотическим микроорганизмам). Во-вторых – как видно из рис. 3, довольно часто полярность изменения концентрации ключевых микробов оказывается в противофазе. Вы стимулируете бифидобактерии – а их и так оказывается избыток. Больной

не отвечает на пробиотик. В третьих – на восстановление численности медленно растущих микробов требуется продолжительное время. Более перспективным выглядит применение жидких пробиотиков типа нормофлоринов или трилакта. В них на два порядка больше живых бактерий ( $N=10^{10}$ ), да еще жидкая среда в качестве пребиотика. Конечно, и этого мало, чтобы восполнить недостаток или подрастить дефицитные лактобациллы или бифидобактерии – дело не в этом. Поскольку в кишечнике их примерно  $10^{12}$ , то добавка пробиотика не восполняет дефицита по количеству клеток, но на самом деле клинический эффект достигается. Можно предположить, что живые культуры бифидо- и лактобактерий вместе с частью культуральной среды содержат биокаталитические вещества, стимулирующие восстановление не только этих, но и других микробов – то есть восстановление кишечного гомеостаза. В качестве примера можно привести коррекцию дисбактериоза у больного циррозом печени (рис 4) (доктор Киселев В.В., Институт скорой помощи им Склифосовского).

До лечения у больного обнаружен избыток *S. ramosum*, стрептококков, нокардий и *Actinomyces viscosus* при существенном недостатке основных микроорганизмов нормальной микробиоты кишечника – лактобацилл, бифидобактерий, зубактерий и пропионобактерий. После лечения микробиологический статус в основном нормализовался, за исключением того, что лактобациллы не достигли нормы, а численность зубактерий перешла в избыток.

Нормализующее действие на нарушенную микробиоту кишечника оказывает синтетический тетрадекапептид гепон. В отличие от большинства известных иммуномодуляторов гепон обладает противовоспалительными свойствами, противовирусной активностью, способностью к активации местного иммунитета, повышению устойчивости слизистой оболочки к инфекциям. Уровень колонизации микроорганизмами тощей кишки возрастает до пяти раз в сравнении с исходным уровнем, что актуально для больных СРК, у которых дефицит микробиоты может быть семикратным. Базовые кишечные микроорганизмы - зубактерии, бифидобактерии и клостридии достигают или превышают уровень нормы. Лактобациллы остаются ниже нормы, хотя их численность увеличивается на порядок по сравнению с первоначальной. По многим микробам - кокки, актиномицеты, энтеробактерии, грибы обнаруживается восстановление нормы или избыточный рост более чем на порядок.

Результаты количественного анализа широкого круга микроорганизмов кишечника в двух его отделах (тощая и ободочная) одновременно позволили выявить сложную картину перестройки микробиоты в результате применения в качестве регулирующего средства – пробиотика энтерола, представляющего собой препарат дрожжей *Saccharomyces boulardii*. Сопоставление микробных профилей до и после курса лечения энтеролом показали, что в тонком кишечнике происходят изменения, одинаково направленные у всех обследованных в сторону восстановления нормальной микробиоты. Однако ее восстановления до уровня колонизации практически здоровых людей не происходит, несмотря на положительные результаты по клиническим показателям. Тенденций к специфическому воздействию энтерола на определенные микроорганизмы или их группы при этом не выявлено. Энтерол более активен по отношению к микроорганизмам тощей кишки по сравнению с толстой. Это проявляется в общем увеличении уровня колонизации при исходном дефиците микробиоты, а также в преимущественном росте количества отдельных видов микроорганизмов. Кроме того, стабильно увеличивается численность большинства видов микроорганизмов. Причем этот рост не специфичен: у разных пациентов стимулируется рост разных видов. В фекалиях изменения происходят хаотично, как в отношении общего содержания в них микроорганизмов, так и отдельных членов сообщества. Можно усмотреть тенденцию к усугублению общего дефицита микрофлоры, подавлению клостридий перфрингенс, лактобацилл, энтерококков, некоторых эубактерий и пропионобактерий. У всех пациентов многократно в сравнении с контрольной группой снижено общее содержание бактерий в фекалиях. Хотя действие энтерола несомненно изменяет численность ряда микроорганизмов в сторону нормы, но по сумме микробов он либо слабо увеличивается, не достигая нормы, либо происходит уменьшение общей численности за счет, например, существенного уменьшения избытка клостридий перфрингенс и лактобацилл на фоне роста концентрации организмов других таксонов.

Препарат висмута ДеНол, как оказалось, обладает воспроизводимым эффектом оптимизации общего уровня колонизации тощей кишки и концентрации отдельных микроорганизмов. То есть нивелирование дисбактериоза в сторону нормы: уменьшение концентрации микробов, проявляющих избыточный рост, и увеличение численности дефицитных микробов. Так реагируют на ДеНол основные обитатели кишечника – бифидобактерии, эубактерии (*E. moniliforme*, *E. nodatum*, *E. sabureum* и пр.) а также

пропионовые бактерии. К сожалению, исходный нормальный уровень лактобацилл в большинстве случаев понижается под действием препарата. Концентрации клостридий пропионикум и гистолитикум при исходном низком уровне (на один-два порядка ниже нормы) после лечения увеличивают численность и достигают в ряде случаев нормального уровня. Численность *C. difficile*, как правило, уменьшается после лечения от 20% до шести раз. Численность актинобактерий (*Actinomyces*, *Streptomyces*, *Nocardia*), грибов и цитомегаловируса также имеет тенденцию к снижению. Заметно уменьшается количество энтерококков и стафилококков, изначально превышавших норму. Можно предположить, что для снижения больших концентраций энтерококков требуется увеличение дозировки препарата.

#### Список литературы:

1. Burkhart C.N., 2003.
2. Healy E., Simpson N., 1994; Daniel F. et al., 2000; Cordain L. et al., 2002; Dreno B., Poli F., 2002.
3. Аравийская Е.Р. с соавт., 1998; Wolf J.E., 2002; Woodard I., 2002; Данилова А.А., 2001; Адаскевич В.П., 2003; Burkhart C.N., 2003.
4. Till A.E. et al., 2000; Burkhart C.N., 2003.
5. Neubert U., Korting H.C., 1988; Eady E.A. et al., 1988; Noble W.C., 1993.
6. Осипов, 1996; Крымцева, 2003; Хабиб, 2004.
7. S. Higaki and M Morohashi Characteristics of anaerobes from skin specimens. *Drugs Exp Clin Res*, January 1, 2003; 29(4): 153-5.
8. CN Burkhart and CG Burkhart Microbiology's principle of biofilms as a major factor in the pathogenesis of acne vulgaris. *Int J Dermatol*, December 1, 2003; 42(12): 925-7.
9. I. Brook, Secondary bacterial infections complicating skin lesions. *J. Med. Microbiol.* -- Vol. 51 (2002), 808-812.
10. Vjorksten B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Oct; 108(4): 516-20.
11. Волкова Л. А., Халиф И. Л., Кабанова И. Н. Влияние дисбактериоза кишечника на течение вульгарных угрей. *Клиническая медицина* №6 2001.
12. Осипов, Парфенов 2001.
13. Осипов Г.А., 1996; Крымцева Т.А., 2002; Хабиб О.Н., 2002.
14. Белобородова, 2000.
15. Поздеев О.К. Медицинская микробиология. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001, стр. 123.
16. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. В 3-х томах. Том 1.; Микрофлора человека и животных и ее функции. Стр 14-17. М., Грант, 1998.

17. Нобл У.К., 1986.

18. Полеско И.В.

Galland, L. and S. Barrie, Intestinal dysbiosis and the causes of disease. J. Advancement Med., 1993. 6: p. 67-82.

Davies, G.R., M.E. Wilkie, and D.S. Rampton, Effects of metronidazole and misoprostol on indomethacin-induced changes in intestinal permeability. Dig Dis Sci, 1993. 38(3): p. 417-25.

Bjarnason, I., et al., Metronidazole reduces intestinal inflammation and blood loss in non-steroidal anti-inflammatory drug induced enteropathy. Gut, 1992. 33: p. 1204-1208.

Pybus, P.K., Metronidazole in rheumatoid arthritis. S. African Med. J., 1982. (February 20): p. 261-262.

### **Материалы и методы.**

**Газовая хроматография - масс-спектрометрия.** Цельную кровь в количестве 0,05 мл высушивали при добавлении метанола и подвергали кислому метанолизу в 1 М HCl в метаноле. В результате реакции метанолиза жирные кислоты освобождаются в виде метиловых эфиров. Их двукратно экстрагировали 200 мкл гексана, высушивали и обрабатывали в 20 мкл N,O-бис(триметилсилил)-трифторацетамида в течение 15 мин при 80 °С для получения триметилсилильных эфиров гидрокси-кислот. Смесь эфиров в количестве 1 мкл вводили в инжектор ГХ-МС системы AT-5973 Agilent Technologies (США). Для управления и обработки данных использовали штатные программы прибора. Хроматографическое разделение пробы осуществляли на капиллярной колонке с метилсиликоновой привитой фазой HP-5ms Хьюлетт-Паккард. Длина колонки 25м, внутренний диаметр 0.25 мм. Режим анализа - программированный, скорость нагрева термостата колонки - 5 град/мин в диапазоне 130 - 320°С. Масс-спектрометр - квадрупольный, с ионизацией электронами (70эВ) работал в режиме селективных ионов (SIM), при периодическом детектировании до 30 ионов в пяти интервалах времени. Интервалы и ионы выбирали таким образом, чтобы селективно измерять концентрации маркерных жирных кислот определяемых видов микроорганизмов. В том числе использовали сильный ион  $m/z = 87$  в спектрах жирных кислот (ЖК) для детектирования малых количеств микробных кислот C12-C15, C17, C19. Ион 175 взят постоянно в каждом режиме для детектирования  $\beta$ -оксикислот, для которых он специфичен и интенсивен в спектре. Интенсивные ионы 301, 315 и далее через 14 единиц массы (структуры M-15) выбраны в качестве свидетелей молекулярного иона оксикислот тридекановой, тетрадекановой и следующих в гомологическом ряду. Ион 312, как молекулярный, взят для выявления изомеров нонадекановой кислоты, важных для диагностики стафилококков и энтерококков. Всего в программу мониторинга при записи хроматограммы в режиме SIM введено 33 иона. Такой алгоритм детектирования масс-спектральных параметров биологической пробы, по нашему подсчету, позволяет детектировать около двухсот известных ЖК, спиртов и стеролов микроорганизмов, что достаточно для выявления и количественного определения более 170 таксонов клинически значимых микроорганизмов на уровне рода или вида, а также для полного анализа этих веществ в каждом сале.

Площади пиков маркеров на масс-фрагментограммах интегрировали автоматически по

заданной программе с использованием внутреннего стандарта – тридейтеро-метилового эфира тридекановой кислоты (CD<sub>3</sub>-C13:0). Затем эти данные вводили в программу расчета, подготовленную в электронных таблицах EXCEL.

#### **Анализ липидных веществ кожного сала.**

Жирные кислоты, спирты и стеролы кожного сала получали путем кислого метанолиза мазков, снятых с кожи ватным тампоном, применяемым в бактериологии. Наружную часть ваты снимали пинцетом и помещали в виал для метанолиза. Далее обрабатывали пробу вместе с ватой, как описано выше для случая анализа крови. ГХ-МС анализ проводили по тому же методу масс-фрагментографии с добавлением в программу сканирования ионов с массой 103, характерных для гомологического ряда триметилсилильных производных жирных спиртов и иона 129, общего для ряда целевых стеролов. Отличалась от прежней методика обработки данных включением уникальных для себума разветвленных и ненасыщенных ЖК и спиртов с длиной цепи от 10 до 30 атомов углерода. При обработке данных в программе EXCEL автоматически суммировали количество спиртов, жирных кислот и стеролов и соотношение их вариантов. Для сопоставления проб и мониторинга лечения использовали профиль деципроцентного состава проб – долю веществ от их суммы, нормированной на 1000 (а не на 100, как в обычных процентах). Для идентификации веществ хроматограммы проводили отдельные анализы при прямом сканировании проб по полному масс-спектру с последующим библиотечным поиском в штатных базах данных прибора (NIST98.L и WILEY275.L).

#### **Кожа – мишень токсинов кишечных микробов**

- **Результаты исследования изменений состава микроорганизмов в кишечнике при кожных заболеваниях свидетельствуют, что здоровье кожи напрямую связано со стабильностью.**
- **Избыток вредных, равно как недостаток полезных веществ, продуцируемых пристеночной микробиотой нарушает на молекулярном уровне нормальное функционирование кожи, как органа.**
- **Что является первичным, а что вторичным в этом взаимоотношении еще предстоит выяснить. Тем не менее, ясно, что нормализация кишечного биоценоза может облегчить лечение заболевания.**

#### **Заболевания**

##### **полимикробны**

- Все исследованные случаи кожных патологий связаны с увеличением концентраций маркеров до 20 и более видов микроорганизмов
- Все они относятся, как правило, к индигенной микробиоте
- Осложненные, хронические и другие трудные состояния связаны с участием микробов

(анаэробов, актиномицетов и др.), не диагностируемых в обычной клинической практике

**При акне:** Растет доля ЖК с длиной цепи 10-17 при уменьшении доли стеариновой и пальмитиновой и высших ЖК C20-C30. Наряду с увеличением количества спиртов это свидетельствует об увеличении доли восков в себуме и сдвига соотношения экзогенных липидов кожи (фосфолипидов) и эндогенных (восков) в сторону уменьшения.

Растет относительное количество 5,8 18:2 по сравнению с 9,12 изомером октадиеновой кислоты

Растет доля спиртов, в основном за счет нечетных

Практически значимы для понимания этиологии заболевания, полученные в работе сведения о некультивируемых микроорганизмах кожи и кишечника, а также изменениях 127 видов жирных кислот, спиртов и стероидов себума.

Впервые проведена оценка степени дисбактериоза кишечника у больных ВУ по данным анализа микробных маркеров в крови.