2
2019

Педиатрия

www.spisanie-pediatria-bg.eu



Значение на кожния и лигавичен микробиом за имунитета в детската възраст

Ж. Стоянова[1,2], И. Бакърджиев[2,3]

[1] Отделение по кожни болести и венерология, УМБАЛ „Света Марина“ ЕАД - Варна

[2] Медицински университет - Варна

[3] Медицински колеж - Варна

Ключови думи: *микробиом, нормална флора, имунитет, имунен отговор на кожата в детска възраст, Лактобацили, Пропионибактерии, антитела*

ВЪВЕДЕНИЕ

Кожата медиира информацията от външния свят и осигурява първа линия на защита срещу патогени, токсини и неблагоприятните условия на околната среда. Тази бариерна функция е както физическа, така и имунологична и се поддържа от микробните общности, обитаващи кожата(1). Микроорганизмите, живеещи по кожата и лигавиците на орофаринкса, горните дихателни пътища, конюнктивата, дебелото черво и долните отдели на уро-генитална трактт, се наричат „нормална флора“ (физиологична, естествена, индигенна, аутохтонна, микробиом) - разнообразна колекция от микроорганизми - бактерии, гъбички, вируси - и акари (2-7). Кожната микрофлора допринася за бариерната функция, като се конкурира с патогени и комуникирайки с имунните клетки в кожата (9), за да модулира имунните отговори на местно (10) и системно ниво (11). Кожната микрофлора и имунните медиатори, като системата на комплемента (12), имат двупосочно взаимодействие, което показва, че коменсалните микроби трябва да се считат за съществена част от здравата кожа. Установено е, че съставът на микробиома, може да окаже голямо влияние върху индивидуалното здраве (13,14).

Възрастта е основна детерминанта на кожния микробен състав. Разнообразието от микробиоти се увеличава най-бавно през първите години от живота, което се свързва с доминирането на лактобацилите върху кожата (особено род Streptococcus). През пубертета се наблюдава по-голямо видово разнообразие, отколкото в по-малките възрастови групи. В подрастващите относителното изобилие на Lactobacilles намалява и се заменя от други групи, а именно Actinobacteria и Proteobacteria. На 14-годишна възраст разнообразието в кожната микрофлора наподобява това, което се наблюдава при възрастни (15).

Нормална флора на детската кожа и лигавици

Най-висшите микроорганизми, които притежават прецизни регулаторни системи - топлокръвните птици и млекопитаещи (вкл. и човекът), предоставят най-добрите условия за развитието на различни микроорганизми.

Използва се терминът „флора“, тъй като повечето от обитателите на човешкия организъм са бактерии. Изчислено е, че всеки от нас притежава около 40 трилиона телесни клетки (16) и около 22 хиляди гени (17) и повече от 100 трилиона микроорганизми (18) повечето, от които бактерии, локализирани в чревния тракт.

Преобладаващата част от нормалната флора, живееща постоянно по кожата или лигавиците се нарича резидентна флора. За разлика от тях от околната среда в организма попадат и преживяват временно микроорганизми, които съставят транзиторната флора. Микроорганизми, които попадат временно върху кожата от съседна зона и могат да причинят заболяване, се наричат временни резиденти.

Покритието на различните участъци от кожата с микроорганизми зависи преди всичко от степента на нейната влажност и наличие на себацейни жлези. Сухите участъци са относително бедни, докато повлажните като аксили, перинеум, интердигитални пространства и скалпа поддържат по-голяма микробна популация.

В дълбоките части на космените фоликули се откриват анаеробните Propionibacterium, а повърхностно - аеробни коки, Malassezia. Не се наблюдават обитатели в апокринните, екринните, потните жлези и каналите им. Единствено в последните се откриват вещества с различна антимикробна активност.

Аеробната резидентна флора се представя от Грам-позитивни видове Staphylococcus, Micrococcus, Corinebacterium spp, Грам негативните - Acinetobacter spp. Анаеробната флора най-често е представена от Propionebacterium spp, Staph.saccharolyticus в 20% от популацията.

Популацията на стафилококовите микроорганизми е представена от над 40 вида, като 10 от тях са редовно изолирани от нормалната кожа - коагулазо-негативните S. hominis и S epidermidis, а също и S. capitis, S cohnii, S. haemoliticus, S. saprophyticus, S. warneri. Тя е по-многобройна, сравнено с популацията на Micrococcus, представена от M. luteus, M. varians, M. kristinae, M. sedentarius и M. lylae.

Коринеформените бактерии (дифтероидите) са предимно Грам-положителни, аеробни, плеоморфни пръчици. Разделят са на четири Коринеформени комплекса - C. bovis, C. minutissimum, C. xerosus и C hofmani. Последните, заедно с Propionibacterium и Brevibacterium, са изключително представени в зоните с по-висока влажност.

Пропионебактериите са представени от три вида микроорганизми - P. acnes, P. granulosum и P. avidum. Това са анаеробни, Грам-положителни пръчици, които

по-често ангажират кожата по лицето, подмишниците и слабините на възрастните.

Количествено разпределение на кожния микробиом:

Популацията на Микрококацеа на квадратен сантиметър от кожата е изчислена на 600 за ръце, 60 - предмишници, 300 - regio scapulare и 500 хил. до 1 млн. в аксилите (19). Тоталният брой на анаеробите, включвайки и дефтероиди е 1.46x10(6) по скалпа и 2.41x10(6) за аксиларните зони (20).

По кожата на фронтална област се откриват над 200 хиляди, докато по предмишниците се откриват две популации от резидентни микроорганизми. Едната с по-голяма численост - 4500/см², а другата - 100/см². За гърба средната стойност на населеност е малко над 300/см².

В зоните с по-големи фоликули - лице, гърди, гръб, анаеробните представители варират от 50 хил. до няколко млн/см² (21). Използвайки микродисецираща техника на космен фоликул, може да се определи броят на анаеробите в един фоликул - 3.8x10(4) (22).

Броят на микроорганизмите през годините варира незначително. Разлики се наблюдават в популацията. Някои индивиди, хабитуално носят повече, а други по-малко резидентни микроорганизми, но въпреки това се наблюдава равномерно разпределение по кожата в различните зони на тялото.

Модифициращи фактори

Факторите на околната среда и макроорганизма пряко оказват влияние върху микробната популация. Избягване на често миене на кожата не води до драстично повишаване общия брой микроорганизми, понеже хигиенизирането предизвиква значителна временна редукция на бактериалната флора и временно разрушаване в микроколониите. Един до два часа след това се наблюдава повишаване дисеминацията на бактерии от съседни зони (19). Счита се, че сезоните не оказват особено влияние на кожния микробиом, но е установено увеличаване на популациите с повишаване на температурата на околна среда и влажността при едновременно влияние на тези два фактора, не и самостоятелно (23). Ефектите от повишеното хидратиране на кожата са установени чрез покриване на кожата с фин хидратиращ филм, при което количеството на общата флора значително се повишава в началните фази като коагулазо негативните стафилококи и микрококи преодоминират, но по-късно липофилните коринебактерии увеличават числеността си, а микрококите намаляват. Грам-негативните пръчици се повишават с времето (24). В тропическите ширини често изолиран от аксиларните зони на новородени кърмачета е Pseudomonas aeruginosa, който се оказва честа причина за колонизация и инфектиране в тези области (25).

Друг важен, модифициращ естествената флора фактор е възрастта. Още с раждането човешката кожа бива колонизирана от множество микроорганизми. Микробиомът в бебешката кожа е с непостоянен състав. Най-често е представен от временни резиденти, стрептококи и спорообразуващи бацили. Микрококацеа доминират, сравнено с кожата в зрели индивиди. Пропионебактериите се нуждаят от повишени липидни нива по кожата, затова преобладават във възрастта на пубертета.

Съществуват доказателства, че микробиомът по кожата на мъжете е много по-богат. Това правило се отнася особено за аеробните микроорганизми (19). За разпространението на S.aureus роля имат мъжете-носители в перинеална зона (26).

Убедителни данни за значение на расата има относно назалното носителството на S.aureus. При бели деца то достига 41%, докато при деца от негроидната раса носителството достига до 30% (27). За останалите микробиомни видове данните са неубедителни.

Макроорганизмът и нормалната му флора оформят единна екологична система, която е в пряка връзка и зависимост от околната среда. В резултат на фило- и онтогенетични взаимоотношения е изградено равновесие между макроорганизма и нормалната му флора, а също така и между съставящите я микроорганизми, наречено еубиоза. Еубиозата зависи от установените между тях три типа взаимоотношения - неутрални, антагонистични и синергични. При изменение на условията на обитаване на микроорганизмите по кожата или целия организъм, възникващи най-често при ятрогенни въздействия (приложение на йонизираща радиация, цитостатици, кортикостероиди и др.) или при приложение на химиотерапевтици, равновесието на видовете от микробиома се нарушава. В резултат резистентни условнопатогенни микроорганизми получават селективна възможност да се размножават прекомерно на освободените от чувствителните микроорганизми територии и хранителни вещества, и да причиняват заболяване. Това състояние е известно като дисбактериоза и е предпоставка за развитието на ксеротични състояния по кожата, бактериали инфекции, атопичен дерматит и др.

Антисептиците, дезинфектантите при оперативни интервенции, измивните вещества водят до премахване на временната флора и значително редуцират резидентите (28). Агентите, потискащи Грам-положителните коки, предизвикват повишаване популацията на Грам-отрицателните пръчици. Носителството на S.aureus се повлиява от студено време, хоспитализация, инжекционни манипулации (29).

РОЛЯ НА НОРМАЛНАТА ФЛОРА

Положителни въздействия:

Защитна роля срещу колонизацията на инфекциозни агенти. Аутохтонната флора е един от факторите на имунитета и на естествената резистентност. Нейни механизми са:

- Предотвратяване на колонизацията - цялата кожна и лигавична повърхност са колонизирани от микробиома и постъпилите отвън микроби, трябва да се конкурират за рецептори за адхезия. При невъзможност за адхезия, патогените се оттиват и извърлят с естествения ток на секретите и екскретите.
- Конкуренция за хранителни вещества и растежни фактори в дадена екологична ниша.
- Селективна промяна на локалната физикохимична среда - в своето развитие бактериите продуцират метаболитни продукти, като едновременно с това изчерпват кислорода от средата и предотвратяват развитието на патогенни видове. В някои случаи, в резултат на тяхната жизнена дейност, средата се подкиселява - лактобацилите на Дьодерлайн, бифидобактериите в чревния тракт на кърмачето, които супресират развитието на патогенни ентеробактерии и др.

- Стимулиране развитието на имунната система и имунния отговор, секретиране на антибактериални вещества: кератиноцитите разпознават микробните антигени чрез рецептори за разпознаване (pattern recognition). Последните различават свързаните с патогена молекулярни модели (PAMPs). Такива са липополизахарид, флагелин, нуклеинови киселини от грам-отрицателни бактерии, манан и цимозан от гъбични клетъчни стени, както и пептидогликан и липотейхоева киселина от грам-положителни бактерии. Ключови рецептори, разпознаващи тези микробни компоненти, са Toll-like рецепторите, NOD-рецепторите и манозните рецептори. Активацията на кератиноцитите инициира вродения имунен отговор, водещо до секреция на цитокини, хемокини и антимикробни пептиди (АМП), като кателицидини и β-дефензини, които активират адаптивния имунен отговор(30). АМП действат подобно на антибиотиците срещу инфекциозни патогени и някои от тях (като кателицидин) индуцират възпалителен отговор.
- Кератиноцитите модулират различни сигнали от хоста и от микробен произход. Независимо, че е изложена на действието на различни фактори, кожата може да разграничи патогенни от непатогенни микроорганизми и да развие толеранс към коменсалите. При нормални условия кожните Лангерхансови клетки и дермалните дендритни клетки поддържат толеранса чрез FOXP3+ регулаторните Т лимфоцити. Достатъчно доказателства са натрупани в полза на тезата, че коменсалната флора на кожата може да инхибира патогенната. Staphylococcus epidermidis селективно инхибира S. aureus, стрептококи от група А и E. coli чрез фенол-разтворими модулини (31,32). Последните активират също антимикробните пептиди и така се усилва имунният отговор спрямо патогените, но се потиска възпалителният отговор срещу коменсалите. Това става чрез потискане на цитокиновата продукция на кератиноцитите от липотейхоевата киселина на S. epidermidis.
- Стимулиране растежа на епителните клетки в лигавиците и синтеза на цитоплазматични клетки в тях.
- Ензимна производителност - някои имат благоприятни ефекти, но бактериалната уреаза, например, хидролизира уреята до CO2 и NH3; някои ензими на микробиомните клетки дезаминират аминокиселини, естерифицират, деалкилират, хидролизират или редуцират диазо-съединения, дехидроксилират или хидролизират жлъчните киселини до свободни жлъчни киселини, метаболизират билирубина до уробилиноген, който се реабсорбира и екскретира с урината и жлъчката.
- Продукция на витамини - предимно тези от гр. В, поради тази причина при продължително лечение с антибиотичен препарат е препоръчително да се приемат витамини от посочената група.

Неблагоприятни въздействия:

- Инфекции - при попадане в нормално стерилни области на организма (перфорация на черво, кожни наранявания, екстракция на зъби); опортюнистични инфекции при имуносупресирани пациенти.
- Ензимна производителност - ензимите на бактериите от устната кухина предизвикват кариес, бактериалните азоредуктази хидролизират редуктивно азовръзката в боите, което води до образуване на ароматни амини някои, от които са силно канцерогенни.

Нормална флора в отделните зони на тялото

В отделните зони на тялото се открива разнообразие във вида и броя на микробите от нормалната флора:

Носна кухина - коагулазо-негативни стафилококи, микрококи, коринебактерии. S.aureus се представя като резидентна флора при около 35% от здравите пациенти. Не рядко се среща и S. pyogenes.

Външен слухов канал - Коагулазо-негативни стафилококи и коринебактерии, Proetus spp, E.coli, Neisseria catarrhalis и N. flora.

Аксили - зоната предполага висока колонизация, поради условията, които предоставя - топлина, влага, подходящо pH - стафилококи, микрококи, коринебактерии, P.acne и P. avidum, Acinetobacter spp.

Междупръстия - четвърто междупръстие на стъпалото е обикновено най-влажно и мацерирано, това определя изключително висока колонизация с основната резидентна флора, но и Грам-негативни микроби. Откриват се и Brevibacterium spp, Acinetobacter spp, Alkaligenes spp.

Вулва - коагулазо-негативни стафилококи, микрококи, коринебактерии, колиформи, ентерококи като временна флора, мигрираща от съседната перианална зона, ограничени количества стрептококи от група В.

Перинеум и слабини - коагулазо-негативни стафилококи, микрококи и разнообразие от различни коринебактерии, Acinetobacter

Пъп - скоро след раждането тази зона е поселена със S. aureus, по-рядко се среща S. pyogenes.

Адхезия

По влажни повърхности, хидрофобната структура на бактериалната стена осигурява плътен контакт между нея и човешките клетки. Това явление се обезпечава от допълнителни „помощници", разположени по външната бактериална повърхност, наречени адхезини (33). Те обикновено са специфични и комуникират с клетката-гостоприемник чрез рецепторен апарат. Пример за бактериални адхезини са молекулите на липотейхоевата киселина (34), открити в стафилококи и стрептококи, по-късно преоткрити под формата на фибрили. Подобни филаментозни структури се откриват в много Грам-негативни бактерии. Адхезините не само позволяват на микробиомните клетки да остават върху кожната повърхност, но участват във взаимоотношенията по между им. Секрецията на екстрацелуларна слуз от резидентите, също подпомага придържането им към различни повърхности и най-вече към stratum corneum (33).

МЕТОДИ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА НОРМАЛНАТА ФЛОРА

Много методи са използвани за изследване на нормалната и коменсална флора, но се оказва, че нито един от тях не е достатъчно приложим за всички резиденти (35). За доказване на големи колонии обикновено се използват смивове. За стимулиране растежа на бактериите се прилагат допълнително продължително

триене, налягане, овлажняване на пробите. Информация за пространственото разпространение на видовете се установява чрез лепящи ленти. Най-добрите количествени оценки на общата бактериална флора се определят чрез прилагане на цилиндър с отворен край на известна площ на напречното сечение към кожата, като се въвежда малък познат обем от подходящ течен носител, с последващо остъргване на кожната повърхност, за да се освободят микроорганизмите. Чрез този метод добре се изучава промяната в броя на микроорганизмите, но той е много времеемък и недостатъчно информативен относно анаеробните популации. Изрязването на биопсия в цялата дебелина на кожата се предполага, че би бил най-информативният метод, но предвид травматичния момент и трудното му приложение, също е с ограничено приложение.

Отделянето на организми може да бъде изследвано чрез техники за вземане на проби от въздуха, като се използват или плочки за утаяване, или уловител за вземане на проби, докато субектът изпълнява специфична дейност, например съблечайки се в малка стая. Използваните за изолация среди влияят на резултатите от взетите проби. Препоръчително е основно да се използват кръвни и серумни агари за аеробни организми и обогатена с тиогликолат среда на Brewer с 1% Tween 80 за изолиране на P.acnes (19).

За независими културелни изследвания, използващи по-нови молекулярни генетични методи, ДНК на организмите трябва да бъде извлечена, обработена и амплифицирана. Широкообхватните PCR праймери, насочени към определени региони на бактериите, позволяват относително лесно амплифициране на последователностите на малките подгрупи рРНК гени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кожата е най-големият орган на човешкото тяло, колонизиран от разнообразни микроорганизми, повечето от които са безвредни и дори благоприятни за техния домакин. Колонизацията зависи от условията на кожната повърхност, която е силно променлива в зависимост от топографското местоположение, ендогенните фактори на гостоприемника и екзогенните фактори на околната среда. Имунната система на макроорганизма и аутохтонната микрофлора са в постоянна корелация. Развитието на молекулярните методи за идентифициране на микроорганизми доведе до нови постижения в изучаването на резидентните кожни бактерии. Подобреното разбиране на микробиома на кожата е необходимо, за да се получи по-добра представа за микробното участие в нарушенията на човешката кожа и да се дадат нови промикробни и антимикробни терапевтични подходи за тяхното лечение.

Литература

1. **Pasparakis, M., Haase, I. & Nestle, F. O.** *Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. Nature reviews.* Immunology 14, 289-301 (2014).
2. **Chiller K, Selkin BA, Murakawa GJ.** *Skin microflora and bacterial infections of the skin. J. Investig. Dermatol.* Symp. Proc. 2001;6:170-174.
3. **Fredricks DN.** *Microbial ecology of human skin in health and disease. J. Investig. Dermatol.* Symp. Proc. 2001;6:167-169.
4. **Marples M.** *The Ecology of the Human Skin. Bannerstone House, Springfield, Illinois: Charles C Thomas; 1965.* A seminal and comprehensive work of classical dermatological microbiology.
5. **Roth RR, James WD.** *Microbial ecology of the skin.* Annu. Rev. Microbiol. 1988;42:441-464.
6. **Noble WC.** *Skin microbiology: coming of age.* J. Med. Microbiol. 1984;17:1-12.
7. **Roth RR, James WD.** *Microbiology of the skin: resident flora, ecology, infection.* J. Am. Acad. Dermatol. 1989;20:367-390.
8. **Cogen AL, Nizet V, Gallo RL.** *Skin microbiota: a source of disease or defence?* Br. J. Dermatol. 2008;158:442-455.
9. **Naik, S. et al.** *Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals.* Science 337, 1115-1119 (2012).
10. **Belkaid, Y. & Segre, J. A.** *Dialogue between skin microbiota and immunity.* Science 346, 954-959 (2014).
11. **Fyhrquist, N. et al.** *Acinetobacter species in the skin microbiota protect against allergic sensitization and inflammation.* The Journal of allergy and clinical immunology 134, 1301-1309.e11 (2014).
12. **Chehoud, C. et al.** *Complement modulates the cutaneous microbiome and inflammatory milieu.* Pnas 110, 15061-15066 (2013).
13. **Palm, N. W., de Zoete, Marcel, R. & Flavell, R. A.** *Immune-microbiota interactions in health and disease.* Clinical immunology 159, 122-127 (2015).
14. **Sanford, J. A. & Gallo, R. L.** *Functions of the skin microbiota in health and disease.* Seminars in immunology 25, 370-377 (2013).
15. **Lehtimgki, J. et al.** *Patterns in the skin microbiota differ in children and teenagers between rural and urban environments.* Scl. Rep. 7, 45651; doi: 10.1038/srep45651 (2017).
16. **Blanconi E, Piovesan A, Facchin F et al.** *An estimation of the number of cells in the human body. Ann Hum Biol.* 2013 Nov-Dec; 40(6):463-71
17. **Pertea M, Salzberg SL** *Between a chicken and a grape: estimating the number of human genes.* Genome Biol. 2010 11(5):206
18. **Savage DC.** *Microbial ecology of the gastrointestinal tract.Annu Rev Microbiol.* 1977; 31:107-33.
19. **Noble WC.** *Microbiology of Human Skin.* London: Lloyd-Luke Medical Books, 1981.
20. **Williamson P.** *Quantitative estimation of cutaneous bacteria, In: Malibach HI, Hildick Smith G, eds. Skin Bacteria and their Role in Infection.* New York: McGraw Hill, 1965: 3-11.
21. **Somerville DA, Murphy CT.** *Quantitation of Corynebacterium acnes on healthy human skin.* J Invest Dermatol 1973; 60: 231-3
22. **Puhvel SM, Reisner R, Mirian DA.** *Quantitation of bacteria in isolated pilosecaceous follicles in normal skin.* J Invest Dermatol 1975; 65: 525-31.
23. **Duncan LM, McBride ME, Knox JM.** *Bacterial flora: the role of environmental factors.* J Invest Dermatol 1969; 52: 479-84.
24. **Bibel DJ, Le Brun JR.** *Changes in cutaneous flora after wet occlusion.* Can J Microbiol 1975; 21: 496-501.
25. **Hojyo-Tomoka MT, Marples R, Kligman AM.** *Pseudomonas infection in super hydrated skin.* Arch Dermatol 1973; 107: 723-7.
26. **Hill J, Howwel A, Blowers R.** *Effect of clothing on dispersal og Staphylococcus aureus by males and females.* Lancet 1974; 2: 1131-2.
27. **Nobel WC.** Carriage of Staphylococcus aureus and β-hemolytic streptococci in relation to race. Acta Derm Venereol (Stockh) 1974; 54: 403-5.
28. **Malibach HI, Aly R, eds.** *Skin Microbiology: Relevance to Clinical infection.* New York: Springer, 1981.
29. **Tuazon CU.** *Skin and skin structure infections in the patients in risk: carrier state of Staphylococcus aureus.* Am J Med 1984; 76: 166-71.
30. **Braff MH, Bardan A, Nizet V, Gallo RL.** *Cutaneous defence mechanisms by antimicrobial peptides.* J. Invest. Dermatol. 2005;125:9-13.
31. **Cogen AL, et al.** *Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from Staphylococcus epidermidis a normal resident of the skin.* J. Invest. Dermatol. 2010;130:192-200.
32. **Cogen AL, et al.** *Staphylococcus epidermidis antimicrobial δ-toxin (phenol-soluble modulin-γ) cooperates with host antimicrobial peptides to kill Group A Streptococcus.* PLoS ONE. 2010;5:e8557.
33. **Cristensen GD, Simpson WA, Bisno Al et al.** *Adherence of slime producing strains of Staphylococcus epidermidis to smooth surfaces.* Infect Immun 1982; 37: 318-26.
34. **Carruthers MM, Kabat WJ.** *Mediation of staphylococcal adherence to mucosal cells by lypoteichoic acid.* Infect Immun 1983; 40: 444-6.
35. **Shehaden NH, Kligman AM.** *The effect of topical antibacterial agents on the bacterial flora of the axilla.* J Invest Dermatol 1963; 40: 61-71.