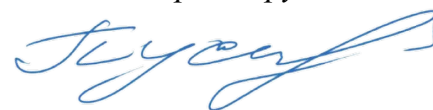


На правах рукописи



Пустовая Кристина Николаевна

**Морфофункциональные изменения элементов барьера кожи человека при
наличии признаков местной тканевой реакции организма, ассоциированной
с клещами рода *Demodex***

1.5.22. Клеточная биология (медицинские науки)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Научный руководитель:

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук,
профессор,

Сергей Львович Кузнецов

Официальные оппоненты:

Дубовая Татьяна Клеониковна – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт биологии и патологии человека, кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии, профессор кафедры

Шестакова Валерия Геннадьевна – доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра анатомии, гистологии и эмбриологии, заведующий кафедрой

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « 23 » сентября 2024 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.31 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) МЗ РФ, по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1 и на сайте организации www.sechenov.ru.

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2024 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Блинова Екатерина Валериевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Кожа человека представляет собой уникальный орган, выполняющий ряд важных функций, одной из которых является барьерно-защитная. О.Д. Мяделец [Мяделец О.Д., 2000] условно выделяет специфические и неспецифические механизмы осуществления барьерно-защитной функции. К неспецифическим относят наличие гидро-липидной мантии, рогового слоя эпидермиса, базальной мембраны. А к специфическим структурам – совокупность иммунокомпетентных клеток, а также эндотелий кровеносных сосудов. Эти и другие механизмы защиты чаще относят к элементам эпидермального барьера кожи. Однако информация о компонентах механизмов защиты, осуществляемых в более глубоких структурах кожи с точки зрения барьерных функций, встречается редко.

Учитывая это было проведено изучение отдельных элементов кожного барьера, понимая под ними компоненты, входящие в состав гистогематического барьера кожи (ГГБК), который представляет интерес в качестве системы, обеспечивающей защиту и гомеостаз компонентов кожи при воздействии различных факторов (бактерии, химические агенты, возрастные и гормональные изменения). Особое внимание привлекают его составляющие – сально-волосяной комплекс (СВК), прослойка рыхлой волокнистой соединительной ткани (РВСТ) и стенка кровеносного капилляра (базальная мембрана + эндотелий). Практический интерес представляет один из факторов, способный нарушить целостную структуру барьера – клещи рода *Demodex spp.*, которые являются условно-патогенными организмами, обитающими в коже человека. Волосяной канал, волосяная воронка, сальная железа и ее проток являются местами локализациями особей *Demodex spp.* Мы предполагаем, что при повреждении компонентов барьера кожи происходит проникновение их антигенов в соединительную ткань, а затем в гемокапилляры. В этом случае биологически активные вещества (антигены клещей рода *Demodex spp.* и продукты распада особей) действуют через трансмембранные клеточные рецепторы, вызывая местные и системные адаптивные реакции. Эти и другие факторы способны вызвать местную тканевую реакцию, которая может проявляться нарушением процессов дифференцировки кератиноцитов, повышением продукции кожного сала, дезорганизацией стенки гемокапилляров, фиброзом тканей, увеличением количества иммунокомпетентных клеток в дерме и прочим. Такие изменения в компонентах барьера кожи также ведут к нарушению его целостности и функционирования.

Таким образом, системный анализ взаимоотношений между компонентами барьера кожи и клещами рода *Demodex spp.* (в качестве повреждающего фактора внешней среды) с применением морфологических, иммуногистохимических, иммунологических методов позволит разработать терапевтические подходы для лечения патологических состояний, связанных с

нарушением барьера, что способствует более рациональной разработке и применению лекарственных препаратов в рамках подходов персонализированной медицины.

Степень ее разработанности

Опубликованы исследования влияния биологических и небιологических факторов на отдельные компоненты барьера. Имеются работы [Рогов Ю.И. и соавт., 2017; Fugue K. и соавт., 2019], посвященные морфологическим изменениям кожи при инвазии клещами рода *Demodex* spp. Наиболее информативным методом их выявления является окрашивание срезов кожи гематоксилином и эозином, которое позволяет увидеть хитиновый скелет клеща, а также полиморфноядерные инфильтраты. В целом, морфологическая картина пораженной кожи демонстрирует наличие очаговой полиморфноядерной инфильтрации; гипертрофию сальных желез, разрушение эпителия волосяных фолликулов; образование структур, похожих на цисты и гранулемы [Лавриненко М.В. и соавт., 2013; Fugue K. и соавт., 2019; Norgan A.P. и соавт., 2018]. Имеются исследования, показывающие влияние гормональных изменений на трансформацию состава кожного сала и его гиперсекрецию, что приводит к закрытию протока СВК и нарушению его функционирования [Вартанян А.А., 2012; Лавриненко М.В. и соавт., 2013; Маслодудова Е.Н. и соавт., 2010]. В исследовании Е.И. Теддера [Теддер Е.И. и соавт., 2005] наблюдали разрушенные волосяные фолликулы и перифолликулярные инфильтраты в дерме. С. Perrigouard [Perrigouard С. и соавт., 2013] в исследовании кожи с нарушением работы сосудов микроциркуляторного русла наблюдал их расширение, аномальную форму с прерывистым эндотелием, набухшими эндотелиальными клетками.

Цели и задачи

Цель исследования: изучение элементов барьера кожи человека в норме при наличии местной тканевой реакции как неспецифического характера, так и ассоциированной с клещами рода *Demodex* spp.

Задачи исследования:

1. Изучить структурные параметры барьера кожи человека с помощью окрасок гематоксилином и эозином, ШИК-реакции и трихромом по Маллори.
2. Провести иммуногистохимическое исследование пролиферативных процессов в элементах барьера кожи человека с использованием моноклональных антител к Ki67.
3. Определить показатели Т-клеточной системы в сыворотке крови для изучения адаптации тканей к действию клещей рода *Demodex* spp. как фактора, оказывающего повреждающее воздействие на элементы барьера кожи.
4. Исследовать биологические особенности клещей рода *Demodex* spp. в условиях *in vitro*, приближенных к естественной среде обитания в коже, как модели для разработки новых препаратов в рамках подходов персонализированной медицины.

Научная новизна

Впервые проведено комплексное изучение состояния элементов барьера кожи в норме, а также в условиях проявления местных тканевых реакций в коже с и без наличия клещей рода *Demodex spp.* Определены критерии повреждения структур барьера и продемонстрировано вовлечение системы Т-клеточного иммунитета при повреждении кожного барьера. Проведено морфологическое исследование для определения локализации клещей рода *Demodex spp.* в компонентах барьера кожи. Показано, что клещи могут инкапсулироваться в структурах СВК. Создана 3D-модель ГТБК, позволяющая в учебном процессе оценить локализацию и уровень тканевой реакции в коже, поврежденной особями *Demodex spp.* Разработан способ сохранения жизнеспособности клещей рода *Demodex spp.* на основании оценки их двигательной активности с помощью создания оптимальных условий внешней среды: температура (от +20°C до +25°C), отсутствие световых и химических раздражителей, нормальный уровень кислорода в воздухе (около 21%) и наличие питательной среды.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты исследования дополняют сведения о морфологических проявлениях взаимоотношений между клещами *Demodex spp.* и кожей человека. Разработанная 3D-модель барьера кожи может быть использована для исследования новых препаратов в рамках персонализированной медицины и в практике преподавания курсов «Гистология, цитология, эмбриология» для объяснения механизма взаимоотношений компонентов барьера с внешними и внутренними факторами. Способ сохранения жизнеспособности клещей *Demodex spp.* также может быть использован для дальнейшего научного поиска, в том числе создания новых лекарственных препаратов для разработки терапевтических подходов в лечении дерматитов, ассоциированных с ними.

Методология и методы исследования

Методология настоящего исследования строилась на применении морфологических, лабораторных и статистических методов для определения состояния элементов барьера кожи человека. Морфологические методы включали оценку гистологических препаратов, полученных методом биопсии от 135 добровольцев, у которых определяли локализацию клещей, наличие и степень повреждения барьера. Диагностику биоматериала проводили с помощью микроскопа AxioImager A1 (Zeiss, Германия) с камерой AxioCam 305 Color и программным обеспечением Zen. Так же оценивали жизнеспособность и подвижность особей в различных условиях окружающей среды. Для иммуногистохимического исследования использовали «Anti-Ki67 Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody [SR00-02]» (CAT HA721115, LOT HP0304, «Huabio», Китай). Определение иммунного статуса добровольцев проводили на оборудовании FACSCalibur и FACSCanto II (BD Biosciences, США). Сканирующую электронную микроскопию осуществляли на аппарате Hitachi

S-3400N (Hitachi, Япония). Исследование бациллярных антигенов методом ПЦР анализа проводили путем выделения ДНК набором «РИБО-ПРЕП» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия). Олигонуклеотиды были синтезированы в ЗАО «Синтол», Россия. Статистическую обработку полученных результатов производили с использованием программы Origin Pro (OriginLab, США).

Положения, выносимые на защиту

1. Морфологические изменения элементов барьера кожи в присутствии клещей рода *Demodex* spp. характеризуются комплексной реакцией структур сально-волосяного комплекса, гемокapилляров и окружающей ткани. Наблюдается очаговая полиморфноядерная инфильтрация компонентов барьера, дезорганизация их базальных мембран, снижение толщины коллагеновых волокон дермы, инкапсулирование остатков экзоскелета клещей. Разработанная 3D-модель ГГБК может быть использована для исследования механизмов взаимодействия внешних, в том числе повреждающих, факторов с отдельными частями барьера.

2. Тканевая реакция кожи, ассоциированная с клещами рода *Demodex* spp. сопровождается повышением пролиферативной активности клеток в элементах барьера, что выражается в виде местного увеличения количества Ki67-позитивных клеток.

3. При наличии тканевых реакций в коже, ассоциированных с клещами рода *Demodex* spp., происходит изменение в работе компонентов Т-клеточного звена иммунитета человека, приводящее к снижению количества Т-лимфоцитов в крови у человека. Это положение подтверждает гипотезу о развитии местной адаптивной реакции компонентов барьера кожи к повреждающему воздействию особей *Demodex* spp.

4. Структурные нарушения элементов барьера кожи человека и значения показателей Т-клеточного иммунитета в условиях наличия местных тканевых реакций в коже, ассоциированных с клещами рода *Demodex* spp. характеризуются более выраженными деструктивными изменениями и снижением показателей Т-клеточного звена иммунитета относительно групп сравнения.

5. Выявленные морфометрические особенности клещей *Demodex* spp., их устойчивый хитиновый экзоскелет, наличие сложного ротового аппарата и колющих конечностей, способность особей быть переносчиками микроорганизмов должны лежать в основе поиска новых лекарственных препаратов.

6. Созданные условия окружающей среды, приближенные к естественным в коже, могут служить экспериментальной моделью в ходе разработок новых лекарственных препаратов и их рационального использования (в рамках персонализированной медицины).

Диссертация соответствует п. 1. «Изучение строения клеток и тканей и общих закономерностей генеза, ультраструктурной организации и функции клеток эукариот, в том числе в составе тканей и органов»; п. 10. «Изучение закономерностей цито- и гистогенеза, клеточной дифференцировки, физиологической и репаративной регенерации тканей, а также, регуляции этих процессов»; п. 13. «Изучение молекулярных, иммунологических, цитохимических и физиологических аспектов жизненного цикла клеток при экспериментальных (в том числе повреждающих) воздействиях. Изучение пролиферации клеток, старения и клеточной гибели»; п. 14. «Исследование адаптации клеток и тканей к действию различных факторов внешней среды»; п. 19. «Клеточные технологии как основа для разработки терапевтических подходов для лечения различных патологий. Создание клеточных моделей различных заболеваний, в том числе наследственных»; п. 22. «Разработка и применение новых экспериментальных моделей и методов гистотехнологии, культивирования клеток, цитологической диагностики, иммуноцитохимии, микроскопии, компьютерной морфометрии, цифрового анализа изображений, методов молекулярно-генетического анализа индивидуальных клеток, а также других методов, необходимых для проведения исследований в области клеточной биологии» области исследования паспорта научной специальности 1.5.22. Клеточная биология (медицинские науки).

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности результатов определена стандартизацией условий взятия материалов для микроскопического и иммунологического исследований, достаточным количеством участников, их рандомизацией с учётом выявленных патологий, формированием групп сравнения, адекватным морфологическим методом исследования, методами статистического анализа. Тема одобрена на заседании Комиссии по этике локального этического комитета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) протокол № 10-24 от 18.04.2024 г.

Апробация результатов диссертационного исследования проведена на заседании кафедры анатомии и гистологии человека, протокол № 18 от 06.05.2024 г. Результаты диссертационного исследования представлены и обсуждены на 9-ти научных конгрессах, конференциях, совещаниях и заседаниях: 1. II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Импортозамещение, доступная медицинская помощь и равные возможности в дерматологии» – 19-20 декабря 2018 г., Москва; 2. I научно-практической конференции с международным участием «Интегративная и синтетическая дерматовенерология» – 30 мая - 1 июня 2019 г., Смоленск; 3. Научно-практической конференции с международным участием «Современная морфология: проблемы и перспективы развития» – 3-4 октября 2019 г., Минск; 4. Всероссийской научной конференции с международным участием «Актуальные

проблемы морфологии: эмбриональный и репаративный гистогенез, филогистогенез» – 19 декабря 2019 г., Санкт-Петербург; 5. XXXVII Научно-практической конференции с международным участием «Рахмановские чтения» – 30-31 января 2020 г., Москва; 6. VII Международной научно-практической конференции «Психолого-педагогическое сопровождение образовательного процесса: проблемы, перспективы, технологии» – 2-3 апреля 2020 г., Орел; 7. Международной научной конференции, посвященной 75-летию юбилею Государственного Медицинского и Фармацевтического Университета им. Николае Тестемицану – 2020 г., Кишинёв; 8. XXXVIII Научно-практической конференции с международным участием «Рахмановские чтения» – 2021 г., Москва; 9. Международном форуме дерматовенерологов и косметологов «Синтез науки и практики» – 2022 г., Москва.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре анатомии и гистологии человека ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева», в лаборатории эктопаразитозов ВНИИП - филиала ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

Личный вклад

Личное участие автора заключалось в планировании и проведении экспериментов. Автор вела прием добровольцев, диагностику исследуемого материала, участвовала в проведении гистологического и иммуногистохимического исследований, выполняла статистическую обработку полученных результатов. Автором написаны все статьи и тезисы по теме диссертации, а также рукописи диссертации и автореферата.

Публикации по теме диссертации

По теме исследования опубликовано 25 печатных работ, из них: 3 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК при Минобрнауки РФ, 3 статьи в журналах, индексируемых международными системами цитирования Scopus и Web of Science, 10 иных публикаций, 7 материалов конференций, получены 2 патента на изобретение Российской Федерации.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 108 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, приложений и благодарностей. Работа иллюстрирована 34 рисунками (30 – в тексте диссертации, 4 – в приложениях) и 7 таблицами. Список литературы содержит 120 работ, из них отечественных – 56.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Для изучения общей картины воздействий представителей нормальной флоры кожи человека – клещей рода *Demodex* spp. на элементы барьера кожи в качестве фактора, оказывающего повреждающее воздействие, исследовали 135 человек обоего пола в возрасте от 18 до 75 лет. Мужчин было 50, женщин – 85. Наблюдение за участниками исследования осуществляли в течение 2 приемов. На первом проводили сбор анамнеза, соскоб на наличие клещей *Demodex* spp. На втором (через 7 дней) осуществляли распределение в группу, брали панч-биопсию и кровь на определение Т-лимфоцитов: Т-лимфоциты общие, Т-хелперы, Т-цитотоксические лимфоциты, иммунорегуляторный индекс. Участники были разделены на 3 группы с учетом классификации возрастов ВОЗ. Первую группу ($n = 45$) составили добровольцы в возрасте 18–44 лет с нормальной кожей, без внешних признаков реактивных тканевых процессов и повреждения барьера кожи. Во второй группе ($n = 45$) были обследуемые в возрасте 45–75 лет, имеющие признаки местной тканевой реакции кожи за счет наличия дерматита, без клещей. В третью группу ($n = 45$) были отобраны люди в возрасте 45–75 лет, с признаками местной тканевой реакции кожи, за счет дерматита, ассоциированного с наличием клещей рода *Demodex* spp. Критерием отбора, послужило наличие более 5 особей на 1 см^2 кожи в материалах соскоба от каждого человека.

Морфологическое изучение компонентов и состояния кожного барьера выполняли с помощью панч-биопсии. С помощью панча осуществляли взятие кусочка кожи в височной области или носогубного треугольника размером $3 \times 3\text{ мм}^2$. Для гистологического исследования окраску материала проводили гематоксилином и эозином, ШИК-реакцией или трехцветной окраской по Маллори по стандартной методике. Для иммуногистохимического исследования использовали моноклональные антитела к Ki-67 по протоколу производителя. Всего было получено 810 препаратов от 135 обследуемых. Оценивали изменения элементов барьера в гистологических и иммуногистохимических препаратах от участников трех групп с подсчетом и морфометрией полиморфноядерных клеток, вакуолизированных кератиноцитов и эритроцитов вне сосудов, определяли наличие отдельных клеток в 6 полях зрения в 6 гистологических препаратах от каждого обследуемого. Присутствие и локализацию клещей рода *Demodex* spp. оценивали с помощью световой микроскопии. Полученный материал соскобов с клещами *Demodex* spp. *in vitro* использовали для выявления возможностей и механизмов их влияния на структуры барьера кожи посредством изучения особенностей строения особей. Морфологические характеристики клещей исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Для выявления микрофлоры, обитающей внутри них, использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Изучение жизнеспособности и двигательной активности *Demodex* spp. в различных условиях окружающей среды оценивали при диапазоне температур

(от +18°C до +26°C), воздействии и отсутствии световых и химических раздражителей, нормальном уровне кислорода в воздухе (около 21%) и в анаэробной среде, при наличии питательной среды (кожный детрит: секрет сальных желез, роговые чешуйки эпидермиса) и при ее отсутствии. Эти критерии отображают естественные факторы среды, влияющие на клещей *Demodex* spp. в условиях *in vivo*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Исследование структурных элементов барьера кожи человека

1.1. Морфофункциональное состояние элементов барьера кожи человека в норме и при наличии признаков местной тканевой реакции

На гистологических препаратах кожи добровольцев первой группы отсутствовали признаки тканевой реакции или нарушения структуры барьера (Рисунок 1).

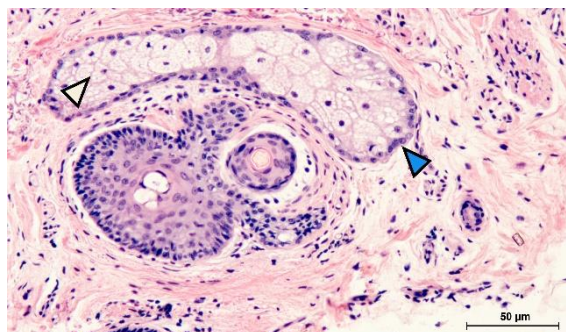


Рисунок 1 – Структура кожи обследуемого А. в возрасте 34 лет в норме. Белой стрелкой отмечена сальная железа без признаков местной тканевой реакции и деструкции, синей – целостность базальной мембраны. Окраска гематоксилином и эозином, об. 10, ок. 20

На гистологических препаратах кожи добровольцев 2 группы морфологические изменения обусловлены нарушением кератинизации, гиперкератозом и прочими локальными изменениями. Местный тканевой процесс отмечен повреждением стенки сальной железы, полиморфноядерным инфильтратом в дерме, истончением коллагеновых волокон, подлежащих к участку кожи с выраженной тканевой реакцией (Рисунок 2).

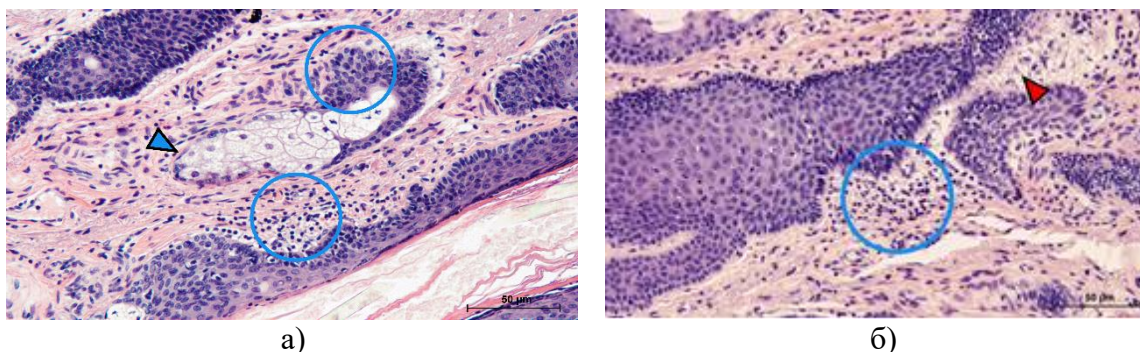


Рисунок 2 – Кожа обследуемого (а) Микропрепарат кожи обследуемого А. в возрасте 54 лет, (б) Микропрепарат кожи участника С., в возрасте 50 лет. Полиморфноядерные инфильтраты (в круге). Синей стрелкой обозначено нарушение базальной мембраны (а), красной – уменьшение толщины коллагеновых волокон. Окраска гематоксилином и эозином, об. 10, ок. 20

1.2. Морфофункциональные изменения структуры компонентов барьера кожи человека

при наличии местных тканевых реакций, ассоциированных с клещами рода *Demodex* spp.

В структуре элементов барьера кожи у участников третьей группы в местах локализации клещей рода *Demodex* spp. имела выраженные изменения в виде дезорганизации базальной мембраны волосяных фолликулов и сальных желез, деструкции себоцитов, большого количества детрита, фиброзных процессов в сальных железах, нарушения целостности стенки капилляров, наличия полиморфноядерных инфильтратов, изменения толщины слоев эпидермиса и коллагеновых волокон в дерме. В зависимости от степени и продолжительности воздействия биологических факторов эти изменения могут присутствовать как по отдельности, так и совместно. На гистологическом препарате (Рисунок 3) показаны различные повреждения структур СВК, что говорит о давности тканевого процесса и его тяжелом течении.

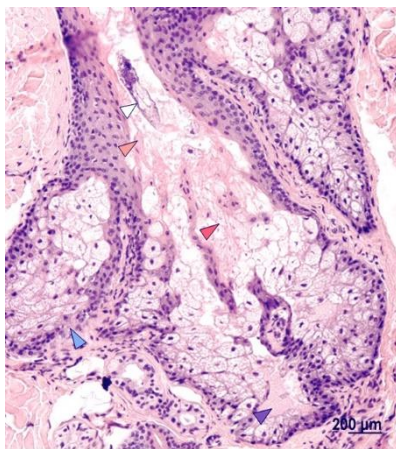


Рисунок 3 – Фрагмент кожи участника С. в возрасте 67 лет с наличием клещей рода *Demodex* spp. в протоке сальной железы. Белой стрелкой отмечен клещ рода *Demodex* spp., синей – нарушение базальной мембраны, красной – признаки деструкции себоцитов, оранжевой – большое количество детрита, фиолетовой – эритроциты. Окраска гематоксилином и эозином, об. 10, ок. 20

Очаговое повреждение ацинуса сальной железы является распространенным признаком повреждения компонента барьера кожи клещами рода *Demodex* spp. Базальные клетки желез были изменены, ядра пикнотизированы, уплощены. Наблюдала участки пустот, возникающих вследствие миграции особей *Demodex* spp., а также области фиброза в железе. Базальная мембрана в зоне повреждения нарушена, также была нарушена целостность базального слоя клеток ацинуса сальной железы (Рисунок 4). На полученных препаратах нами выявлены признаки нарушения местного кровообращения в виде нарушения базальной мембраны капилляров и их полнокровия вблизи от мест нахождения клещей в тканях на срезе, а также остаточные признаки течения местной тканевой реакции в виде инфильтрации окружающих клеща тканей (Рисунки 4, 5а).

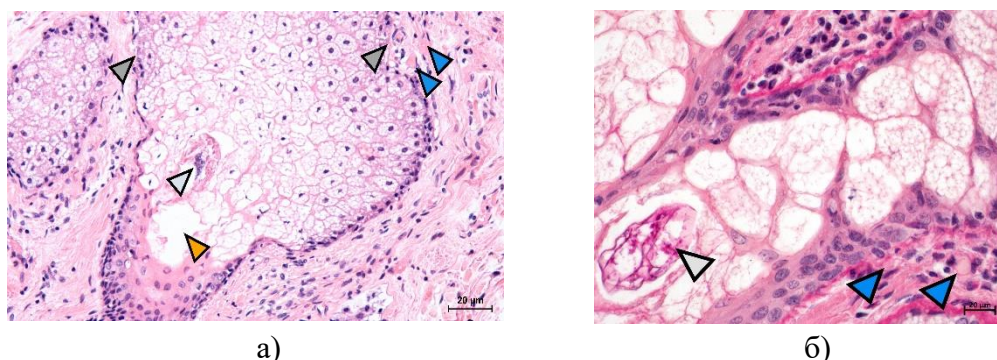


Рисунок 4 – Кожа обследуемого (а) Микропрепарат кожи обследуемого В. в возрасте 51 года, (б) Микропрепарат кожи обследуемого С. в возрасте 57 лет с клещом *Demodex* spp. в сальной железе. Белой стрелкой отмечен клещ. Синими – полнокровные капилляры. Серой – очаговые нарушения базальной мембраны с измененными клетками (а). Участки просветов обозначены оранжевой стрелкой (а). Окраска гематоксилином и эозином (а), ШИК-реакцией с доокраской ядер гематоксилином (б) об. 10 (а), об. 63 (б), ок. 20.

Кроме того, одним из вариантов местного тканевого процесса в местах локализации *Demodex* spp. является возникновение фиброза вследствие механического повреждения тканей их ротовым аппаратом и конечностями. Этот процесс может являться механизмом адаптации кожи к воздействию биологических объектов. Замещение себоцитов соединительнотканскими тяжами способствует снижению продукции кожного сала (Рисунок 5б).

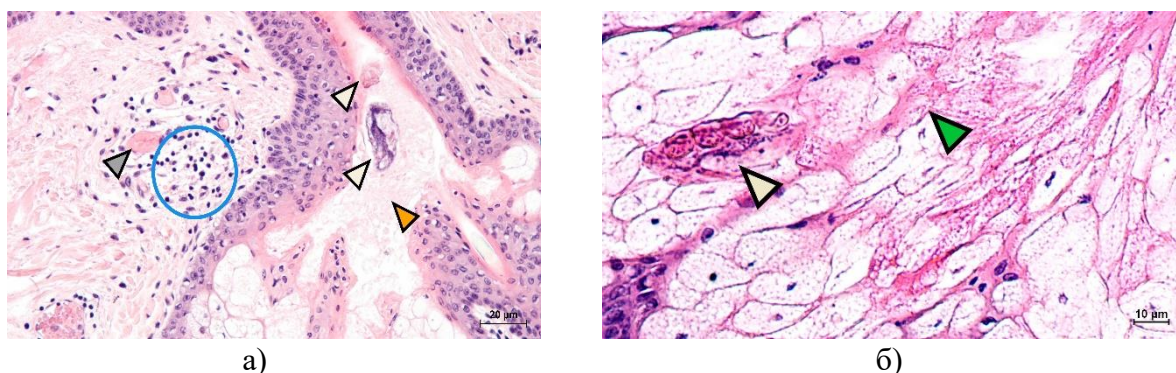


Рисунок 5 – Микропрепарат кожи добровольца Л. в возрасте 60 лет (а) и добровольца Н. в возрасте 70 лет (б) с наличием клещей *Demodex* spp. Белыми стрелками отмечены клещи. (а) Серой стрелкой обозначен один из полнокровных кровеносных капилляров, наблюдаются признаки инфильтрации окружающих тканей (в круге). Оранжевой стрелкой большое количество детрита. (б) Зеленой стрелкой – признаки фиброза железы в виде соединительнотканских волокон. Окраска гематоксилином и эозином, об. 40, ок. 20

Клещи рода *Demodex* spp. оказывали повреждающее влияние не только на СВК, но и на такие компоненты барьера как гемокапилляры и соединительная ткань дермы. Наблюдали уменьшение толщины коллагеновых волокон сетчатого слоя дермы, а также застойные процессы и нарушение базальной мембраны капилляров (Рисунок 6).

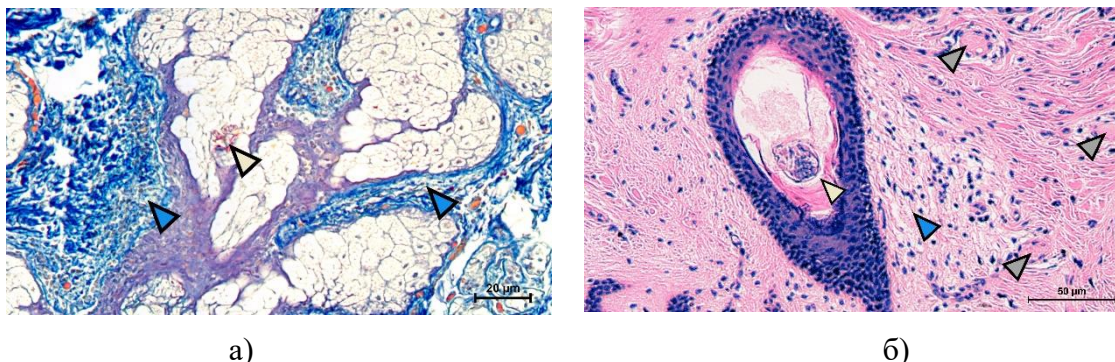


Рисунок 6 – Микропрепарат кожи добровольца Е. в возрасте 64 лет (а) и добровольца П. в возрасте 66 лет (б) с наличием клещей *Demodex* spp. Белой стрелкой отмечен клещ. Синими стрелками показано истончение коллагеновых волокон. Серыми стрелками отмечены полнокровные кровеносные капилляры. Окраска трихром по Маллори (а) и гематоксилином и эозином (б), об. 40, ок. 20

Присутствие клещей в просвете волосяного фолликула характеризовалось наличием выраженных морфологических изменений в эпидермисе и дерме. В окружающих тканях наблюдали наличие очаговых полиморфноядерных инфильтратов. Наблюдали выраженное уменьшение толщины коллагеновых волокон соединительной ткани дермы (Рисунок 7).

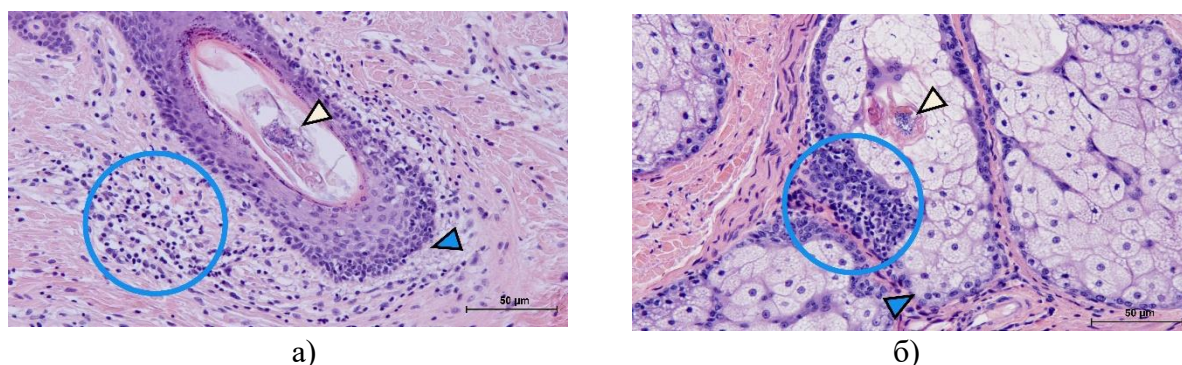


Рисунок 7 – Микропрепарат кожи обследуемого О. в возрасте 52 лет с наличием клещей рода *Demodex* spp. в просвете волосяного фолликула (а) и сальной железы (б). Белой стрелкой отмечен клещ рода *Demodex* spp., синей – истончение коллагеновых волокон (а), нарушение базальной мембраны (б). Повышена клеточность в соединительной ткани. Эпителий волосяного фолликула и сальных желез инфильтрирован (в круге), имеются вакуолизированные клетки. Окраска гематоксилином и эозином, об. 40, ок. 20

В процессе своей жизнедеятельности клещи образовывали так называемые «капсулы», которые блокировали и защищали особей *Demodex* spp. от местных иммунных реакций со стороны кожи. Содержимое «капсул» включало кожный детрит, сало и частицы экзоскелета особей (Рисунок 8). Гистологическая картина кожи, пораженной клещами рода *Demodex* spp., как модель воздействия биологических факторов, демонстрирует нарушение структуры слоев кожи, в частности деструкцию эпителия. Одной из причин является повреждение кожи ротовым аппаратом клеща, другой – механическая блокировка особями сально-волосяного комплекса. Образование «капсул» с клещами и продуктами их жизнедеятельности гистологически проявляется в виде гипертрофии эпителия. Со временем происходит процесс фиброза за счет

образования соединительнотканых тяжей в элементах барьера, а также нарушение целостности базальной мембраны. Тканевая реакция кожи, вызываемая особями *Demodex* spp., частицами их экзоскелета и продуктами жизнедеятельности, вызывает образование полиморфноядерной инфильтрации и истончение коллагеновых волокон. Гистологически наблюдали изменение просвета капилляров, дезорганизацию их базальной мембраны. Со стороны сальных желез в препаратах встречали наличие в них фиброза, гипертрофию стенок, деструкцию себоцитов. Выраженность вышеуказанных процессов зависела от количества клещей, а также давности процесса.

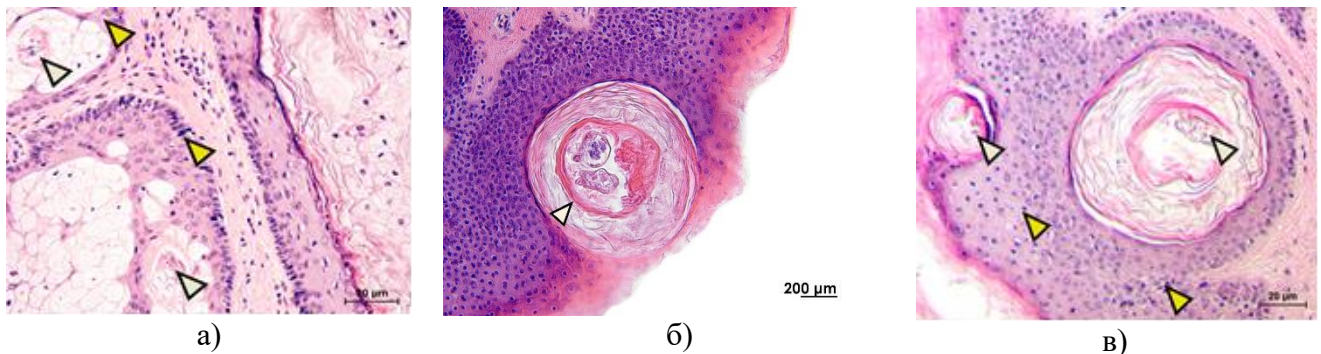


Рисунок 8 – Кожа обследуемого (а) Микропрепарат кожи участника Г. в возрасте 55 лет с наличием клещей рода *Demodex* spp. в сальной железе. Желтой стрелкой обозначены гипертрофия сальных желез и утолщение их стенок за счет недифференцированных себоцитов, как следствие образования капсул с клещами рода *Demodex* spp. (белые стрелки). (б) Микропрепарат кожи участника Д. в возрасте 46 лет с наличием клещей рода *Demodex* spp. в эпидермисе. Отмечено увеличение толщины шиповатого, зернистого и рогового слоя эпидермиса. (в) Микропрепарат кожи участника К. в возрасте 53 лет с наличием клещей рода *Demodex* spp. в эпидермисе. Желтыми стрелками отмечена инфильтрация лейкоцитов в эпидермисе. Отмечено увеличение толщины шиповатого, зернистого и рогового слоев эпидермиса. Окраска гематоксилином и эозином, об. 40 (а) и (в), об. 10 (б), ок. 20

Таким образом, наблюдали нарушение морфологической структуры и целостности сально-волосного комплекса, прилежащих к нему капилляров и соединительной ткани, а также увеличение толщины эпидермиса. В данном случае, эти структуры являются элементами барьера кожи человека. Эти деструктивные изменения с течением времени приводят к снижению его защитной и гомеостатической функций. Клещи рода *Demodex* spp. как сложная биологическая модель приводят к необходимости появления адаптивных изменений в структурно-функциональной организации барьера. Эти сдвиги характеризуются либо отсутствием местной тканевой реакции и появлением «капсул» с клещами и соединительнотканых тяжей в местах локализации особей. Вторым вариантом течения процесса является возникновение и дальнейшее развитие местной тканевой реакции в структурах барьера и близлежащих тканях. Из этого следует, что барьер кожи человека представляет собой динамическую структурно-функциональную систему, способную к изменению в зависимости от воздействия различных внешних и внутренних факторов.

1.3. Изменения морфологических показателей структурных компонентов барьера кожи человека

На основании результатов морфологического исследования элементов барьера кожи (ГГБК) была создана 3D-модель ГГБК. Проведенное гистологическое исследование у участников трех групп показало достоверные различия некоторых структурных компонентов барьера кожи человека. При изучении инфильтратов, обнаруженных в местах локализации клещей *Demodex spp.*, осуществляли подсчет количества структур в них (Таблица 1). Степень поражения кожи обследуемых третьей группы повышена в сравнении с первой и второй группами.

Таблица 1 – Определение наличия структур в эпидермисе и дерме кожи ед. в п.з., $M \pm SE$, $n = 45$ в группе

Структуры	Количество		
	1 группа	2 группа	3 группа
Полиморфноядерные клетки, ед.	$4,0 \pm 0,7$	$17,2 \pm 4,0^*$	$16,8 \pm 4,1^\dagger$
Эритроциты вне сосудов, ед.	0	$6,8 \pm 1,1^*$	$7,3 \pm 1,1^\dagger$
Вакуолизированные кератиноциты, ед.	$7,7 \pm 2,1$	$22,1 \pm 5,7^*$	$24,3 \pm 5,2^\dagger$

*,[†] достоверность различий изучаемых показателей в сравнении с первой группой, $p \leq 0.05$

С течением времени тканевые процессы в коже могут способствовать развитию фиброза. При подсчете коэффициента фиброзирования получили достоверные результаты повышенного фиброза сальных желез обследуемых с выявленными клещами *Demodex spp.* в сравнении с железами, расположенными в непораженных участках кожи (Рисунок 9).

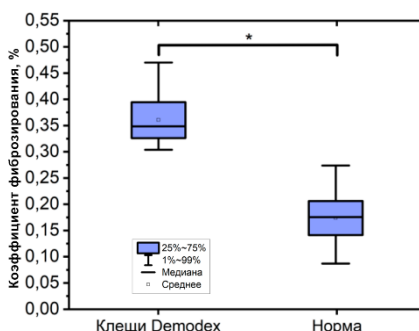


Рисунок 9 – Коэффициент фиброзирования (отношение участков разрастания фиброзной соединительной ткани к общей площади) сальных желез у обследуемых 1 группы (норма) и 3 группы (тканевой процесс, ассоциированный с клещами рода *Demodex spp.*, Me (25L; 75U).

* достоверность различий изучаемых показателей в сравнении с группой без выявленных клещей рода *Demodex spp.*, $p \leq 0.001$

Коллагеновые волокна в дерме в норме имеют толщину 1-10 мкм, хаотичное расположение и формируют сосочковый слой дермы. При распространении реактивного процесса за пределы сально-волосяного комплекса наблюдали истончение коллагеновых волокон, подлежащих к пораженному участку. Результаты измерений их толщины в 6 полях

зрения в 3 гистологических препаратах от каждого участника представлены ниже (Рисунок 10).

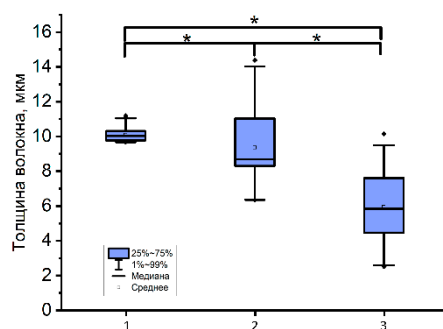


Рисунок 10 – Сравнительная морфометрия толщины коллагеновых волокон дермы, Me (25L; 75U). Группа 1 – добровольцы с нормальной кожей, без внешних признаков реактивных тканевых процессов. Группа 2 – обследуемые, имеющие признаки местной тканевой реакции кожи. Группа 3 – обследуемые с признаками местной тканевой реакции, ассоциированной с наличием клещей рода *Demodex* spp.

* достоверность различий изучаемых показателей в сравнении с группой без выявленных клещей рода *Demodex* spp., $p \leq 0.001$

Проведение морфометрического измерения эпидермиса людей третьей группы показало достоверное увеличение толщины базального, шиповатого, зернистого и рогового слоев в сравнении с эпидермисом кожи у обследуемых первой и второй групп (Рисунок 11).

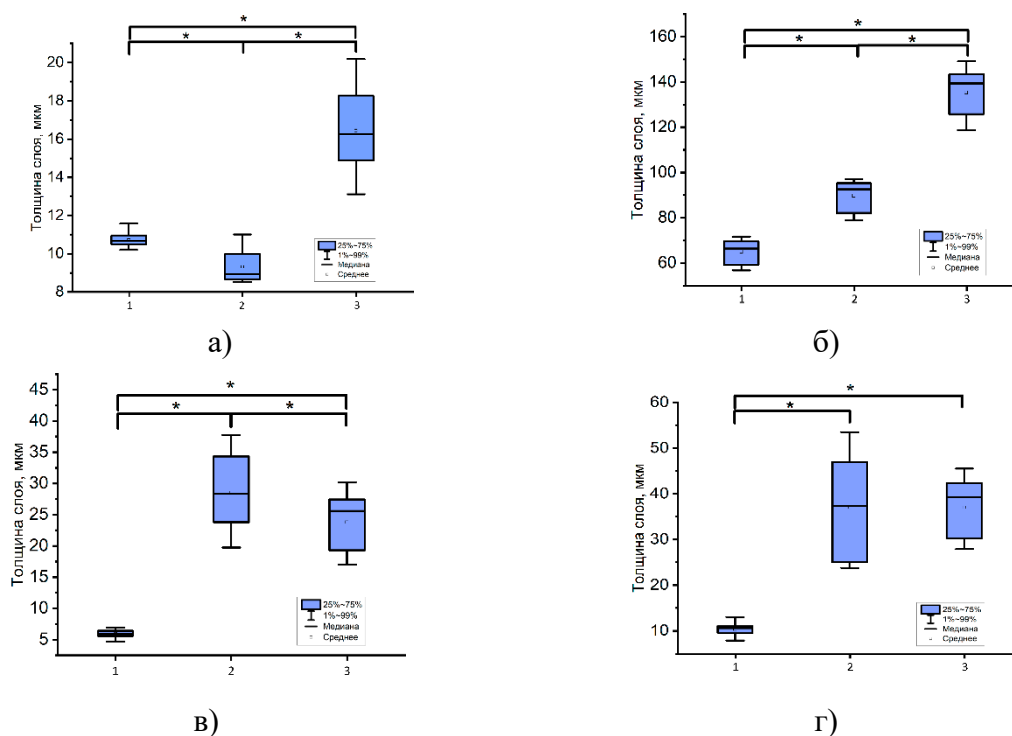


Рисунок 11 – Толщина слоев эпидермиса тонкой кожи: а) базальный; б) шиповатый; в) зернистый; г) роговой, Me (25L; 75U). Группа 1 – добровольцы с нормальной кожей, без внешних признаков реактивных тканевых процессов. Группа 2 – обследуемые, имеющие признаки местной тканевой реакции кожи. Группа 3 – обследуемые с признаками местной тканевой реакции, ассоциированной с наличием клещей рода *Demodex* spp.

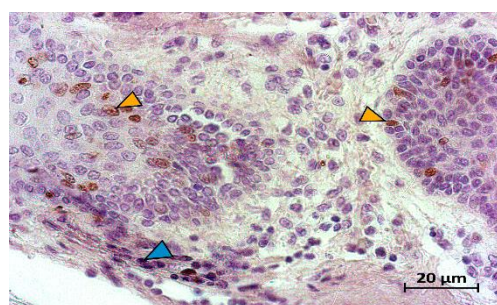
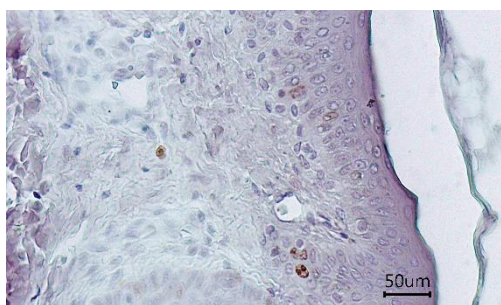
* достоверность межгрупповых различий изучаемых показателей, $p \leq 0.001$

Эти данные свидетельствуют об активной реакции ткани в ответ на деятельность клещей,

в связи с чем клинически можно предположить обострение хронического тканевого процесса. Таким образом, морфологические изменения отдельных компонентов барьера кожи участников третьей группы характеризовались выраженными нарушениями. Они проявлялись гипертрофическими процессами в эпидермисе, истончением волокон коллагена сосочкового слоя дермы, фиброзом сальных желез, наличием полиморфноядерного инфильтрата. Эти изменения могут привести к нарушению целостности и функционирования компонентов барьера кожи и увеличению площади поражения кожи.

2. Морфологические особенности пролиферативных процессов в элементах барьера кожи человека в условиях наличия местной тканевой реакции, ассоциированной с клещами рода *Demodex* spp.

Микропрепараты участников первой группы с отсутствием признаков тканевой реакции и нарушения компонентов барьера демонстрировали либо единичные Ki67-позитивные клетки, диффузно расположенные в различных компонентах барьера, либо их отсутствие (Рисунок 12а). Результаты анализа микропрепаратов, обследуемых 2 группы, показали наличие Ki67-позитивных клеток в элементах барьера. В отличие от 3 группы, клетки расположены преимущественно около имеющегося полиморфноядерного инфильтрата (Рисунок 12б).



а)

б)

Рисунок 12 – Кожа обследуемого (а) Микропрепарат кожи участника Р. из первой группы в возрасте 44 лет. Имеются единичные Ki67-позитивные клетки, окрашенные коричневым цветом. (б) Микропрепарат кожи участника Н. в возрасте 47 лет с наличием местной тканевой реакции сально-волосяного комплекса (синяя стрелка). Ki67-позитивные клетки окрашены коричневым цветом (оранжевые стрелки). Окраска гематоксилином, об. 40, ок. 20

Иммуногистохимический анализ материалов добровольцев из третьей группы показал повышенное количество Ki67-позитивных клеток в местах локализации клещей *Demodex* spp. в структурах барьера кожи (Рисунок 13). Большинство этих клеток расположены в составе сально-волосяного комплекса непрерывно, однако имеются и диффузно распределенные клетки в РВСТ (чаще в дермальном влагище). Наряду с Ki67-позитивными клетками имеются и другие изменения: истончение коллагеновых волокон, вакуолизация кератиноцитов, полиморфноядерная инфильтрация участков барьера, окружающих места локализации клещей.

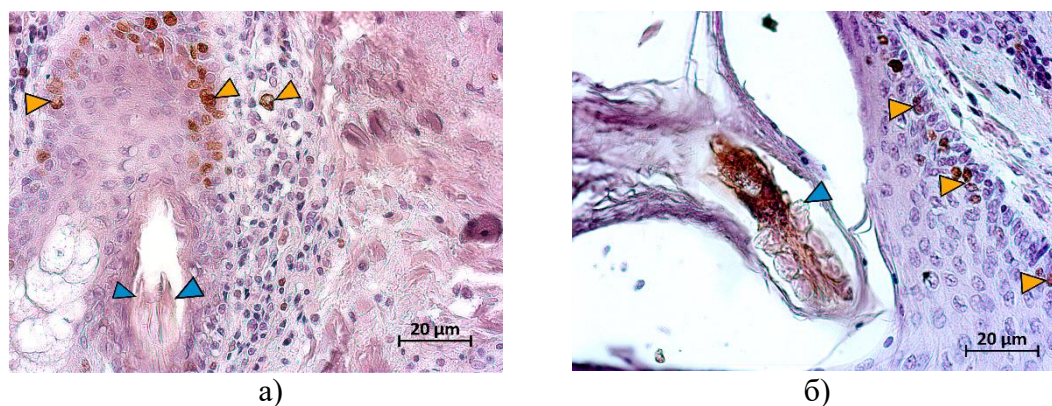


Рисунок 13 – Кожа обследуемого с наличием клещей *Demodex* spp. в сально-волосяном комплексе (синие стрелки) (а) Микропрепарат кожи участника Т. в возрасте 60 лет. (б) Микропрепарат кожи участника Д. в возрасте 53 лет. Ki67-положительные клетки окрашены коричневым цветом (оранжевые стрелки). Окраска гематоксилином, об. 40, ок. 20

Сравнительная количественная характеристика Ki67-положительных клеток в полученных препаратах от добровольцев трех групп представлена на Рисунке 14. Она показала достоверное различие между числом клеток исследуемой группы с имеющимся местным тканевым процессом, ассоциированным с особями *Demodex* spp. и другими группами (без признаков повреждения барьера). Таким образом, выявление Ki67-положительных клеток в компонентах барьера кожи при наличии местной тканевой реакции, ассоциированной с клещами рода *Demodex* spp. подтверждает их способность вызывать ответную тканевую реакцию в виде повышенной пролиферативной активности, так как процесс пролиферации является частью репаративной регенерации ткани после завершения первичных тканевых реакций.

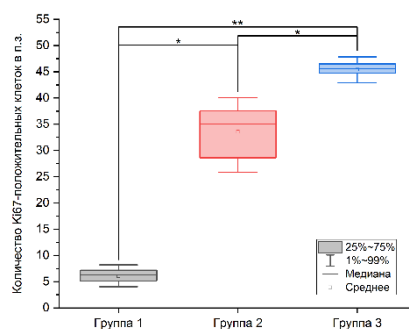


Рисунок 14 – Количество Ki67-положительных клеток в поле зрения для каждой исследуемой группы. Тест ANOVA с учетом поправки Бонферрони

*, ** достоверность различий между всеми 3 группами при $p \leq 0,05$

3. Изучение показателей крови, характеризующих состояние иммунной системы у людей с наличием клещей рода *Demodex* spp. и признаками местных тканевых реакций

Анализ показателей клеточного иммунитета обследуемых 3 группы выявил достоверное снижение в сравнении с 1 группой. Количество Т-хелперов и ИРИ у обследуемых с клещами *Demodex* spp. были достоверно снижены по сравнению со 2 группой, которая также имела признаки местной тканевой реакции. Абсолютное значение Т-цитотоксических лимфоцитов в 3 группе было выше, чем в 1 группе (Таблица 2).

Таблица 2 – Количество Т-лимфоцитов у обследуемых трех групп, $M \pm SE$, $n = 45$ в группе

Показатели Группы	Т-лф отн. %	Т-лф абс. $10^9/л$	Т-хл отн. %	Т-хл абс. $10^9/л$	Т-цт отн. %	Т-цт абс. $10^9/л$	ИРИ
1 группа	$73,07 \pm 1,692$	$1,75 \pm 0,109$	$45,80 \pm 0,942$	$1,10 \pm 0,065$	$24,00 \pm 1,441$	$0,58 \pm 0,048$	$2,01 \pm 0,127$
2 группа	$76,33 \pm 1,767$	$1,94 \pm 0,154$	$45,33 \pm 1,894$	$1,18 \pm 0,074$	$26,67 \pm 1,365$	$0,73 \pm 0,057$	$1,70 \pm 0,133$
3 группа	$68,93 \pm 1,843^*$	$1,54 \pm 0,090^*$	$36,33 \pm 1,443^{*,\#}$	$0,82 \pm 0,050^{*,\#}$	$27,27 \pm 2,972$	$0,85 \pm 0,084^\#$	$1,33 \pm 0,111^{*,\#}$

Обозначения: * достоверность различия изучаемого показателя между участниками 2 и 3 групп, # достоверность различия изучаемого показателя между участниками 1 и 3 групп, $p \leq 0.05$. Т-лф., отн. – Т-лимфоциты, относительное количество; Т-лф., абс. – Т-лимфоциты, абсолютное количество; Т-хл., отн. – Т-хелперы, относительное количество; Т-хл., абс. – Т-хелперы, абсолютное количество; Т-цт., отн. – Т-цитотоксические лимфоциты, относительное количество; Т-цт., абс. – Т-цитотоксические лимфоциты, абсолютное количество; ИРИ – иммунорегуляторный индекс

Таким образом, более выраженные отклонения Т-клеточной системы имели место у добровольцев 3 группы с выявленными клещами *Demodex spp.*, что делает их фактором, усугубляющим течение тканевого процесса и их повышенном влиянии на повреждение элементов барьера кожи.

4. Биологические особенности клещей рода *Demodex spp.* в условиях *in vitro*, приближенных к естественной среде обитания в коже

4.1. Изучение способов сохранения жизнеспособности клещей рода *Demodex spp.*

Изучение ультраструктуры и факторов патогенности клещей потребовало разработки условий, приближенных к их естественной среде обитания в коже, что необходимо для поиска эффективных веществ, приводящих к гибели *Demodex spp.*, в составе новых лекарственных препаратов. Исследование выявило, что в условиях температуры (от $+20^\circ\text{C}$ до $+25^\circ\text{C}$), отсутствии световых и химических раздражителей, нормальном уровне кислорода в воздухе (около 21%), а также при наличии питательной среды выживаемость взрослых особей клещей рода *Demodex spp.* составляет от 2 до 7 суток.

4.2. Особенности ультрамикроскопического строения и патогенности клещей рода *Demodex spp.*

Особи *Demodex spp.* являются условно-патогенными представителями нормальной флоры кожи человека, а их размеры по данным проведенной морфометрии варьируют от 0,1 до 0,4 мм в зависимости от вида. Результаты сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (Рисунок 15) четко показали не только строение, но структуру хитинового экзоскелета особей, его сложного трехкомпонентного ротового аппарата, а также степень адгезии кожного детрита, а значит и микрофлоры кожи на поверхности тела клеща.

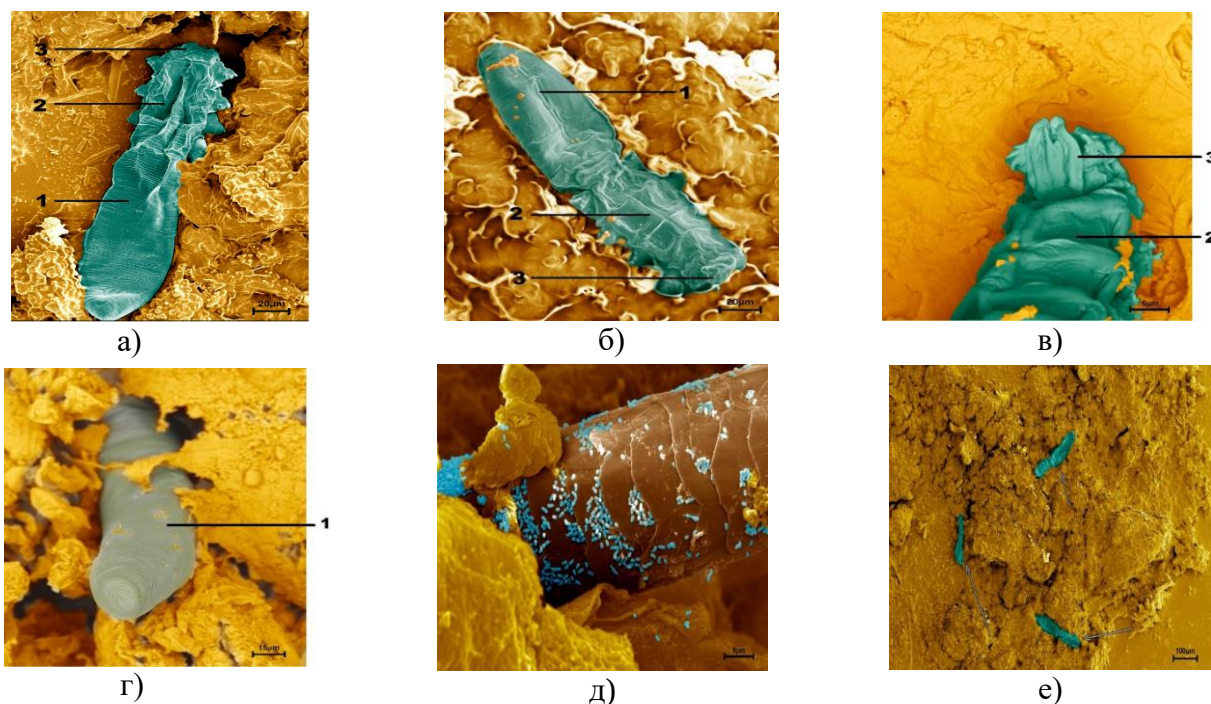


Рисунок 15 – Электронные микрофотографии материала соскобов с клещами рода *Demodex* spp. на стадии имаго и волоса человека: а) дорсальное положение *Demodex folliculorum*; б) вентральное положение *Demodex brevis*; в) сложный ротовой аппарат клеща *Demodex brevis*; г) слепо заканчивающаяся опистосома клеща *Demodex folliculorum*; д) стержневой волос человека с выявленными бактериями на поверхности е) обзорная картина группы клещей *Demodex folliculorum* в материалах соскоба; стрелками показаны 2 особи имаго справа и нимфа слева. Сканирующая электронная микроскопия с последующей цветокоррекцией. Обозначения: 1 – брюшко; 2 – грудь; 3 – головной отдел; (а) – $\times 400$; б) – $\times 500$; в), д) – $\times 1900$; г) – $\times 700$; е) – $\times 95$).

Ультрамикроскопические детали строения клеща на полученных изображениях демонстрируют его размерные характеристики и позволяют сделать вывод о возможности механического повреждения кожи ротовым аппаратом и конечностями паразита. Кроме того, колющие хелицеры и крючья способствуют перемещению и возможности закрепления клеща в структурах сально-волосяного комплекса. Эти факторы могут быть одними из причин его повреждающего влияния на функционирование элементов барьера. При подготовке материала соскобов к исследованию сохранилась целостная структура поверхности тела особей благодаря прочности хитинового экзоскелета, что демонстрирует обособленность антигенных компонентов клеща от окружающей среды и отсутствие общей иммунной реакции со стороны окружающих тканевых структур. Результаты измерений показали, что ширина опистосомы особей *Demodex* spp. достоверно больше ширины пушкового волоса человека, что говорит о возможности механической травматизации и блокировке волосяного канала.

Выявленный размер особей и место их обитания позволяет говорить о них как о возможном переносчике бактерий. Проводили микробиологический анализ содержимого клещей для определения наличия бактериальной флоры как еще одной причины развития и усугубления признаков местного тканевого процесса. В ходе исследования бациллярных антигенов нами

получен ПЦР фрагмент, содержащий 299 пар нуклеотидов, что подтверждает наличие в исследуемом материале бациллярной ДНК. Изучали образцы выделенной бактериальной культуры, в качестве контролей были использованы ДНК, выделенные из бактерий видов: *Bac. subtilis*, *St. epidermidis*, *St. pyogenes*, *Bac. cereus*, *Pr. vulgaris*. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в соскобе, содержащем *D. folliculorum*, присутствуют бациллярная ДНК, специфичная к роду *Bacillus*. Таким образом, полученные данные позволили подтвердить, что клещи рода *Demodex* spp. являются переносчиками бактерий рода *Bacillus*, особенности их ультраструктуры позволяют ограничить проникновение собственных антигенов и общую иммунную реакцию со стороны окружающих тканей, что значимо для разработки практических рекомендаций в лечении дерматита, ассоциированного с клещами рода *Demodex* spp.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Структурные изменения элементов барьера кожи человека при воздействии внешних повреждающих факторов проявляются в виде наличия в них признаков местных тканевых реакций. Это выражается выявлением в них полиморфноядерных инфильтратов, нарушением базальных мембран, а также гипертрофическими процессами в эпидермисе.

Клещи рода *Demodex* spp. являются условно-патогенными представителями нормальной флоры кожи человека. Однако, в условиях активности особей происходит развитие и усугубление местных тканевых процессов в местах их локализации в компонентах барьера кожи. Это сопровождается полиморфноядерной инфильтрацией сально-волосяных комплексов, активацией пролиферативных процессов, снижением толщины коллагеновых волокон дермы, гипертрофией сальных желез, дезорганизацией базальных мембран, нарушением проницаемости гемокапилляров с возможным возникновением периваскулярного отека.

Исследование параметров Т-клеточного звена иммунитета при наличии тканевой реакции, ассоциированной с клещами рода *Demodex* spp., выявило снижение показателей для Т-лимфоцитов, что свидетельствует о вовлечении в процесс иммунной системы.

Изучение ультрамикроскопических особенностей строения клещей *Demodex* spp. подтвердило возможность механического повреждения структур барьера кожи ротовым аппаратом и конечностями паразита. Показано, что особи *Demodex* spp. также являются переносчиками некоторых видов бактерий рода *Bacillus*. Разработанные условия содержания, приближенные к естественным для клещей *Demodex* spp., способствуют длительной жизнеспособности особей, что стало основой для формулировки практических рекомендаций к терапии ассоциированных состояний.

ВЫВОДЫ

1. Элементы барьера кожи человека в условиях наличия местной тканевой реакции, ассоциированной с клещами *Demodex spp.* имели более выраженные признаки повреждения отдельных структур по сравнению с этими же компонентами при отсутствии инвазии клещами.

2. Возрастание количества Ki67-позитивных клеток в местах нахождения клещей в элементах барьера кожи у исследуемой группы, что свидетельствует об активации местных пролиферативных процессов.

3. Количество Т-лимфоцитов у обследуемых с признаками местной тканевой реакции, ассоциированной с особями *Demodex spp.* было достоверно снижено, что подтверждает развитие местной адаптивной реакции компонентов барьера кожи человека к повреждающему воздействию клещей.

4. Важную роль в нарушении целостности структур барьера кожи и осложнении течения местных тканевых процессов играют биологические особенности клещей. Выявленные особенности могут играть важную роль в их выживаемости и деструктивном влиянии на все компоненты барьера кожи.

5. Разработанные условия сохранения жизнеспособности, приближенные к естественным для клещей *Demodex spp.*, могут быть предложены как экспериментальная модель для проведения исследований и способствуют длительному сохранению особей для поиска новых препаратов и их рационального использования в рамках персонализированной медицины.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Возможная роль гистогематического барьера в морфогенезе демодекоза кожи / **К.Н. Пустовая**, Г.А. Пьявченко, М.Г. Костяева [и др.] // **Морфология**. – 2019. – № 156(6). – С. 115.
2. Гистогематические барьеры в морфогенезе демодекоза / **К.Н. Пустовая**, Г.А. Пьявченко, М. В. Арисов, В.И. Ноздрин // Современная морфология: проблемы и перспективы развития: сб. тр. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 90-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки Республики Беларусь, профессора Петра Иосифовича Лобко. В 2 ч. – 2019. – Ч. 2. – С. 63-66.
3. Изучение действия акарицидного препарата на клещей вида *Demodex folliculorum* в исследовании *in vitro* / **К.Н. Пустовая**, Г.А. Пьявченко, М.В. Арисов, В.И. Ноздрин // **Клиническая дерматология и венерология**. – 2019. – Т. 18. – № 2. – С. 157-161. [**Web of Science, Scopus**].
4. Подвижность особей и акарограмма как критерии оценки действия препаратов против клещей рода *Demodex* / **К.Н. Пустовая**, Г.А. Пьявченко, М.В. Арисов, В.И. Ноздрин // **Клиническая дерматология и венерология**. – 2019. – Т. 18. – № 6. – С. 710-714. [**Web of Science, Scopus**].

5. Пустовая, К.Н. Клеши Demodex spp. у человека / О.В. Калинина, **К.Н. Пустовая**, В.И. Ноздрин // Ретиноиды. Альманах. Балашиха. – 2019. – Т. 35. – С. 9-16.
6. Пустовая, К.Н. Сравнительное исследование акарицидного влияния препарата Д-18 на клещей Demodex canis и Demodex folliculorum in vitro / **К.Н. Пустовая**, Г.А. Пьявченко, В.И. Ноздрин // **Вестник последипломного медицинского образования**. – 2019. – № 2. – С. 25-29.
7. Макет гистогематического барьера кожи: патент на промышленный образец №120631 РФ / **К. Н. Пустовая**, К.В. Ноздрин, М.Г. Костяева, В.И. Ноздрин, заявитель и патентообладатель – АО ФНПП «Ретиноиды» заявл. № 2019505747 18.12.2019, опубл. 20.07.2020. – Бюл. № 8. – 2 с.
8. Способ сохранения жизнедеятельности клещей рода Demodex spp. для проведения акарограммы и оценки подвижности взрослых особей: патент № 2732602 РФ / **К.Н. Пустовая**, Г.А. Пьявченко, М.В. Арисов, В.И. Ноздрин, заявитель и патентообладатель – ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. АО ФНПП «Ретиноиды» – заявл. № 2019138074 26.11.2019, опубл. 21.09.2020. – Бюл. № 27. – 2 с.
9. Пустовая, К.Н. 3D-модель гистогематического барьера кожи для изучения локализации клещей рода Demodex у человека / **К.Н. Пустовая**, В.И. Ноздрин // Материалы Международной научной конференции посв. 75-летию юбилею Государственного Медицинского и Фармацевтического Университета им. Николае Тестемицану Республики Молдова. – Кишинёв, 2020. – С. 164-166.
10. Внешний вид клещей рода Demodex и их локализация в сально-волосяных комплексах / **К.Н. Пустовая**, Н.И. Аванесова, Ю.М. Жук [и др.] // **Клиническая дерматология и венерология**. – 2020. – Т. 19. – № 6. – С. 880-884. [Web of Science, Scopus].
11. Пустовая, К.Н. Иммунорегуляторный индекс у пациентов с акнеформными дерматозами, осложненными клещами рода Demodex / **К.Н. Пустовая**, В.И. Ноздрин // **Вестник последипломного медицинского образования**. – 2020. – № 3. – С. 29-32.
12. Пустовая, К.Н. Методика обучения студентов с помощью 3D-моделей на примере макета «Гистогематический барьер кожи» / **К.Н. Пустовая**, В.И. Ноздрин // Материалы VII Международной научно-практической конференции Психолого-педагогическое сопровождение образовательного процесса: проблемы, перспективы, технологии. – Орёл, 2020. – С. 300-301.
13. Состояние Т-системы иммунитета у пациентов с диагнозами «розацеа», «угревая болезнь» и «периоральный дерматит» / **К.Н. Пустовая**, Г.А. Пьявченко, М.М. Сморгков, В.И. Ноздрин // Рахмановские чтения. Современная дерматовенерология и междисциплинарные связи. XXXVII Научно-практическая конференция с международным участием: сборник тезисов. – Москва: Практическая медицина. – 2020. – С. 64-66.

14. Пустовая, К.Н. Клеши рода *Demodex*. Причина или сопутствие некоторым заболеваниям кожи / **К.Н. Пустовая**, В.И. Ноздрин // Ретиноиды. Альманах. Балашиха. – 2021. – Т. 36. – С. 27-39.
15. Пустовая, К.Н. Возможность использования метода дерматоскопии для оценки эффективности лечения некоторых фациальных дерматозов / **К.Н. Пустовая**, В.И. Ноздрин // Ретиноиды. Альманах. Балашиха. – 2021. – Т. 36. – С. 70-75.
16. Пустовая, К.Н. Подвижность клещей рода *Demodex* при добавлении щёлочи *in vitro* / **К.Н. Пустовая**, В.И. Ноздрин // Ретиноиды. Альманах. Балашиха. – 2021. – Т. 36. – С. 76-77.
17. Пустовая, К.Н. Подвижность клещей рода *Demodex* в условиях светового раздражителя *in vitro* / **К.Н. Пустовая**, В.И. Ноздрин // Ретиноиды. Альманах. Балашиха. – 2021. – Т. 36. – С. 77-78.
18. Пустовая, К.Н. Подвижность клещей рода *Demodex* в анаэробных условиях *in vitro* / **К.Н. Пустовая**, В.И. Ноздрин // Ретиноиды. Альманах. Балашиха. – 2021. – Т. 36. – С. 78-79.
19. Пустовая, К.Н. Влияние температуры на продолжительность жизни клещей рода *Demodex in vitro* / **К.Н. Пустовая**, В.И. Ноздрин // Ретиноиды. Альманах. Балашиха. – 2021. – Т. 36. – С. 79-81.
20. Пустовая, К. Н. Подвижность клещей рода *Demodex* в естественной питательной среде *in vitro* / **К.Н. Пустовая**, В.И. Ноздрин // Ретиноиды. Альманах. Балашиха. – 2021. – Т. 36. – С. 81-82.
21. Пустовая, К.Н. Оценка изменений индексов качества жизни у пациентов с акнеформными дерматозами / **К.Н. Пустовая**, В.И. Ноздрин / Рахмановские чтения. Современная дерматовенерология и междисциплинарные связи. XXXVIII Научно-практическая конференция с междунар. участием: сборник тезисов // **Дерматология в России**. – 2021. – 1(S1). – С. 30.
22. Пустовая, К.Н. Влияние факторов внешней среды на жизнеспособность клещей рода *Demodex* / **К.Н. Пустовая**, В.И. Ноздрин // Сборник трудов 15 Международный форум дерматовенерологов и косметологов «Синтез науки и практики». – 2022. – С. 63.
23. Пустовая, К.Н. Морфофункциональные изменения кожи человека при акнеформных дерматозах / **К.Н. Пустовая**, Г.А. Пьявченко, Н.Т. Алексеева [и др.] // **Журнал анатомии и гистопатологии**. – 2022. – Т. 11. – № 4. – С. 33-40.
24. Пустовая, К.Н. Морфофункциональные изменения кожи человека в результате влияния клещей рода *Demodex* / **К.Н. Пустовая**, Г.А. Пьявченко, Н.Т. Алексеева, С.Л. Кузнецов // **Журнал анатомии и гистопатологии**. – 2023. – Т. 12. – № 2. – С. 64-71.
25. Пустовая, К.Н. Определение возможных причин повреждения гистогематического барьера кожи человека на модели клещей рода *Demodex* / **К.Н. Пустовая** // **Морфологические ведомости**. – 2023. – Т. 31. – № 4. – С. 25-33.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ГГБК – гистогематический барьер кожи

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИРИ – иммунорегуляторный индекс

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РВСТ – рыхлая волокнистая соединительная ткань

СВК – сально-волосяной комплекс

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

Т-лф. – Т-лимфоциты

Т-хл. – Т-хелперы

Т-цт. – Т-цитотоксические лимфоциты

УФ – ультрафиолет

CD – кластер дифференцировки

D. brevis – *Demodex brevis*

D. folliculorum – *Demodex folliculorum*