

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

*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

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор,  
член-корреспондент РАН  
Кузнецов Сергей Львович

Москва – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	15
1.1. Структурные компоненты барьера кожи человека в норме .....	15
1.2. Возможность влияния различных внешних и внутренних факторов на тканевые процессы, локализованные в элементах кожного барьера.....	22
1.2.1. Сально-волосяной комплекс .....	23
1.2.2. Соединительная ткань дермы и гемокapилляры.....	24
1.3. Характеристика особенностей строения и жизнедеятельности клещей рода <i>Demodex</i> spp. ....	26
1.4. Модель естественной среды обитания клещей рода <i>Demodex</i> spp. для проведения экспериментальных исследований .....	30
1.5. Влияние клещей рода <i>Demodex</i> spp. на иммунную систему .....	31
1.6. Статистика распространенности клещей рода <i>Demodex</i> spp., как факторов, участвующих в повреждении барьера, среди населения в мире .....	34
1.7. Заключение .....	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.....	37
2.1. Оценка морфологического состояния элементов барьера кожи человека.....	37
2.1.1. Взятие соскоба с кожи и диагностика наличия клещей.....	38
2.1.2. Взятие панч-биопсии кожи .....	38
2.2. Исследование морфологических изменений в компонентах барьера кожи человека в условиях наличия местной тканевой реакции, ассоциированной с клещами рода <i>Demodex</i> spp.....	39
2.3. Иммуногистохимическое исследование пролиферативных процессов в компонентах барьера кожи человека в условиях наличия местной тканевой реакции, ассоциированной с клещами рода <i>Demodex</i> spp.....	40
2.4. Определение иммунного статуса людей с наличием клещей рода <i>Demodex</i> spp. и признаками местных тканевых реакций.....	41

2.5. Сохранение жизнеспособности клещей рода <i>Demodex</i> spp. для проведения экспериментальных исследований .....	41
2.6. Исследование клещей рода <i>Demodex</i> spp. методом сканирующей электронной микроскопии.....	42
2.7. Исследование бактериальной флоры клещей рода <i>Demodex</i> spp. методом полимеразной цепной реакции .....	43
2.8. Статистическая обработка полученных результатов .....	43
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	45
3.1. Морфофункциональное состояние элементов барьера кожи человека в норме и при наличии признаков местной тканевой реакции .....	45
3.2. Морфофункциональные изменения структуры компонентов барьера кожи человека при наличии местных тканевых реакций, ассоциированных с клещами рода <i>Demodex</i> spp. ....	48
3.2.1. Изменения морфологических показателей структурных компонентов барьера кожи человека.....	59
3.3. Морфологические особенности пролиферативных процессов в элементах барьера кожи человека в условиях наличия местной тканевой реакции, ассоциированной с клещами рода <i>Demodex</i> spp. ....	63
3.4. Изучение показателей крови, характеризующих состояние иммунной системы у людей с наличием клещей рода <i>Demodex</i> spp. и признаками местных тканевых реакций .....	67
3.5. Биологические особенности клещей рода <i>Demodex</i> spp. в условиях <i>in vitro</i> , приближенных к естественной среде обитания в коже .....	68
3.5.1. Изучение способов сохранения жизнеспособности клещей рода <i>Demodex</i> spp. ....	68
3.5.2. Особенности ультрамикроскопического строения и патогенности клещей рода <i>Demodex</i> spp. ....	71
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	76
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	84
ВЫВОДЫ .....	85

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	86
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	87
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	88
ПРИЛОЖЕНИЕ А .....	102
ПРИЛОЖЕНИЕ Б .....	105
БЛАГОДАРНОСТИ .....	108

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Кожа человека представляет собой уникальный орган, выполняющий ряд важных функций, одной из которых является барьерно-защитная. Структура кожи позволяет защитить организм от воздействия неблагоприятных внешних факторов, таких как УФ-излучение, температурное воздействие, проникновение чужеродных микроорганизмов и вредных химических соединений в системный кровоток и другие. Так, О.Д. Мяделец [19] условно выделяет специфические и неспецифические механизмы осуществления барьерно-защитной функции. К неспецифическим относят наличие гидро-липидной мантии, рогового слоя эпидермиса, базальной мембраны, выработку меланина. Структурная целостность и нормальное функционирование этих компонентов определяют состав индивидуальной микрофлоры каждого человека и препятствуют размножению и проникновению посторонних патогенных бактерий. К специфическим элементам барьерно-защитной функции кожи относят совокупность иммунокомпетентных клеток (клетки Лангерганса, макрофаги дермы и гиподермы, лимфоциты, тканевые базофилы, гранулоциты, кератиноциты), пептидергические, аминергические и пуринергические нервные волокна, а также эндотелий кровеносных сосудов (регулирует проницаемость). Все эти элементы могут в той или иной степени модулировать иммунный ответ. 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.

В дальнейшем О.Д. Мяделец также изучал взаимодействие клеток основных систем органов с соответствующим им гематопаренхиматозным (гистогематическим) барьером (ГГБ) [21]. По его данным, состав любого ГГБ включает следующие компоненты: эндотелий капилляров, обеспечивающий питание клеток; базальная мембрана эндотелия; прослойка рыхлой волокнистой

соединительной ткани (РВСТ) с иммунокомпетентными клетками, отвечающими за защиту клеток органа; базальная мембрана клеток рабочей части каждой из систем органов.

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, которая участвует в обеспечении защиты и гомеостаза компонентов кожи, например, при воздействии различных внешних и внутренних факторов (бактерии, химические воздействия на кожу, возрастные и гормональные изменения). В настоящей работе особое внимание уделено таким элементам барьера, как сально-волосяной комплекс (СВК), прилежащая РВСТ и стенка кровеносного капилляра (базальная мембрана + эндотелий). Практическое значение в медицине 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 этих структур кожи происходит проникновение их антигенов в соединительную ткань, а затем в гемокапилляры (Приложение Б). В этом случае биологически активные вещества (антигены клещей рода *Demodex spp.* и продукты распада особей) действуют через трансмембранные клеточные рецепторы, вызывая местные и системные реакции. Эти и другие факторы способны вызвать местную тканевую реакцию, которая может проявляться нарушением процессов дифференцировки кератиноцитов, повышением продукции кожного сала, дезорганизацией стенки сосудов микроциркуляторного русла, фиброзом тканей, увеличением количества иммунокомпетентных клеток в дерме и другими признаками. Такие изменения в компонентах барьера кожи также ведут к нарушению его целостности и функционирования.

Таким образом, системный анализ взаимоотношений между элементами 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 отдельные исследования влияния различных внешних факторов на течение местного тканевого процесса в коже. Имеются работы [39, 86, 99], касающиеся морфологических изменений кожи при инвазии клещами рода *Demodex spp.* Наиболее информативным методом их выявления является окрашивание срезов кожи гематоксилином и эозином, которое позволяет выявить хитиновый скелет клеща, его внутренние структуры, 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 [18, 39, 86, 99].

Проведены исследования, показывающие воздействие возрастных гормональных изменений на трансформацию состава кожного сала и его гиперсекрецию, что приводит к закрытию протока в СВК и нарушению его функционирования [6, 11, 15, 45]. В исследовании Е.И. Теддера и соавторов [50] проанализирована возможность влияния микроорганизмов на волосяные фолликулы как факторов, приводящих к их разрушению и образованию перифолликулярных лимфогистиоцитарных инфильтратов в дерме. С. Perrigouard и соавторы [101] в своем исследовании участков кожи, периодически подвергавшихся температурному воздействию и УФ-излучению, наблюдали нарушение работы сосудов микроциркуляторного русла, их расширение и аномальную форму с прерывистым эндотелием, набухшими эндотелиальными клетками как следствие ответной тканевой реакции.

## **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 присутствия 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 ГГБК, 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),

отсутствия световых и химических раздражителей, нормального уровня кислорода в воздухе (около 21%) и наличия 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 человека может быть использована для разработки и получения новых препаратов в рамках подходов персонализированной медицины, а также в практике преподавания курсов «Гистология, эмбриология, цитология» для объяснения механизма взаимодействия компонентов ГБК с внешними и внутренними факторами. Способ сохранения жизнеспособности клещей *Demodex spp.* может быть использован для возможного дальнейшего научного поиска, в том числе создания новых лекарственных препаратов с целью разработки терапевтических подходов в лечении дерматитов, ассоциированных клещами рода *Demodex spp.*

### **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 в возрасте 18–75 лет, 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 3.3. Этим же способом оценивали жизнеспособность и подвижность особей в различных условиях окружающей среды. Оценивали пролиферативную активность клеток в области сально-волосяных комплексов для всех групп исследования с помощью моноклональных антител «Anti-Ki67 Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody [SR00-02]» (CAT HA721115, LOT HP0304, «Huabio», Китай). Определение иммунного статуса участников проводили на оборудовании FACSCalibur и FACSCanto II (BD Biosciences, США) с автоматической подготовкой проб. Сканирующую

электронную микроскопию осуществляли с помощью аппарата 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).

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Работа выполнена в соответствии с паспортом научной специальности 1.5.22. Клеточная биология (медицинские науки), 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».

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Степень достоверности результатов определена стандартизацией условий

взятия материалов для микроскопического и иммунологического исследований, достаточным количеством обследуемых, их рандомизацией, формированием групп сравнения, адекватным морфологическим методом исследования, методами параметрического и непараметрического 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.

Материалы диссертации изложены в 25 публикациях, Основные положения работы доложены и обсуждены на заседании: II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Импортозамещение, доступная медицинская помощь и равные возможности в дерматологии» (Москва, 2018 г.), I научно-практической конференции с международным участием «Интегративная и синтетическая дерматовенерология» (Смоленск, 2019 г.), научно-практической конференции с международным участием, посвященной 90-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки Республики Беларусь, лауреата Государственной премии Республики Беларусь, профессора Петра Иосифовича Лобко: «Современная морфология: проблемы и перспективы развития» (Минск, 2019 г.), Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 105-летию со дня рождения чл.-кор. АМН СССР, профессора Алексея Георгиевича Кнорре «Актуальные проблемы морфологии: эмбриональный и репаративный гистогенез, филогистогенез» (Санкт-Петербург, 2019 г.), Рахмановских чтениях «Современная дерматовенерология и междисциплинарные связи. XXXVII Научно-практическая конференция с международным участием» (Москва, 2020 г.), VII Международной научно-практической конференции "Психолого-педагогическое сопровождение образовательного процесса: проблемы, перспективы, технологии" (Орел, 2020 г.), международной научной конференции, посвященной 75-летию юбилею Государственного Медицинского и Фармацевтического Университета им. Николае Тестемицану (Кишинёв, 2020 г.), Рахмановских чтениях «Современная дерматовенерология и междисциплинарные связи. XXXVIII

Научно-практическая конференция с международным участием» (Москва, 2021 г.), международном форуме дерматовенерологов и косметологов «Синтез науки и практики» (International Forum of Dermatovenereologists and Cosmetologists «Synthesis of Science and Practice») (Москва, 2022 г.).

Апробация результатов диссертационного исследования проведена на заседании кафедры анатомии и гистологии человека, протокол № 18 от 06.05.2024 г.

### **Личный вклад**

Личное участие автора заключалось в определении задач исследования, планировании и выполнении экспериментальной части исследования, в ходе которой были получены материалы соскобов, панч-биопсии, а также сыворотка крови для изучения структуры барьера кожи и ультраструктуры клещей рода *Demodex* spp. методами микроскопии, сканирующей электронной микроскопии и другими методами. Проведен морфометрический анализ показателей изменения структурных компонентов барьера кожи человека в различных группах и особенностей строения клещей рода *Demodex* spp., выполнена статистическая обработка полученных данных, проанализированы и обобщены результаты исследования. Проведен анализ и отбор отечественной и мировой литературы по теме исследования. Подготовлены лично и в соавторстве публикации по материалам проведенного исследования.

### **Публикации по теме диссертации**

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

### **Структура и объём диссертации**

Диссертация написана по классическому типу и содержит введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований,

обсуждение полученных данных, заключение, выводы, список сокращений и список литературы, приложения. Список литературы содержит 120 работ, из них отечественных – 56. Работа иллюстрирована 34 рисунками (30 – в тексте диссертации, 4 – в приложениях) и 7 таблицами. Диссертационная работа написана на 108 страницах.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Структурные компоненты барьера кожи человека в норме

Кожа обеспечивает взаимодействие между окружающей и внутренней средой организма человека, защищает от различных физических, химических, биологических и прочих факторов, которые могут вызвать местную тканевую реакцию. При продолжительном воздействии этих факторов, нарушениях иммунной реакции организма или отсутствии лечения процесс может стать системным. В зависимости от тяжести и распространенности местного тканевого процесса происходят морфологические и функциональные изменения структур кожи, в том числе элементов гистогематического барьера кожи (ГГБК). Понятие гистогематический барьер ввела в 1929 году Л.С. Штерн. Автор охарактеризовала его как пластичный, подвижный аппарат, принимающий участие в поддержании постоянства внутренней среды, функции которого можно регулировать с помощью физиологически активных веществ [42]. Компоненты ГГБК являются одним из механизмов, сдерживающих распространение и систематизацию воспалительного процесса. В настоящее время наиболее изученными считаются компоненты эпидермального барьера кожи, которые являются частью ГГБК. Информации о структуре и функционировании более глубоких компонентов барьера кожи, действующих как единый механизм, недостаточно много. Целью настоящего обзора является анализ некоторых элементов барьера кожи человека и его роль в тканевых реакциях кожи, вызванных различными внешними и внутренними факторами.

Каждый вид ГГБ специфичен и характеризуется наличием тех или иных свойств, а его строение и функции определяются морфофункциональными взаимоотношениями в органе, направленными на защиту от различных эндо - и экзогенных факторов [21]. Основные функции ГГБ любого органа заключаются в поддержании гомеостаза (регуляция относительно постоянного химического

состава, физиологической активности клеток рабочей части органа), обеспечении селективного транспорта необходимых веществ к клеткам и элиминации продуктов обмена, а также осуществлении барьерно-защитной функции (защита клеток от проникновения эндо - и экзогенных токсичных веществ).

В настоящем обзоре были проанализированы такие компоненты барьера кожи человека как сально-волосяной комплекс (СВК), соединительная ткань (СТ), и стенка кровеносного капилляра (базальная мембрана + эндотелий). Интерес в изучении представляют их отдельные структуры, отвечающие за поддержание барьерно-защитной функции.

Строение волосяного фолликула и сальной железы рассмотрено в работах многих авторов [21, 23], однако информации о функционировании сально-волосяного комплекса с точки зрения компонента барьера достаточно немного. Например, структурные компоненты, составляющие СВК в области волосяной воронки, волосяного канала, главного протока сальной железы требуют более глубокого изучения, так как являются пограничной областью между внешней и внутренней средой. К ним относятся наружное корневое эпителиальное влагалище, включающее утолщение (выпуклость), базальная мембрана и дермальное влагалище. Перечисленные элементы являются общими для волосяных фолликулов и сальных желез кожи человека. Со стороны внешней среды на них оказывают влияние условно-патогенные и патогенные факторы (бактерии, грибы, вирусы, клещи и прочие), а также физические параметры внешней среды (температура, УФ-излучение, травмы и т.д.). В то же время гормональные и возрастные изменения организма человека, генетические особенности, а также соматические патологии могут оказывать стимулирующее или деструктивное действие на структуры СВК. Таким образом, последовательный морфофункциональный анализ каждой структуры может быть полезен для формирования общей картины роли барьерных элементов кожи в поддержании ее гомеостаза.

Наружное корневое эпителиальное влагалище, окружающее волосяной фолликул и сальную железу, состоит из многослойного плоского

неороговевающего эпителия. Однако в области волосяного канала встречаются кератиноциты, способные к ороговению [20]. Единичные роговые чешуйки, смешиваясь с кожным салом, выделяются в волосяную воронку, создавая благоприятное микроокружение для микрофлоры кожи в норме. Кератиноциты поверхностного слоя наружного эпителиального влагалища являются камбиальными и переходят в базальный слой эпидермиса кожи сверху, а снизу образуют скопление стволовых эпителиальных клеток, называемое утолщением (выпуклостью) [100]. Благодаря этой структуре происходит обновление клеток фолликула, а также заживление травм. Кроме кератиноцитов здесь встречаются клетки Лангерганса и амеланотические меланоциты. Число клеток Лангерганса, выполняющих иммунную функцию, уменьшается от поверхностных к глубоким слоям фолликула, в связи с этим проксимальные структуры СВК имеют возможность "иммунной привилегии" по отношению к чужеродным объектам. Благодаря этой особенности условно-патогенные микроорганизмы могут обитать в СВК, не вызывая иммунной реакции со стороны кожи. Амеланотические клетки служат предшественниками меланоцитов и приобретают активность в случае необходимости защиты от УФ-излучения. Камбиальный слой клеток влагалища окружен базальной мембраной, которая представляет собой гомогенную эозинофильную структуру, отграничивающую эпителиальную ткань волосяного фолликула от соединительной ткани дермального влагалища. Морфологически и функционально эта мембрана аналог базальной мембраны эпидермиса. По мнению Р. Rousselle и соавторов [104] базальная мембрана играет одну из ключевых ролей в сохранении пула стволовых клеток, участвует в дифференцировке и регенерации кератиноцитов. Эти факторы в свою очередь являются необходимыми для поддержания барьерно-защитной функции ГГБК. Дермальное влагалище снаружи покрывает СВК и состоит из плотно прилегающих друг к другу коллагеновых и эластических волокон, а также остальных компонентов соединительной ткани, в том числе гемокапилляров. Упоминания об этой структуре встречаются в работах О.Д. Мядельца и В.П. Адашкевича [20] как о соединительнотканной капсуле или волосяной сумке, состоящей из более плотного внутреннего и менее плотного

наружного слоев. Дермальное влагалище является еще одним общим компонентом для волосяного фолликула и сальной железы, выполняющим защитно-барьерную функцию. Сальная железа как часть СВК покрыта клетками наружного корневого эпителиального влагалища. Их число уменьшается по мере продвижения к секреторным альвеолоцитам. Кнаружи от кератиноцитов железа также как и волос покрыта соединительнотканной капсулой с кровеносными капиллярами. В своей работе В.И. Ноздрин и соавторы [23] пишут о том, что базальная мембрана гемокapилляров дермального влагалища волосяных фолликулов и сальных желез в норме является пластичной структурой, состоящей из светлой и темной пластинок и прилегающей фибриллярной зоны. А также, что кровоснабжение сальных желез является общим с корневой системой волос, то есть с дермальным сосочком волоса. На основании этого волосяной фолликул и сальная железа могут быть объединены в СВК, имеющий общую морфофункциональную структуру. Таким образом, корневое эпителиальное влагалище, базальная мембрана и дермальное влагалище являются компонентами «рабочей части органа» барьера кожи. Они способствуют первичной защите внутренней среды от проникновения чужеродных антигенов и препятствуют распространению и систематизации воспалительных процессов в коже (Рисунок 1).

Еще одной частью барьера кожи является СТ дермы, которая помимо коллагеновых и эластических волокон, содержит специфические иммунокомпетентные клетки. К ним относятся макрофаги дермы, лимфоциты, тканевые базофилы, гранулоциты. Также присутствуют нервные волокна, имеющие в своем составе отростки пептидергических, аминергических и пуринергических нейронов (используют ангиотензин, вещество Р, гистамин, простагландины, АТФ, дофамин, брадикинин в качестве медиаторов). Все эти вещества могут в той или иной степени влиять на проницаемость барьера и способны модулировать иммунный ответ на воспалительную реакцию [19].

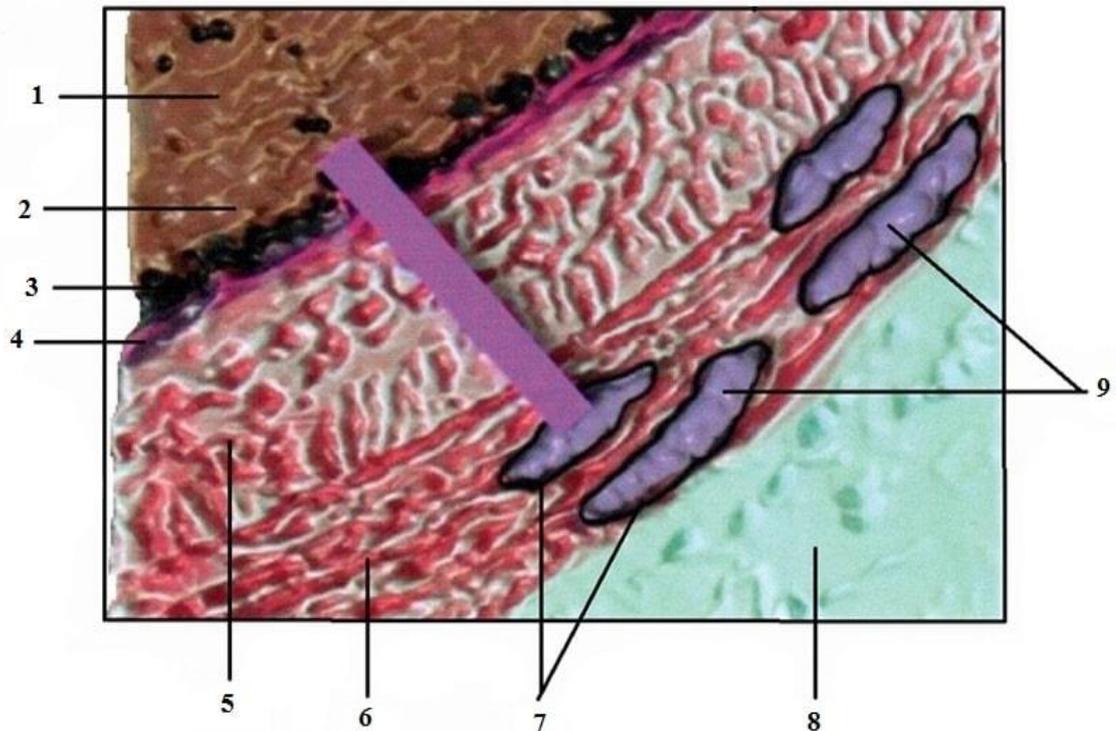


Рисунок 1 – Компоненты барьера кожи (на основании созданной 3D-модели ГГБК): 1 – мозговое вещество волоса; 2 – корковое вещество волоса, 3 – кутикулы внутреннего корневого эпителиального влагалища и волоса, 4 – внутреннее корневое эпителиальное влагалище, 5 – наружное корневое эпителиальное влагалище, 6 – дермальное корневое влагалище, 7 – базальная мембрана гемокapилляра, 8 – рыхлая соединительная ткань, 9 – эритроциты в капилляре, Фиолетовая полоса показывает первичный фолликулярно-эндотелиальный барьер, входящий в состав общего барьера кожи

Эта теория согласуется с ролью кожи как периферического иммунного органа. Функционально гистиоциты кожи обратимо делятся на покоящиеся и блуждающие, отличающиеся строением. Фактором перехода из неактивного в активное состояние могут служить микроорганизмы и их частицы, другие объекты фагоцитоза и цитокинов. Помимо эндоцитоза, макрофаги синтезируют и выделяют около 100 различных веществ. Н.А. Юрина и А.И. Радостина [55] разделили их на группы: гидролитические ферменты; модуляторы поведения клеток; продукты окисления арахидоновой кислоты; цитотоксические метаболиты кислорода; компоненты комплемента; интерфероны и другие вещества.

Таким образом, макрофаги влияют на устойчивость и постоянство соединительных и эпителиальных тканей в норме и патологии. Антигенпредставляющие свойства гистиоцитов являются еще одной их важной

функцией. Так, в случае невозможности завершения фаго- или пиноцитоза на местном уровне, эти клетки перерабатывают инородные частицы и образуют комплекс для дальнейшей деактивации патологических клеток.

Нейтрофильные гранулоциты выполняют множество функций, в том числе и защитную. Основным механизмом осуществления является фагоцитоз. Однако ему предшествует такое явление как респираторный взрыв, во время которого клетка активно вырабатывает токсические для микроорганизма вещества (супероксид кислорода, перекись водорода). Одновременно с этим происходит секреция нейтрофилами миелопероксидазы, лизоцима, лактоферрина и катионных белков. Эти вещества также оказывают губительное действие на чужеродные агенты. После активации этих защитных механизмов путем фагоцитоза бактерия окончательно разрушается.

Эозинофильные лейкоциты также играют важную защитную роль в коже. Благодаря наличию специфических гранул (большой основной белок, эозинофильный катионный белок, эозинофильный нейротоксин, эозинофильная пероксидаза, гидролитические ферменты, катепсин), эти клетки оказывают цитотоксическое действие на паразитов, грибков, простейших и бактерий, осуществляют гидролиз при фагоцитозе.

Примером реализации защитной функции базофильных лейкоцитов может служить реакция кожной базофильной гиперчувствительности (реакция Джонса-Моута), которая является воспалительной реакцией замедленного типа. Она возникает в ответ на внедрение паразитов и их антигенов, а также клещей, в кожу.

Участие Т-лимфоцитов в барьерно-защитной функции кожи напрямую связано с иммунной системой. Некоторые авторы относят их к периферической подсистеме иммунологического надзора [111], которая отвечает за элиминацию пораженных вирусом или злокачественно перерожденных клеток. Т-лимфоциты вырабатывают множество медиаторов и лимфокинов, например, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-8, гамма-интерферон, фактор некроза опухоли, способствующие созреванию других видов клеток. В целом, эти клетки способны как индуцировать (Т-хелперы), так и подавлять иммунный ответ кожи (Т-супрессоры), а также

взаимодействуют и влияют на пролиферацию В-лимфоцитов, натуральных киллеров, предшественников тучных клеток, активность макрофагов и фибробластов [19].

Коллагеновые и эластические волокна, вырабатываемые фибробластами, составляют большую часть СТ дермы. Особенностью фибробластов является их участие в процессах, обеспечивающих регенерацию кожи, резистентность к некоторым агентам, иммунный ответ, синтез коллагена, эластина, протеогликанов, поддержание стабильности архитектоники кожи. После созревания зрелые клетки делятся на три типа: синтезирующие фибробласты, фиброкласты и миофибробласты. Первые осуществляют синтез и регуляцию межклеточного вещества. Вторые участвуют в процессах грануляции и рубцевания тканей. Миофибробласты также способствуют заживлению, сокращая площадь дефекта. Большинство фибробластов пребывает в неактивной форме, однако при повреждении структур тканей они способны переходить в активную зрелую форму. Shimabukuro Y. [108] в своей работе отмечает супрессорную активность этих клеток по отношению к Т-лимфоцитам, а также способность подавлять их пролиферацию.

Еще одним компонентом кожного барьера являются гемокapилляры, находящиеся в дерме. Основную роль в изменении их проницаемости играют базальная мембрана и лежащие на ней эндотелиоциты. Эндотелий сосудов влияет на проницаемость и выраженность иммунного ответа. Аналогично базальным мембранам структур СВК, здесь она также участвует в барьерной функции и избирательно проницаема для ряда иммунокомпетентных клеток. Отрицательно заряженные гликозаминогликаны и коллагеновые волокна базальной мембраны ограничивают попадание водорастворимых комплексов, крупных белков, экзо- и эндотоксинов и т.д. Таким образом, этот компонент барьера регулирует транспорт веществ между СВК и СТ дермы, а также СТ дермы и просветом гемокapилляров (Рисунок 2).

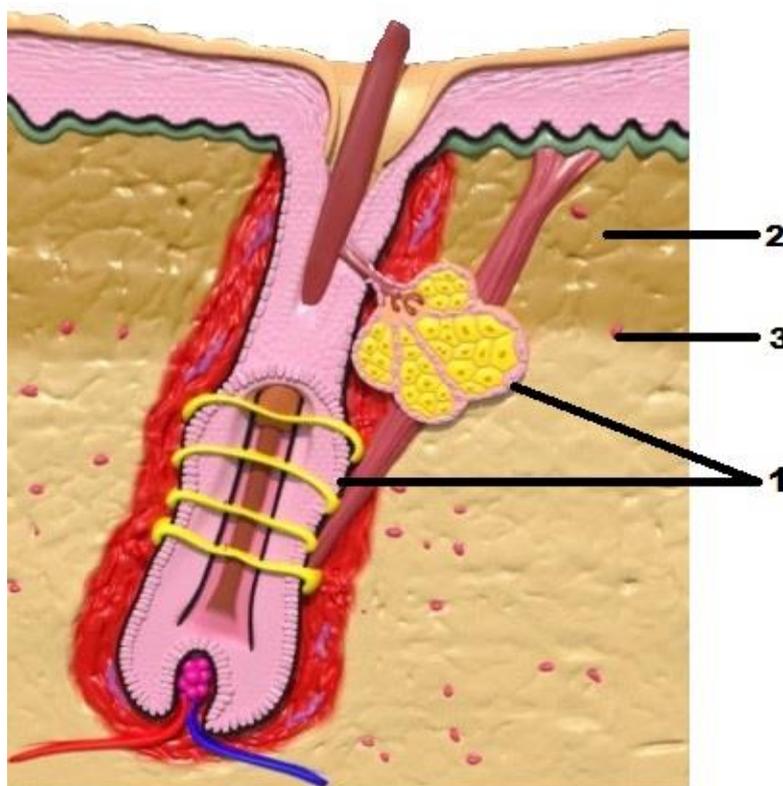


Рисунок 2 – Общий план строения и локализации компонентов барьера кожи человека (на основании созданной 3D-модели ГГБК): 1 – сально-волосяной комплекс, 2 – соединительная ткань дермы, 3 – гемокapилляры в дерме

## 1.2. Возможность влияния различных внешних и внутренних факторов на тканевые процессы, локализованные в элементах кожного барьера

Различные внешние и внутренние факторы, такие как воздействие ультрафиолетовых (УФ) лучей, механическая травматизация, биологические агенты, возрастные изменения кожи, гормональные нарушения, стресс, наследственность могут приводить к возникновению типичной тканевой реакции в коже. Эти факторы могут действовать как независимо друг от друга, так и одновременно, оказывая свое влияние на поддержание нормального функционирования как отдельных структурных компонентов кожи, так и состояния гомеостаза в целом.

### 1.2.1. Сально-волосяной комплекс

Возрастные и гормональные изменения, происходящие в коже, имеют свои особенности в каждом возрастном периоде. Так, в пубертатном периоде кожа человека претерпевает специфические адаптивные изменения сально-волосяных комплексов, характеризующиеся возможностью возникновения фолликулярного гиперкератоза, гипертрофии сальных желез и колонизации характерных микроорганизмов и прочего. В результате влияния половых гормонов происходит преобладание процесса пролиферации над десквамацией, что может привести к формированию фолликулярного гиперкератоза [46]. Кроме того, гормональные изменения способствуют трансформации состава кожного сала и его гиперсекреции [6, 45]. В нем снижается содержание альфа-линоленовой кислоты, которая участвует в регуляции дифференцировки кератиноцитов [11]. Это приводит к гиперпролиферации себоцитов, кератиноцитов наружного эпителиального влагалища и, как следствие, к закрытию протока и канала сально-волосяного фолликула, что отмечается во многих гистологических исследованиях [11, 15]. В результате создаются анаэробные условия, благоприятные, например, для развития *Cutibacterium acne* и других микроорганизмов. Бактерии выделяют адгезивные вещества, что ведет к еще большему скоплению корнеоцитов в области воронки волосяного фолликула [16].

Микроорганизмы способствуют развитию типичного тканевого процесса, который может служить причиной возникновения лейкоцитарного инфильтрата и деструкции сальных желез [2, 15, 101]. Иммунные клетки локализуются, как правило, вокруг сально-волосяных комплексов и кровеносных сосудов. Количественный и качественный состав инфильтрата непостоянный, он зависит от типа, длительности и тяжести воздействия факторов. Так, Е.И. Теддер и соавторы [50] в своем исследовании наблюдали воздействие микроорганизмов на деструкцию сально-волосяных фолликулов и появление перифолликулярных лимфогистиоцитарных инфильтратов в дерме.

Тканевая реакция в коже, вызванная внешней травматизацией, также может характеризоваться появлением лейкоцитарного инфильтрата. В одном из исследований А. М. Layton и соавторов [90] изучали вопрос зависимости клеточного состава лейкоцитарного инфильтрата от времени, прошедшего с начала воспаления. В первые 24 часа наблюдали перидуктальные и периваскулярные очаговые инфильтраты CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, которые также содержали CD1<sup>+</sup> дендритные клетки (предположительно, клетки Лангерганса). Нейтрофилы были заметны при реакции продолжительностью более 24 ч. в элементах с гнойным содержимым. Это может свидетельствовать о ведущей роли Т-лимфоцитов в возникновении воспаления, в то время как нейтрофилы привлекаются к месту повреждения хемотаксическими факторами, продуцируемыми Т-клетками. Также, Е. Firlej и соавторы [116] показали, что при подобном процессе происходит продуцирование матриксных металлопротеиназ, антимикробных пептидов, провоспалительных цитокинов, среди которых альфа-ИЛ-1, запускающий фолликулярную гиперпролиферацию и ремоделирование состава кожного сала.

### **1.2.2. Соединительная ткань дермы и гемокapилляры**

Е.В. Свирцевская и соавторы [44] анализировали влияние стресса на кожу. При чрезмерном синтезе стрессовых молекул происходит дегрануляция тучных клеток. Высвобождающиеся медиаторы расширяют сосуды, повышают их проницаемость, стимулируют миграцию иммунных клеток в ткань дермы. Вазодилатация с усилением местного кровотока вызывает появление периваскулярного и интерстициального отека. В результате увеличивается толщина сосочкового слоя дермы. За счет наличия отека при ультразвуковом исследовании заметно снижается акустическая плотность дермы по сравнению со здоровой кожей [1]. Можно предположить, что периваскулярный и интерстициальный отек служит одной из причин уменьшения толщины коллагеновых волокон дермы.

Кроме того, в одном из проведенных исследований было отмечено уменьшение количества эластических и коллагеновых волокон, их истончение в присутствии тканевой реакции дермы, вызванной возрастными или гормональными изменениями [118]. В отдельных случаях, например, при нарушении процесса кератинизации и работы сальных желез было обнаружено повышение уровня эластазы нейтрофильных клеток, MMP-12 (макрофагальной эластазы), а также MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, способных разрушать коллагеновые и эластические волокна [41, 64]. Деградация эластических волокон происходит не только на уровне белка, но и на уровне процесса транскрипции, что было выявлено методом ПЦР [64]. А низкое содержание коллагена авторы исследования объясняют снижением уровня TGF- $\beta$ 1, который в большей степени способствует компенсаторному восстановлению коллагена первого типа [64].

При заживлении ран после травматизации кожи происходят фиброзные процессы в дерме, которые характеризуются чрезмерным накоплением коллагена с образованием гипертрофического рубца. Ключевым элементом данного этапа является повышение уровня TGF-альфа 1, что приводит к активной пролиферации фибробластов, выработке коллагена [81].

Возрастные и гормональные факторы имеют деструктивное влияние на целостность и тонус гемокapилляров. Так, С. Perrigouard и соавторы [101] при исследовании биоптата кожи с явлениями нарушения структуры и функционирования сосудов микроциркуляторного русла наблюдали их расширение и аномальную форму с прерывистым эндотелием, набухшими эндотелиальными клетками как следствие местных тканевых реактивных процессов. Морфологически определяли периваскулярный инфильтрат, состоящий в основном из CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и гистиоцитов, реже встречались плазматические клетки. Исследователи W.J. Lee и соавторы [88] также отметили, что при начальной стадии поражения сосудов дерма инфильтрирована тучными клетками и нейтрофильными гранулоцитами, в то время как эозинофильная инфильтрация более характерна для длительного течения процесса.

Таким образом, внешние и внутренние факторы могут способствовать возникновению и развитию местного тканевого процесса в отдельных компонентах барьера кожи. Со временем эти изменения могут привести к разрушению структурных элементов барьера (базальные мембраны сально-волосяного комплекса и гемокапилляров, кератиноцитов наружного эпителиального влагалища, эндотелиоцитов капилляров) и снижению его функциональности. В настоящей работе представлено влияние клещей рода *Demodex* spp., как биологической модели, на структурно-функциональное состояние элементов барьера.

### **1.3. Характеристика особенностей строения и жизнедеятельности клещей рода *Demodex* spp.**

Клещи рода *Demodex* spp. являются представителями нормальной флоры кожи человека. История их изучения берет начало с 1841 года, когда впервые они были обнаружены французским дерматологом Berger в содержимом соскоба наружного слухового прохода у пациента [16]. Свой вклад в определение видов, особенностей строения и локализации *Demodex* spp. внесли ученые Simon G. [109], Акбулатова Л.Х. [62], Ayres S. [66], Desch C. и соавторы [77]. Так, на сегодняшний день известно, что на поверхности кожи человека наиболее часто встречаются 2 вида: *D. folliculorum* и *D. brevis*. Первый вид преимущественно обитает в волосяных фолликулах, а второй - в сальных железах. Зачастую организмы встречаются колониями по 10-15 особей [103]. Размеры паразита варьируют от 0,1 до 0,4 мм в зависимости от вида [73], а жизненный цикл составляет 14-18 дней (Рисунок 3). У взрослых особей клещей *Demodex* spp. выделяют головной отдел, грудь и брюшко. Тело клеща покрыто полупрозрачной хитиновой оболочкой и состоит из двух слившихся сегментов. Четыре пары коротких сегментированных ножек прикреплены к груди и заканчиваются когтями. Они обеспечивают движение

клеща со скоростью 8-16 мм/ч, в основном, ночью. Клещ имеет круглое ротовое отверстие и колющие хелицеры. Пищеварительная система клещей редуцирована и состоит из хелицер и слабо развитого просвета среднего кармана, без задней кишки и ануса [89, 94].



Рисунок 3 – Микрофотографии последовательных стадий развития клеща рода *Demodex* spp. (слева направо): яйцо, личинка, протонимфа, дейтонимфа, имаго

Структуры, входящие в состав барьера кожи, являются местами локализации особей. Litwin D. и соавторы [89], Lasey N. и соавторы [96] сообщают о различных вариантах воздействия клещей на кожу, например, механическое блокирование волосяных протоков, что вызывает:

- 1) гиперкератоз и гиперплазию эпидермиса;
- 2) разрушение железистых и эпителиальных клеток ферментами;
- 3) выброс антигенов особей *Demodex* spp.

Прослойка соединительной ткани содержит гранулоциты, макрофаги, лимфоциты и другие клетки, которые способны затормозить развитие патологического процесса. При разрушении базальных мембран СВК и

гемокапилляров реакция может стать системной. Процесс может развиваться годами без ярких клинических проявлений, но может и давать осложнения [51].

Наиболее распространенным методом обнаружения клещей рода *Demodex* spp. в рутинной практике является стандартизированная поверхностная биопсия кожи (Standardized skin surface biopsy - SSSB) [89]. Этот способ позволяет дифференцировать кожу, пораженную *Demodex* spp. от непораженной. Однако в сложных случаях, например, при хроническом рецидивирующем течении процесса или неэффективности проводимой терапии требуется биопсия кожи, а также проведение сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Кроме того, изучение особенностей ультрамикроскопического строения особей *Demodex* позволяет изучить их возможное влияние на морфологические изменения структур кожи в местах локализации клещей. Создание в начале 30-х годов XIX века первого сканирующего электронного микроскопа фактически стало открытием нового метода исследований клеща *Demodex* spp. Так, в 1983 году С. Crosti и соавторы [72] в своей работе представили электронограммы хвостового конца (опистосома) клещей, сделанные при помощи СЭМ с напылением образца палладиевым золотом. *Demodex* spp. представили в сравнении с волосом и без него. Авторы сделали краткое описание этой части паразита, сравнив его с отпечатком пальца. Е. О. Kairinen и соавторы [95] в 1984 г. с помощью СЭМ получили изображения опистосомы клещей *Demodex* spp. в волосяном фолликуле. Целью работы F. P. English и соавторов [117] стало изучение ультраструктуры клеща. Они описали и сфотографировали поверхностный слой (кутикула) *D. folliculorum*, включающий 2 подслоя, которые состоят из филаментов. Под кутикулой располагается другой слой, представленный множественными твердыми гранулами, а под ним тонкий ряд мышечных клеток. Он содержит миофибриллы, которые состоят из толстых и тонких миофиламентов, организованных по типу скелетной мускулатуры. Особое внимание авторы уделили бактериям, найденным на поверхности клещей. В них выделили внутреннюю плазматическую мембрану и наружную клеточную стенку, внутри бактерий визуализируется мезосома. В одном из следующих исследований F.P. English и соавторы [115] опубликовали снимки

гнатосомы и подосомы паразитов, их расположение на ресницах и коже. В их работе также описана локализация паразитов, стадии развития и их влияние на эпителиальные клетки. В 2005 году Xu Jing и соавторы [94] уделили наибольшее внимание ротовому аппарату клеща, включающему круглое ротовое отверстие (1211 нм), острую ротовую иглу (300 нм), которая способна вытягиваться вперед и назад (отсутствует у вида *Demodex brevis*), и гипостому, похожую на продолговатый стержень (5508 нм в длину, 325 нм в ширину). Сбоку находятся щупальца, на каждом из них 7 крючьев (3 направлены вперед, 4 назад), у особей *Demodex brevis* – 5 крючьев. Эти крючья помогают клещу крепко держаться на поверхности и могут разрушать ткани. Похожие изображения структур взрослой особи клеща, а также микрофотографии начальной стадии развития (яйцо) получили G. Plewig и соавторы [102], а также Elston Carly A. и Elston Dirk M. [79]. Большую часть своего жизненного цикла паразиты проводят в структурах кожи, питаются сально-роговыми массами, и накапливая продукты жизнедеятельности внутри. Остатки хитинового экзоскелета клещей и продуктов их жизнедеятельности также являются механизмом, способным вызвать ответную реакцию в коже.

Вопрос о роли *Demodex spp.* как переносчиков бактерий, вирусов и грибов остается актуальным [80, 83, 103]. Впервые о роли клеща, как переносчика бактерий, стало известно в 1970 году после публикации исследования English Frank P. и соавторов [117]. Однако выделить чистую культуру микроорганизмов им не удалось. В дальнейших исследованиях выяснено, что, передвигаясь, клещ способствует перемещению поверхностной микрофлоры вглубь кожи [4, 16, 24, 78], например, золотистого стафилококка, вирусов, хламидий, микоплазм и грибов с образованием гранул [9, 52, 54, 75, 83]. Исследование Abd-El-Al A.M. и соавторов [58], опубликованное в 1997 году также подтверждает способность клеща переносить на себе бактерии. Авторы, используя метод СЭМ, получили микрофотографии *Demodex spp.* с бактериями на его поверхности, а также внутри пищеварительного тракта. Litwin D. и соавторы [89] пишут о синергетических взаимоотношениях между клещами и стафилококками.

Солнцева В.К. [47] считает, что клещи могут переносить на себе гуморальные факторы защиты (иммуноглобулины, белки системы комплемента и другие), которые в совокупности образуют специфические комплексы. Их образование ведет к активации комплемента и образованию анафилоксинов (C3a, C5a).

Относительно недавно у клещей *Demodex spp.* была выделена *Bacillus oleronius*. Эта бактерия продуцирует 2 антигена, которые вызывали пролиферацию инфильтративных клеток в периферической крови в 3-4 раза чаще у пациентов с наличием паразитов, чем без них. Эта информация предполагает возможную патогенетическую роль бактерий в жизнедеятельности клещей [70, 79, 97, 112]. Роль *Bacillus pumilus* была исследована в работе Tatu A.L. и соавторов [112]. Авторы пишут о цитотоксичности и гемолитической активности этих бацилл, найденных в клещах *Demodex spp.* у пациентов. Murillo N. и соавторы в своей работе проанализировали микробиоту клещей у людей с воспалительными процессами в сравнении со здоровыми. Результаты основаны на данных 367 клонов, полученных от 73 клещей. Выявлены 92 вида микроорганизмов, из которых выделены также 3 вида *Bacillus* [98]. Кроме того, в симбиоз с *Demodex spp.* могут входить возбудители фолликулита *S. epidermidis* и *S. aureus*, а также бактерии *P. acnes* и *T. akamushi* [117].

#### **1.4. Модель естественной среды обитания клещей рода *Demodex spp.* для проведения экспериментальных исследований**

Экспериментальное создание условий внешней среды для увеличения продолжительности жизни клещей рода *Demodex spp.* является актуальной темой многие годы. Эта информация помогает подробнее изучить особенности поведения и жизненного цикла паразитов, а также их устойчивость к различным химическим веществам. Известно, что в лабораторных условиях клещи устойчивы к широкому диапазону антисептических растворов, а также к 10% повидон-йоду и 4% раствору

пилокарпина; в 100% спирте они гибнут в течение одной минуты [75].

В настоящее время применяются различные методики обработки и хранения исследуемого материала [47, 77]. Например, после нанесения исследуемого материала на предметное стекло добавляют каплю 10% щелочи или глицерина, или керосина и накрывают покровным стеклом. После этого проводят микроскопическое исследование. В доступной нам литературе нет информации о длительности сохранения материала для проведения акарограммы и оценки подвижности взрослых особей клещей. По данным Litwin D. и соавторов оптимальной температурой *in vitro* для клещей *Demodex folliculorum* и *Demodex brevis* является 16–22°C, также организмы являются фотонегативными и выживают в условиях помещения в серокультуру или сыворотку человека [89]. Маслодудова Е.Н. и соавторы [24] выяснили, что при температуре +30-40°C и в условиях отсутствия света клещи проявляют максимальную активность. Работа Nath A. K. и соавторов [76] показала, что клещи рода *Demodex spp.* относятся к аэробам и могут обитать на стержне волоса. Кроме того, Tsai Y.J. и соавторы пишут о наибольшей активности клещей вида *Demodex canis*, относящихся к роду *Demodex spp.*, в ночное время [113].

Таким образом, в различных работах имеется описание отдельных критериев для сохранения жизнеспособности особей *Demodex spp.*

### **1.5. Влияние клещей рода *Demodex spp.* на иммунную систему**

Влияние клещей *Demodex spp.* на микробиом кожи в литературе обсуждается довольно широко [89]. Кожа является периферическим органом иммунной системы человека и ее ответные реакции зависят от вида организма, стадии инвазии и выраженности реакций гиперчувствительности немедленного и замедленного типов. Имунокомпетентные клетки компонентов барьера кожи могут некоторое время сдерживать распространение тканевой реакции, вызывая только местные

изменения, однако при разрушении компонентов барьера происходит диссеминация и систематизация процесса.

На поверхности клеща идентифицированы сывороточные IgD, альфа-1-антитрипсин и альфа-1-антихимотрипсин, препятствующие развитию тканевой реакции [63]. В то же время, хитин, покрывающий тело паразита, может иметь связь с TLR2, которые влияют на секрецию провоспалительных цитокинов. После гибели клеща остатки его хитиновой оболочки и оболочек бактерий могут проникать в глубокие структуры кожи, вызывая ответ иммунной системы [93]. Сундеева Е.А. и соавторы опубликовали исследование, посвященное изучению взаимодействия продуктов жизнедеятельности клещей с иммунокомпетентными клетками больных [51]. Полученные данные свидетельствуют, что продукты жизнедеятельности клещей оказывают определенное воздействие на иммунокомпетентные клетки. На рецепторный аппарат лимфоцитов они оказывают супрессирующее, а на фагоцитирующие клетки иммуностимулирующее действие. В исследовании методом кожных проб показано, что клещи *Demodex spp.* вызывают повышенную экспрессию генов интерлейкина ИЛ-8, ИЛ-1-альфа, фактора некроза опухоли-альфа, циклооксигеназы-1 и других. Иммунный статус в ответ на вторжение этих клещей остаётся малоизученным [59, 63, 69].

Большинство авторов [5, 40, 61, 74, 87, 105] пишут о наличии супрессивного эффекта на показатели Т- и В- иммунных систем, о снижении иммунной реактивности, которое вызвано патологическими изменениями иммунного статуса, в результате чего возрастает риск развития реактивного процесса в тканях, вызванного видами *Demodex spp.* Эти факторы снижают местный иммунитет и иммунореактивность кожи: нарушается соотношение между клетками Т- и В-звеньев, продукция иммуноактивных веществ, снижается численность клеточных популяций CD4+. Супрессивный эффект клещей на иммунную систему человека отмечают и другие исследователи, в результате чего происходит успешная колонизация тканей клещами и условно-патогенной флорой и усиление развития местной тканевой реакции кожи [13]. Дворянкова Е.В. и соавторы [12] отметили снижение уровня ИЛ-4 и повышения концентрации Ig E. В.П. Федотов и другие

[53] считают, что в ответ на микробную колонизацию происходит активация ТН 1-го типа с увеличением числа активных нейтрофилов и ростом фагоцитарного индекса. М.А. Самгин и другие [43] установили, что в ответ на антигенную стимуляцию к протоку сально-волосяного фолликула начинается миграция моно- и полинуклеарных фагоцитов, продуцирующих ИЛ-1, 1-альфа, 8 и ФНО-альфа, активирующих систему комплемента. В результате инициации ИЛ усиливается выработка фермента циклооксигеназы, которая участвует в образовании лейкотриена В<sub>4</sub>, главного медиатора воспаления. Ведутся исследования иммунитета у пациентов с клещами рода *Demodex spp.* и имеющимися дисфункциональными нарушениями сосудов микроциркулярного русла. Обнаружено, что при этом состоянии преобладают изменения гуморального иммунитета, в частности, повышается уровень циркулирующих иммунных комплексов [42]. Ю.С. Бутов и соавторы [40] выявили изменение в системе тромбоцитов, снижение содержания В-лимфоцитов, увеличение С3-фракции комплемента и изменение уровня Ig A и M. М.В. Черкасова и соавторы [48] отметили повышение уровней Ig M и G с преобладанием в перифолликулярном инфильтрате Т-клеток (преимущественно ТН). В другом исследовании было выявлено, что у обследуемых с наличием воспаления кожи лица наблюдается иммуносупрессия по классу зрелых Т- лимфоцитов и Т-хелперов [14]. По мнению авторов, снижение показателей цитотоксических лимфоцитов свидетельствует об истощении пролиферации этих клеток и уменьшении интенсивности киллинга микроорганизмов. Ведутся исследования по изучению роли цитокинов в генерализации тканевой реакции, ассоциированной с клещами рода *Demodex spp.* Е.В. Мельникова и другие [8] выявили повышение продукции ФНО-альфа. Работа Н.В. Кусая [17] посвящена изменениям иммунного и цитокинового статуса у людей с наличием клещей *Demodex spp.* У них зарегистрировано увеличение ФНО-альфа, ИЛ-13 и ИЛ-12p70 с повышением индексов соотношения ФНО-альфа/ИЛ-10, ИЛ-12p70/ИЛ-12p40 и отсутствием корреляционных взаимосвязей между ними. Установлено снижение показателей клеточного иммунитета (CD3+, CD4+, CD8+), активация гуморального звена иммунитета с увеличением уровня CD22+ и

дисбалансом иммуноглобулинов во всех исследуемых группах. Повышение уровня естественных киллеров (CD16+), а также экспрессии маркеров активации лимфоцитов (CD25+, HLA-DR+) зарегистрированы в группах пациентов с клещами и сопутствующей патологией кожи. Юцковский А.Д. и соавторы выявили недостаточность Т-лимфоцитов, фагоцитоза при высоком уровне естественных киллеров и В-лимфоцитов [56].

### **1.6. Статистика распространенности клещей рода *Demodex spp.*, как факторов, участвующих в повреждении барьера, среди населения в мире**

Клещи *Demodex spp.* одинаково распространены среди всех рас и всех возрастных групп [96]. Описаны случаи обнаружения клеща у новорожденных, который передается через физический контакт с матерью. Однако из-за низкой выработки кожного сала существенная колонизация демодексом у детей не происходит [67, 71, 85].

Количество клещей увеличивается с возрастом. Так, у пациентов моложе 20 лет распространенность клещей *Demodex spp.* составляет 13-20%, а к 70 годам увеличивается до 95-100% [84, 106]. Опубликованы сведения, что уровень заражения клещами студентов может достигать до 90% [110]. Наибольшее количество случаев поражения кожи, ассоциированных с клещами *Demodex spp.*, отмечается у людей в возрастной группе 20-40 лет, когда салоотделение находится на высоком уровне [60, 82]. В то время как у пациентов после 45 лет активность клещей может поддерживаться возрастными изменениями кожи, гормональными перестройками, а также различной соматической патологией. Эти данные сочетаются с исследованием D. Czerita и соавторы [75], по данным, которых клещ *Demodex spp.* выявляется у 13 % детей в возрасте от 3 до 15 лет, у 34 % взрослых в возрасте от 19 до 25 лет, у 69 % - от 31 до 50 лет, у 87 % обследуемых в возрасте от 51 до 70 лет и у 95 % лиц в возрасте от 71 до 96 лет. Результаты исследований по

степени поражения мужчин и женщин клещами *Demodex spp.* являются спорными. По одним данным, обсеменённость преобладает у мужчин, по другим – у женщин, в ряде исследований статистические различия установлены не были [89, 107]. *Demodex folliculorum* выявляется чаще, чем *Demodex brevis*, соотношение их обнаружения у мужчин составляет 4:1, у женщин - 10:1 [89, 107].

## 1.7. Заключение

Изучение факторов, влияющих на нормальную структуру и функционирование кожи, является актуальной задачей на протяжении многих лет. Однако в литературе до сих пор существует немного работ, характеризующих целостную картину морфофункциональных особенностей элементов барьера кожи, а также отражающих влияние на них различных внешних и внутренних факторов. Возрастные и гормональные изменения, стресс, факторы внешней среды (УФ-излучение, механические травмы и прочие) оказывают повреждающее влияние на структуры барьера, провоцируя развитие или усугубление различных местных тканевых процессов в коже. Это проявляется гипертрофическими процессами клеток сально-волосяного комплекса, наличием полиморфноядерного инфильтрата, нарушением базальных мембран структур сально-волосяного комплекса и другими следствиями.

Клещи рода *Demodex spp.*, как биологические объекты, оказывают значительное влияние на морфологическую структуру компонентов барьера кожи человека. Это выражается в повреждении базальных мембран сально-волосяного комплекса, а также в нарушении процессов нормальной микроциркуляции в гемокапиллярах и частичной деструкции эндотелиоцитов, возникновения лейкоцитарных инфильтратов рядом с местами локализации и инкапсуляции клещей рода *Demodex spp.*, увеличение толщины слоев эпидермиса в сравнении с участками нормальной кожи.

Немногочисленными также являются данные, связывающие гистологическую картину течения тканевого процесса, ассоциированного с клещами *Demodex spp.*, с нарушением работы иммунной системы человека. Бактерии рода *Bacillus*, обитающие в особях *Demodex spp.*, являются одним из возможных факторов, отягощающих течение тканевой реакции в коже человека. Хитиновый экзоскелет взрослых особей *Demodex spp.* также может являться одним из агентов, провоцирующих реакцию местного иммунитета. Первыми элементами, реагирующими на повреждение барьера, являются показатели Т-клеточной иммунной системы (Т-лимфоциты общие, Т-супрессоры, Т-цитотоксические).

Изучение морфофункциональных особенностей элементов барьера кожи человека позволяет осуществить комплексную оценку влияния внешних и внутренних факторов и выявить пути восстановления и поддержания целостности барьера.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

### 2.1. Оценка морфологического состояния элементов барьера кожи человека

Для выявления морфологических изменений элементов барьера кожи человека исследовали структурные изменения отдельных участков в норме, а также в условиях наличия тканевых реакций с и без присутствия клещей рода *Demodex spp.* Пораженной считали кожу с наличием признаков местной тканевой реакции. Клещи рода *Demodex spp.* являются представителями нормальной флоры кожи человека. Их влияние было использовано в качестве фактора, оказывающего повреждающее воздействие на элементы ГГБК.

В исследовании участвовали 135 человек обоего пола в возрасте от 18 до 75 лет, среди них 50 мужчин и 85 женщин. 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 Всемирной организации здравоохранения. Первую группу (n=45) составили лица 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 счёт наличия дерматита, без клещей. В третью группу (n=45) были отобраны добровольцы в возрасте 45–75 лет с признаками местной тканевой реакции, за счет дерматита, ассоциированного с наличием клещей рода *Demodex spp.*

Критерии включения были следующими: мужчины и женщины в возрасте от 18 до 75 лет с и без наличия признаков местной тканевой реакции на коже;

добровольное информированное согласие на проведение манипуляций и использование материала в исследовании; отсутствие тяжелой соматической патологии и беременности на момент обследования.

Добровольцев с клещами рода *Demodex* spp. отбирали на основании выявления более 5 особей клещей в материалах соскоба на 1 см<sup>2</sup> кожи, а также обнаружения таких местных тканевых проявлений на коже, как папуло-пустулезные высыпания на эритематозном фоне, сопровождающиеся гиперкератозом.

### **2.1.1. Взятие соскоба с кожи и диагностика наличия клещей**

Для распределения по группам, проведения сканирующей электронной микроскопии и полимеразной цепной реакции, определения условий для сохранения жизнеспособности клещей *Demodex* spp. использовали материалы соскобов с пораженных участков кожи лица обследуемых. Перед процедурой участники исследования не умывали кожу лица и не применяли косметические средства в течение 1-2 суток. Содержимое помещали на предметное стекло и изучали под микроскопом.

### **2.1.2. Взятие панч-биопсии кожи**

После взятия соскобов и распределения в группы выполняли взятие гистологического материала. Для проведения исследований использовался материал, полученный от 135 добровольцев. Морфологическое изучение компонентов и состояния ГГБК выполняли с помощью панч-биопсии. Обследуемым проводили анестезию выбранного участка пораженной кожи раствором 1% ультракаина. С помощью панча (трубчатый скальпель в виде ручки, Medax, Италия) осуществляли взятие кусочка кожи в височной области или лба (на

границе с волосистой частью головы), или в области крыла носа, размером 3×3 мм<sup>2</sup>. Каждый фрагмент помещали в пластиковую кассету и фиксировали в 10% нейтральном формалине. Осуществляли промывку, проводку, заливку и резку материала. Окраску проводили гематоксилином и эозином, ШИК-реакцией или трехцветной окраской по Маллори используя стандартные протоколы окраски. Всего было получено 810 препаратов. Оценивали изменения составляющих элементов барьера в гистологических препаратах от участников трех групп с подсчетом и морфометрией некоторых структур, определяли наличие отдельных клеток в 6 полях зрения в 6 гистологических препаратах от каждого участника исследования. Диагностику биоматериала проводили с помощью микроскопа AxioImager A1 (Zeiss, Германия) с камерой AxioCam 305 Color и программным обеспечением Zen 3.3.

## **2.2. Исследование морфологических изменений в компонентах барьера кожи человека в условиях наличия местной тканевой реакции, ассоциированной с клещами рода *Demodex spp.***

Признаки структурных нарушений компонентов барьера кожи добровольцев в местах локализации клещей рода *Demodex spp.* оценивали в гистологических препаратах по наличию и степени изменений его частей (сально-волосяной комплекс, гемокапилляры и СТ). Морфологические критерии патологических изменений ГГБК включали оценку структуры базальной мембраны СВК, изменений себоцитов, вакуолизации кератиноцитов, целостности стенки капилляров, степени фиброзных процессов, толщины слоев эпидермиса и коллагеновых волокон дермы, наличия клеточных инфильтраций, а также количество клещей в эпидермисе и дерме в 6 полях зрения в 3 гистологических препаратах от каждого участника исследования. Материал получали и анализировали по методике, указанной выше. Проводили морфометрический

анализ элементов: вычисляли их среднее количество и размер в поле зрения светового микроскопа.

### **2.3. Иммуногистохимическое исследование пролиферативных процессов в компонентах барьера кожи человека в условиях наличия местной тканевой реакции, ассоциированной с клещами рода *Demodex spp.***

Для изучения особенностей пролиферативных процессов в компонентах барьера кожи человека в условиях наличия местной тканевой реакции, ассоциированной с клещами рода *Demodex spp.* использовали моноклональные антитела к Ki67. Для осуществления иммуногистохимических исследований использовали полилизиновые стекла с адгезивным покрытием «Surgipath X-tra Adhesive» (CAT 3800200AE, LOT 4900059958, «Leica Biosystems», Германия). После проведения депарафинизации и демаскировки выполняли промывку с использованием PBS (CAT 70011-044, LOT 145744, «Invitrogen», США) и инкубацию в 3% растворе перекиси водорода. Далее наносили BSA (CAT 68100, LOT BB20561101, «ПанЭко», Россия) и применяли предварительно разведенные (1:15000) первичные антитела «Anti-Ki67 Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody [SR00-02]» (CAT HA721115, LOT HP0304, «Huabio», Китай). После инкубации и повторной промывки PBS использовали вторичные антитела «HRP Conjugated Goat anti-Rabbit IgG UltraPolymer Antibody» (CAT HA1119, LOT M05-22-P2, «Huabio», Китай), а затем наносили хромоген DAB (CAT 506685, «Central Drug House, Ltd», Индия). Каждый микропрепарат исследовали с использованием микроскопа AxioImager A1 (Zeiss, Германия) с камерой AxioCam 305 Color и программным обеспечением Zen 3.3. Отдельные срезы дополнительно окрашивали гематоксилином Карazzi по стандартному протоколу. Иммуногистохимические реакции проводили в соответствии с протоколом производителя антител. В

качестве групп сравнения исследовали микропрепараты обследуемых из первой и второй групп.

В препаратах определяли среднее количество Ki67-позитивных клеток в 6 полях зрения от каждого препарата (по 3 препарата для каждого случая).

#### **2.4. Определение иммунного статуса людей с наличием клещей рода *Demodex spp.* и признаками местных тканевых реакций**

Для выявления влияния локального нарушения компонентов барьера кожи на состояние иммунитета у обследуемых проводили исследование Т-клеточной системы. Результаты оценивали по абсолютным и относительным показателям: Т-лимфоциты общие (CD3+ CD19-), Т-хелперы (CD3+ CD4+), Т-цитотоксические лимфоциты (CD3+ CD8+), Иммунорегуляторный индекс (Т-хелперы / Т-цитотоксические), (CD3+ CD4+ / CD3+ CD8+). Объектом исследования служила сыворотка крови. Взятие материала осуществляли в утренние часы, натощак. Кровь центрифугировали при 2200 об/мин в течение 10 мин. Исключали гемолизированную и хилезную сыворотки. Анализ проводили на оборудовании FACSCalibur и FACSCanto II (BD Biosciences, США) с автоматической подготовкой проб. Показатели сравнивали со стандартными референсными значениями, а также с показателями групп сравнения.

#### **2.5. Сохранение жизнеспособности клещей рода *Demodex spp.* для проведения экспериментальных исследований**

Для дальнейшего изучения влияния клещей рода *Demodex spp.* на барьер кожи человека были определены необходимые условия внешней среды, которые позволили сохранить жизнеспособность особей.

После взятия соскобов с участков кожи обследуемых, их хранили в разных температурных условиях (от 20°C до +24°C), воздействии и отсутствии световых и химических раздражителей, нормальном уровне кислорода в воздухе (около 21%) и в анаэробной среде, а также при наличии питательной среды для клещей рода *Demodex* spp. (кожный детрит: секрет сальных желез, роговые чешуйки эпидермиса) и ее отсутствии (Приложение А). Исследование каждого параметра проводили при сохранении оптимальных условий для жизнеспособности особей (согласно литературным данным, рассмотренным в обзоре): наличие кислорода и питательной среды, отсутствие света, комнатная температура (+20°C– 24°C). Оценку критериев условий выживаемости проводили по степени подвижности клещей: «+» – слабая степень подвижности (подвижность сохранялась у одной из частей тела клеща: ротовой аппарат, конечности, хвост); «++» – средняя степень подвижности (подвижность сохранялась у любых двух частей тела клеща: ротовой аппарат, конечности, хвост); «+++» – выраженная степень подвижности (все три части были подвижны).

## **2.6. Исследование клещей рода *Demodex* spp. методом сканирующей электронной микроскопии**

Сканирующая электронная микроскопия позволяет оценить возможность механического повреждения компонентов ГГБК клещами рода *Demodex* spp. Для проведения этого метода использовали оборудование Hitachi S-3400N (Hitachi, Япония). Содержимое соскоба кожи погружали в фиксатор 2,5% раствора глутарового альдегида на натрий-фосфатном буфере. Трехкратно промывали в дистиллированной воде по 40 минут. После в спиртах восходящей концентрации от 40% до 95% производили обезвоживание по 40 минут в каждом. Затем проводили сушку, фиксировали на столике (с помощью токопроводящего материала) и осуществляли микроскопию.

## **2.7. Исследование бактериальной флоры клещей рода *Demodex spp.* методом полимеразной цепной реакции**

Для выявления микрофлоры, обитающей внутри клещей, также использовали содержимое соскобов сально-волосяных комплексов. При обнаружении особей *D. folliculorum* содержимое соскоба переносили в мясо-пептонный бульон (МПБ) для дальнейших микробиологических анализов и постановки анализа с помощью ПЦР.

Материал в пробирке с МПБ культивировали 24 часа при 37°C. Затем проводили пересев до единичных колоний с МПБ на мясо-пептонный агар (МПА) и культивировали от 24 до 48 часов при 37 °С. После этого на МПА проводили идентификацию видового состава бактерий, выращенных из соскоба микроорганизмов.

Исследование бациллярных антигенов методом ПЦР анализа проводили путем выделения ДНК набором «РИБО-ПРЕП» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия). Олигонуклеотиды были синтезированы в ЗАО «Синтол», Россия (последовательность праймеров BO1: 5`-AACGGCTCACCAAGGCGACG-3` (20 нуклеотидов), BO2: 5`-TCCGGACAACGCTTGCCACC-3` (20 нуклеотидов). В качестве контроля использовали материал ДНК, выделенный из бактерий видов: *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus oleronius*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*.

## **2.8. Статистическая обработка полученных результатов**

Статистическую обработку материала проводили с использованием программы «Origin Pro» (OriginLab Corporation, США). Проводили оценку нормальности распределения данных на основании критерия Колмогорова-Смирнова, после чего использовали параметрические или непараметрические методы оценки. В случае нормального распределения получали средние значения

показателей и стандартной ошибки ( $M \pm SE$ ), а также t-критерия Стьюдента, иначе производили расчет медианы, межквартильного размаха (Me, 25L; 75U) и определяли U-критерий Манна-Уитни. Для анализа пролиферативной активности в области сально-волосяного комплекса по количеству Ki67-позитивных клеток применяли тест ANOVA с учетом поправки Бонферрони. Уровень вероятности не менее 95% считали статистически значимым ( $p \leq 0,05$ ).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

В процессе жизнедеятельности кожа подвергается влиянию различных внешних и внутренних факторов. Например, возрастные изменения кожи, ультрафиолетовые (УФ) лучи, стресс, гормональные нарушения, наследственность могут приводить к различным морфологическим изменениям, в том числе к ответным тканевым процессам. Выраженность этих проявлений зависит от длительности и интенсивности воздействия одного или нескольких параметров. Структура элементов барьера кожи у обследуемых первой и второй групп исследована в аналогичных областях.

На гистологических препаратах участков кожи участников первой группы отсутствовали признаки тканевой реакции или нарушения структуры барьера. Эпидермис представлен многослойным плоским ороговевающим эпителием, расположенным на базальной мембране. Целостность структур волосяных фолликулов и сальных желез не повреждена. Соединительнотканые волокна дермы не истончены, фиброзные процессы не выражены, отсутствовали лимфоплазматитарные и прочие инфильтраты, а также множественные вакуолизированные клетки (Рисунок 4).

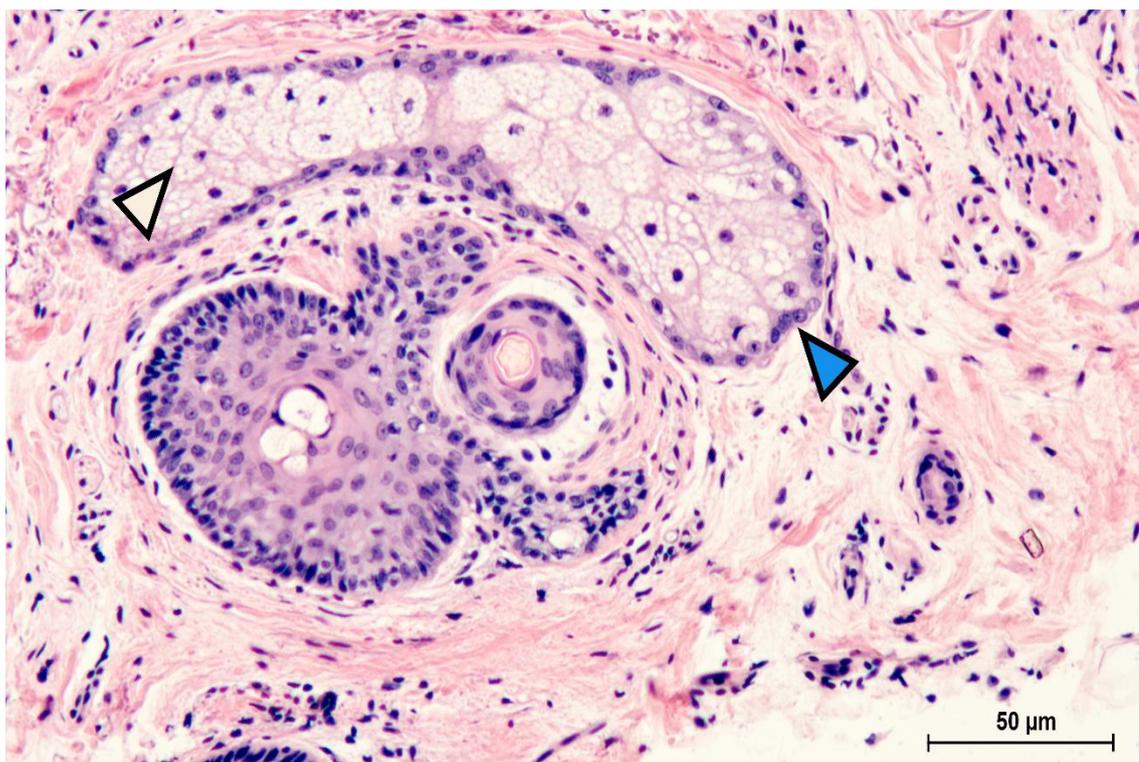


Рисунок 4 – Структура кожи обследуемого А. в возрасте 34 лет в норме. Белой стрелкой отмечена сальная железа без признаков местной тканевой реакции и деструкции, синей – целостность базальной мембраны. Окраска гематоксилином и эозином, об. 10, ок. 20

На гистологических препаратах участков кожи участников второй группы морфологические изменения были обусловлены наличием дерматита и действием внешних факторов, которые способствовали появлению местной тканевой реакции, а также нарушению кератинизации, гиперкератозу и прочим локальным изменениям. Тканевой процесс характеризовался повреждением стенки сальной железы, притоком лейкоцитов. Кроме того, отмечали деструкцию волосяного фолликула и проникновение секрета сальной железы в окружающие ткани. Полиморфноядерный инфильтрат при этом локализовался в дерме (Рисунки 5, 6).

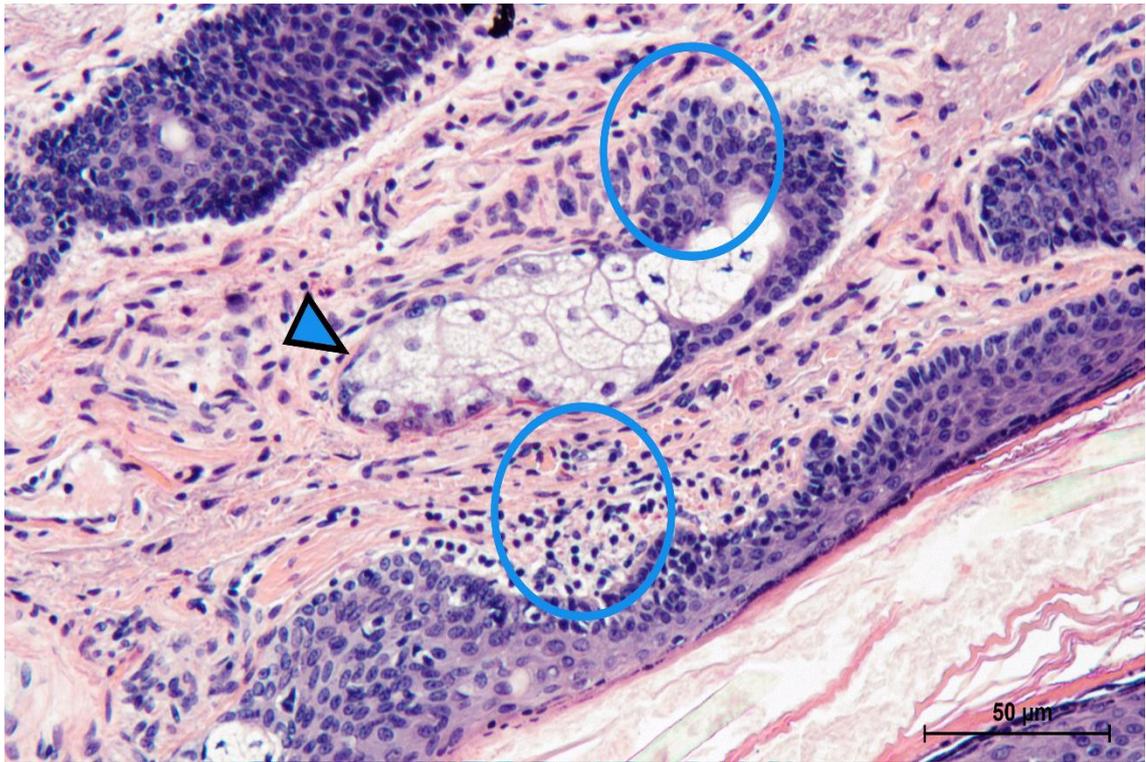


Рисунок 5 – Структура кожи обследуемого А. в возрасте 54 лет. Синей стрелкой обозначено нарушение базальной мембраны. Имеются полиморфноядерные инфильтраты (в круге). Окраска гематоксилином и эозином, об. 10, ок. 20

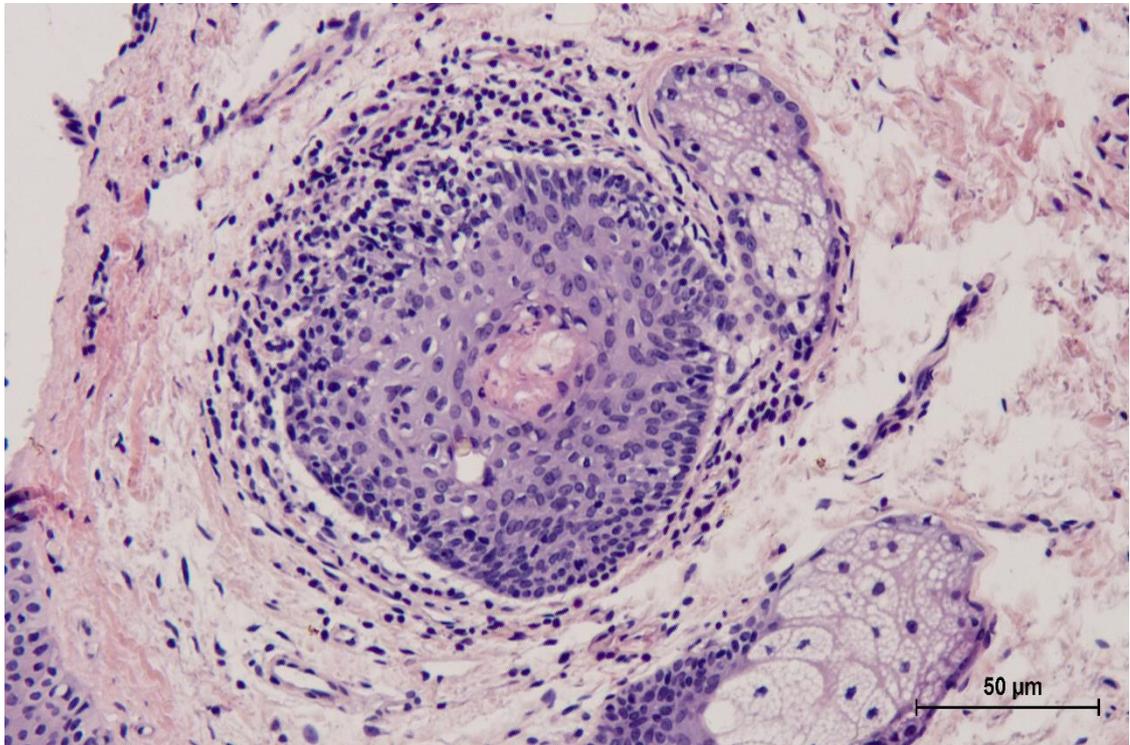


Рисунок 6 – Микропрепарат кожи, добровольца Е. в возрасте 66 лет. Имеется деструкция волосяного фолликула. Окраска гематоксилином и эозином, об. 10, ок. 20

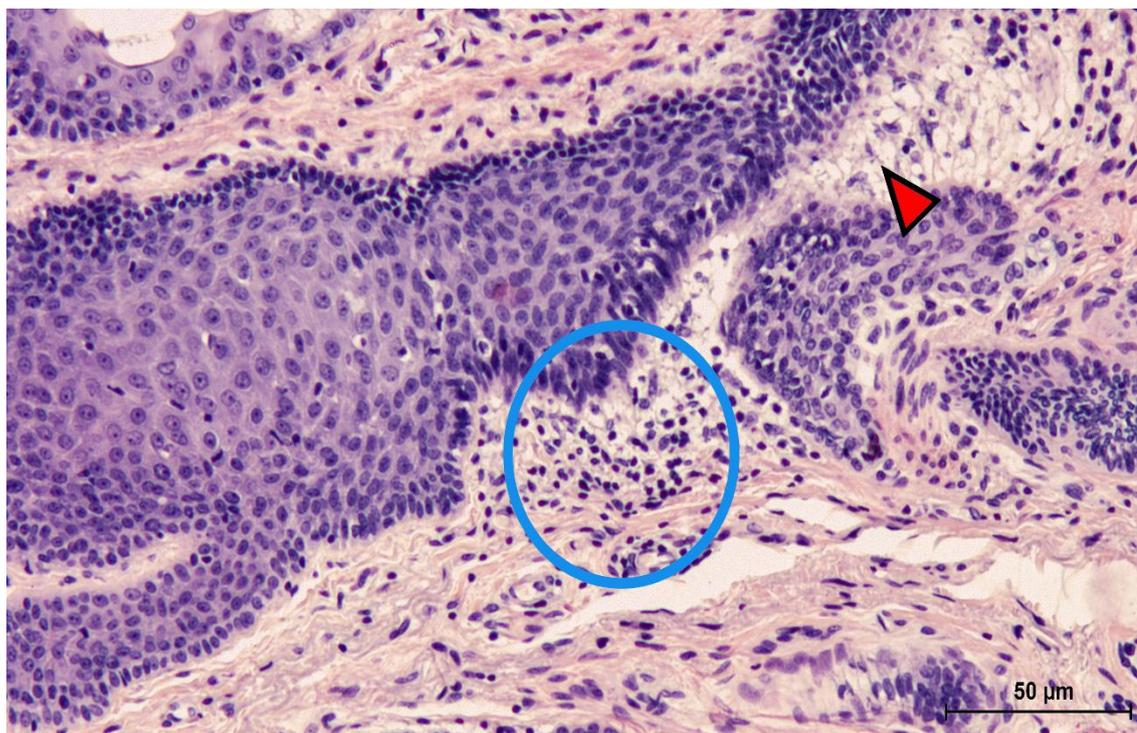


Рисунок 7 – Микропрепарат кожи участника С., в возрасте 50 лет. Красной стрелкой отмечено уменьшение толщины коллагеновых волокон. Имеется инфильтрат в окружающих тканях (в круге). Окраска гематоксилином и эозином, об. 10, ок. 20

У другого человека из этой же группы тканевой процесс характеризовался распространением за пределы сально-волосяного комплекса. Гистологическая картина отличалась инфильтрацией дермы лейкоцитами, истончением коллагеновых волокон, подлежащих к участку кожи с выраженной тканевой реакцией (Рисунок 7). Эпителий также инфильтрирован лимфоцитами.

### **3.2. Морфофункциональные изменения структуры компонентов барьера кожи человека при наличии местных тканевых реакций, ассоциированных с клещами рода *Demodex* spp.**

Структура элементов барьера кожи у обследуемых третьей группы в местах локализации клещей рода *Demodex* spp. (более 5 особей на 1 см<sup>2</sup>) имела выраженные изменения. В препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином,

ШИК-реакцией или трехцветной окраской по Маллори наблюдались дезорганизация базальной мембраны волосяных фолликулов и сальных желез, деструкция себоцитов, большое количество детрита, фиброзные процессы в сальных железах, нарушение целостности стенки капилляров, наличие полиморфноядерных инфильтратов, а также изменение 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 8) показаны повреждения структур СВК. Большое количество детрита, эритроцитарный выпот и участки нарушения целостности базальной мембраны говорят о давности процесса и его тяжелом течении.

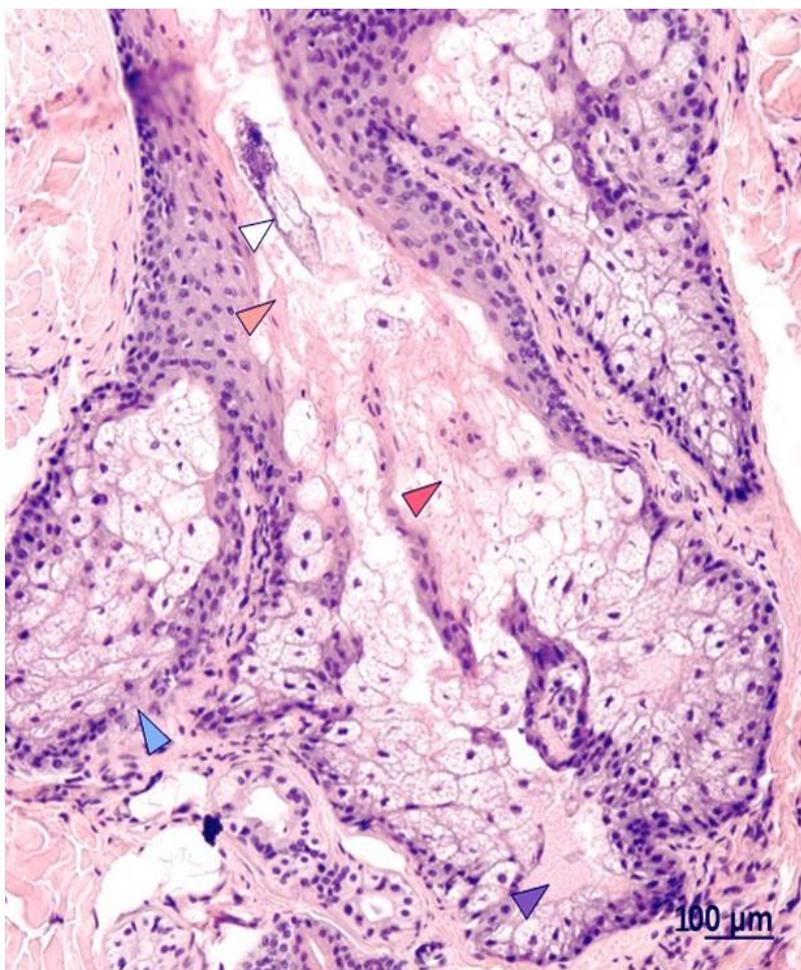


Рисунок 8 – Фрагмент кожи участника С. в возрасте 67 лет с наличием клещей рода *Demodex* spp. в протоке сальной железы. Белой стрелкой отмечен клещ рода *Demodex* spp., синей – нарушение базальной мембраны, красной – признаки деструкции себоцитов, оранжевой – большое количество детрита, фиолетовой – 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. Наблюдался 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. Отмечали полнокровные капилляры с возможным их повреждением (Рисунок 9).

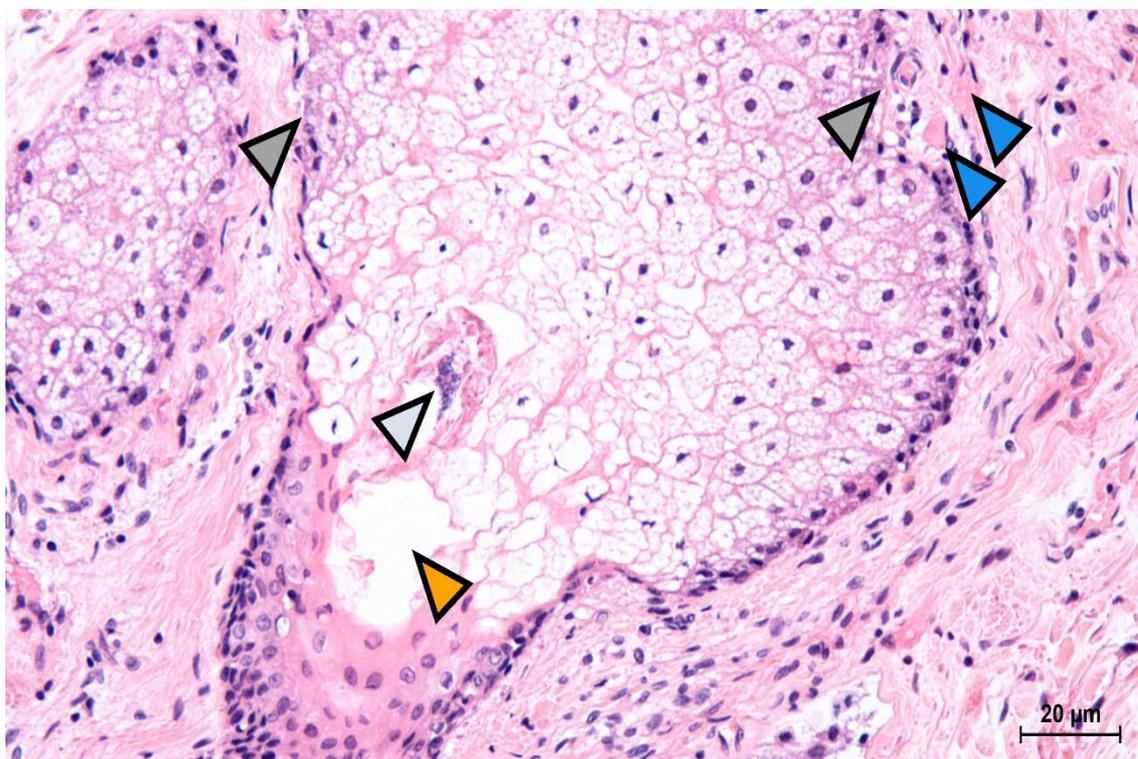


Рисунок 9 – Микропрепарат кожи обследуемого В. в возрасте 51 года с клещом *Demodex* spp. в сальной железе. Белой стрелкой отмечен клещ. Серой – очаговые нарушения базальной мембраны с измененными клетками. Синими – полнокровные капилляры. Участки просветов обозначены оранжевой стрелкой. Окраска гематоксилином и эозином, об. 40, ок. 20

На полученных препаратах нами выявлены признаки нарушения местного кровообращения в близлежащих от мест нахождения клещей в тканях на срезе в виде полнокровия капилляров и нарушения целостности их стенок (Рисунки 10, 11). Обнаружены также повреждение стенки сальной железы (Рисунок 11) и остаточные признаки течения местного тканевого процесса в виде инфильтрации окружающих клеща тканей (Рисунок 12).

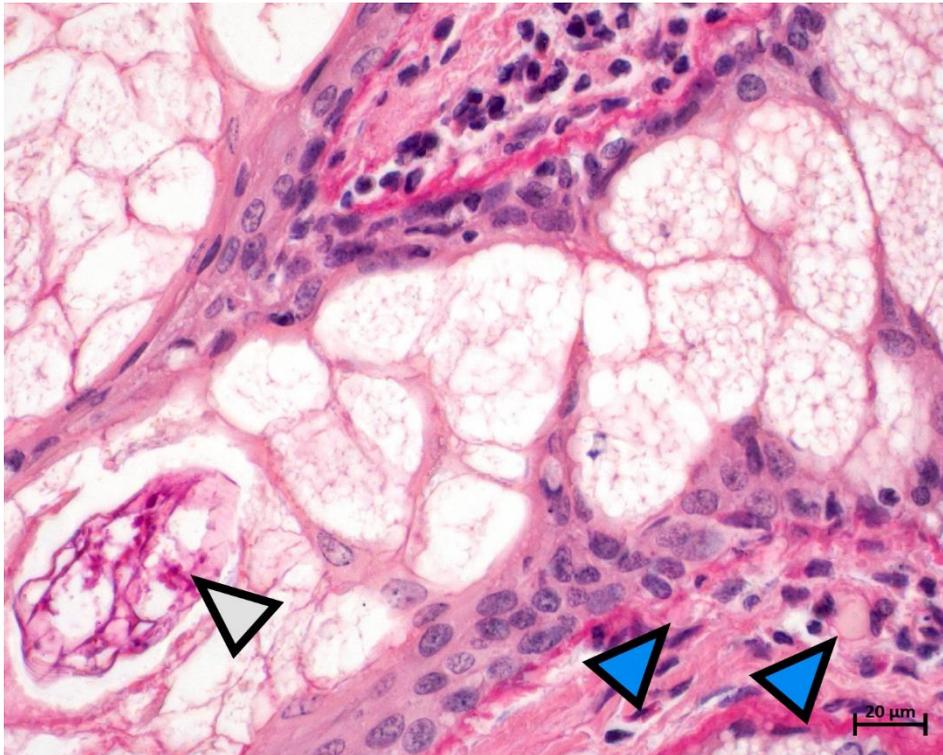


Рисунок 10 – Микропрепарат кожи обследуемого С. в возрасте 57 лет с клещом *Demodex spp* в сальной железе. Белой стрелкой отмечен клещ. Синими – нарушение базальной мембраны капилляров и их полнокровие. Окраска ШИК-реакцией, об. 63, ок. 20

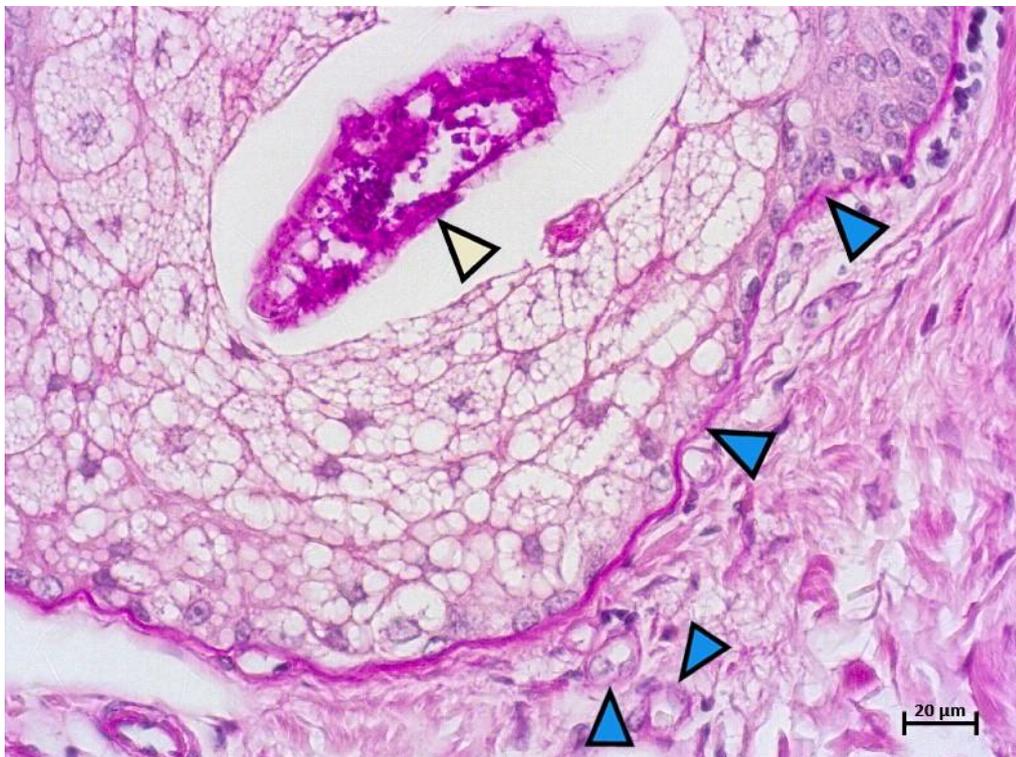


Рисунок 11 – Микропрепарат кожи обследуемого В. в возрасте 61 года с клещом *Demodex spp* в сальной железе. Белой стрелкой отмечен клещ. Синими – нарушение базальной мембраны сальной железы и гемокапилляров. Окраска ШИК-реакцией, об. 40, ок. 20

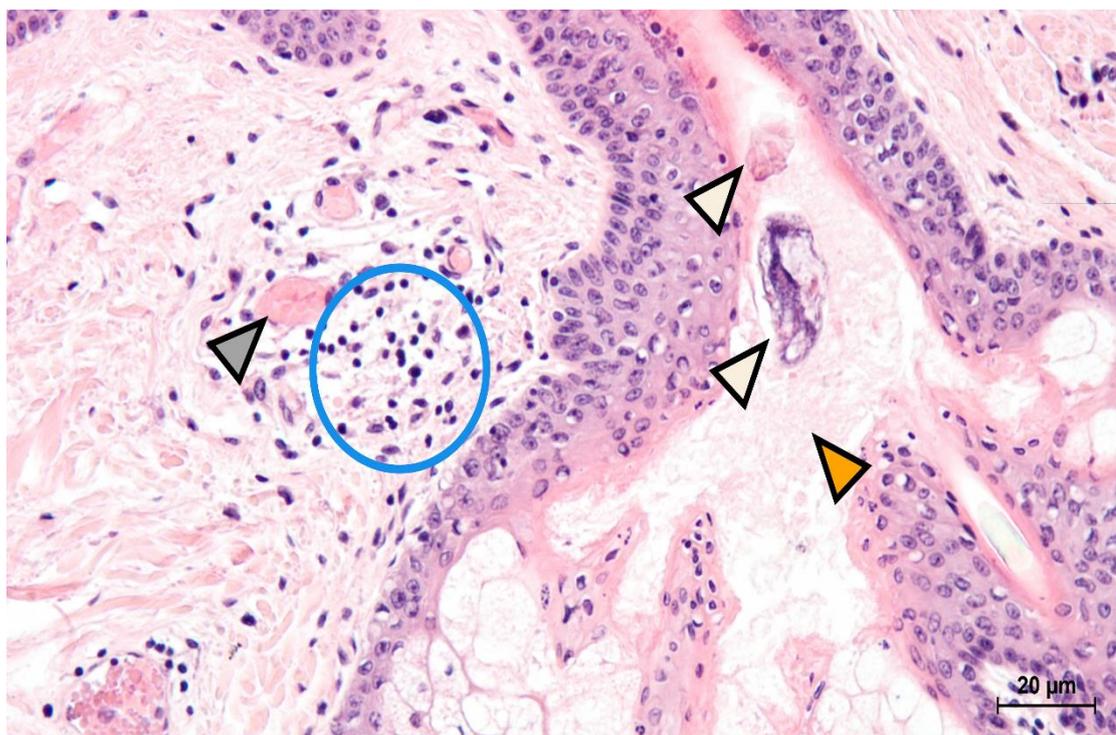


Рисунок 12 – Микропрепарат кожи добровольца Л. в возрасте 60 лет с наличием клещей *Demodex* spp. в протоке сально-волосного комплекса. Белыми стрелками отмечены клещи. Серой стрелкой обозначен один из полнокровных кровеносных капилляров, наблюдаются признаки инфильтрации окружающих тканей (в круге). Оранжевой стрелкой обозначено большое количество детрита. Окраска гематоксилином и эозином, об. 40, ок. 20

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 защитным механизмом адаптации кожи к воздействию биологических объектов. Замещение себоцитов соединительнотканными тяжами способствует снижению продукции кожного сала (Рисунок 13).

Клещи рода *Demodex* spp. оказывали повреждающее влияние не только на структуру СВК, но и на такие окружающие 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 (Рисунки 14–16).

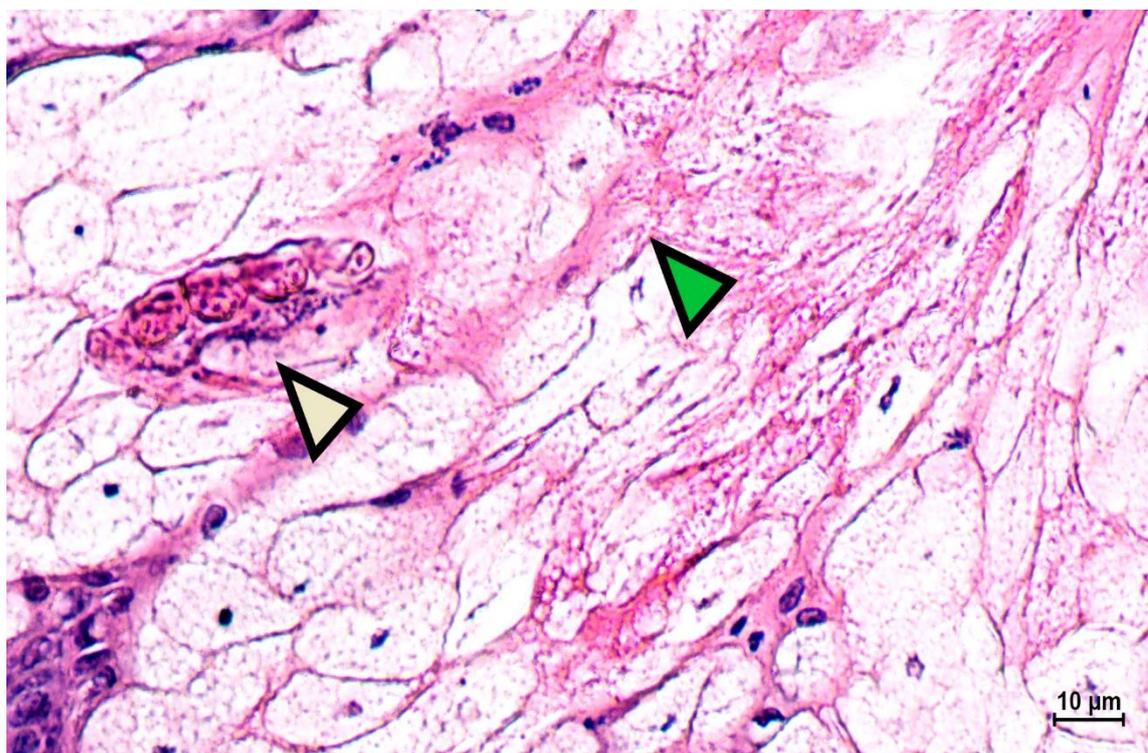


Рисунок 13 – Микропрепарат кожи добровольца Н. в возрасте 70 лет с наличием клещей *Demodex* spp. в сальной железе. Белой стрелкой отмечен клещ в сальной железе. Зеленой – признаки фиброза железы в виде соединительнотканых волокон. Окраска гематоксилином и эозином, об. 40, ок. 20

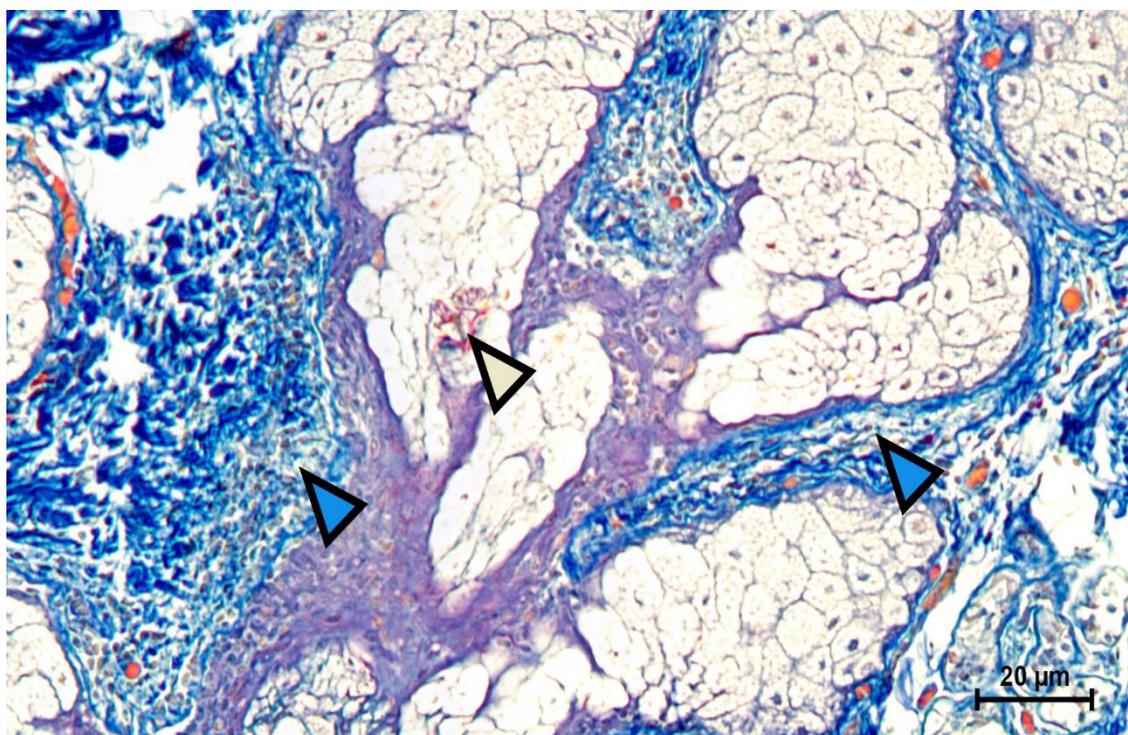


Рисунок 14 – Микропрепарат кожи добровольца Е. в возрасте 64 лет с наличием клещей *Demodex* spp. в сальной железе. Белой стрелкой отмечен клещ. Синими стрелками показано уменьшение толщины коллагеновых волокон. Окраска трихром по Маллори, об. 40, ок. 20

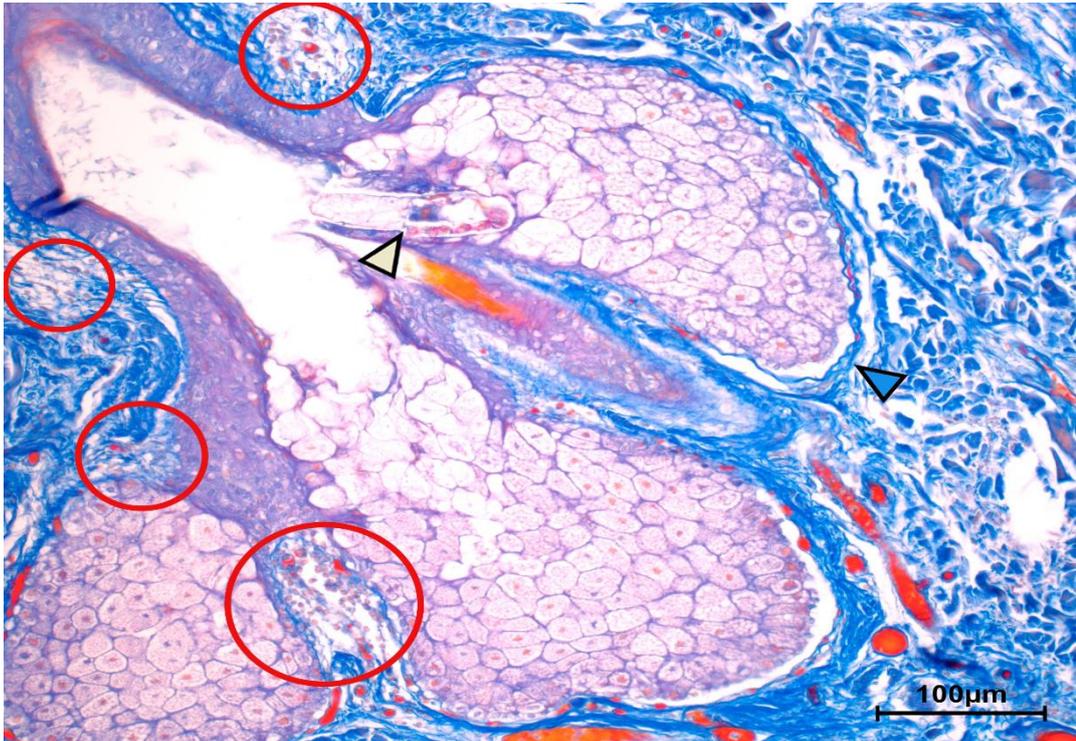


Рисунок 15 – Микропрепарат кожи добровольца М. в возрасте 73 лет с наличием клещей *Demodex* spp. в сальной железе. Белой стрелкой отмечен клещ. Синей стрелкой показано уменьшение толщины коллагеновых волокон. Выход эритроцитов из гемокапилляров в интерстициальное пространство дермы – в круге. Окраска трихром по Маллори, об. 40, ок. 20

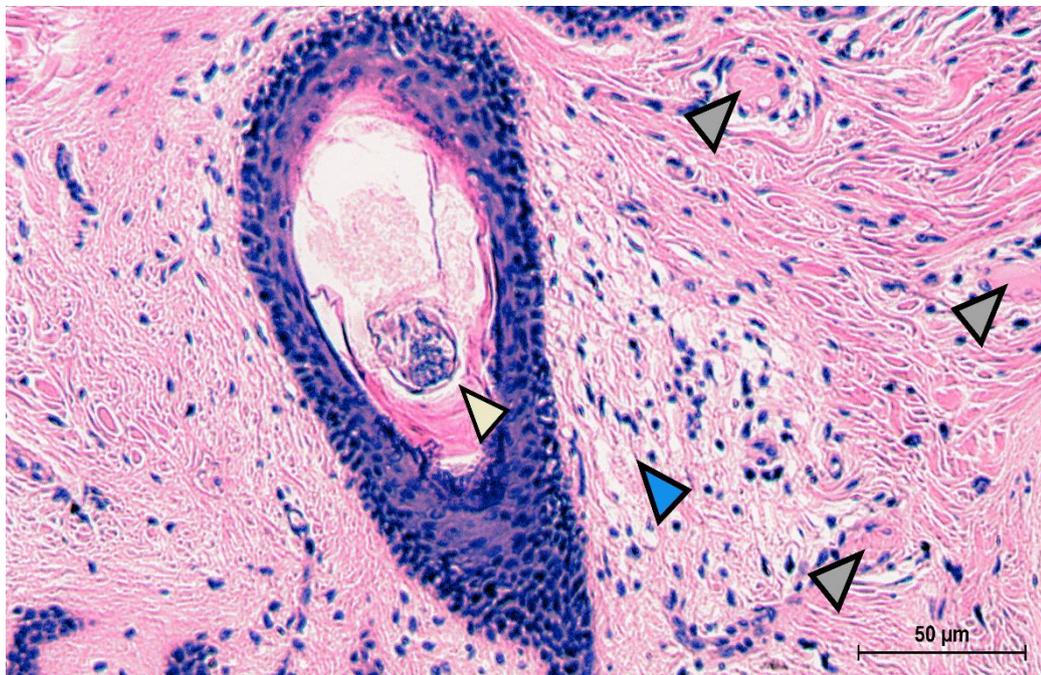
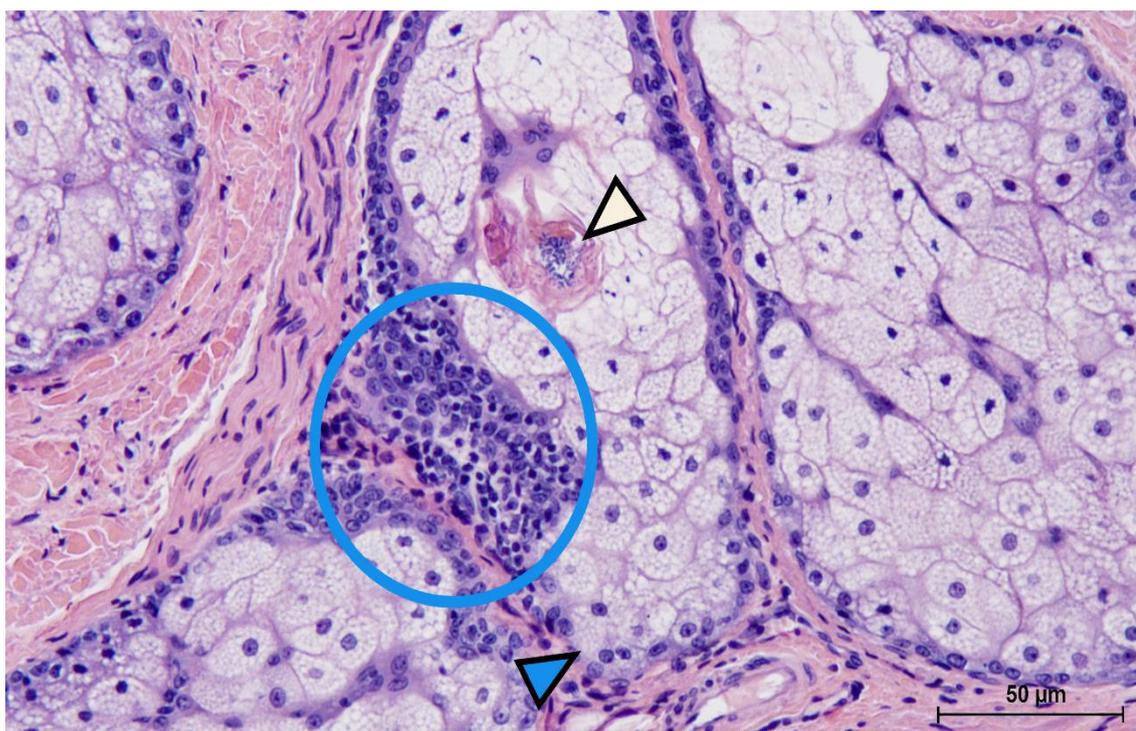


Рисунок 16 – Микропрепарат кожи добровольца П. в возрасте 66 лет с наличием клещей *Demodex* spp. в канале волоса. Белой стрелкой отмечен клещ. Синей – показано уменьшение толщины коллагеновых волокон. Серыми стрелками обозначены полнокровные кровеносные капилляры. Окраска гематоксилином и эозином, об. 40, ок. 20



а)



б)

Рисунок 17 – 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 также инфильтрирован, имеются вакуолизированные клетки. Полиморфноядерный инфильтрат компонентов барьера кожи (в круге). Окраска гематоксилином и эозином, об. 40, ок. 20

Присутствие клещей в просвете волосяного фолликула характеризовалось наличием выраженных патологических изменений в эпидермисе и дерме. В окружающих тканях наблюдали наличие очаговых полиморфноядерных инфильтратов. Наблюдали выраженное уменьшение толщины коллагеновых волокон соединительной ткани дермы (Рисунок 17).

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, остатки экзоскелета особей (Рисунки 18–20). Эти структуры способствовали развитию тканевой реакции в эпидермисе и дерме, характеризующейся морфологическими изменениями.

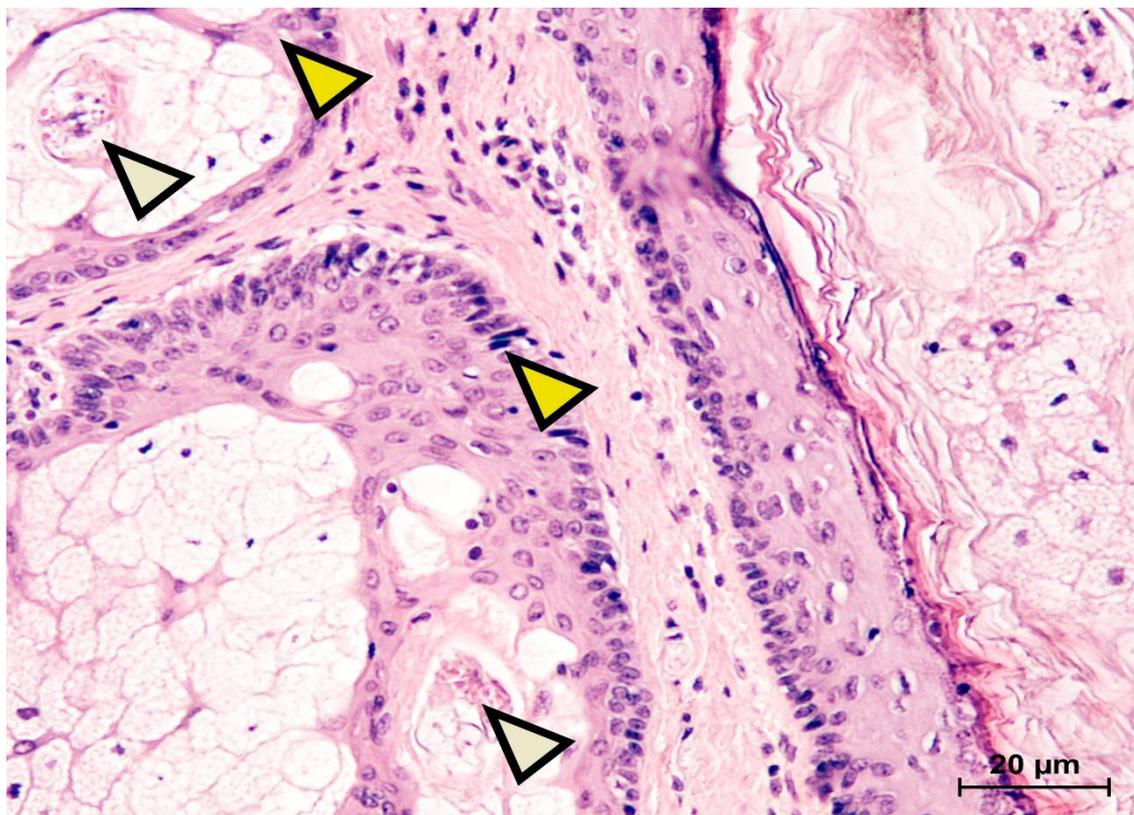


Рисунок 18 – Микропрепарат кожи участника Г. в возрасте 55 лет с наличием клещей рода *Demodex* spp. в сальной железе. Желтой стрелкой обозначены гипертрофия сальных желез и утолщение их стенок за счет недифференцированных себоцитов, как следствие образования «капсул» с клещами рода *Demodex* spp. (белые стрелки). Окраска гематоксилином и эозином, об. 40, ок. 20



Рисунок 19 – Микропрепарат кожи участника Д. в возрасте 46 лет с наличием клещей рода *Demodex* spp. в эпидермисе. «Капсула» с клещами рода *Demodex* spp., белой стрелкой отмечены стенки капсулы, образованные роговыми массами. Отмечено увеличение толщины шиповатого, зернистого и рогового слоя эпидермиса. Окраска гематоксилином и эозином, об. 10, ок. 20

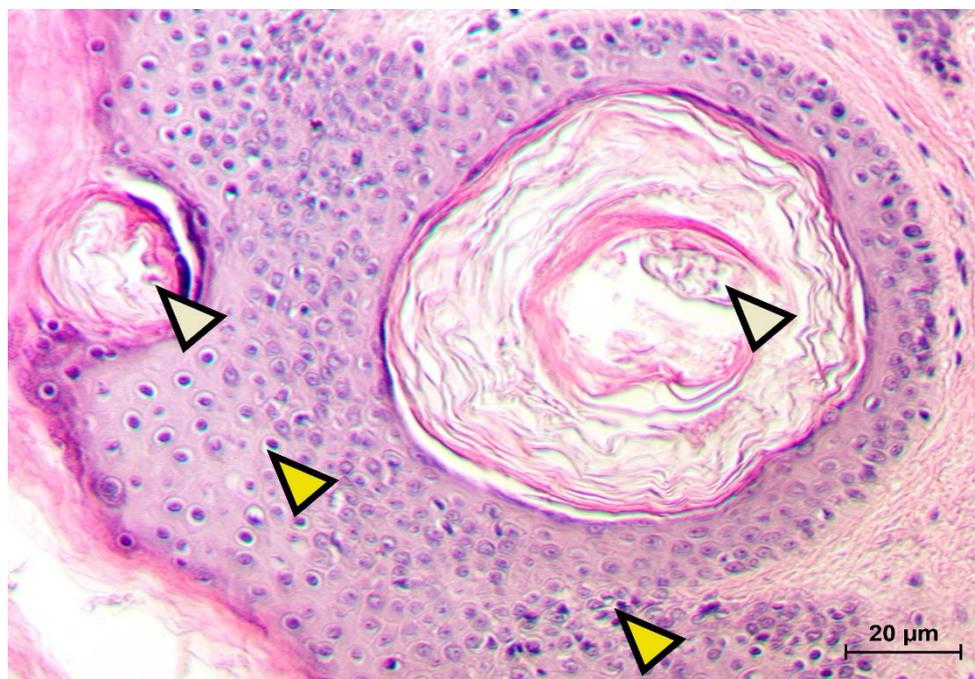


Рисунок 20 – Микропрепарат кожи участника К. в возрасте 53 лет с наличием клещей рода *Demodex* spp. (белые стрелки) в эпидермисе. «Капсулы» с клещами рода *Demodex* spp. Желтыми стрелками отмечена инфильтрация лейкоцитов в эпидермисе. Имеется увеличение толщины шиповатого, зернистого и рогового слоев эпидермиса. Окраска гематоксилином и эозином, об. 40, ок. 20

Гистологическая картина кожи, пораженной клещами рода *Demodex* spp., как модель воздействия биологических факторов, демонстрирует нарушение структуры слоев кожи, в частности деструкцию и десквамацию эпителия. Одной из причин является повреждение кожи ротовым аппаратом клеща, другой – механическая блокировка паразитами сально-волосяного комплекса. Образование «капсул» с клещами *Demodex* spp. и продуктами их жизнедеятельности гистологически проявляется в виде гипертрофии эпителия и сальных желез. Со временем происходит процесс фиброза за счет образования и прорастания соединительнотканых тяжей в элементы барьера кожи (например, в сальные железы), а также нарушение базальной мембраны. Тканевая реакция кожи, вызываемая клещами рода *Demodex* spp., элементами их экзоскелета и продуктами жизнедеятельности, а также бактериями, обитающими на поверхности особей, вызывает образование полиморфноядерной инфильтрации и уменьшение толщины коллагеновых волокон. Гистологически наблюдали изменение просвета капилляров, дезорганизацию их базальной мембраны. Со стороны сальных желез в разных препаратах встречали наличие в них фиброза, изменение формы, гипертрофию стенок, деструкцию себоцитов. Выраженность вышеуказанных процессов зависела от количества клещей в эпидермисе и дерме, а также давности процесса.

Таким образом, наблюдали нарушение морфологической структуры и целостности сально-волосяного комплекса, прилежащих к нему капилляров и соединительной ткани, а также увеличение толщины эпидермиса. В данном случае, эти структуры являются элементами барьера кожи человека. Деструктивные изменения этих компонентов 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 *Demodex* spp., а также соединительнотканых тяжей в местах локализации особей. Вторым вариантом течения процесса является возникновение

и дальнейшее развитие местной тканевой реакции в структурах самого 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.

### 3.2.1. Изменения морфологических показателей структурных компонентов барьера кожи человека

Проведенное гистологическое исследование у добровольцев 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±0,7	17,2±4,0*	16,8±4,1†
Эритроциты вне сосудов, ед.	0	6,8±1,1*	7,3±1,1†
Вакуолизированные кератиноциты, ед.	7,7±2,1	22,1±5,7*	24,3±5,2†

\*,† 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 21).

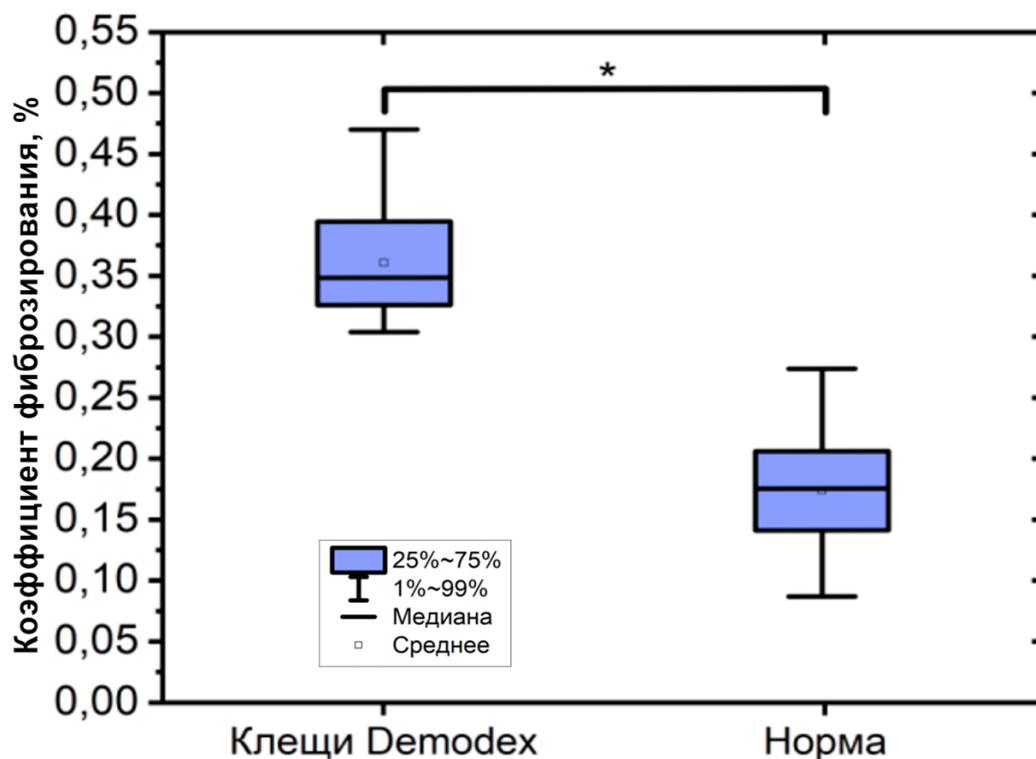


Рисунок 21 – Коэффициент фиброизирования (отношение участков разрастания фиброзной соединительной ткани к общей площади) сальных желез у обследуемых 1 группы (норма) и 3 группы (тканевой процесс, ассоциированный с клещами рода *Demodex spp.*, Me (25L; 75U).

\* 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 соединительной ткани. При распространении реактивного тканевого процесса за пределы сально-волосяного комплекса происходили изменения в сосочковом слое дермы. Они были выражены в истончении коллагеновых волокон, подлежащих к участку кожи с наличием местного тканевого процесса. Результаты измерений толщины коллагеновых волокон дермы в 6 полях зрения в 3 гистологических препаратах от каждого из 6 добровольцев представлены графически (Рисунок 22).

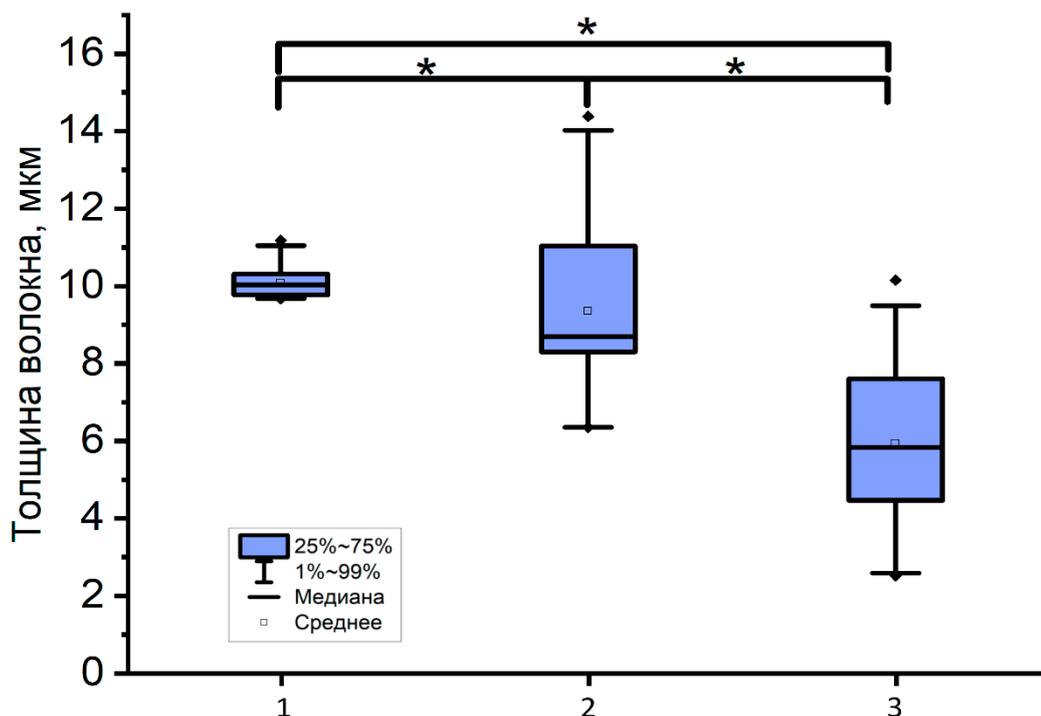


Рисунок 22 – Сравнительная морфометрия толщины коллагеновых волокон дермы, Me (25L; 75U). Группа 1 – добровольцы с нормальной кожей, без внешних признаков реактивных тканевых процессов. Группа 2 – обследуемые, имеющие признаки местной тканевой реакции кожи. Группа 3 – обследуемые с признаками местной тканевой реакции, ассоциированной с наличием клещей рода *Demodex spp.*

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

Проведение морфометрического измерения эпидермиса участников из третьей группы показало достоверное увеличение толщины базального, шиповатого, зернистого и рогового слоев в сравнении с эпидермисом кожи у обследуемых первой и второй групп (Рисунок 23). Эти данные свидетельствуют об активной реакции ткани в ответ на деятельность клещей, в связи, с чем можно предположить обострение хронического тканевого процесса.

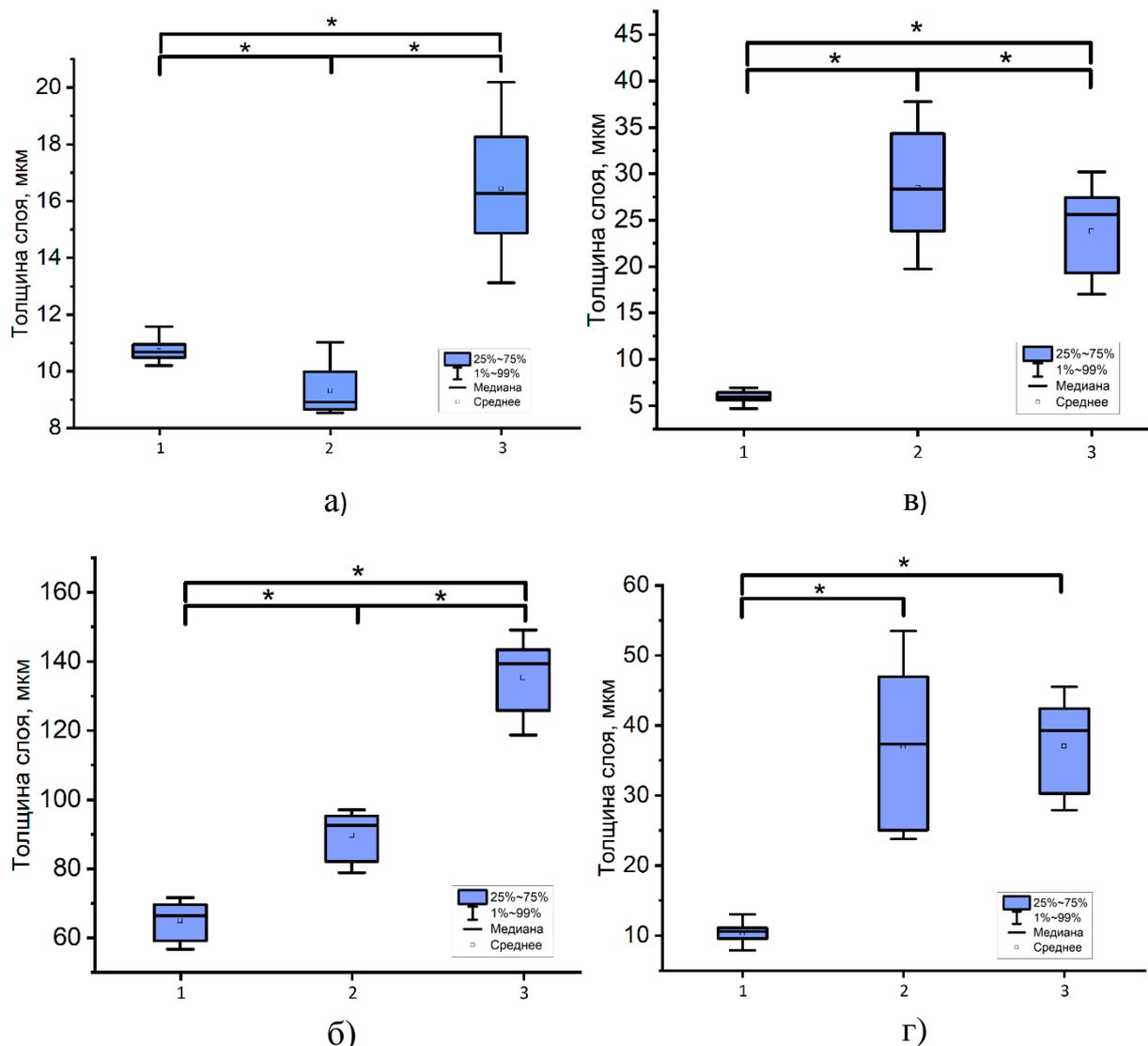


Рисунок 23 – Изучение толщины слоев эпидермиса тонкой кожи: а) базальный; б) шиповатый; в) зернистый; г) роговой, Me (25L; 75U). Группа 1 – добровольцы с нормальной кожей, без внешних признаков реактивных тканевых процессов.

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,  $p \leq 0.001$

Таким образом, морфологические изменения отдельных компонентов кожного барьера 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 компонентов и функционирования барьера кожи, а также увеличению площади поражения кожи.

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

Микропрепараты обследуемых первой группы с отсутствием признаков тканевой реакции и нарушения элементов барьера демонстрировали либо единичные Ki67-позитивные клетки, диффузно расположенные в различных компонентах барьера, либо их отсутствие (Рисунок 24).

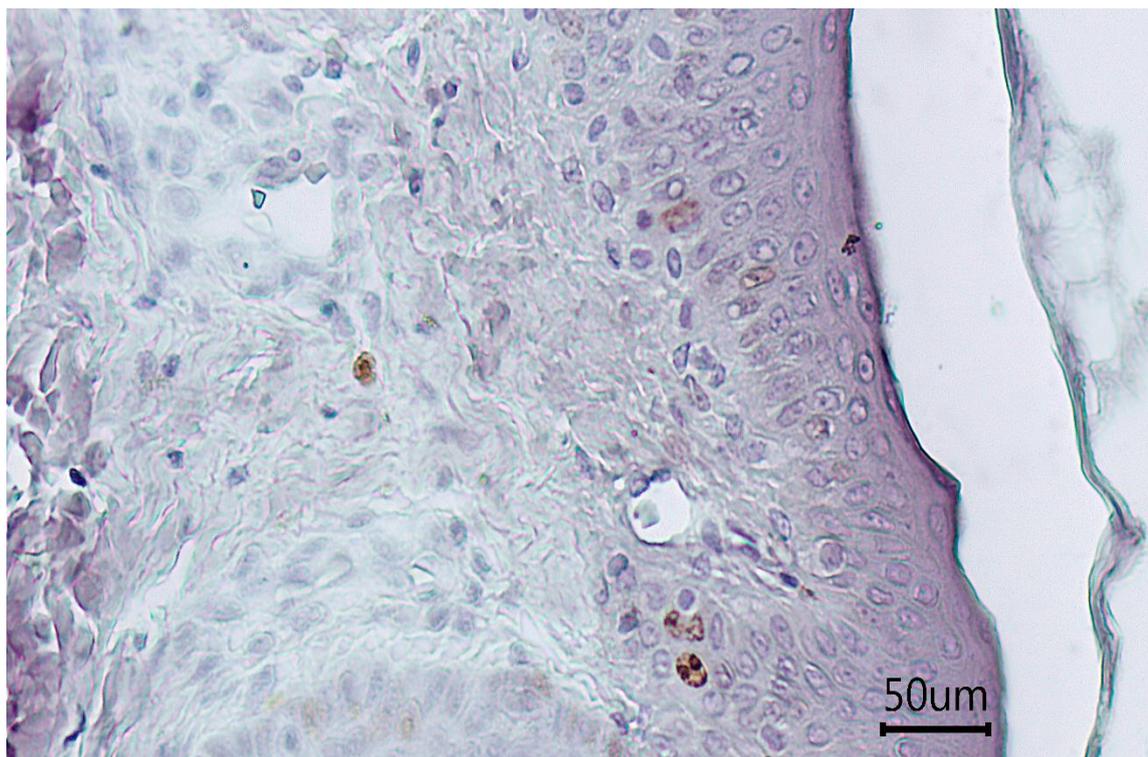


Рисунок 24 – Микропрепарат кожи участника Р. из первой группы в возрасте 44 лет. Имеются единичные Ki67-позитивные клетки, окрашенные коричневым цветом. Окраска гематоксилином, об. 40, ок. 20

Результаты анализа микропрепаратов обследуемых второй группы показали наличие Ki67-позитивных клеток в структурных компонентах барьера. В отличие от третьей группы, клетки расположены преимущественно около имеющегося полиморфноядерного инфильтрата (Рисунок 25).

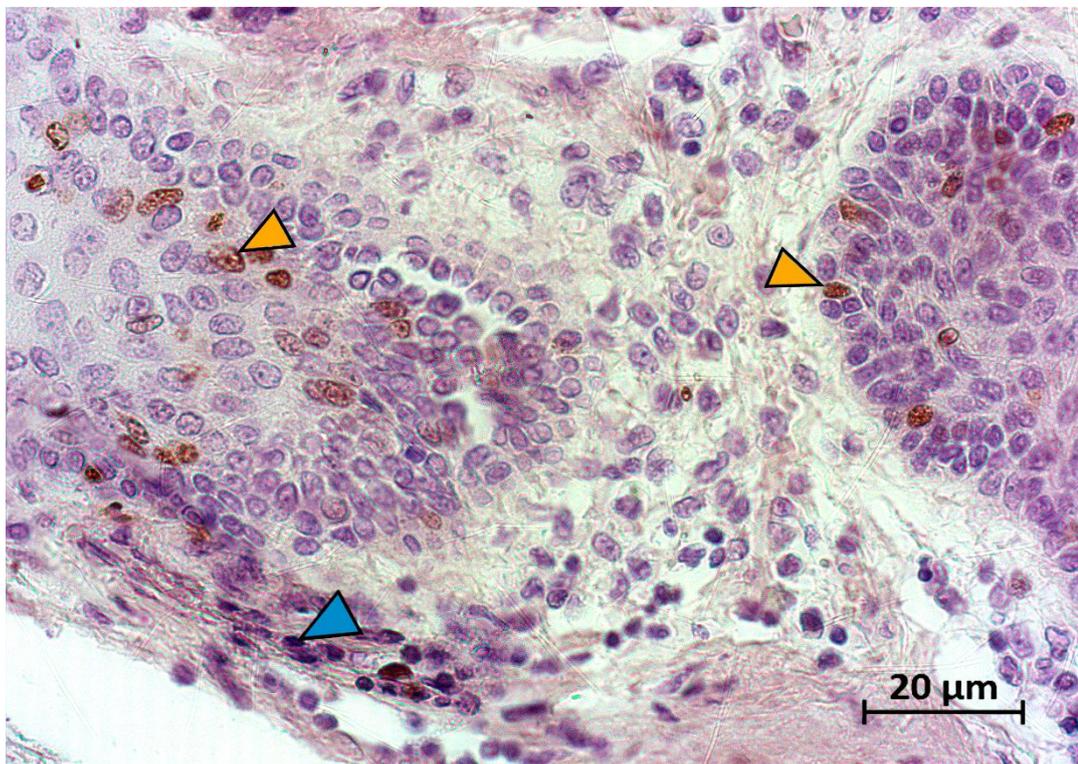


Рисунок 25 – Микропрепарат кожи участника Н. в возрасте 47 лет с наличием местной тканевой реакции сально-волосяного комплекса (синяя стрелка). Ki67-позитивные клетки окрашены коричневым цветом (оранжевые стрелки). Окраска гематоксилином, об. 40, ок. 20

Иммуногистохимическое исследование материалов добровольцев из третьей группы показало повышенное количество Ki67-позитивных клеток в местах локализации клещей рода *Demodex* spp. в элементах барьера человека. Большинство таких клеток расположены непрерывным слоем в составе сально-волосяного комплекса, однако имеются и диффузно распределенные клетки в РВСТ (чаще в составе дермального влагиалища). Наряду с Ki67-позитивными клетками имеются и другие морфологические изменения, такие как уменьшение толщины коллагеновых волокон, вакуолизация кератиноцитов, полиморфноядерная инфильтрация участков барьера, окружающих места локализации особей *Demodex* spp. (Рисунки 26, 27).

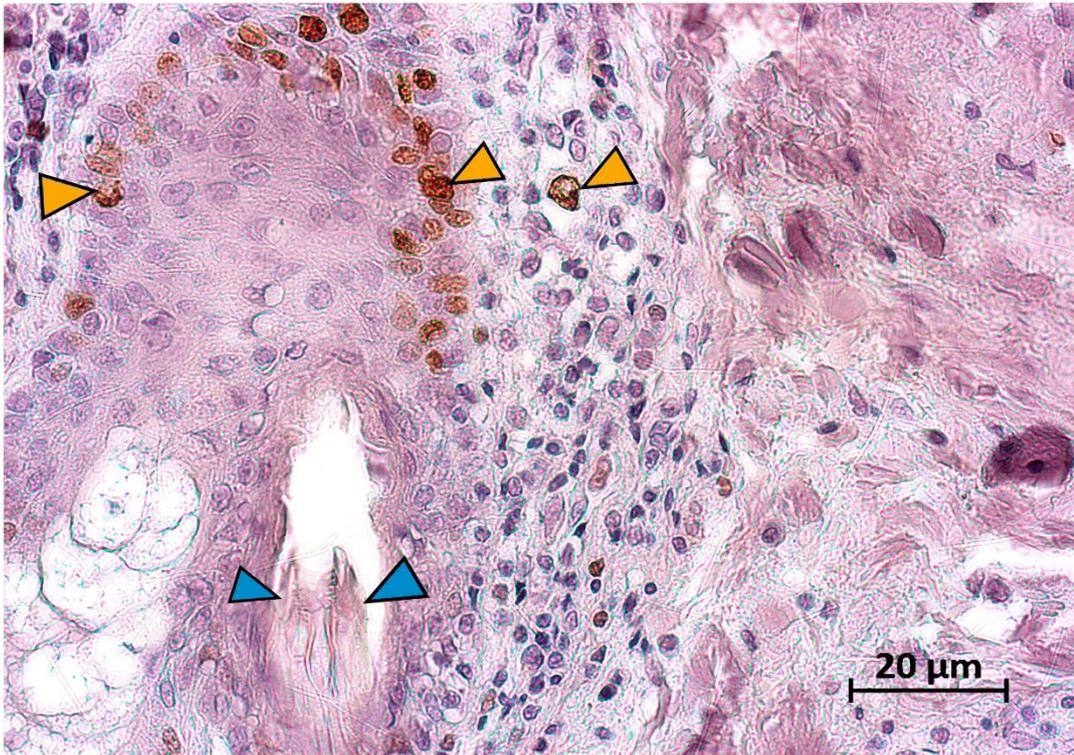


Рисунок 26 – Микропрепарат кожи участника Г. в возрасте 60 лет с наличием клещей *Demodex* spp. в канале сально-волосяного комплекса (синие стрелки). Кі67-позитивные клетки окрашены коричневым цветом (оранжевые стрелки). Окраска гематоксилином, об. 40, ок. 20

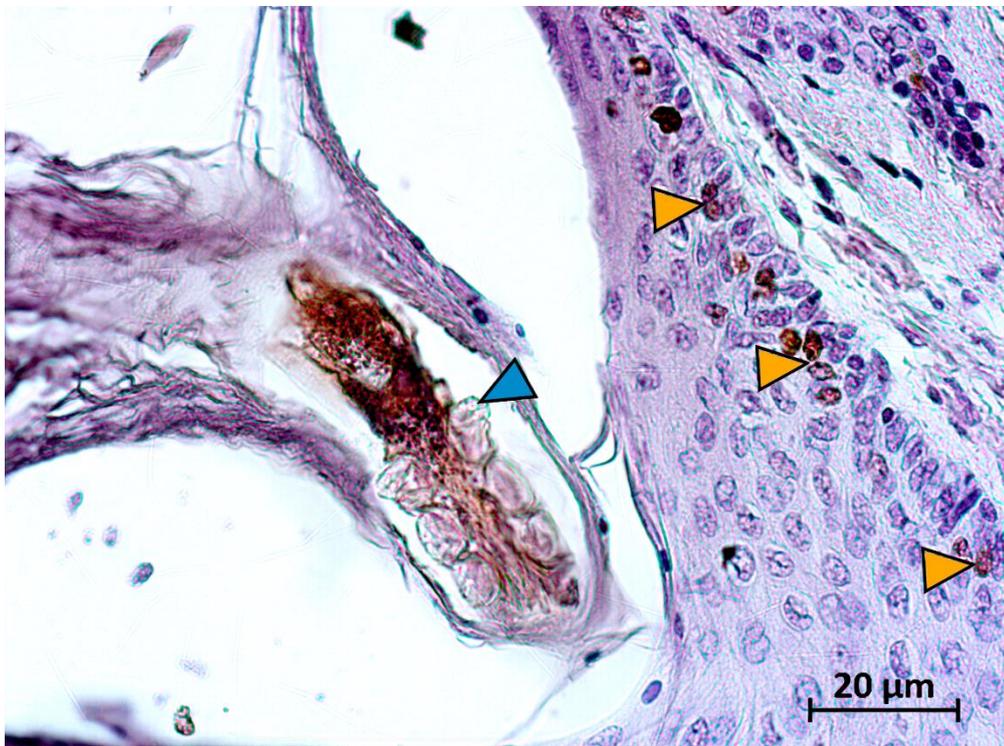


Рисунок 27 – Микропрепарат кожи участника Д. в возрасте 53 лет с наличием клещей *Demodex* spp. в волосяном фолликуле (синяя стрелка). Кі67-позитивные клетки окрашены коричневым цветом (оранжевые стрелки). Окраска гематоксилином, об. 40, ок. 20

Сравнительная количественная характеристика Ki67-положительных клеток в полученных препаратах от добровольцев трех групп представлена на Рисунке 28.

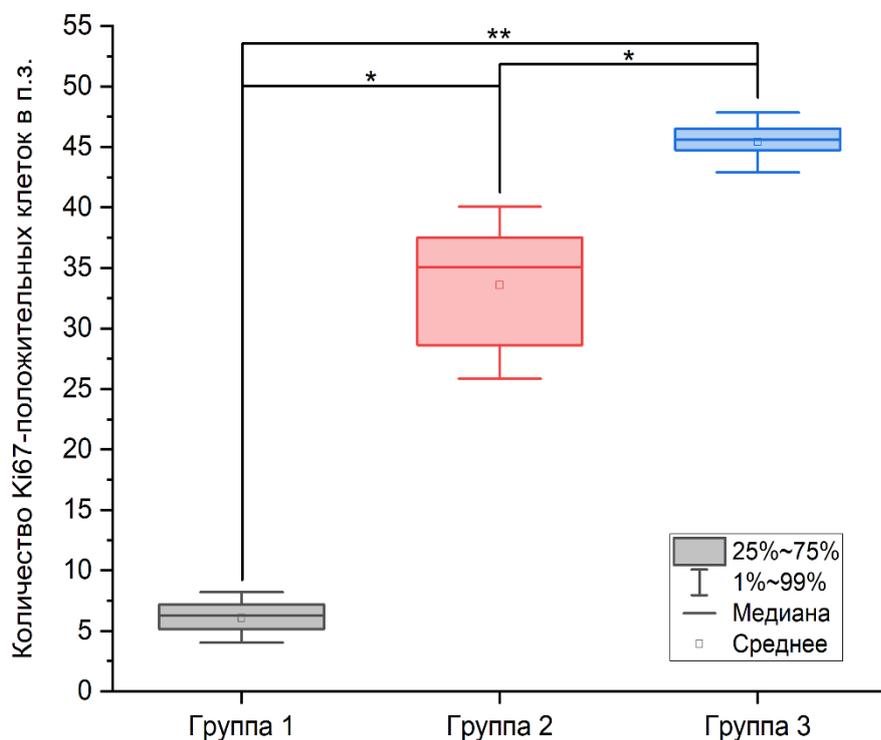


Рисунок 28 – Количество Ki67-положительных клеток в поле зрения для каждой исследуемой группы. Тест ANOVA с учетом поправки Бонферрони.

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

Она показала достоверное различие между числом клеток исследуемой группы с имеющимся местным тканевым процессом, ассоциированным с клещами рода *Demodex* spp. (Рисунок 28) и другими группами (без признаков повреждения барьера).

Таким образом, выявление Ki67-положительных клеток в компонентах барьера кожи человека в условиях наличия местной тканевой реакции, ассоциированной с клещами рода *Demodex* spp. подтверждает способность этих организмов вызывать ответную тканевую реакцию в виде повышенной пролиферативной активности, так как процесс пролиферации является частью репаративной регенерации ткани после завершения первичных тканевых реакций.

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

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

Таблица 2 – Количество Т-лимфоцитов у добровольцев 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 обследуемыми 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 этих особей фактором, усугубляющим течение тканевой реакции и их влиянии на повреждение элементов барьера кожи. Полученные результаты средних значений показали хроническое течение процесса в кожном покрове.

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

#### **3.5.1. Изучение способов сохранения жизнеспособности клещей рода *Demodex spp.***

Клещи рода *Demodex spp.* являются условно-патогенными организмами, обитающими в СВК кожи. Подбор специфических параметров внешней среды *in vitro* позволил определить показатели для сохранения жизнеспособности особей в структурах барьера кожи для разработок подходов к лечению проявлений местной тканевой реакции, ассоциированной с особями *Demodex spp.* (Приложение А). Изучение ультраструктуры и факторов патогенности клещей требовало разработки определенных условий, приближенных к их естественной среде обитания в коже, что необходимо для поиска эффективных компонентов, приводящих к гибели *Demodex spp.*, в составе новых препаратов. Результаты исследования параметров представлены в Таблицах 3–6.

Таблица 3 – Подвижность клещей рода *Demodex spp.* в отсутствии света *in vitro*

Вид подвижности	№ клеща	Время нахождения в термостате, ч						
		24	48	72	96	120	144	168
Ротовой аппарат	№ 1	+	+	+	+	+	+	–
	№ 2	+	+	+	+	+	–	–

Продолжение таблицы 3

Вид подвижности	№ клеща	Время нахождения в термостате, ч						
		24	48	72	96	120	144	168
	№ 3	+	+	+	-	-	-	-
	№ 4	+	+	+	-	-	-	-
	№ 5	+	+	+	-	-	-	-
Конечности	№ 1	+	+	+	+	+	+	-
	№ 2	+	+	+	+	-	-	-
	№ 3	+	+	+	-	-	-	-
	№ 4	+	+	+	-	-	-	-
	№ 5	+	+	-	-	-	-	-
Перемещение в пространстве	№ 1	+	+	+	-	-	-	-
	№ 2	+	+	+	-	-	-	-
	№ 3	+	+	-	-	-	-	-
	№ 4	+	+	-	-	-	-	-
	№ 5	+	-	-	-	-	-	-

Таблица 4 – Подвижность клещей рода *Demodex* spp. в естественной питательной среде *in vitro*

Вид подвижности	№ клеща	Время нахождения в термостате, ч							
		24	48	72	96	120	144	168	192
Ротовой аппарат	№ 1	+	+	+	+	+	+	+	-
	№ 2	+	+	+	+	+	+	+	-
	№ 3	+	+	+	+	+	+	-	-
	№ 4	+	+	+	+	+	+	-	-
	№ 5	+	+	+	+	+	+	-	-
Конечности	№ 1	+	+	+	+	+	+	-	-
	№ 2	+	+	+	+	+	+	-	-
	№ 3	+	+	+	+	-	-	-	-
	№ 4	+	+	+	+	-	-	-	-
	№ 5	+	+	+	+	-	-	-	-
Перемещение в пространстве	№ 1	+	+	+	+	+	-	-	-
	№ 2	+	+	+	+	+	-	-	-
	№ 3	+	+	+	+	-	-	-	-
	№ 4	+	+	+	-	-	-	-	-
	№ 5	+	+	+	-	-	-	-	-

Таблица 5 – Подвижность клещей рода *Demodex* spp. в аэробных условиях *in vitro*

Вид подвижности	№ клеща	Время нахождения в термостате, ч							
		24	48	72	96	120	144	168	192
Ротовой аппарат	№ 1	+	+	+	+	+	+	+	–
	№ 2	+	+	+	+	+	+	–	–
	№ 3	+	+	+	+	+	+	–	–
	№ 4	+	+	+	+	+	–	–	–
	№ 5	+	+	+	+	–	–	–	–
Конечности	№ 1	+	+	+	+	+	–	–	–
	№ 2	+	+	+	+	+	–	–	–
	№ 3	+	+	+	+	+	–	–	–
	№ 4	+	+	+	–	–	–	–	–
	№ 5	+	+	+	–	–	–	–	–
Перемещение в пространстве	№ 1	+	+	–	–	–	–	–	–
	№ 2	+	+	–	–	–	–	–	–
	№ 3	+	+	–	–	–	–	–	–
	№ 4	+	–	–	–	–	–	–	–
	№ 5	+	–	–	–	–	–	–	–

Таблица 6 – Подвижность клещей рода *Demodex* spp. в условиях +20°C, +22°C, +24°C *in vitro*

Вид подвижности	№ клеща	+20°C, +22°C, +24°C							
		Время нахождения в термостате, ч							
		24	48	72	96	120	144	168	192
Ротовой аппарат	№ 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	–++	----
	№ 2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	----	----
	№ 3	+++	+++	+++	+++	+++	+–+	----	----
	№ 4	+++	+++	+++	+++	–++	----	----	----
	№ 5	+++	+++	+++	––+	----	----	----	----
Конечности	№ 1	+++	+++	+++	+++	+++	–++	----	----
	№ 2	+++	+++	+++	+++	+++	––+	----	----
	№ 3	+++	+++	+++	+++	––+	----	----	----
	№ 4	+++	+++	–++	–+-	----	----	----	----
	№ 5	+++	+++	–+-	----	----	----	----	----
Перемещение в пространстве	№ 1	+++	+++	+++	+++	––+	----	----	----
	№ 2	+++	+++	+++	––+	----	----	----	----
	№ 3	+++	+++	–++	––+	----	----	----	----
	№ 4	+++	–++	––+	----	----	----	----	----
	№ 5	+++	–++	----	----	----	----	----	----

Таким образом, обнаружено, что в условиях температуры (от +20°C до +25°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 (Рисунок 29).

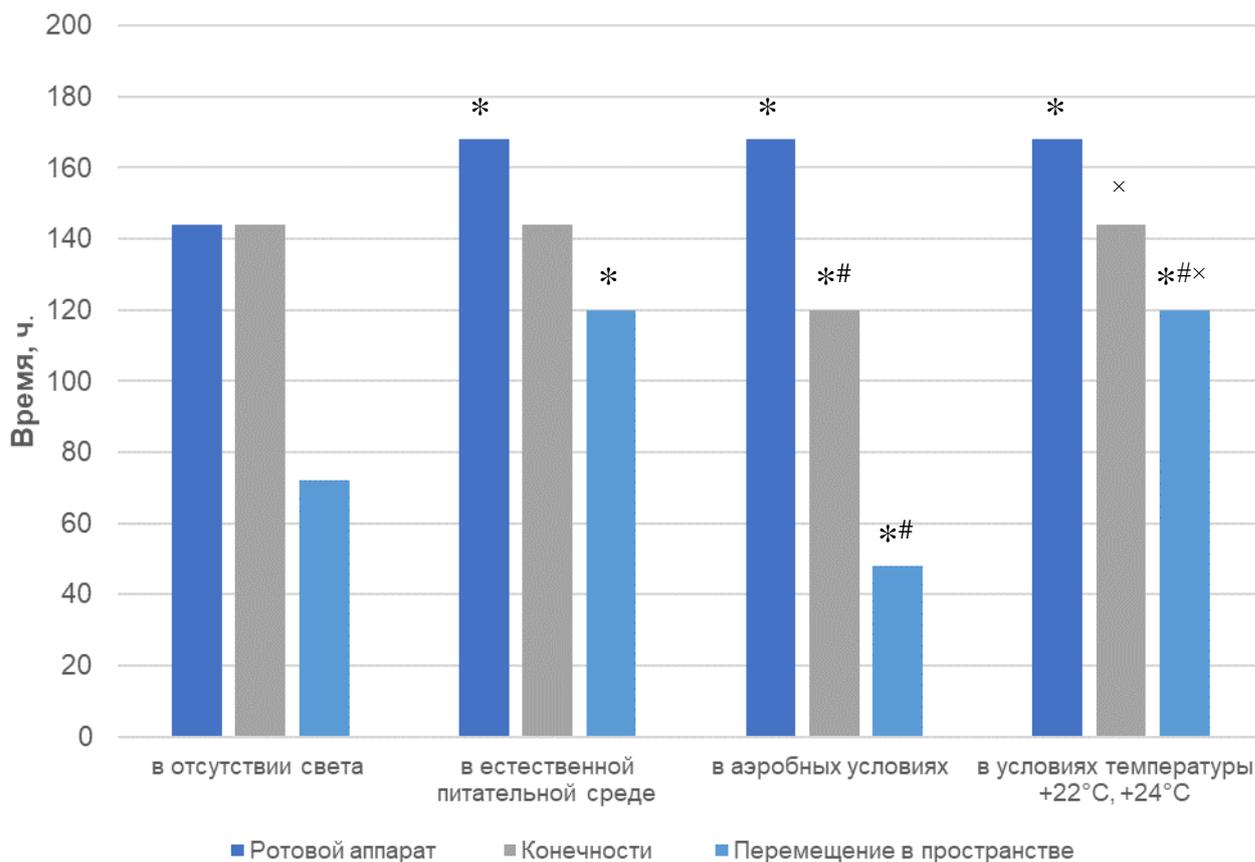


Рисунок 29 – Максимальное значение времени сохранения подвижности различных частей тела особей *Demodex* spp. в условиях внешней среды, приближенных к их естественной среде обитания в коже. Достоверность различий ( $p \leq 0,05$ ) показателей подвижности соответствующих частей тела клещей при различных условиях окружающей среды в сравнении с показателем подвижности в: \* отсутствии света, # естественной питательной среде, × аэробных условиях

### 3.5.2. Особенности ультрамикроскопического строения и патогенности клещей рода *Demodex* spp.

Особи *Demodex* spp. являются представителями нормальными флоры кожи человека, а их размеры по данным проведенной морфометрии варьируют от 0,1 до

0,4 мм в зависимости от вида. Структурные особенности строения и размеры клещей рода *Demodex* spp. являются факторами, влияющими на целостность компонентов барьера кожи человека, которые в норме являются местами их локализации. Результаты сканирующей электронной микроскопии четко показали не только строение, но структуру хитинового экзоскелета паразитов, его сложного трехкомпонентного ротового аппарата, а также адгезию кожного детрита, а значит и микрофлоры кожи на поверхности тела клеща. На изображениях, полученных при СЭМ (Рисунок 30), отчетливо виден сложный ротовой аппарат клеща (круглое ротовое отверстие, острая ротовая игла, гипостома) способный разрушать компоненты СВК. Прочный хитиновый экзоскелет клеща и конечности с крючьями способствуют свободному перемещению и возможности закрепления клеща в структурах кожного барьера. Хитин не подвергается воздействию внешних факторов, в том числе химических веществ, но является пластичным. Поэтому его структура осталась неповрежденной при приготовлении препаратов. Также мы наблюдали частицы чешуек эпидермиса на особях, это говорит о возможности переноса клещом *Demodex* spp. нормального и патологического микробиома кожи в глубокие структуры (волосяной канал, сальные железы и прочее).

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 патологического влияния на нормальное 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 иммунной реакции немедленного типа со стороны окружающих тканевых структур.

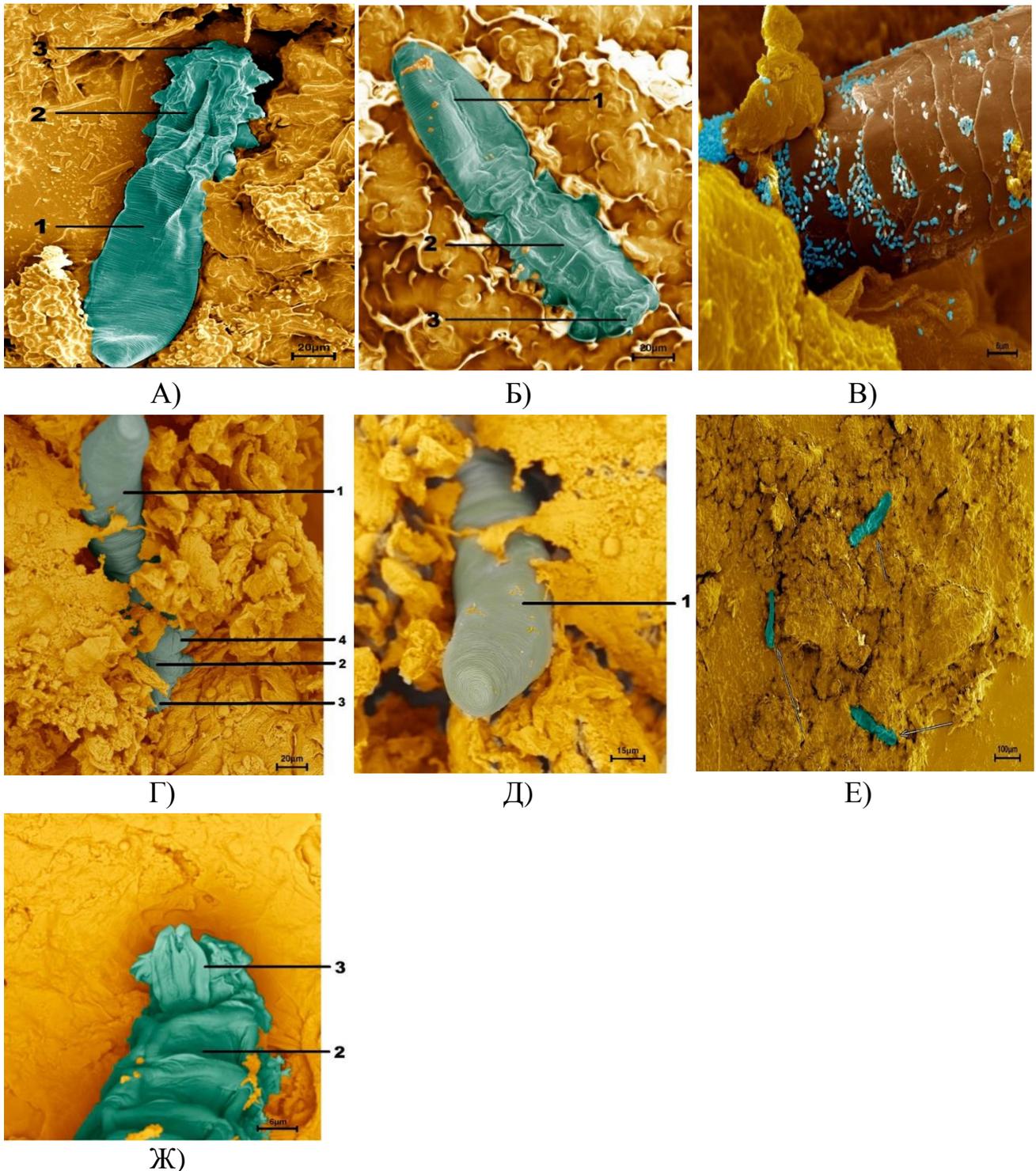


Рисунок 30 – Электронные микрофотографии материала соскобов с клещами *Demodex* spp. и волоса человека: а) дорсальное положение *Demodex folliculorum*; б) вентральное положение *Demodex brevis*; в) стержневой волос человека с выявленными бактериями на поверхности; г) *Demodex folliculorum* в частицах детрита; д) слепо заканчивающаяся опистосома клеща *Demodex folliculorum*; е) обзорная картина группы клещей *Demodex folliculorum* в материалах соскоба; ж) сложный ротовой аппарат клеща *Demodex brevis*. Сканирующая электронная микроскопия с последующей цветокоррекцией. Обозначения: 1 – брюшко; 2 – грудь; 3 – головной отдел; 4 – конечности (а) –  $\times 400$ ; б) –  $\times 500$ ; в), ж) –  $\times 1900$ ; г) –  $\times 420$ ; д) –  $\times 700$ ; е) –  $\times 95$ )

С помощью электронограмм была выполнена сравнительная морфометрия отдельных структур клещей разных видов, а также сопоставление с размером человеческого волоса (Таблица 7).

Таблица 7 – Сравнительная морфометрия структур особей *Demodex folliculorum*, *Demodex brevis* с волосом человека, Me (L25; U75)

Параметр	<i>D. folliculorum</i>	<i>D. brevis</i>
Головной отдел (гнатосома), длина/ширина, $\mu\text{m}$	12,0 (11,78; 12,24) / 19,3 (18,92; 19,63)	16,3 (16,07; 16,71) / 28,6 (26,68; 29,80)
Ротовой аппарат, длина/ширина, $\mu\text{m}$	13,1 (12,33; 13,75) / 9,0 (8,56; 9,79)	16,3 (14,98; 16,60) / 12,8 (11,18; 13,42)
Длина ротовой иглы (гипостома)	10,4 (9,65; 11,90)	12,3 (11,86; 12,91)
Коллющие хелицеры, длина/ширина, $\mu\text{m}$	3,3 (3,14; 3,51) / 3,4 (3,03; 4,35)	3,6 (3,44; 4,08) / 4,9 (4,30; 5,27)
Туловище (подосома), длина/ширина, $\mu\text{m}$	79,4 (78,72; 82,53) / 36,8 (33,65; 48,64)	65,3 (63,44; 68,29) / 32,7 (30,57; 34,45)
Ширина крючьев	7,14 (6,77; 7,51)	7,1 (5,43; 8,82)
Хвостовой отдел (опистосома), длина/ширина, $\mu\text{m}$	148,7 (124,88; 183,17) / 46,1 (45,05; 48,43)	87,6 (81,32; 94,84) / 40,8 (39,59; 42,63)
Толщина колец опистосомы	0,7 (0,58; 0,99)	0,6 (0,29; 0,63)
Диаметр хвостового отдела, длина/ширина, $\mu\text{m}$	17,7 (16,47; 18,03) / 14,0 (13,96; 15,88)	16,4 (16,26; 17,70) / 16,9 (15,47; 18,54)
Толщина пушкового волоса человека, $\mu\text{m}$	27,8* (26,75; 28,74)	

Жирным шрифтом выделены параметры со статистически достоверными различиями в группе *D. brevis* в сравнении с группой *D. folliculorum*,  $p \leq 0,05$ ; \* статистически достоверные различия толщины пушкового волоса человека в сравнении с шириной опистосомы в группах *D. brevis* и *D. folliculorum*,  $p \leq 0,05$

Результаты морфометрических измерений показали, что ширина опистосомы особей *Demodex* spp. достоверно больше ширины пушкового волоса человека (Таблица 7), что позволяет говорить о возможности механической травматизации и блокировке канала волосяного фолликула клещами или детритом.

Выявленный размер особей и место их обитания позволяет говорить о них как о возможном переносчике бактериальных инфекций. Проводили

микробиологический анализ содержимого клещей рода *Demodex* spp. для определения наличия бактериальной флоры как еще одной причины развития и усугубления признаков местной тканевой реакции в коже. 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, а также 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. Установлено, что данные праймеры являются специфичными к роду *Bacillus*. Таким образом, нами выявлены бактерии рода *Bacillus*, обитающие внутри клещей рода *Demodex* spp. Эти данные позволили подтвердить, что клещи рода *Demodex* spp. являются переносчиками микроорганизмов, обитающих внутри особей и на их поверхности, что необходимо учитывать при исследовании их взаимодействия с элементами барьера.

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 иммунную реакцию немедленного типа со стороны окружающих тканей, что значимо для разработки практических рекомендаций в лечении дерматита, ассоциированного с клещами рода *Demodex* spp., а также адаптации особей к нахождению в компонентах барьера кожи человека.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рамках подходов персонализированной медицины для разработки новых лекарственных препаратов и их рационального использования представляется важным обсудить морфологическую структуру некоторых элементов барьера кожи человека и их роль в осуществлении барьерно-защитной функции. Кроме того, нами выявлены механизмы взаимодействия и критерии повреждения элементов барьера различными внешними факторами.

Клещи рода *Demodex spp.* являются одним из повреждающих факторов, обитающих в норме в сально-волосяном комплексе и оказывающим местное и системное влияние на элементы кожного барьера. В связи с этим проанализированы особенности строения особей, развитие местной адаптивной реакции компонентов барьера к повреждающему воздействию особей *Demodex spp.*, а также изменения в иммунной системе.

### **Морфологические особенности компонентов барьера кожи человека и их роль в защитных реакциях**

Впервые термин «гистогематический барьер» был введен в 1929 году Л.С. Штерн [42]. Автор писала о барьере как о физиологическом механизме, который защищает и регулирует относительное постоянство состава и свойств внутренней среды клеток, тканей и органов. В дальнейшем общее понятие ГГБ было разделено на отдельные барьеры, соответствующие локализации систем органов: гемато-энцефалический, гемато-офтальмический, гемато-плацентарный, гемато-тестикулярный и прочие. Изучение структуры элементов барьера кожи и выполняемых ими функций в настоящей работе позволило дополнить имеющуюся информацию о взаимосвязи кожи с внешней и внутренней средой и роли барьера в поддержании гомеостаза. Так, выяснено, что один из компонентов барьера (сально-волосяной комплекс), имеет последовательно расположенные защитные слои, включающие клетки наружного корневого эпителиального влагалища, базальную мембрану и дермальное влагалище с гемокapиллярами. Эти структуры СВК

взаимодействуют как с факторами внешней среды, так и являются границей с внутренней частью барьера (СТ дермы с гемокапиллярами).

В некоторых работах имеются упоминания об общем строении гистогематических или гематопарехиматозных барьеров [21]. В других авторы анализировали строение и роль отдельных компонентов кожного барьера, например волосяных фолликулов и сальных желез, СТ и иммунокомпетентных клеток дермы [19, 23], однако, в настоящей работе эти элементы рассмотрены как общая система, выполняющая защитную, регуляторную и гомеостатическую функции.

### **Критерии повреждения структурных компонентов барьера кожи при влиянии различных факторов, вызывающих местную тканевую реакцию**

В современной литературе существует много работ, посвященных влиянию внешних и внутренних факторов, которые могут способствовать возникновению тканевой реакции в коже [4, 16, 105]. Так, например, рассмотрена роль условно-патогенных и патогенных микроорганизмов [16], возрастных и гормональных изменений [6, 22, 101], механической травматизации [81]. Однако, в этих исследованиях информации о морфологических изменениях структур барьера кожи недостаточно. Авторы подробно описали лейкоцитарные инфильтраты [9, 13], нарушения архитектоники эпидермиса [1] и сальных желез [11, 15] с точки зрения локальных реакций, связанных с определенной патологией. В настоящей работе показаны морфологические изменения компонентов кожного барьера в условиях текущей тканевой реакции, вызванной внешними или внутренними факторами. Благодаря изучению структуры и функционирования элементов барьера как целостной системы становится возможным прогнозирование распространения процесса, его длительности и тяжести. В связи с этим можно выделить критерии повреждения системы кожного барьера: нарушение целостности базальной мембраны СВК; деструкция себоцитов и кератиноцитов; наличие соединительнотканых тяжей в СВК; нарушение целостности гемокапилляров; наличие полиморфноядерных инфильтратов в структурах барьера; истончение коллагеновых волокон дермы. Выявление одного или

нескольких критериев может помочь в изучении и прогнозировании адаптивных процессов, происходящих в коже при воздействии различных внешних и внутренних факторов. Так как барьер кожи является «живой» изменяющейся системой, то эти критерии могут меняться в зависимости от локализации тканевого процесса в коже, вида воздействия и прочих факторов. Однако, неизменными показателями его разрушения остаются нарушения целостности структур и выполнения барьерно-защитной и гомеостатической функций.

### **Морфологические изменения элементов барьера кожи, ассоциированные с действием клещей рода *Demodex spp.***

В исследовании показана локализация клещей рода *Demodex spp.* в структурах барьера кожи, инкапсуляция клещей вместе с продуктами их распада и роговыми чешуйками кожи. Гистологические срезы показали, что наиболее частой локализацией паразитов является сально-волосяной комплекс, а именно волосяной канал, волосяная воронка, сальная железа. Эти данные согласуются с работами Litwin D. и соавторов [89], Lacey N. и соавторов [96], которые также отметили локализацию клещей рода *Demodex spp.* в расширенной волосяной воронке, окруженной лейкоцитарным инфильтратом, а также в сальных и мейбомиевых железах.

Благодаря особенностям своего строения взрослые особи могут проникать через эти структуры, разрушая стержень волоса, внутреннее и наружное корневые эпителиальные влагалища, базальные мембраны волосяных фолликулов и сальных желез. При повреждении элементов барьера клещами происходит проникновение их антигенов в соединительную ткань, а затем в лимфо- или гемокапилляры. В этом случае биологически активные вещества (антигены клещей рода *Demodex spp.* и продукты их распада) действуют через поверхностные клеточные рецепторы, вызывая местные и системные реакции. В настоящей работе на срезах пораженной кожи наблюдали расширенные сосуды с нарушением целостности стенок, полиморфноядерную инфильтрацию вокруг очагов, гипертрофию сальных желез и разрушение эпителия фолликулов, образование гранулем. Кроме того, на микрофотографиях видны фиброзные процессы (соединительнотканые тяжи) и

уменьшение толщины коллагеновых волокон дермы в местах обитания особей *Demodex spp.* Эти признаки показаны в работах других авторов [43, 51]. При проведении ИГХ исследования выявлены скопления Ki67-позитивных клеток в местах локализации особей, что говорит об их способности воздействовать на активацию пролиферативных процессов в окружающих тканях.

### **Волосяные фолликулы**

Aylesworth R. и соавторы в своём исследовании [65], опубликованном в 1982 году, указали на наличие фолликулярной и перифолликулярной инфильтрации при заражении клещом. Авторы также отметили расширение волосяных фолликулов, внутри которых находились клещи, а в 52% случаев паразиты были окружены гомогенным эозинофильным веществом. Исследователи предположили, что оно представляет собой разрушенные эпителиальные клетки волосяного фолликула. Было выявлено, что лимфогистиоцитарный инфильтрат в 29% случаев не только окружает пораженный фолликул, но и проникает в него. При этом авторы отметили неизвестную гигантскую клетку, содержащую в себе остатки тела клеща.

В 1984 году в исследовании Kairinen E.O. и соавторов [95], было подтверждено наличие гомогенного вещества, окружающего клещей. Авторы отметили, что оно напоминает смесь клеток рогового слоя и "скомканного" кожного сала. Кроме этого, ученые указали, что некоторые волосяные фолликулы могли содержать несколько волосяных стержней.

В работе Рогова Ю.И. и соавторов [39] особи *Demodex spp.* обнаружены как в участках кожи с сохраненной структурой, так и с нарушенной. Авторы описывают локализацию паразитов в области волосяных воронок и пилосебацейных комплексах, а вызываемый ими процесс – перифокальная продуктивная тканевая реакция разной степени активности. При этом наблюдали повреждение или разрушение фолликула и высвобождение элементов паразитов в дерму.

A.P. Norgan и соавторы [99] наблюдали воспалительный инфильтрат, состоящий из лимфоцитов, нейтрофилов и гигантских клеток макрофагальной природы. В 2014 году Elston C. и Elston D. описали способность бактерий, входящих в симбиоз с *Demodex spp.* и размножающихся на поверхности и в

желудочно-кишечном тракте клещей, стимулировать пролиферацию лимфоцитов в месте локализации особей в структурах сально-волосяного комплекса [79].

Результаты исследования Chen W. и Plewig G. в статье 2014 года подтверждают данные Aylesworth R. и соавторов, связывающие возникновение выраженной фолликулярной и перифолликулярной инфильтрации с присутствием *Demodex spp.* [68]. Позже Zeytun E. и Karakurt Y. также пишет о способности клещей *Demodex spp.* разрушать эпителиальные клетки волосяных фолликулов [119]. E. Vonnar и соавторы [67] говорят о возникновении гранулематозной реакции кожи вследствие воздействия хитинового экзоскелета клещей, а также гиперкератоза и эпителиальной гиперплазии из-за механического блокирования волосяных фолликулов, и протоков сальных желез. Выявление гранулем и инфильтрата, состоящего из плазматических клеток и многоядерных макрофагов, опубликовано в работах и других авторов [89]. А недавние исследования Jacob S. и соавторов [82] продемонстрировали связь *Demodex spp.* и процесс развития хронического воспаления в тканях.

### **Сальные железы**

В работах English F.P. и соавторов [115, 117] отмечают, что особи *Demodex spp.*, мигрируя через сальные железы, разрывают себоциты и мелкие кровеносные сосуды, цепляясь за них крючьями. Как следствие, возникает интенсивная локализованная тканевая реакция в сальных железах.

В 2018 году Zeytun E. и Karakurt Y. [119] описали способность клещей посредством ротового аппарата разрушать эпителиальные клетки сальных желез, мелкокалиберные сосуды и нарушать барьер кожи, провоцируя местную реакцию в тканях.

Кроме этого, Demirdag H. G. и соавторы [114] в своем исследовании отмечают снижение выработки и изменение состава кожного сала у пациентов. Некоторые исследования свидетельствуют о влиянии клеща на кожу в целом: группа ученых во главе с Demirdag H. G. [114] и Foley R. [73] в отдельных работах выявили снижение показателей влажности кожи и pH более чем на 0,05 единиц.

## Сосуды микроциркуляторного русла

Влияние паразитов на сосуды представили E. Vonnag и соавторы [67]. Согласно этим данным, движения клеща в волосяных фолликулах, продукты его жизнедеятельности раздражают рецепторы кожи. Вследствие этого развивается паралич вазомоторов, что, в свою очередь, вызывает нарушение тонуса мелких сосудов, развитие спазма артериол, понижение тонуса венул. Это приводит к усилению проницаемости стенок. Сосудистые изменения способствуют нарушению трофики дермы и развитию ответной тканевой реакции с изменением коллагеновых волокон вокруг сально-волосяных фолликулов.

В обзорной работе Лавриненко М.В. и соавторов [18] представлена информация о структурно-функциональном изменении многих элементов барьера кожи человека. Авторы отметили наличие расширения и утолщения стенок сосудов, очаговой лимфоцитарной, нейтрофильной и эозинофильной инфильтрации, гиперплазии сальных желез и разрушения эпителия фолликулов, а также образование в дерме цист и гранулем.

Таким образом, клещи рода *Demodex spp.* оказывают влияние на сально-волосяной комплекс и окружающие его структуры. Эти изменения могут представлять собой как локализованную тканевую реакцию кожи с лейкоцитарным инфильтратом, разрастанием стенок сосудов и гипертрофией сальных желез, так и разрушение фолликула с образованием кист и гранулем. Степень выраженности процесса зависит от многих факторов, в том числе и от изначального состояния отдельных структур барьера.

### **Изменения иммунной системы при наличии клещей рода *Demodex spp.* в коже**

Изменению показателей иммунной системы организма, пораженного клещами рода *Demodex spp.*, посвящено довольно много работ. Некоторые авторы [5, 61, 74, 87, 105] рассматривали нарушение иммунитета при наличии активности особей *Demodex spp.* и текущем воспалительном процессе. Другие исследовали изолированное влияние этих микроорганизмов на Т- и В-систему иммунитета. Кроме того были рассмотрены разные степени тяжести проявления заболеваний.

В настоящем исследовании изучены изменения показателей Т-клеточной иммунной системы у обследуемых при отсутствии структурных нарушений элементов барьера кожи, при наличии тканевого процесса и при наличии этого процесса, ассоциированного с клещами рода *Demodex spp.* В последнем случае это проявилось достоверным снижением Т-лф, Т-хл и ИРИ, а также повышением Т-цт. Согласно лабораторной интерпретации снижение показателей Т-лф может свидетельствовать о развитии местного тканевого процесса, снижение значений Т-хл говорит о его хроническом течении, повышение уровня Т-цт означает присутствие инфекции (бактериальной, вирусной, протозойной). Понижение уровня ИРИ интерпретируется как наличие инфекции, хроническое заболевание, стресс. Следует отметить, что абсолютные значения говорят о количестве тех или иных клеток в крови, в то время как относительные параметры демонстрируют уровень показателя в сравнении с другими величинами. Таким образом, изменение относительных значений говорит о начале иммунного ответа, а абсолютных об устойчивом и продолжительном процессе.

Полученные в настоящем исследовании результаты средних значений показали хроническое течение тканевого инфекционного процесса. Похожие результаты о снижении CD3+, CD4+ клеток у добровольцев с наличием клещей *Demodex spp.* описаны в работе Бутова Ю.С. и соавторов [40]. В исследовании Юцковского А.Д. и соавторов [56] у групп обследуемых (с воспалительными процессами, ассоциированными с особями *Demodex spp.*) наблюдали уменьшение показателей клеточного звена иммунитета. Зарубежные авторы el-Bassiouni S.O. и другие [57] пишут о падении абсолютного количества лимфоцитов, субпопуляции Т-клеток и других изменениях по сравнению с контрольной группой. Таким образом, полученные нами результаты подтверждают дефицит клеток Т-звена иммунитета при легкой и средней степени повреждения ГТБК.

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

В настоящем исследовании получены электронограммы особей *Demodex spp.*, на которых показаны сложный ротовой аппарат клещей (длинная ротовая

игла и колющие хелицеры), конечности, заканчивающиеся крючьями, а также прочный поперечно-исчерченный хитиновый экзоскелет паразита. Детальное строение структур клещей изучали Xu Jing и соавторы [94], которые также отметили способность ротового аппарата и конечностей закрепляться в тканях и разрушать их. Изучение слоев экзоскелета *Demodex spp.* проводили и другие ученые [115, 117]. В своих работах они выявили наличие дополнительного слоя экзоскелета (под поверхностным слоем), представленного твердыми гранулами, ряд мышечных клеток а также бактерий, обитающих на поверхности взрослых особей. В 2014 году Jarmuda S. и соавторы [70] обнаружили бациллярные антигены в ПЦР фрагменте, содержащие 299 пар нуклеотидов. В этом исследовании мы получили схожие результаты, получив специфичные к роду *Bacillus* праймеры.

Таким образом, механическая травматизация структурных элементов барьера кожи ротовым аппаратом и конечностями объясняет наличие местной тканевой реакции, а также дальнейшее фиброзирование участков барьера. В то же время клещи *Demodex spp.* являясь переносчиками антигенов бактерий, могут способствовать их распространению в более глубокие компоненты кожного барьера.

## 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 человека. Это сопровождается полиморфноядерной инфильтрацией сально-волосяных комплексов, активацией пролиферативных процессов, снижением толщины коллагеновых волокон дермы, гипертрофией сальных желез, дезорганизацией базальных мембран, нарушением проницаемости гемокapилляров 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.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Разработанная 3D-модель гистогематического барьера кожи человека может быть использована для исследования новых препаратов в рамках подходов персонализированной медицины, а также в практике преподавания курсов «Гистология, цитология, эмбриология» для объяснения механизма взаимоотношений компонентов ГГБК с внешними и внутренними факторами.

Способ сохранения жизнеспособности клещей *Demodex spp.* также может быть использован для возможного дальнейшего научного поиска, в том числе создания новых лекарственных препаратов с целью разработки терапевтических подходов в лечении дерматитов, ассоциированных клещами рода *Demodex spp.*

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

- АТФ – аденозинтрифосфат  
ГГБ – гистогематический барьер  
ГГБК – гистогематический барьер кожи  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
ИГХ – иммуногистохимия  
ИЛ – интерлейкин  
ИРИ – иммунорегуляторный индекс  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
РВСТ – рыхлая волокнистая соединительная ткань  
СТ – 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*  
HLA-DR+ – человеческий лейкоцитарный антиген DR изотип  
Ig – иммуноглобулин  
ММР – металлопротеиназа  
НК – естественные киллеры  
ТН – Т-хелперы  
TLR – толл-подобные рецепторы  
TNF- $\alpha$ /ФНО $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абдухаликова, М. Л. Морфометрическая оценка эффективности терапии акне системным изотретиноином в форме LIDOSE / М. Л. Абдухаликова, И. О. Малова // Вестник дерматологии и венерологии. – 2016. – Т. 92. – № 1. – С. 99-104.
2. Адаскевич, В. П. Периоральный дерматит: клиническая картина, диагностика, лечение / В. П. Адаскевич // Приложение к журналу Consilium medicum. – 2008. – № 1. – С. 17-20.
3. Багрец, А.Н. Роль локального стероидогенеза в регуляции пролиферации себоцитов при акне : дис. ... канд. мед. наук : 14.01.10 / Багрец Анна Николаевна ; Уральский научно-исследовательский институт дерматовенерологии и иммунопатологии. – Красноярск, 2014. – 100 с.
4. Белоусова, Н. Ю. Демодекс vs человек (обзор литературы) / Н. Ю. Белоусова, Т. И. Полтанова // Уральский медицинский журнал. – 2019. – № 12(180). – С. 126-132.
5. Бутов, Ю. С. Факторы успешной колонизации клещами *Demodex spp.* кожи человека / Ю. С. Бутов, О. Е. Акилов // Вестник последипломного медицинского образования. – 2002. – № 1. – С. 87.
6. Вартанян, А.А. Влияние комбинированной наружной терапии больных акне на морфологические и функциональные изменения кожи : авторефер. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.10 / Вартанян Алла Альбертовна ; Первый моск. гос. мед. ун-т. им. И. М. Сеченова. – Москва, 2012. – 24 с.
7. 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.
8. Возможности и перспективы оценки иммунной системы кожи / Е. В. Мельникова, Я. А. Юцковская, Н.Б. Метляева [и др.] // Медицинская иммунология. – 2005. – Т. 7. – № 2-3. – С. 262.

9. Гаврилова, Н. А. Тромбидиформные клещи и болезни, вызываемые ими / Н. А. Гаврилова // *VetPharma*. – 2013. – № 1(12). – С. 82-85.
10. 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, лауреата Государственной премии Республики Беларусь, профессора Петра Иосифовича Лобко. В 2 ч. – 2019. – Ч. 2. – С. 63-66.
11. Губина-Вакулик, Г. И. Патогенетическая терапия акне и патоморфологические аспекты изменений кожи в процессе саногенеза / Г. И. Губина-Вакулик, И. М. Бронова // *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник української медичної стоматологічної академії*. – 2017. – Т. 17. – № 2(58). – С. 98-107.
12. Дворянкова, Е. В. Особенности психоэмоционального статуса у дерматологических больных / Е. В. Дворянкова, М. В. Горячкина, З. Э. Рагимова // *Экспериментальная и клиническая дерматокосметология*. – 2007. – № 3. – С. 52-55.
13. Дерматозы лица: клиничко-патогенетические и иммунологические аспекты / А. Д. Юцковский, Я. А. Юцковская, Н. В. Кусая [и др.] // *Pacific Medical Journal*. – 2008. – № 3. – С. 78-82.
14. Долматова, Л. Е. Место и роль дрожжеподобных грибов в развитии угревой болезни / Л. Е. Долматова, С. Н. Рахманова, А. Д. Юцковский // *Вестник дерматовенерологии, косметологии и сексопатологии*. – 2008. – № 2. – С. 17-20.
15. Иммуноморфологическая характеристика папул и пустул при угрях обыкновенных / А. И. Новиков, В. А. Охлопков, А. В. Губарева [и др.] // *Омский научный вестник*. – 2008. – № 1(65). – С. 78-81.
16. Канюков, В. Н. Демодекоз глаз: проблемы и пути решения / В. Н. Канюков, В. К. Банников, Е. К. Мальгина // *Офтальмохирургия*. – 2015. – № 1. – С. 48-52.

17. Кусая, Н. В. Показатели уровня цитокинов при демодекозе / Н. В. Кусая, Н. Б. Метляева, Я. А. Юцковская // *Фундаментальные исследования*. – 2006. – № 9. – С. 51.
18. Лавриненко, М. В. Современные представления о биологии, эпидемиологии, патогенезе и клинике демодекоза / М. В. Лавриненко, Ж. А. Ревенко // *Клиническая инфектология и паразитология*. – 2013. – № 4 (07). – С. 118-126.
19. Мяделец, О. Д. Клеточные механизмы барьерно-защитных функций кожи и их нарушения при кожной патологии / О. Д. Мяделец. – Витебск : Издательство Витебского государственного медицинского университета, 2000. – 283 с. – ISBN 985-6461-08-1.
20. Мяделец, О. Д. Морфофункциональная дерматология : руководство / О. Д. Мяделец, В. П. Адашкевич. – Москва : Медицинская литература, 2006. – 734 с. – ISBN 9785896770633.
21. Мяделец, О. Д. Основы частной гистологии : пособие / О. Д. Мяделец. – Москва : Медицинская книга ; Нижний Новгород : НГМА, 2002. – 374 с. – ISBN 5-86093-090-9.
22. Ноздрин, В. И. Возрастные изменения эпидермиса кожи волосистой части головы у мужчин / В. И. Ноздрин, М. В. Горелова, Т. А. Белоусова // *Морфология*. – 2011. – Т. 139. – № 1. – С. 74-81.
23. Ноздрин, В. И. Гистофизиология кожи / В. И. Ноздрин, С. А. Барашкова, В. В. Семченко. – Омск : Омская областная типография, 2008. – 280 с. – ISBN 5-87367-056-0.
24. Особенности биологии *Demodex folliculorum* и его распространение среди населения городов Макеевка и Донецк / Е. Н. Маслодудова, Е. Н. Макарова, Т. Л. Бурым, Е. В. Семенова // *Проблемы экологіїта охорони природи техногенного регіону*. – 2010. – № 1(10). – С. 133.
25. Пустовая, К. Н. 3D-модель гистогематического барьера кожи для изучения локализации клещей рода *Demodex spp.* у человека / К. Н. Пустовая, В. И. Ноздрин // *Материалы Международной научной конференции посв. 75-летнему*

юбилею Государственного Медицинского и Фармацевтического Университета им. Николае Тестемицану Республики Молдова. – Кишинёв, 2020. – С. 164-166.

26. Пустовая, К. Н. Влияние температуры на продолжительность жизни клещей рода *Demodex* spp. in vitro / К. Н. Пустовая, В. И. Ноздрин // В сборнике : Ретиноиды. Альманах. АО "Ретиноиды". Фармацевтическое научно-производственное предприятие. Московская область. – 2021. – Т. 36. – С. 79-81.

27. Пустовая, К. Н. Влияние факторов внешней среды на жизнеспособность клещей рода *Demodex* spp. / К. Н. Пустовая, В. И. Ноздрин // Сборник трудов 15 Международной конференции дерматовенерологов и косметологов «Синтез науки и практики» International Forum of Dermatovenereologists and Cosmetologists «Synthesis of Science and Practice». – 2022. – С. 63.

28. Пустовая, К. Н. Возможность использования метода дерматоскопии для оценки эффективности лечения некоторых фациальных дерматозов / К. Н. Пустовая, В. И. Ноздрин // В сборнике : Ретиноиды. Альманах. АО "Ретиноиды". Фармацевтическое научно-производственное предприятие. Московская область. – 2021. – Т. 36. – С. 70-75.

29. Пустовая, К. Н. Иммунорегуляторный индекс у пациентов с акнеформными дерматозами, осложненными клещами рода *Demodex* spp. / К. Н. Пустовая, В. И. Ноздрин // Вестник последипломного медицинского образования. – 2020. – № 3. – С. 29-32.

30. Пустовая, К. Н. Клещи *Demodex* spp. у человека / О. В. Калинина, К. Н. Пустовая, В. И. Ноздрин // Альманах «Ретиноиды». – 2019. – Т. 35. – С. 9-16.

31. Пустовая, К. Н. Клещи рода *Demodex* spp. Причина или сопутствие некоторым заболеваниям кожи / К. Н. Пустовая, В. И. Ноздрин // В сборнике : Ретиноиды. Альманах. АО "Ретиноиды". Фармацевтическое научно-производственное предприятие. Московская область. – 2021. – Т. 36. – С. 27-39.

32. 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.

33. 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 международным участием : сборник тезисов // Дерматология в России. – 2021. – 1 (S1). – С. 30.

34. Пустовая, К. Н. Подвижность клещей рода *Demodex* spp. в анаэробных условиях *in vitro* / К. Н. Пустовая, В. И. Ноздрин // В сборнике : Ретиноиды. Альманах. АО "Ретиноиды". Фармацевтическое научно-производственное предприятие. Московская область. – 2021. – Т. 36. – С. 78-79.

35. Пустовая, К. Н. Подвижность клещей рода *Demodex* spp. в естественной питательной среде *in vitro* / К. Н. Пустовая, В. И. Ноздрин // В сборнике : Ретиноиды. Альманах. АО "Ретиноиды". Фармацевтическое научно-производственное предприятие. Московская область. – 2021. – Т. 36. – С. 81-82.

36. Пустовая, К. Н. Подвижность клещей рода *Demodex* spp. в условиях светового раздражителя *in vitro* / К. Н. Пустовая, В. И. Ноздрин // В сборнике : Ретиноиды. Альманах. АО "Ретиноиды". Фармацевтическое научно-производственное предприятие. Московская область. – 2021. – Т. 36. – С. 77-78.

37. Пустовая, К. Н. Подвижность клещей рода *Demodex* spp. при добавлении щёлочи *in vitro* / К. Н. Пустовая, В. И. Ноздрин // В сборнике : Ретиноиды. Альманах. АО "Ретиноиды". Фармацевтическое научно-производственное предприятие. Московская область. – 2021. – Т. 36. – С. 76-77.

38. Пустовая, К. Н. Сравнительное исследование акарицидного влияния препарата Д-18 на клещей *Demodex* spp. canis и *Demodex* spp. folliculorum *in vitro* / К. Н. Пустовая, Г. А. Пьявченко, В. И. Ноздрин // Вестник последипломного медицинского образования. – 2019. – № 2. – С. 25-29.

39. Рогов, Ю. И. Присутствие демодекса в кожных биопсиях человека / Ю. И. Рогов, Ю. А. Кузьменко-Москвина // В сборнике : Сахаровские чтения 2017 года: экологические проблемы XXI века материалы 17-й международной научной

конференции в 2-х частях ; под общей редакцией С. А. Маскевича, С. С. Позняка. – Информационно-вычислительный центр Министерства финансов Республики Беларусь, 2017. – С. 208-209.

40. Роль иммунных нарушений в патогенезе демодекоза кожи / Ю. С. Бутов, О. Е. Акилов, И. А. Власова, С. В. Казанцева // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2003. – № 3. – С. 65-68.

41. Роль матриксных металлопротеиназ в воспалении при акне: патогенез, диагностика, лечение, прогноз / А. Р. Назаренко, Н. Н. Потекаев, А. Н. Львов [и др.] // Медицинский алфавит. – 2021. – № 9. – С. 24-28.

42. Росин, Я. А. Учение Л. С. Штерн о гистогематических барьерах. Гистогематические барьеры и нейрогуморальная регуляция / Я. А. Росин. – Москва : Наука, 1981. – 314 с.

43. Самгин, М. А. Новое в патогенезе и местной терапии угревой сыпи / М. А. Самгин, С. А. Монахов // Вестник дерматологии и венерологии. – 2003. – № 2. – С. 31-33.

44. Свирцевская, Е. В. Актуальные вопросы патогенеза и терапии розацеа / Е. В. Свирцевская, Е. В. Матушевская, Ю. И. Матушевская // Клиническая дерматология и венерология. – 2017. – Т. 16. – № 4. – С. 4-13.

45. Себорейный дерматит: патогенетические аспекты, клинические формы и терапия больных / Л. А. Юсупова, Е. И. Юнусова, З. Ш. Гараева [и др.] // Лечащий врач. – 2019. – № 8. – С. 48-51.

46. Современные представления о патогенезе, особенностях клинической картины, диагностике и терапевтической тактике вульгарных акне у детей и подростков / Е. Р. Аравийская, Н. Н. Мурашкин, Л. С. Намазова-Баранова, Р. А. Иванов // Вопросы современной педиатрии. – 2020. – Т. 19. – № 6. – С. 408-419.

47. Солнцева, В. К. Особенности микробиоценоза кожи в норме и при распространенных хронических дерматозах / В. К. Солнцева, А. С. Быков // Альманах клинической медицины. – 1999. – № 2. – С. 420-423.

48. Состояние системы гемостаза и показателей иммунитета у больных розацеа / М. В. Черкасова, Ю. В. Сергеев, Е. В. Лобанова [и др.] // Вестник дерматологии и венерологии. – 1999. – № 6. – С. 28-30.

49. Состояние Т-системы иммунитета у пациентов с диагнозами «розацеа», «угревая болезнь» и «периоральный дерматит» / К. Н. Пустовая, Г. А. Пьявченко, М. М. Сморгачев, В. И. Ноздрин // Рахмановские чтения. Современная дерматовенерология и междисциплинарные связи. XXXVII Научно-практическая конференция с международным участием : сборник тезисов / сост. Н. Г. Кочергин. – Москва : Практическая медицина. – 2020. – С. 64-66.

50. Структурные и морфометрические параметры эпидермиса и дермы при себорейном дерматите и себорейной алопеции / Е. И. Теддер, С. Л. Кашутин, Л. Л. Шагров [и др.] // Морфологические ведомости. – 2018. – Т. 26.– № 3.– С. 23-26.

51. Сундеева, Е. А. Влияние продуктов обмена клещей рода *Demodex* на функциональную активность клеток крови в опытах *in vitro* / Е. А. Сундеева, Ф. Ф. Ягофаров, Т. М. Беляева // Медицина Кыргызстана. – 2014. – № 2-1. – С. 112-113.

52. Уровень локальной продукции цитокинов в клинике традиционного лечения демодекозного блефарита и в условиях использования криотерапии век / А. Н. Стеблюк, Н. В. Колесникова, В. Э. Гюнтер [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. – 2017. – Т. 24. – № 6. – С. 129-133.

53. Федотов, В. П. Очерки по иммунокоррекции в дерматовенерологии: пособие для врачей / В. П. Федотов, С. Б. Рыбалкин, М. Г. Романцов. – Санкт-Петербург : ООО «Тактик-Студио», 2005. – 78 с. – ISBN: 5-94542-154-5.

54. Чупров, А. Д. Современный взгляд зарубежных авторов на диагностику и лечение блефаритов демодекозной этиологии / А. Д. Чупров, Е. К. Мальгина // Практическая медицина. – 2018. – № 3(114). – С. 200-203.

55. Юрина, Н. А. Макрофагическая система / Н. А. Юрина, А. И. Радостина. – Москва : Издательство Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, 1978. – 90 с.

56. Юцковский, А. Д. Особенности иммунного статуса у пациентов с демодекозом кожи / А. Д. Юцковский, Я. А. Юцковская, Н. В. Кусая // *Terra Medica*. – 2011. – №3-4. – С. 33-36.
57. A study on *Demodex spp. folliculorum* mite density and immune response in patients with facial dermatoses / S. O. el-Bassiouni, J. A. Ahmed, A. I. Younis, [et al.] // *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. – 2005. – Vol. 35. – № 3. – P. 899-910.
58. Abd-El-Al, A. M. A study on *Demodex folliculorum* in rosacea / A. M. Abd-El-Al, A. M. Bayoumy, E. A. Abou Salem // *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. – 1997. – Vol. 27. – № 1. – P. 183-195.
59. Activation of neutrophils via IP3 pathway following exposure to *Demodex*-associated bacterial proteins / F. McMahon, N. Banville, D. A. Bergin, [et al.] // *Inflammation*. – 2016. – Vol. 39. – № 1. – P. 425-433.
60. Adaskevich, V. P. Clinical efficacy and immunoregulatory and neurohumoral effects of mm therapy in patients with atopic dermatitis / V. P. Adaskevich // *Critical Reviews in Biomedical Engineering*. – 2000. – Vol. 28. – № 5-6. – P. 11-21.
61. Afanasjev, Y. I. Effect of a hypervitaminosis on the lymphocyte count / Y. I. Afanasjev, V. I. Nosdrin // *Folia morphologica*. – 1980. – Vol 28. – № 3. – P. 294-297.
62. Akbulatova, L. Kh. Demodicidosis in man / L. Kh. Akbulatova // *Vestnik Dermatologii i Venerologii*. – 1963. – № 38. – P. 34-42. (In Russian).
63. Akne vulgaris etyopatogenezinde *D. folliculorum*'ların rolünün araştırılması / V. Baysal, M. Aydemir, B. Yorgancıgil, M. Yıldırım // *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. – 1997. – № 21. – P. 265-268.
64. Atrophic acne scar: a process from altered metabolism of elastic fibres and collagen fibres based on transforming growth factor- $\beta$ 1 signalling / J. Moon, J. Y. Yoon, J. H. Yang, [et al.] // *British Journal of Dermatology*. – 2019. – Vol. 181. – № 6. – P. 1226-1237.
65. Aylesworth, R. *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis* in cutaneous biopsies / R. Aylesworth, J. C. Vance // *Journal of the American Academy of Dermatology*. – 1982. – Vol. 7. – № 5. – P.583-589.

66. Ayres, S. Rosacea-like demodicidosis / S. Ayres // *California Medicine*. – 1963. – Vol. 98. – № 6. – P. 328-330.
67. Bonnar, E. The Demodex mite population in rosacea / E. Bonnar, P. Eustace, F. Powell // *Journal of the American Academy of Dermatology*. – 1993. – № 28. – P. 443-448.
68. Chen, W. Human demodicosis: revisit and a proposed classification / W. Chen, G. Plewig // *British Journal of Dermatology*. – 2014. – Vol. 170. – № 6. – P. 1219-1225.
69. Chitin modulates innate immune responses of keratinocytes / B. Koller, A. S. Muller-Wiefel, R. Rupec, [et al.] // *Public Library of Science*. – 2011. – Vol. 6. – № 2. – P. 16594.
70. Correlation between serum reactivity to Demodex-associated Bacillus oleronius proteins, and altered sebum levels and Demodex populations in erythematotelangiectatic rosacea patients / S. Jarmuda, F. McMahon, R. Żaba, [et al.] // *Journal of Medical Microbiology*. – 2014. – Vol. 63. – № 2. – P. 258-262.
71. Delfos, N. M. Demodex folliculitis: a skin manifestation of immune reconstitution disease / N. M. Delfos, A. F. Collen, F. P. Kroon // *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. – 2004. – Vol. 18. – № 4. – P. 701-702.
72. Demodectic infestation of the pilosebaceous follicle / C. Crosti, S. Menni, F. Sala, R. Piccinno // *Journal of cutaneous pathology*. – 1983. – Vol. 10. – № 4. – P. 257-261.
73. Demodex: a skin resident in man and his best friend / R. Foley, P. Kelly, S. Gatault, F. Powell // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. – 2020. – Vol. 35. – № 1. – P. 62-72.
74. Demodex folliculitis on the trunk of a patient with mycosis fungoides / T. Nakagawa, M. Sasaki, K. Fujita, [et al.] // *Clinical and Experimental Dermatology*. – 1996. – № 21. – P. 148-150.
75. Demodex folliculorum and Demodex brevis as a cause of chronic marginal blepharitis / D. Czepita, W. Kuźna-Grygiel, M. Czepita, A. Grobelny // *Annales Academiae Medicae Stetinesis*. – 2007. – Vol. 53. – № 1. – P. 63-67.

76. Demodex in an aerobic environment on the eyelashes / A. K. Nath, D. K. Timshina, D. M. Thappa, R. Sinclair // *Australasian Journal of Dermatology*. – 2012. – Vol. 53. – № 2. – P. 159-160.
77. Desch, C. *Demodex folliculorum* (Simon) and *D. brevis* (Akbulatova) of man: redescription and reevaluation / C. E. Desch, W. B. Nutting // *Journal of Parasitology*. – 1972. – Vol. 5. – № 1. – P. 169-177.
78. Discrimination between *Demodex folliculorum* (Acari: Demodicidae) isolates from China and Spain based on mitochondrial *cox1* sequences / Y. E. Zhao, J. X. Ma, H. Li, [et al.] // *Journal of Zhejiang University Science B*. – 2013. – Vol. 14. – № 9. – P. 829-836.
79. Elston, C. A. *Demodex* mites / C. A. Elston, D. M. Elston // *Clinics in Dermatology*. – 2014. – Vol. 32. – № 6. – P. 739-743.
80. Endosymbiosis and its significance in dermatology / K. Kubiak, H. Sielawa, W. Chen, E. Dzika // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. – 2018. – Vol. 32. – № 3. – P. 347-354.
81. Expression of inflammatory and fibrogenetic markers in acne hypertrophic scar formation: focusing on role of TGF- $\beta$  and IGF-1R / J. H. Yang, J. Y. Yoon, J. Moon, [et al.] // *Archives of Dermatological Research*. – 2018. – Vol. 310. – № 8. – P. 665-673.
82. Facial demodicosis / K. Zomorodian, M. Geramishoar, F. Saadat, [et al.] // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. – 2004. – № 14. – P. 121-122.
83. First report of palpebral conjunctival inflammatory nodule associated with *Demodex* species / Y. Li, G. E. Kim, K. C. Yoon, W. Choi // *Indian Journal of Ophthalmology*. – 2018. – Vol. 66. – № 9. – P. 1365-1367.
84. Forton, F. *Démodex* et inflammation périfolliculaire chez l'homme: revue et observation de 69 biopsies [Demodex and perifollicular inflammation in man: review and report of 69 biopsies] / F. Forton // *Annales de Dermatologie et de Venereologie*. – 1986. – Vol. 113. – № 11. – P. 1047-1058.

85. Franklin, C. D. Demodex infestation of oral mucosal sebaceous glands / C. D. Franklin, J. C. Underwood // *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology*. – 1986. – Vol. 61. – № 1. – P. 80-82.
86. Furue, K. Detailed visualization of Demodex spp. mites by Dylon staining / K. Furue, M. Furue, M. Furue // *Pathology, research and practice*. – 2019. – Vol. 215. – № 6. – P. 152421.
87. Gothe, R. Demodicosis of dogs – a factorial disease? / R. Gothe // *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*. – 1989. – № 102. – P. 293-297.
88. Histopathological Analysis of 226 patients with rosacea according to rosacea subtype and severity / W. J. Lee, J. M. Jung, Y. J. Lee, [et al.] // *The American Journal of Dermatopathology*. – 2016. – Vol. 38. – № 5. – P. 347-352.
89. Human Permanent Ectoparasites. Recent Advances on Biology and Clinical Significance of Demodex Mites: Narrative Review Article / D. Litwin, W. Chen, E. Dzika, J. Korycinska // *Iranian Journal of Parasitology*. – 2017. – Vol. 12. – № 1. – P. 12-21.
90. Immunohistochemical investigation of evolving inflammation in lesions of acne vulgaris / A. M. Layton, C. Morris, W. J. Cunliffe, E. Ingham // *Experimental Dermatology*. – 1998. – Vol. 7. – № 4. – P. 191-197.
91. Inflammatory events are involved in acne lesion initiation / A. H. Jeremy, D. B. Holland, S. G. Roberts, [et al.] // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2003. – Vol. 121. – № 1. – P. 20-27.
92. Jacob, S. Treatment of Demodex. Associated Inflammatory Skin Conditions: A Systematic Review / S. Jacob, M. A. VanDaele, J. N. Brown // *Dermatologic Therapy*. – 2019. – Vol. 32. – № 6. – P. 13103.
93. Jarmuda, S. Potential role of Demodex mites and bacteria in the induction of rosacea / S. Jarmuda, Z. Adamski, R. Żaba // *Journal of Medical Microbiology*. – 2012. – № 61. – P. 1504-1510.
94. Jing, X. Environmental scanning electron microscopy observation of the ultrastructure of Demodex / X. Jing, G. Shuling, L. Ying // *Microscopy Research and Technique*. – 2005. – Vol. 68. – № 5. – P. 284-289.

95. Kairinen, E. O. Scanning electron microscopy of skin replicas showing demodectic infestation of the pilosebaceous follicle / E. O. Kairinen, E. Kaszynski // *Journal of Cutaneous Pathology*. – 1984. – Vol. 11. – № 2. – P. 103-106.
96. Lacey, N. Under the lash: Demodex mites in human diseases / N. Lacey, K. Kavanagh, S. C. Tseng // *Biochemical Journal*. – 2009. – Vol. 31. – № 4. – P. 2-6.
97. Mite-related bacterial antigens stimulate inflammatory cells in rosacea / N. Lacey, S. Delaney, K. Kavanagh, F. C. Powell // *British Journal of Dermatology*. – 2007. – Vol. 157. – № 3. – P. 474-481.
98. Murillo, N. Microbiota of Demodex mites from rosacea patients and controls / N. Murillo, J. Aubert, D. Raoult // *Microbial Pathogenesis*. – 2014. – № 71-72. – P. 37-40.
99. Norgan, A. P. Parasitic Infections of the Skin and Subcutaneous Tissues / A. P. Norgan, B. S. Pritt // *Advances in Anatomic Pathology*. – 2018. – Vol. 25. – № 2. – P. 106-123.
100. Pawlina, W. Functional considerations: Skin Color In Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology. Eighth Edition / W. Pawlina, M. H. Ross. – Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2019. – 928 p. – ISBN: 9781975115364.
101. Perrigouard, C. Étude histologique et immunohistochimique des anomalies vasculaires et inflammatoires de la rosacée / C. Perrigouard, B. Peltre, B. Cribier // *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*. – 2013. – Vol. 140. – № 1. – P. 21-29.
102. Plewig, G. Plewig and Kligman's Acne and Rosacea / G. Plewig, B. Melnik, W. Chen. – Springer Cham, 2019. – 671 p. – ISBN 978-3-319-49273-5.
103. Quantitative Analysis of the Bacteria in Blepharitis With Demodex Infestation / M. Zhu, C. Cheng, H. Yi, [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – № 9. – P. 1719.
104. Rousselle, P. The basement membrane in epidermal polarity, stemness, and regeneration / P. Rousselle, C. Laigle, G. Rousselet // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 2022. – Vol. 323. – № 6. – P. 1807-1822.

105. Rufli, T. T-cell subsets in rosacea lesions and the possible role of *Demodex folliculorum* / T. Rufli, S. A. Buchner // *Dermatologica*. – 1984. – Vol. 169. – № 1. – P. 1-5.
106. Sengbusch, H. G. Prevalence of hair follicle mites, *Demodex folliculorum* and *D. brevis* (Acari: Demodicidae), in a selected human population in western New York, USA / H. G. Sengbusch, J. W. Hauswirth // *Journal of Medical Entomology*. – 1986. – Vol. 23. – № 4. – P. 384-388.
107. Sharma, Y. K. Human *Demodex* mite: The versatile mite of dermatological importance / Y. K. Sharma, A. Gupta // *Indian Journal of Dermatology*. – 2014. – Vol. 59. – № 3. – P. 302.
108. Shimabukuro, Y. Interferon-gamma-dependent immunosuppressive effects of human gingival fibroblasts / S. Murakami, H. Okada // *Immunology*. – 1992. – Vol. 76. – № 2. – P. 344-347.
109. Simon, G. Ueber eine in den kranken und normalen Haarsicken des Menschen lebende Milbe / G. Simon // *Archiv für Anatomie, Physiologie und Wissenschaftliche Medizin*. – 1842. – P. 218-237.
110. Sociodemographic characteristics and risk factor analysis of *Demodex* infestation (Acari: Demodicidae) / Y. E. Zhao, N. Guo, M. Xun, [et al.] // *Journal of Zhejiang University Science B (Biomed & Biotechnol)*. – 2011. – Vol. 12. – № 12. – P. 998-1007.
111. Streilein, J. W. Circuits and signals of the skin-associated lymphoid-tissue (SALT) / J. W. Streilein // *Journal of Investigative Dermatology*. – 1985. – Vol. 85. – № 1. – P. 10-13.
112. Tatu, A. L. *Demodex folliculorum* associated *Bacillus pumilus* in lesional areas in rosacea / A. L. Tatu, M. A. Ionescu, V. C. Cristea // *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*. – 2017. – Vol. 83. – № 5. – P. 610-611.
113. The dog mite, *Demodex canis*: prevalence, fungal co-infection, reactions to light, and hair follicle apoptosis / Y. J. Tsai, W. C. Chung, L. C. Wang, [et al.] // *Journal of Insect Science*. – 2011. – № 11. – P. 76.

114. The effects of sebum configuration on *Demodex* spp. density / H. G., Demirdağ, H. Özcan, Ş. Gürsoy, G. B Akbulut // Turkish Journal of Medical Sciences. – 2016. – Vol. 46. – № 5. – P. 1415-1421.
115. The presence of the parasite *Demodex folliculorum* on the skin surface of the eyelid / F. P. English, G. W. Zhang, D. P. McManus, F. A. Horne // Australian and New Zealand Journal Ophthalmology. – 1991. – Vol. 19. – № 3. – P. 229-234.
116. The role of skin immune system in acne / E. Firlej, W. Kowalska, K. Szymaszek, [et al.] // Journal of Clinical Medicine. – 2022. – Vol. 11. – № 6. – P. 1579.
117. The vector potential of *Demodex folliculorum* / F. P. English, T. Iwamoto, R. W. Darrell, A. G. DeVoe // Archives of Ophthalmology. – 1970. – Vol. 84. – № 1. – P. 83-85.
118. Wilson, B. B. Papular acne scars a common cutaneous finding / B. B. Wilson, C. H. Dent, P. H. Cooper // Archives of Dermatological Research. – 1990. – Vol. 126. – № 6. – P. 797-800.
119. Zeytun, E. Prevalence and Load of *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis* (Acari: Demodicidae) in patients with chronic blepharitis in the province of Erzincan, Turkey / E. Zeytun, Y. Karakurt // Journal of Medical Entomology. – 2018. – Vol. 56. – № 1. – P. 2-9.
120. Zhao, Y. E. Influence of temperature and medium on viability of *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis* (Acari: Demodicidae) / Y. E. Zhao, N. Guo, L. P. Wu // Experimental and Applied Acarology. – 2011. – Vol. 54. – № 4. – P. 421-425.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

Приложение А – патент на изобретение №2732602 «Способ сохранения жизнедеятельности клещей рода *Demodex* spp. для проведения акарограммы и оценки подвижности взрослых особей» (Рисунок А.1). Изобретение относится к паразитологии, в частности, к дерматологии, и может быть использовано для сохранения жизнедеятельности клещей рода *Demodex* spp. для проведения акарограммы. Для этого человеку необходимо отказаться от умывания на протяжении 1-2 суток, исключая любые очищающие средства для взятия соскобов. Содержимое соскоба кожи пораженных областей получают с помощью скальпеля вместе сальными железами и роговыми клетками эпидермиса в вечернее время в период активности паразита и наносят его на предметное стекло тонким слоем, в условиях комнатной температуры (от +20°C до +25°C), отсутствии световых и химических раздражителей, с доступом кислорода, что способствует выживаемости взрослых особей до 7 суток (Рисунок А.2). Техническим результатом изобретения, является способ сохранения жизнедеятельности клещей рода *Demodex* spp., применяемый для дальнейшего исследования их жизнеспособности при воздействии различных лекарственных препаратов и субстанций, с учетом акарограммы и оценки их подвижности. Оценка подвижности клещей рода *Demodex* spp. проверяется в процессе проведения диагностических процедур, где составляется акарограмма. При акарограмме определяются 5 стадий развития клещей, при оценке подвижности определяется ее степень: + - слабая степень подвижности; ++ - средняя степень подвижности; +++ - сильная степень подвижности.

Авторы: *Пустовая Кристина Николаевна (RU), Пьявченко Геннадий Александрович (RU), Арисов Михаил Владимирович (RU), Ноздрин Владимир Иванович (RU)*



Рисунок А.1 – Патент на изобретение №2732602 «Способ сохранения жизнедеятельности клещей рода Demodex spp. для проведения акарограммы и оценки подвижности взрослых особей»

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(19) **RU** (11) **2 732 602** (13) **C1**(51) МПК  
*A01K 67/033* (2006.01)(12) **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**(52) СПК  
*A01K 67/033 (2020.05)*

(21)(22) Заявка: 2019138074, 26.11.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
26.11.2019Дата регистрации:  
21.09.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.11.2019

(45) Опубликовано: 21.09.2020 Бюл. № 27

Адрес для переписки:

117218, Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28,  
ФГБУ Всероссийский НИИ фундаментальной  
и прикладной паразитологии животных и  
растений - филиал ФГБУ "ФНЦ ВНИИ  
экспериментальной ветеринарии им. К.И.  
Скрябина и Я.Р. Коваленко"

(72) Автор(ы):

Пустовая Кристина Николаевна (RU),  
Пьявченко Геннадий Александрович (RU),  
Арисов Михаил Владимирович (RU),  
Ноздрин Владимир Иванович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
научное учреждение "Федеральный научный  
центр - Всероссийский  
научно-исследовательский институт  
экспериментальной ветеринарии им. К.И.  
Скрябина и Я.Р. Коваленко" (ФГБНУ ФНЦ  
ВИЭВ РАН) (RU),  
Акционерное общество фармацевтическое  
научно-производственное предприятие  
"Ретиноиды", АО "Ретиноиды" (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: ЛАВРИЕНКО М.В., и др.,  
Современные представления о биологии,  
эпидемиологии, патогенезе и клинике  
демодекоза, Клиническая инфектология и  
паразитология, N4 (07), с.118-126. DEMIRDAG.,  
et al., H G The effects of sebum configuration on  
Demodex spp.density. Turk J Med Sci, (2016) 46:  
1415-1421. СИРМАЙС Н.С. и др., Демодекоз:  
патогенетические аспекты (см. прод.)(54) Способ сохранения жизнедеятельности клещей рода *Demodex* для проведения акарограммы и оценки подвижности взрослых особей

## (57) Формула изобретения

Способ сохранения жизнедеятельности клещей рода *Demodex* для проведения акарограммы и оценки подвижности взрослых особей, включающий отказ пациента на 1-2 суток перед взятием соскоба от умывания, взятие с исключением любых очищающих средств соскоба кожи пораженных областей пациента с помощью скальпеля вместе с сальными железами и роговыми клетками эпидермиса, нанесение соскоба на предметное стекло тонким слоем, в условиях комнатной температуры от 20°C до +25°C при отсутствии световых и химических раздражителей, с доступом кислорода.

Стр. 1

RU 2732602 C1

RU 2732602 C1

(56) (продолжение):  
при различных дерматозах лица. Метод. пос. М: 2013; 26 с.

Рисунок А.2 – Формула изобретения к патенту (№2732602)

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Приложение Б – патент на промышленный образец №120631 «Макет гистогематического барьера кожи» (Рисунок Б.1). 3D модель ГГБК предназначена для студентов, ординаторов, аспирантов и специалистов, изучающих гистологию, а также дерматологию, косметологию и трихологию. Макет состоит из двух моделей. Модель №1 детально показывает компоненты ГГБК: сально-волосяной комплекс, рыхлую соединительную ткань и капилляры.

Модель №2 представляет собой сально-волосяной комплекс, состоящий из волоса, сальной железы и мышцы, поднимающей волос. На образце показан эпидермис, переходящий в наружное корневое эпителиальное влагалище, базальная мембрана, дерма и рыхлая соединительная ткань. Представлено мозговое и корковое вещество волоса, а также кутикула, которая его окружает и переходит в кутикулу внутреннего корневого эпителиального влагалища. Представляет интерес такая структура, как выпуклость волосяного фолликула, содержащая эпидермальные стволовые клетки, которые, мигрируя в эпителиальный матрикс эпидермиса и его придатков, отвечают за регенерацию волоса, внутреннего и наружного корневого эпителиального влагалищ. Волосяной фолликул окружает дермальное корневое влагалище, внутри которого находятся эндотелиальные клетки на базальной мембране. Вокруг фолликула располагаются нервные окончания, а капиллярная сеть переходит в дермальный сосочек волоса (Рисунок Б.2).

Автор(ы): *Пустовая Кристина Николаевна (RU); Ноздрин Константин Владимирович (RU); Костяева Маргарита Гурьевна (RU); Ноздрин Владимир Иванович (RU)*



Рисунок Б.1 – Патент на промышленный образец №120631 «Макет гистогематического барьера кожи»

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **120631** (51) МКПО 12 **19-07**

(15) Дата регистрации: 20.07.2020

(21) Номер заявки: 2019505747

(22) Дата подачи заявки: 18.12.2019

(24) Дата, с которой исчисляется срок действия патента: 18.12.2019

(45) Дата публикации: 20.07.2020 Эксп. № 8

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

**(12) СВЕДЕНИЯ О ПАТЕНТЕ НА ПРОМЫШЛЕННЫЙ ОБРАЗЕЦ**

<p>Приоритет(ы):</p> <p>(22) Дата подачи заявки: 18.12.2019</p> <p>(73) Патентообладатель(и): Акционерное общество Фармацевтическое научно-производственное предприятие «Ретиноиды» (RU)</p>	<p>(72) Автор(ы): Пустовая Кристина Николаевна (RU); Ноздри Константин Владимирович (RU); Костяева Маргарита Гурьевна (RU); Ноздри Владимир Иванович (RU)</p> <p>Адрес для переписки: 129090, Москва, Проспект Мира, д. 6, этаж 3, помещение XIV, комн. 14, ООО «Патентно-правовая фирма «ЮС»</p>
--	---

(54) МАКЕТ ГИСТОГЕМАТИЧЕСКОГО БАРЬЕРА КОЖИ  
(55) Макет гистогематического барьера кожи



RU 120631 S

Стр.: 1




RU 120631 S

Стр.: 2

Рисунок Б.2 – Сведения о патенте на промышленный образец

**БЛАГОДАРНОСТИ**

Пьявченко Г.А. за неоценимый вклад и поддержку, невероятное терпение и профессионализм.

Ноздрину В.И. за наставление на верный научный путь и бесконечную помощь и поддержку.

Ноздрину К.В. за поддержку смелых инициатив и полезные советы.

Арисову М.В., Сморгкову М.М., Соловьеву П.В. и Жук Ю.М. за помощь в проведении исследований и полезное обсуждение результатов.