

БІОФІЗИЧНІ ПІДХОДИ ДО МІКРОСКОПІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ДЕМОДИКОЗУ У ХВОРИХ НА РОЗАЦЕА

БІОФІЗИЧНІ ПІДХОДИ ДО МІКРОСКОПІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ДЕМОДИКОЗУ У ХВОРИХ НА РОЗАЦЕА – Висока оптична активність структурних компонентів збудника демоцикозу – кліща *Demodex folliculorum* покладена в основу високочутливого біофізичного методу на принципових засадах поляризованої флуоресценції.

БИОФИЗИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К МИКРОСКОПИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ ДЕМОДИКОЗА У БОЛЬНЫХ С РОЗАЦЕА – Высокая оптическая активность структурных компонентов возбудителя демоцикоза – клеща *Demodex folliculorum* положена в основу высокочувствительного биофизического метода на принципиальных основаниях поляризованной флуоресценции.

BIOPHYSICAL APPROACHES TO THE MICROSCOPIC DIAGNOSIS OF DEMODECOSIS IN PATIENTS WITH ROSACEA – High optical activity of the structural components of the pathogen demodexosis – *Demodex folliculorum* mite is the basis for highly sensitive biophysical method to fundamental principles of polarized fluorescence.

Ключові слова: демоцикоз, оптична активність, поляризована флуоресценція, мікроскопічна діагностика.

Ключевые слова: демоцикоз, оптическая активность, поляризованная флуоресценция, микроскопическая диагностика.

Key words: demodexosis, optical activity, polarized fluorescence, microscopic diagnosis.

ВСТУП Розацеа – одне з поширених дерматологічних захворювань із частотою стрівальності в популяції від 1 до 10 % [1, 2]. Даний дерматоз виникає за умови реалізації як ендогенних, так і екзогенних чинників. Із зовнішніх чинників, які сприяють і ускладнюють перебіг розацеа, на даний час має значення наявність супутньої інвазії кліщами роду *Demodex* [2–4]. Хоча вплив цих кліщів на перебіг дерматозу в ряду науковців викликає сумнів. Актуальність проблеми своєчасної діагностики демоцикозу зумовлена тенденцією поширення паразитозу, що не в останню чергу пов'язана із зниженням опірної здатності людського організму внаслідок зростання системного несприятливого впливу чинників довкілля [4–7]. З іншого боку, звертає увагу недостатній рівень методичного забезпечення лабораторно-діагностичного процесу перш за все у зв'язку [8–11] із особливостями структури збудника з притаманною йому низькою стабільністю тонких кутикулярних стінок і надзвичайно високою їх прозорістю до світла. Це відбувається, наприклад, у процесі формування нової особини у тілі попередника, завдяки тісному приляганню її оболонки до кутикули попередника, через що диференціювати зовнішній скелет нової особини вдається лише під час линьки кліщів. Нерідко саме це унеможливує за допомогою традиційної світлооптичної мікроскопії спостерігати за процесом формування кутикули прото- і дейтонімф в оболонці попередника. Вказані недоліки традиційної мікроскопічної діагностики демоцикозу, власне, й зумовили пошук чутливіх та інформативних методів мікроскопічного аналізу матеріалу від хворих на розацеа й супутній демоцикоз.

Метою дослідження стало підвищити точність та інформативність мікроскопічної діагностики демоцикозу в пацієнтів із розацеа на принципових засадах біофізичного методу дослідження, а саме поляризованої флуоресценції.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Під спостереженням перебувало 140 пацієнтів із розацеа, серед яких переважали жінки, їх було 116 (82,9 %), та 24 (17,1 %) чоловіки. Середній вік обстежених коливався в межах $33,2 \pm 1,1$. Хворі перебували на амбулаторному лікуванні в Тернопільському обласному шкірно-венерологічному диспансері та лікувальному центрі Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського. Діагноз супутнього демоцикозу встановлено за умови виявлення на 1 см^2 ураженої ділянки шкіри понад 5 особин *Demodex folliculorum* при мікроскопічному дослідженні патологічного матеріалу, який було взято з уражених ділянок шкіри хворих на розацеа [2].

Доцільність застосування методу люмінесцентної мікроскопії, зокрема на принципових засадах поляризованої флуоресценції, впливає із відомої здатності поляризованого світла взаємодіяти із оптично-активними біомакромолекулами [12]. Фізична сутність вказаної взаємодії, як відомо, виступає підосною досягнення високого рівня контрастності зображення біооб'єкта, зокрема тіла паразита, а отже, істотного підвищення точності та інформативності діагностичного методу в цілому. Хід дослідження в загальному випадку полягав у поміщенні на предметне скло відбитку на адгезивній оптично-прозорій плівці (скоч) з поверхні ураженої шкіри хворих на розацеа і візуалізації зображення у поляризованому світлі в полі. Певні зміни у методику аналізу вносили відповідно до конкретних завдань дослідження. Так, з метою визначення біоценозу шкіри у пацієнтів із розацеа поверхню шкіри зони ураження попередньо обробляли водним розчином пероксиду водню, на яку після підсихання здійснювали аплікацію скоча, який наступного дня знімали і досліджували в поляризаційному мікроскопі [12]. Вказаний методичний прийом застосовано при розробці й оцінці ефективності нового діагностичного на основі приманки у вигляді нанесеного на скоч моношару порошкоподібного субстрату кріоліофілізованої шкіри [13]. Іншим технічним рішенням аналогічного типу виконано діагностично спрямоване накопичення збудника демоцикозу – кліща на предметному склі, для чого на предметне скло під скоч із відбитком з епідермісу вводили 20–40 мкл свіжоцитратної крові пацієнта з розацеа. Діагностичний висновок про наявність демоцикозу робили за появою в мікропрепараті характерних підвищень, утворених вкритими моношаром цитратної крові тілами кліщів у вигляді “барханів”. Аналогічним чином вказаний прийом використано при вивченні характеру взаємодії із кліщами на предметному склі мікро- і наносфер кристалічного кремнію, а також ан-

тисептика декасану. Конкретно дослідження полягало у нанесенні на субстрат біоматеріалу на предметному склі 20–40 мкл водного розчину декасану в 0,02 % концентрації з наступною візуалізацією результатів у полі зору поляризаційного мікроскопа.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ Основним результатом проведених досліджень слід визнати встановлену нами високу оптичну активність структурних елементів тіла кліща, що проявляється вираженим рівнем контрастності флуоресценції збудника у поляризованому світлі (рис. 1). Наведена особливість набуває особливо важливого значення для діагностичних досліджень з огляду на нестійкість структури кліща за умов елімінації збудника з природних умов паразитування. При цьому типовий характер світіння і розташування паразита в площині мікропрепарату з характерними порожнинами довкола набуває значення специфічної диференційно-діагностичної ознаки (рис. 2).

Запропонований методичний прийом виявився базовим для вирішення низки науково-практичних завдань. Так, у результаті вивільнення атомарного кисню на шкірі пацієнта з розацеа й супутнім демодикозом внаслідок розкладу пероксиду водню істотно збільшився активний вихід на поверхню значної кількості кліщів, що було виявлено у відбитку на скочі поляризаційно-флуоресцентним методом.

Аналогічно високу чутливість запропонованої методики виявлено при дослідженні ефективності біоорганічної приманки – порошкоподібного субстрату кріоліофілізованої ксеногенної шкіри. Вказаний феномен проявився посиленою елімінацією із глибинних шарів шкірного покриву осіб з розацеа кліщів – збудників демодикозу. Останнє набуває відповідного значення не тільки в лікувальному, але й діагностичному аспектах.

На особливий інтерес заслуговують результати діагностичного дослідження наявності кліщів у біоматеріалі від хворого на розацеа (відбиток епідермісу) шляхом інкубації із свіжоцитратною кров'ю. Помітні під мікроскопом підвищення (рис. 3, А і Б), вкриті тонким шаром цитратної крові тіла кліщів у вигляді своєрідних “барханів”, набувають значення патогномонічних утворів.

Діагностично значимими виявилися результати дослідження взаємодії кліщів у відбитку епідермісу хворих на розацеа на предметному склі із мікро- і наносферами кристалічного кремнію. Встановлений цитодеструктивний вплив останніх при інкубації з кліщами проявляється, як видно на рисунках 4 та 5, деформацією поверхні тіла збудника паразитозу, особливо його кутикули, і може розглядатися не тільки з позицій діагностичного і лікувального використання, але й набуває значення високоінформативного інструменту дослідження, зокрема у сфері вивчення проблемних питань біонанотехнологій.

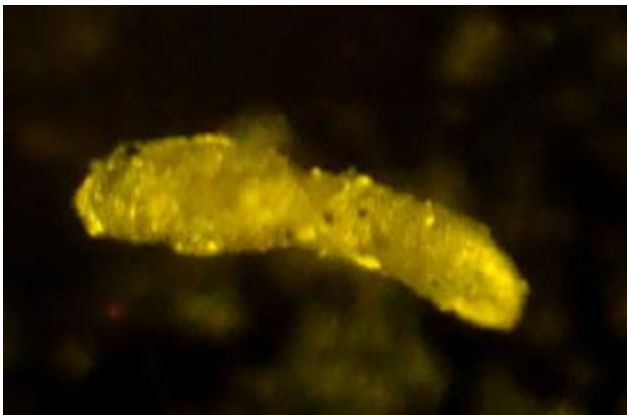


Рис. 1. Флуоресценція кліща у відбитку з епідермісу в поляризованому світлі. МС 200. х 400.

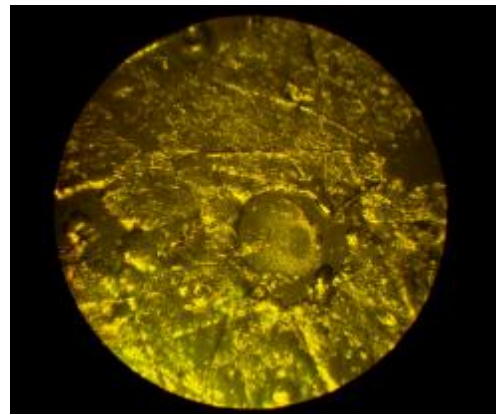
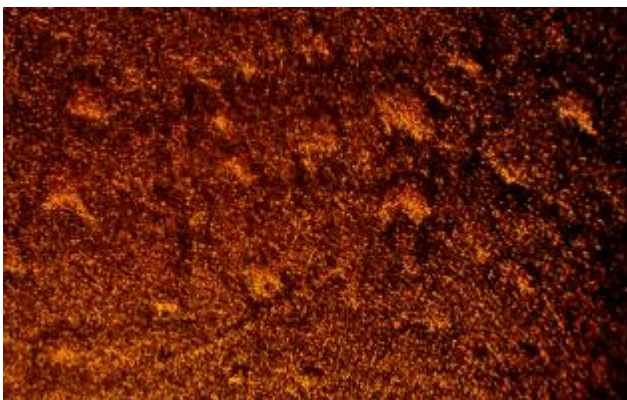
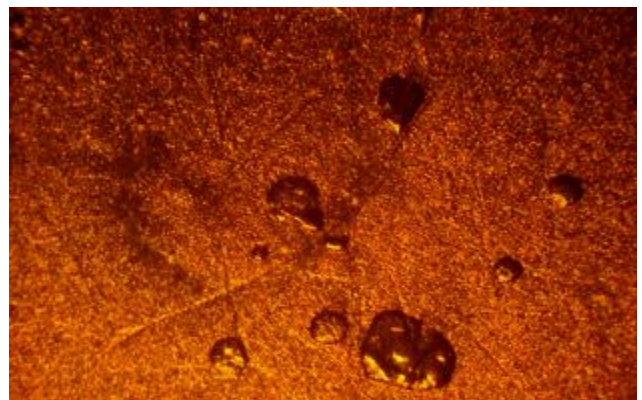


Рис. 2. Інтенсифікація виходу кліща на поверхню шкіри пацієнта внаслідок дії порошкоподібної біоорганічної приманки.



А



Б

Рис. 3. Цитотоксична (гемолітична) активність кліща *in vitro* через 2 (А) і 24 год (Б).

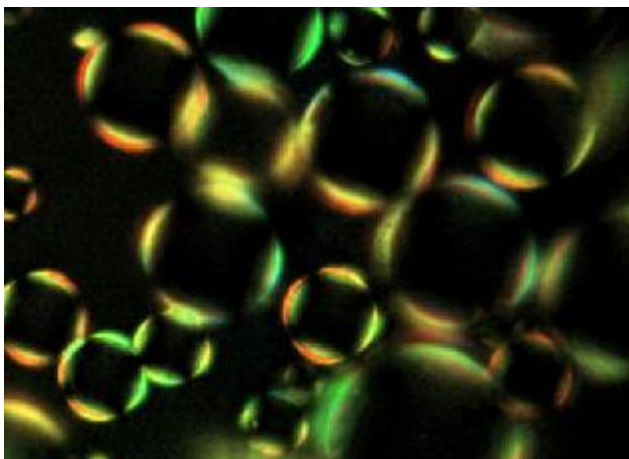


Рис. 4. Мікросфери кристалічного кремнію. Поляризована флуоресценція. МС 200. х 400.

Особливий інтерес викликають результати дослідження взаємодії кліщів – збудників демодекозу з антисептиком декасаном із притаманною йому протимікробною, протівірусною і фунгіцидною активністю за рахунок мембранодесруктивної дії на молекулярному рівні.

Встановлена властивість декасану індукувати знерухомлення і кристалізацію кліща при висиханні мікропрепарату *in vitro* відкриває перспективи подальшого вивчення явища з нових методологічних позицій. Утворення оптично-активних мікрочастин у формі тетраєдру за участю кліща і декасану (рис. 6) окреслюють нову сферу перспективних досліджень у зазначеному напрямку.

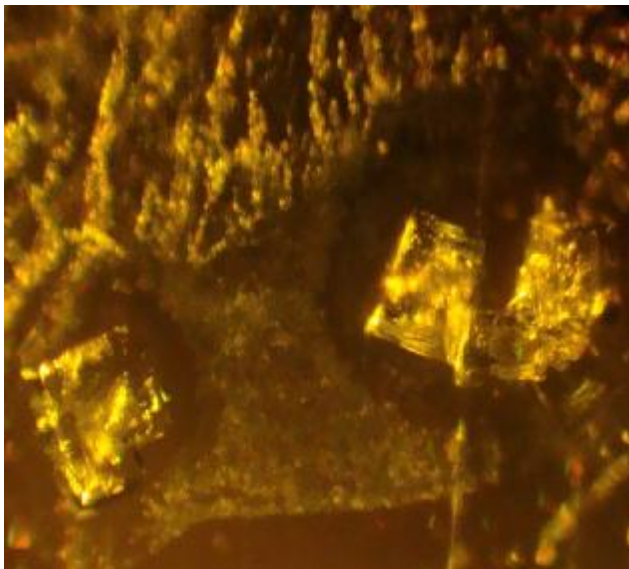


Рис. 6. Кристалізовані тіла кліщів внаслідок взаємодії із декасаном *in vitro*. Поляризована флуоресценція. МС 200. х 150.

ВИСНОВОК Висока оптична активність структурних елементів збудника демодекозу – кліща *Demodex folliculorum* складає підґрунтя нового перспективного методу лабораторно-діагностичного дослідження у хворих на розацеа на принципових засадах високоінформативного методу поляризованої флуоресценції.

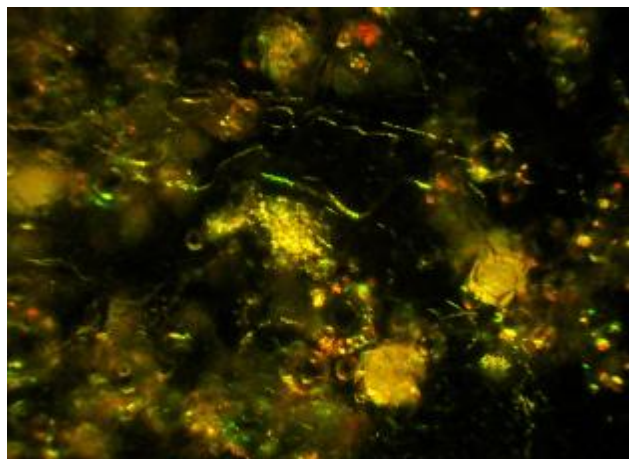


Рис. 5. Взаємодія мікро- і наносфер кремнію з кліщами *in vitro*. Поляризована флуоресценція. МС 200. х 80.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Потекаев Н. Н. Розацеа. Новый взгляд на старую проблему / Н. Н. Потекаев // Актуальные вопросы пластической, эстетической хирургии и дерматокосметологии. – Сборник научных работ (под ред. В. А. Виссарионова). – М., 2001. – С. 88–93.
2. Коган Б. Г. Диагностика і терапія розацеа, демодекозу, дерматиту періорального з урахуванням спільних чинників виникнення, патогенезу та особливостей клінічного перебігу дерматозів: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д. мед. наук / Коган Б. Г. – Київ, 2006. – 44 с.
3. Бутов Ю. С. Клинические особенности и вопросы классификации демодекоза кожи / Ю. С. Бутов, О. Е. Акилов // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2003. – № 2. – С. 53–58.
4. Бутов Ю. С. Обоснование нового подхода к классификации демодекоза кожи / Ю. С. Бутов, О. Е. Акилов // Вестник последипломного медицинского образования. – 2002. – № 1. – С. 87–88.
5. Лошакова В. И. Демодекоз – актуальная проблема современной дерматокосметологии / В. И. Лошакова // Вестник последипломного медицинского образования. – 2001. – № 1. – С. 79–80.
6. Демодекоз : учебное пособие / А. А. Антоньев, В. Н. Шеварова, К. М. Гуссейн-Заде, Д. Д. Агакишиев М. – 1988. – 156 с.
7. Кошевенко Ю. Н. Проблемы демодекса в косметологии / Ю. Н. Кошевенко // Косметика и медицина. – 2001. – № 3. – С. 28–33.
8. Коган Б. Г. Диагностика демодекоза / Б. Г. Коган, В. Т. Горголь // Дерматология. Косметология. Сексопатология. – 2008. – № 1–2 (11). – С. 286–287.
9. Акилов О. Е. Особенности иммунного ответа у больных дерматозами, осложненными тяжелой инвазией антропофильных клещей рода *Demodex* / О. Е. Акилов, И. А. Власова, С. В. Казанцева // Иммунология. – 2002. – № 1. – С. 43–47.
10. Азнабаев Н. Т. Демодекоз глаз / Н. Т. Азнабаев, В. Б. Мальханов, Е. И. Гумсрова // Клиническая офтальмология. – 2003. – Т. 4, № 1. – С. 7–9.
11. Верхогляд И. В. Современная антипаразитарная терапия демодекоза / И. В. Верхогляд // Клиническая дерматология и венерология. – 2006. – № 4. – С. 89–90.
12. Пат. 40079 (UA) G01N 21/21, A61B 10/00. Спосіб визначення біоценозу шкіри у хворих на рожеві вугри / М. Т. Ковальчук – № u200812128 від 13.10.2008; опубл. 25.03.2009, Бюл. № 6.
13. Пат. 91611 (UA) A61B 10/00, G01N 33/483. Діагностикум для виявлення шкірних паразитів – збудників демодекозу / М. А. Андрейчин, М. Т. Ковальчук, В. В. Дем'яненко – № a200813068 від 10.11.2008; опубл. 10.08.2010, Бюл. № 15.

Отримано 20.04.12