

Gdańsk, 2021.03.15

Recenzja pracy doktorskiej lek. Leszek Blicharz

„Wpływ kolonizacji skóry i błony śluzowej przedsionka nosa przez *Staphylococcus aureus* na przebieg kliniczny atopowego zapalenia skóry u dorosłych” .

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska powstała w oparciu o cykl trzech, spójnych tematycznie prac oryginalnych, których łączny IF wynosi 9,206, MNiSW: 210 pkt., opublikowanych w czasopismach o międzynarodowym zasięgu. We wszystkich pracach doktorant jest pierwszym autorem, a jego wkład w powstanie prac oszacowano na poziomie 65%. Rozprawa doktorska składa się ze streszczenia w języku polskim oraz angielskim, jej klasyczny układ: wstęp, założenia i cele badawcze, uzupełniają załączone kopie opublikowanych w/w prac, zaś podsumowanie wyników z dyskusją i wnioski spinają klamrą całość rozprawy. Dysertacja liczy 96 stron wraz z bogatym, aktualnym piśmiennictwem (185 pozycji), zawiera 2 tabele i 6 rycin autorskich, wykaz stosownych skrótów oraz zgodę komisji bioetycznej na prowadzenie badań.

Doktorant w swojej pracy badawczej, która zaowocowała rozprawą na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne, podjął istotny problem z zakresu patogenezy atopowego zapalenia skóry (AZS). Celem pracy było określenie wpływu kolonizacji przez *Staphylococcus* spp. skóry zmienionej chorobowo, pozornie niezmienionej oraz przedsionka nosa na przebieg kliniczny AZS.

Zaburzenia mikrobiomu skóry obok czynników genetycznych, immunologicznych i defektu bariery naskórkowej stanowią istotny składnik patogenezy AZS i są z nimi ściśle powiązane. Poznanie patogenezy tej wieloczynnikowej choroby pozwala wprowadzać nowe, skuteczniejsze terapie i poprawia obniżoną istotnie jakość życia pacjentów chorujących na AZS. Z powodu tego schorzenia cierpi ok. 10% populacji dorosłych. Właśnie tę grupę objął swoimi badaniami Doktorant.

W ostatnich latach aspekt zależności między mikrobiomem i mikrobiotą skóry a AZS jest popularny i ekscytuje środowisko naukowe na świecie. Wykazano dotychczas, że nadmierna ekspansja *Staphylococcus* spp., a w szczególności *S. aureus* (SA) wpływa na ciężkość przebiegu klinicznego AZS. Wiemy, że SA dominuje w okresach zaostrzeń choroby, niekorzystnie oddziałuje na pogłębienie defektu bariery naskórkowej, a także nasilenie stanu zapalnego. SA poprzez wydzielane toksyny nie tylko pobudza cytokiny odpowiedzialne za

powstanie stanu zapalnego w skórze atopowej, ale i świądu. Sprzyja on powstaniu oporności na miejscowe leczenie przeciwzapalne. Dostępne w literaturze badania w przeważającej mierze analizują izolaty z aktywnych, atopowych zmian skórnych. Jednocześnie wiadomo, że skóra pozornie zdrowa chorych na AZS nosi cechy subklinicznego zapalenia i defektu w barierze naskórkowej, a aspekt kolonizacji atopowej skóry niezmienionej nie został jednoznacznie określony. Podobnie sprawa przedstawia się w odniesieniu do oceny kolonizacji przedsionka nosa przez SA i związku z nasileniem objawów AZS, tu wyniki są sprzeczne. W literaturze brakuje kompleksowych doniesień oceniających związek pomiędzy ciężkością przebiegu klinicznego AZS, cechami choroby a kolonizacją omawianych mikronisz przez gronkowce koagulazoujemne (ang. coagulase-negative staphylococci, CoNS) oraz zdolnością do wytwarzania biofilmu przez obecne w ich obrębie szczepy SA. Wobec powyższych cieszę się bardzo, że Doktorant podjął się takiej właśnie tematyki.

We wstępie rozprawy Doktorant rzetelnie omawia epidemiologię, obraz kliniczny, kryteria rozpoznania AZS. Obszerny fragment poświęca patogenecie AZS, w której uwzględnia czynniki genetyczne, immunologiczne, defekt bariery naskórkowej oraz zaburzenia mikrobiota skóry zapoznając czytelnika z podstawami swoich dalszych hipotez badawczych. Należy wysoko ocenić szczegółowe omówienie oraz autorskie ryciny, które wzbogacają ten fragment rozprawy. Doktorant przedstawia chorobę w świetle najnowszych doniesień i potwierdza swoją głęboką znajomość i zrozumienie zagadnienia.

Doktorant jasno sformułował założenia i cele pracy. Za zadanie postawił sobie ocenę kolonizacji skóry zmienionej chorobowo, pozornie niezmienionej i przedsionka nosa przez SA i gronkowce koagulazoujemne u chorych na AZS, ocenę zdolności do wytwarzania biofilmu przez szczepy SA kolonizujące badane mikronisze i co praktycznie kluczowe poszukiwanie korelacji uzyskanych wyników z wybranymi parametrami klinicznymi i immunologicznymi.

W dalszym etapie dysertacji recenzent ma możliwość szczegółowego zapoznania się z osiągnięciem naukowym. Zweryfikowania materiału i metod badawczych, które zostały wyczerpująco opisane. Badaniami objęto łącznie 63 dorosłych chorych na AZS oraz 36 zdrowych osób, które stanowiły grupę kontrolną. Grupy odpowiadały sobie pod względem płci i wieku. Nasilenie choroby oceniono skalą SCORAD, natomiast rozległość zmian skórnych wg reguły dziewiątek Wallace'a. W celu określenia nosicielstwa CoNS, częstości i nasilenia kolonizacji gronkowcem złocistym badanych nisz wymazano materiał biologiczny na podłoże Chapmana. Do identyfikacji kolonii bakteryjnych wykorzystano spektrometrię mas. Nasilenie kolonizacji przez SA oceniono metodą półilościową, a zdolność do wytwarzania biofilmu

metodą płytek titracyjnych. Stężenie całkowitej IgE w surowicy oceniono metodą immunoenzymatyczną. Metod badawcze w tym statystyczne są przejrzyste i odpowiednio dobrane.

Z wynikami badań i dojrzałą dyskusją nad uzyskanymi wynikami można zapoznać się zarówno w załączonych publikacjach jak również w dodatkowo opracowanym przez Doktoranta podsumowaniu wyników prowadzonych z wnikliwą analizą i żywą dyskusją.

W bazie Pubmed znalazłam niewiele publikacji lub sprzeczne wyniki na temat znaczenia i wpływu kolonizacji skóry niezmienionej oraz przedsionka nosa przez SA czy samego biofilmu u chorych z AZS na przebieg kliniczny choroby, nasilenie poszczególnych objawów obiektywnych i subiektywnych oraz parametry immunologiczne. Zatem uzyskane przez Doktoranta wyniki i wnioski z dysertacji można uznać za nowatorskie.

Z kolei praktycznym wynikiem jest wykazana pozytywna korelacja pomiędzy nasileniem kolonizacji przedsionka nosa przez SA a skóry zmienionej chorobowo i pozornie niezmienionej. Czy należałoby zatem rutynowo wymazywać chorych z AZS i leczyć nosicieli SA, aby zapobiec kolonizacji skóry tym patogenem, a przez to hamować zaostrzenia choroby? Zwłaszcza, że Doktorant wykazał także korelację pomiędzy nasileniem kolonizacji wszystkich analizowanych mikronisz przez SA a rozległością zmian skórnych i nasileniem nadżerek. Ponadto stwierdził pozytywną korelację pomiędzy nasileniem kolonizacji skóry zmienionej chorobowo i pozornie niezmienionej przez SA a ciężkością przebiegu choroby mierzonej skalą SCORAD, nasileniem zmian skórnych i co ciekawe dla skóry pozornie niezmienionej z nasileniem suchości skóry.

Interesującym wynikiem przedstawionym przez Doktoranta jest wyższa częstość i nasilenie kolonizacji skóry zmienionej chorobowo i pozornie niezmienionej u mężczyzn niż u kobiet. Przyczyny takiej zależności Doktorant poddał rzeczowej dyskusji, nie pozostawiając tego wyniku jako przypadkowego.

Zaintrygował mnie wynik pozytywnej korelacji IgE z nasileniem kolonizacji skóry zmienionej chorobowo, pozornie niezmienionej i przedsionka nosa przez SA oraz fakt, że średnie wartości surowiczego stężenia IgE były istotnie niższe u pacjentów, u których w obrębie skóry zmienionej chorobowo, skóry pozornie niezmienionej i przedsionka nosa wykazano współistnienie SA z CoNS. Wyniki te w mojej ocenie wytyczają nowe kierunki badań, których rezultaty powinny rozstrzygnąć czy CoNS mają faktycznie znaczenie protekcyjne? Czy będą stanowić alternatywę terapeutyczną? Czy kolonizacja skóry atopowej przez SA może faktycznie wpływać na poziom IgE, rozwój uczulenia, alergii? Czy jest to obserwacja obarczona błędem ze względu na obecność innych czynników zakłócających, o czym wspominał w dyskusji Doktorant?

Doktorant dowiódł, że kolonizacja przedsionka nosa przez szczepy SA wykazujące zdolność do produkcji biofilmu była związana z wyższymi średnimi wartościami SCORAD, rozległością zmian skórnych, suchością skóry. Te wyniki niewątpliwie niosą implikacje terapeutyczne sugerujące konieczność opracowania taktyki i działań profilaktycznych oraz interwencji terapeutycznych.

Za cenne i dojrzałe postrzegam krytyczne odniesienie się przez Doktoranta do ograniczeń własnych badań jak np. stosunkowo niewielka liczebność grupy badanej oraz niektórych wyników jak np. korelacja kolonizacji SA z nasileniem nadżerek, ale nie świadem.

Na podstawie uzyskanych wyników badań Doktorant wyciągnął konkretne, spójne wnioski. Stwierdził u dorosłych z AZS zdominowanie mikrobioty skóry i przedsionka nosa przez szczepy *S. aureus* wykazujące wysoką zdolność do produkcji biofilmu. Ta ostatnia lokalizacja wydaje się stanowić istotny rezerwuuar tego patogenu kolonizującego skórę zmienioną chorobowo oraz pozornie niezmienioną. Nasilona kolonizacja mikronisz przez *S. aureus* oraz produkcja biofilmu przez ten patogen należą do czynników prowokujących ciężki przebieg kliniczny AZS manifestujący się rozległymi zmianami skórnymi, silnym świądem i wysokimi wartościami stężenia całkowitej IgE. Obecność gronkowców koagulazoujemnych w mikroniszach skolonizowanych przez *S. aureus* wydaje się korzystnie wpływać na status immunologiczny pacjentów z AZS. Doktorant wnioskuje i rekomenduje na podstawie swoich badań, iż postępowanie profilaktyczne i terapeutyczne dotyczące eradykacji *S. aureus* w obrębie skóry u pacjentów z AZS powinno zostać rozszerzone na przedsionek nosa. Doktorant na podstawie swoich badań nie tylko przedstawił dojrzałe wnioski wskazujące przesłanki praktycznego, ale także dał podstawy dla rozwinięcia nowych kierunków badawczych.

Dysertacja doktorska lek. Leszka Blicharza jest źródłem solidnej, aktualnej wiedzy na temat AZS. Praca jest przemyślana i napisana starannym językiem, co sprawia iż czyta się ją z przyjemnością. Pozostają pod wrażeniem bogatych i klarownych rycin autorskich, które niewątpliwie podnoszą wartość pracy. Doskonała znajomość tematu, patogenetyki choroby, poprzez trafnie postawione hipotezy badawcze, konsekwencja w badaniach i rozwinięcie logiczne wątków badawczych wraz z inteligentną dyskusją świadczą o dojrzałości naukowej Doktoranta. Na pochwałę zasługuje nie tylko sama hipoteza badawcza, ale praktyczny, logiczny aspekt wykorzystania wyników w celu usprawnienia leczenia z nadzieją na wprowadzenie nowych metod terapeutycznych.

Drobne uwagi, które wymienię absolutnie nie umniejszają wartości pracy.

1. Moją uwagę zwróciło niekonsekwentne nazewnictwo choroby. Raz Doktorant używał nazwy atopowe zapalenie skóry, w innym miejscu wyprysk atopowy. Dlaczego?

2. Sugerowałabym sformułowanie : „wydrapania” (str.11, 63) zastąpić słowem „nadżerki”?
3. W obszernym i szczegółowym wstępie, biorąc pod uwagę temat rozprawy, zabrakło mi wytłumaczenia lub podania definicji dla zagadnień: mikrobiom, mikrobiota, dysbioza.
4. Strzałka dolna na rycinie nr 3 wskazująca na m.in. zaburzenia cytokinowe, degranulację mastocytów, oporność na leczenie miejscowe, wyprowadzona jest z defektu bariery naskórkowej i ta jej lokalizacja w mojej ocenie wnosi pewne nieporozumienie merytoryczne. Efekty w/w są wynikiem działania toksyn SA, o czym zresztą sam Doktorant słusznie pisze w tekście, a nie wynikają z defektu bariery naskórkowej. Stąd obie strzałki i podpisane pod nie efekty przesunęłabym na jeden poziom w ustawieniu np. równoległym.

Biorąc pod uwagę, że Doktorant zaproponował atrakcyjną i ciekawą hipotezę badawczą, zaplanował oraz przeprowadził oryginalne badania, z wykorzystaniem odpowiedniej metodyki i starannie dobranych grup badawczych, poprowadził wnikliwą analizę wyników, dojrzałą dyskusję, świadczącą o bardzo dobrej znajomości zagadnienia i szerokiej analizie piśmiennictwa, wreszcie zważywszy na możliwy aspekt praktycznego wykorzystania uzyskanych wyników uważam, że Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13. Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w związku z art.179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę- Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm.). i wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM o dopuszczenie lek. Leszka Blicharza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto biorąc pod uwagę w/w wnioskuje o wyróżnienie przedstawionej mi do recenzji dysertacji doktorskiej argumentując dodatkowo następująco:

- łączny IF prac przedstawionych do osiągnięcia naukowego opublikowanych w czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu wynosi 9,206 IF i zawiera 3 prace oryginalne, w których Doktorant jest pierwszym autorem.
- dysertacja opracowana jest i przedstawiona w sposób świadczący o dojrzałości naukowej Doktoranta, opanowaniu przez Niego warsztatu naukowego na wysokim poziomie i wyjawia głęboką wiedzę Doktoranta w zakresie popełnionego tematu.
- pomysł i wyniki badań mają charakter nowatorski
- efekt pracy oprócz wysoko ocenionego waloru poznawczego wnosi praktyczne zastosowania

dr hab.n.med. **Magdalena Trzeciak**
PROFESOR UCZELNI
specjalista dermatolog-wenerolog
specjalista Alergolog
354/606

dr. hab. n. med. Magdalena Trzeciak, profesor uczelni