



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Ocena rozprawy doktorskiej lek. med. Leszka Blicharza pt.

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

Atopowe zapalenie skóry jest częstą, w populacji dorosłych dotyczącą nawet 10% osób, przewlekłą, zapalną dermatozą charakteryzującą się nawrotnym przebiegiem z licznymi okresami zaostrzeń i remisji. Z uwagi na przewlekły przebieg i brak leczenia przyczynowego choroba stanowi także istotny problem ekonomiczny dla systemu opieki zdrowotnej w wielu krajach. AZS często współistnieje z innymi chorobami atopowymi stanowiąc część tzw. marszu alergicznego. U 15% pacjentów z AZS może rozwijać się alergia pokarmowa, u 60% chorych alergiczne zapalenie błony śluzowej nosa, a nawet u 20-35% chorych astma oskrzelowa. Patogeneza AZS nie została dotychczas w pełni poznana. U osób predysponowanych genetycznie stwierdzono zaburzenia struktury bariery naskórkowej, nieprawidłowe wzorce odpowiedzi immunologicznej wrodzonej i nabytej z przewagą odpowiedzi Th2-zależnej w fazie ostrej choroby oraz dysbiozę mikrobiomu skóry. Wykazano, że wszystkie powyższe czynniki są ze sobą ściśle powiązane, a ich interakcje mogą promować dodatkowe czynniki modulujące przebieg kliniczny atopowego zapalenia skóry. W dostępnym piśmiennictwie znajdujemy wiele danych przemawiających za protekcyjną rolę prawidłowego mikrobiomu skóry w rozwoju dermatoz zapalnych. W badaniach populacyjnych wykazano, że kolonizacja skóry niemowląt w 2 miesiącu życia przez gronkowce koagulazoujemne wiązała się ze statystycznie niższym ryzykiem rozwoju objawów AZS w pierwszym roku życia.

Podjęcie badań dotyczących „ Wpływu kolonizacji skóry i błony śluzowej przedstonka nosa przez Staphylococcus aureus na przebieg kliniczny AZS u dorosłych” wpisuje się w nurt aktualnie prowadzonych obserwacji na świecie. Prowadzenie badań w grupie pacjentów dorosłych u których przebieg choroby jest bardzo heterogenny i pojawienie się zmian skórnych niejednokrotnie uniemożliwia kontynuację dotychczasowej pracy zawodowej i ogromnie ogranicza jakość życia jest bardzo ważne. Wstęp do prowadzonych przez Doktoranta badań z obszernym, szczegółowym opisem dotyczącym patogenyzy AZS, gdzie Autor powołuje się na najnowsze badania świadczy o doskonałym przygotowaniu i zrozumieniu tematu. W tej części pracy Doktorant podkreśla, które obszary badań wymagają poszerzenia i rozwiązań. Wskazuje, że rola zaburzeń mikrobiomu skóry w patogenyzy wyprysku atopowego wymaga rozszerzenia. Temat rozprawy doktorskiej doskonale wpisuje się w aktualny nurt współczesnych badań dotyczących AZS. Dotychczas niewiele jest oryginalnych prac klinicznych dotyczących tej tematyki.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska lek. Leszka Blicharza oparta jest na cyklu 3 spójnych tematycznie publikacji oryginalnych opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych o łącznej punktacji IF=9,206 i Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego/KBN =210pkt. We wszystkich trzech pracach Doktorant jest pierwszym autorem, co potwierdza Jego główny udział

Wydział Lekarski

Katedra Dermatologii

ul. Kopernika 50

PL 31-501 Kraków

tel.: +48 (12) 424 86 62

dermatologiakrakow.cm-uj.krakow.pl

w przeprowadzeniu badań i przygotowaniu publikacji do druku. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Cykl prac obejmuje następujące pozycje monograficzne:

1. Blicharz L, Usarek P, Młynarczyk G, Skowroński K, Rudnicka L, Samochocki Z. Is Itch Intensity in Atopic Dermatitis Associated with Skin Colonization by *Staphylococcus aureus*? *Indian J Dermatol.* 2020 Jan-Feb;65(1):17-21 doi: 10.4103/ijd.IJD_136_19

2. Blicharz L, Usarek P, Młynarczyk G, Skowroński K, Rudnicka L, Samochocki Z. Nasal Colonization by Staphylococci and Severity of Atopic Dermatitis. *Dermatitis.* 2020 May/Jun;31(3):215-222 doi: 10.1097/DER.0000000000000568

3. Blicharz L, Michalak M, Szymanek-Majchrzak K, Młynarczyk G, Skowroński K, Rudnicka L, Samochocki Z. The Propensity to Form Biofilm *in vitro* by *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from the Anterior Nares of Patients with Atopic Dermatitis: Clinical Associations. *Dermatology.* 2020 Oct 28:1-7 doi: 10.1159/00051118

Celem rozprawy doktorskiej było określenie wpływu kolonizacji skóry zmienionej chorobowo, pozornie niezmienionej oraz przedsionka nosa przez *Staphylococcus* spp. na przebieg kliniczny AZS poprzez:

1. Ocenę kolonizacji skóry zmienionej chorobowo, skóry pozornie niezmienionej oraz przedsionka nosa przez *S. aureus* i gronkowce koagulazujemne;
2. Ocenę zdolności do wytwarzania biofilmu przez szczepy *S. aureus* kolonizujące wymienione mikronisze;
3. Korelację uzyskanych wyników z wybranymi parametrami klinicznymi i immunologicznymi pacjentów z grupy badanej.

Wartość naukowa prac została już potwierdzona pozytywnymi ocenami recenzentów odpowiednich czasopism.

Uzyskane wyniki badań w pełni realizują założenia Autora. Badaniami objęto 63 dorosłych chorych na AZS oraz 36 zdrowych osób z grupy kontrolnej dobranych stosownie do płci i wieku grupy badanej. Wszyscy chorzy spełniali kryteria rozpoznania wg Hanifina i Rajki, nasilenie choroby oceniano zgodnie ze skalą SCORAD, natomiast rozległość zmian skórnych w trakcie roku poprzedzającego udział w badaniu wg reguły dziewiątek Wallace'a. W celu określenia częstości i nasilenia kolonizacji skóry zmienionej chorobowo, skóry pozornie niezmienionej i przedsionka nosa przez SA oraz częstości nosicielstwa CoNS w wymienionych mikroniszach pobrano wymazy, które następnie posiano na podłoże Chapmana. Do identyfikacji odmiennych morfologicznie kolonii bakteryjnych wykorzystano spektrometrię mas. Następnie metodą półilościową oceniono nasilenie kolonizacji celu określenia częstości i nasilenia kolonizacji skóry zmienionej chorobowo, skóry pozornie niezmienionej i przedsionka nosa analizowanych mikronisz przez SA, a zdolność do wytwarzania przez nie biofilmu – metodą płytek titracyjnych. Dodatkowo określono stężenie całkowitej IgE w surowicy metodą immunoenzymatyczną. Wyniki badań bakteriologicznych skorelowano z parametrami klinicznymi oraz stężeniem całkowitej IgE przy użyciu stosownych metod statystycznych.

Wyniki

Ad. 1. Ocena kolonizacji skóry zmienionej chorobowo, pozornie niezmienionej i przedsionka nosa przez S. aureus i gronkowce koagulazujemne.

Częstość nosicielstwa SA na skórze zmienionej chorobowo i pozornie niezmienionej w grupie badanej wyniosła odpowiednio 79,4% (50/63) oraz 61,9% (39/63), $p < 0,0314$. Odsetek kolonizacji skóry w grupie kontrolnej wyniósł 5,6% (2/36; $p < 0,0001$). Wykazano statystycznie istotne różnice pomiędzy średnim nasileniem kolonizacji skóry zmienionej

chorobowo, skóry pozornie niezmienionej oraz skóry osób z grupy badanej (odpowiednio $2,063 \pm 1,242$; $1,222 \pm 1,183$; oraz $0,111 \pm 0,464$, $p < 0,0001$). Zaobserwowano korelację pomiędzy nasileniem kolonizacji skóry zmienionej chorobowo i pozornie niezmienionej ($p < 0,0001$). Częstość i nasilenie kolonizacji skóry zmienionej chorobowo i pozornie niezmienionej była wyższa u mężczyzn niż u kobiet (częstość kolonizacji – odpowiednio 89,2% vs 65,4%, $p < 0,0292$ oraz 83,7% vs 57,7%, $p < 0,0316$; nasilenie kolonizacji – odpowiednio $2,401 \pm 1,033$ vs $1,598 \pm 1,212$ oraz $1,486 \pm 1,216$ vs $0,846 \pm 1,046$, $p < 0,05$).

Kolonizację przedsionka nosa przez SA stwierdzono u 69,8% (44/63) pacjentów.

Średnie nasilenie kolonizacji tej mikroniszy wynosiło $1,4444 \pm 1,1883$. Stwierdzono istotne różnice w częstości i nasileniu kolonizacji przedsionka nosa przez SA pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną (częstość i nasilenie kolonizacji w grupie kontrolnej – odpowiednio 13,9% (5/36) oraz $0,3611 \pm 0,9607$, $p < 0,0001$). Wykazano statystycznie istotnie wyższą częstość kolonizacji przedsionka nosa przez SA u mężczyzn (81,1% vs 53,8%, $p < 0,027$). Stwierdzono korelację pomiędzy nasileniem kolonizacji przedsionka nosa oraz zarówno skóry zmienionej chorobowo ($\rho = 0,332$, $p < 0,008$) jak i pozornie niezmienionej ($\rho = 0,357$, $p < 0,004$) przez SA. W grupie badanej CoNS izolowano odpowiednio w 50% (25/50), 59% (23/39) oraz 53,5% (23/43) posiewów ze skóry zmienionej chorobowo, pozornie niezmienionej i przedsionka nosa, w których wykazano obecność SA ($p > 0,05$). Odsetek kolonizacji skóry i przedsionka nosa CoNS w grupie kontrolnej wynosił odpowiednio 100% (2/2) oraz 0% (0/5).

Ad. 2. Ocena zdolności do wytwarzania biofilmu przez szczepy S. aureus kolonizujące wymienione mikronisze.

Zdolność do wytwarzania biofilmu przez szczepy SA wyizolowane z przedsionka nosa, skóry zmienionej chorobowo i pozornie niezmienionej wykazano odpowiednio u 76,3% (29/38); 79,1% (34/43), $p > 0,05$; oraz 48,5% (16/33), $p < 0,03$. Wśród wyżej wymienionych wysoką zdolność do produkcji biofilmu wykazano odpowiednio u 86,2% (25/29); 64,7% (22/34); oraz 68,8% (11/16) izolatów, $p > 0,05$). Wykazano korelację pomiędzy zdolnością do

produkcji biofilmu *in vitro* przez szczepy wyizolowane z przedsionka nosa i skóry pozornie niezmienionej ($\rho = 0,428$, $p < 0,04$) oraz pomiędzy szczepami wyizolowanymi ze skóry zmienionej chorobowo i pozornie niezmienionej ($\rho = 0,521$, $p < 0,003$).

Ad. 3. Korelacja uzyskanych wyników z wybranymi parametrami klinicznymi oraz immunologicznymi pacjentów z grupy badanej.

Wykazano dodatnią korelację pomiędzy nasileniem kolonizacji wszystkich analizowanych mikronisz przez SA a rozległością zmian skórnych i nasileniem wydrapań/przeczosów (przedsionek nosa – $\rho = 0,312$, $p < 0,02$; $\rho = 0,285$, $p < 0,0444$; skóra zmieniona chorobowo – $\rho = 0,42$, $p < 0,0007$; $\rho = 0,693$, $p < 0,00001$; skóra pozornie niezmieniona – $\rho = 0,488$, $p < 0,0001$; $\rho = 0,441$, $p < 0,02$). Ponadto stwierdzono pozytywną korelację pomiędzy nasileniem kolonizacji skóry zmienionej chorobowo i pozornie niezmienionej przez SA oraz total SCORAD ($\rho = 0,506$, $p < 0,0001$; $\rho = 0,412$, $p < 0,0008$), objective SCORAD ($\rho = 0,503$, $p < 0,0001$; $\rho = 0,476$, $p < 0,0001$), nasileniem zmian skórnych ($\rho = 0,442$, $p < 0,0002$; $\rho = 0,377$, $p < 0,002$), rumieniem ($\rho = 0,380$, $p < 0,003$; $\rho = 0,346$, $p < 0,006$) i obrzękiem/grudkami ($\rho = 0,382$, $p < 0,003$; $\rho = 0,263$, $p < 0,04$). Dodatkowo nasilenie kolonizacji skóry zmienionej chorobowo przez SA pozytywnie korelowało z sączeniem/strupami ($\rho = 0,267$, $p < 0,04$), subiektywnymi odczuciami pacjenta ($\rho =$

0,217, $p < 0,05$) oraz nasileniem zaburzeń snu ($\rho = 0,294$, $p < 0,02$), natomiast skóry pozornie niezmięnionej – z nasileniem suchości skóry ($\rho = 0,362$, $p < 0,003$).

Surowicze stężenie całkowitej IgE pozytywnie korelowało z nasileniem kolonizacji skóry zmienionej chorobowo, skóry pozornie niezmięnionej i przedsionka nosa przez SA (odpowiednio $\rho = 0,402$, $p < 0,002$; $\rho = 0,403$, $p < 0,002$; oraz $\rho = 0,287$, $p < 0,03$).

Średnie wartości surowiczego stężenia całkowitej IgE były istotnie niższe u pacjentów, u których w obrębie skóry zmienionej chorobowo, skóry pozornie niezmięnionej i przedsionka nosa wykazano współistnienie SA z CoNS niż u pacjentów skolonizowanych jedynie przez SA (odpowiednio: $1164,66 \pm 1010,36$ vs $1762,99 \pm 1059,15$, $p < 0,0213$; $1166,9 \pm 1006,4$ vs $2152,7 \pm 759,2$, $p < 0,0063$; 1022 ± 1100 vs $1925 \pm 880,8$, $p < 0,0044$).

Kolonizacja przedsionka nosa przez szczepy SA wykazujące zdolność do produkcji biofilmu była związana z wyższymi średnimi wartościami total SCORAD ($51,64 \pm 17,39$ vs $39,86 \pm 10,70$, $p < 0,03$), objective SCORAD ($42,33 \pm 14,88$ vs $28,19 \pm 7,57$, $p < 0,0008$), rozległości zmian skórnych ($42,69 \pm 32,50\%$ vs $14,56 \pm 8,69\%$, $p < 0,02$), suchości skóry ($1,76 \pm 0,79$ vs $0,67 \pm 0,87$, $p < 0,004$) oraz największej rozległości zmian skórnych w trakcie zaostrzeń ($63,93 \pm 33,87\%$ vs $35,89 \pm 30,95\%$, $p < 0,03$). Obecność szczepów SA produkujących biofilm na skórze zmienionej chorobowo była związana z wyższą średnią rozległością zmian skórnych w okresie stabilnym ($1,6 \pm 2,13\%$ vs $5,7 \pm 3,72\%$, $p < 0,004$).

Na podstawie przeprowadzonych badań i analizy ich wyników wysunięto następujące wnioski:

1. Dominacja mikrobioty nie tylko skóry zmienionej chorobowo i pozornie niezmięnionej, ale i przedsionka nosa przez szczepy *S. aureus* wykazujące wysoką zdolność do produkcji biofilmu jest cechą charakterystyczną dorosłych chorych na AZS;
2. Błona śluzowa przedsionka nosa stanowi prawdopodobnie istotny rezerwuuar *S. aureus* kolonizującego skórę zmienioną chorobowo oraz pozornie niezmięntoną;
3. Zdolność do produkcji biofilmu przez szczepy *S. aureus* kolonizujące przedsionek nosa wydaje się stanowić istotny czynnik warunkujący rozsiew tego patogenu na skórę;
4. Nasiloną kolonizacją przedsionka nosa, skóry zmienionej chorobowo i pozornie niezmięnionej przez *S. aureus* oraz produkcją 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;
5. Obecność gronkowców koagulazoujemnych w mikroniszach skolonizowanych przez *S. aureus* wydaje się korzystnie wpływać na status immunologiczny pacjentów z AZS poprzez hamowanie odpowiedzi Th2-zależnej nasilanej przez ten patogen;
6. Postępowanie profilaktyczne i terapeutyczne dotyczące eradykacji *S. aureus* w obrębie skóry u pacjentów z AZS powinno zostać rozszerzone na przedsionek nosa.

Uzyskane przez Doktoranta wyniki mają znaczącą wartość praktyczną, potwierdzają konieczność terapii i profilaktycznych działań mających na celu utrzymanie prawidłowej mikrobioty skóry co może pozwolić na złagodzenie ciężkości objawów AZS. Autor powołując się na liczne publikacje podkreśla jednak, że przewlekłe stosowanie antybiotyków u pacjentów chorujących na AZS z uwagi na możliwość rozwoju lekooporności, działania niepożądane oraz brak selektywnego działania

w stosunku do *S. aureus* nie jest terapią rekomendowaną . W aktualnych rekomendacjach terapeutycznych wymienia się m.in. kąpiele w podchlorynie sodu, które ograniczają populację *S. aureus* oraz wywierają działanie przeciwzapalne i przeciwświądowe, część autorów proponują również noszenie odzieży z jonami srebra.

Potwierdzona także przez Doktoranta korelacja pomiędzy suchością skóry i nasileniem kolonizacji przez *S. aureus* przemawia dodatkowo za korzystnym wpływem stosowania regularnego emolientów na dysbakteriozę skóry w AZS.

Z uwagi na wykazaną rolę przedsionka nosa jako istotnego rezerwuaru *S. aureus*

zdaniem Doktoranta zasadna wydaje się być dekontaminacja tej mikroniszy w celu poprawy skuteczności leczenia oraz przedłużenia remisji choroby. Zastosowanie w obrębie przedsionka nosa mogłyby znaleźć preparaty z dodatkiem szczepów probiotycznych, AMP czy bakteriofagów. Wykazana w pracy rola biofilmu *S. aureus* kolonizującego przedsionek nosa stanowi podstawę do prowadzenia badań mających na celu opracowanie metod selektywnego niszczenia tej struktury.

Reasumując i uzasadniając wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej;

-Autor wnikliwie przygotował swój warsztat badawczy, poprzedzając prowadzenie badań oryginalnych/ własnych szeroką analizą piśmiennictwa dotyczącego patogenyzy atopowego zapalenia skóry, roli mikroflory skóry w zaostrzeniach klinicznych AZS, mechanizmów tworzenia biofilmu bakteryjnego – co pozwoliło na bardzo dobre poznanie tematu i precyzyjne przygotowanie dyskusji.

-We wszystkich pracach oryginalnych Doktorant przeprowadził badania na dużej grupie pacjentów z atopowym zapaleniem skóry (63 pacjentów) i dobranej liczbowo grupie kontrolnej. Podnosi to wartość merytoryczną uzyskanych przez Doktoranta wyników badań.

Dobór tematyki pracy, metodyki badań, wyważone wnioski świadczą o bardzo dobrej współpracy

i doskonałym przygotowaniu Doktoranta przez Promotora Dr hab. Zbigniewa Samochockiego, który jest uznanym Ekspertem w dziedzinie chorób alergicznych skóry i doskonałym nauczycielem.

Rozprawę doktorską lekarza medycyny Leszka Blicharza , oceniam pozytywnie z uwagi na ważność podjętego tematu oraz wymierne znaczenie uzyskanych wniosków. Wszystkie 3 publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej są spójne tematycznie, zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach medycznych, co dodatkowo podkreśla nowatorstwo, znaczenie oraz wymierny aspekt praktyczny uzyskanych wyników. Doktorant wykazał się głęboką znajomością problematyki stanowiącej przedmiot rozprawy, zebrał wartościowy materiał kliniczny, zrealizował założone cele badawcze, poprawnie dobrał i zastosował metody badawcze i analizy statystyczne, poczynił wiele istotnych obserwacji oraz prawidłowo sformułował wnioski płynące z badań. Angielskojęzyczne piśmiennictwo we wszystkich publikacjach jest dobrze wyselekcjonowane i właściwie dobrane, co świadczy o dobrej znajomości tematu i umiejętności posługiwania się literaturą naukową. Doktorant posiada odpowiednie umiejętności i jest dobrze przygotowany do prowadzenia samodzielnie dalszych badań.

Na podstawie powyżej przedstawionych danych, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska lekarza medycyny Leszka Blicharza przygotowana pod opieką promotorską dr hab., med. Zbigniewa Samochockiego spełnia warunki określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 z późniejszymi zmianami (Dz.U.nr.65, poz. 595), jak również Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 30.01.2018w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

Mam więc zaszczyt przedłożyć Radzie Dyscypliny Nauki Medyczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego moją pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej lek.med. Leszka Blicharza pt. *Wpływ kolonizacji skóry i błony śluzowej przedsonka nosa przez Staphylococcus aureus na przebieg kliniczny atopowego zapalenia skóry u dorosłych* wraz z wnioskiem o dopuszczenie lekarza medycyny Leszka Blicharza do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Dodatkowo na podstawie przedstawionego powyżej uzasadnienia wnioskuje o wyróżnienie pracy.

KMAMW 31.03.2021

Anne Wojas-Pol
