

Recenzja pracy doktorskiej lek. Klaudii Tutki
pt. „Znaczenie mikrobiomu skóry w patogenezie przewlekłych dermatoz
zapalnych”

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Adam Reich

Promotor Pomocniczy: Dr n. med. Magdalena Żychowska

W przedstawionej mi do recenzji rozprawie doktorskiej Klaudii Tutki pt. „Znaczenie mikrobiomu skóry w patogenezie przewlekłych dermatoz zapalnych” za główne cele postawiono zbadanie mikrobiomu skóry u pacjentów chorujących na choroby zapalne: atopowe zapalenie skóry i świerzbiczkę guzkową. Szczególną uwagę zwrócono na różnorodność mikrobiomu oraz na obecność gronkowca złocistego i jego wpływ na przebieg choroby. Oceniono również działanie terapeutyczne kąpieli w roztworze podchlorynu sodu oraz wpływ tej terapii na eradykację gronkowca złocistego. Temat podjęty przez Doktorantkę jest bardzo istotny. Badania przyczynią się do wyjaśnienia wpływu mikrobiomu skóry na przebieg chorób zapalnych: atopowego zapalenia skóry (AZS) i świerzbiczki guzkowej (PN). Niezwykle ważny jest również wymiar praktyczny pracy, ze względu na wykazanie pozytywnego efektu terapeutycznego kąpieli w roztworze podchlorynu sodu. Praca została opublikowana w piśmiennictwie medycznym. Jako wstęp do badań własnych Doktorantka przeanalizowała różnorodność i skład mikrobiomu skóry, krwi i jelit w trądziku różowatym w oparciu o dokonany przez nią przegląd piśmiennictwa. Wyniki swojej analizy opublikowała w artykule: Tutka K, Żychowska M, Reich A. Diversity and Comparison of Skin, Blood and Gut Microbiome in Rosacea – A systemic Review of the Literature. *Microorganisms*. 2020; 8(11): 1756(16).

Badania z udziałem pacjentów chorujących na AZS i PN opublikowała w artykułach:

Tutka K, Reich A. Częstość występowania *Staphylococcus aureus* na skórze pacjentów z atopowym zapaleniem skóry i lekooporność izolowanych szczepów. *Dermatologia Praktyczna*.2019, 2:1-4;

Tutka K, , Reich A. Sodium hydrochloride baths in atopic dermatitis and their influence on the skin microbiome . Forum Dermatologicum. 2021;7(2):43-49;

Tutka K, , Reich A. Zastosowanie podchlorynu sodu w leczeniu wspomagającym atopowego zapalenia skóry. Dermatologia praktyczna. 2022;1:1-4;

Tutka K, Żychowska M, Żaczek A, Maternia-Dudzik K, Pawłeczyk J, Strapagiel D, Lach J, Reich A. Skin microbiome in prurigo nodularis. International Journal of Molecular Science. 2023;24(8):7675.

We wszystkich publikacjach Doktorantka była pierwszym autorem. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma podział na rozdziały: curriculum vitae, wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, wstęp, cele pracy, materiał, wyniki, publikacje stanowiące rozprawę doktorską, wnioski, omówienie, piśmiennictwo, streszczenie w języku polskim i angielskim, oświadczenia współautorów. Praca zawiera 98 stron.

We wstępie Doktorantka wyjaśniła pojęcie mikrobiomu oraz uzasadniła decyzję o podjęciu jego badania w skórnych chorobach zapalnych. Mikrobiom to pula organizmów zasiedlająca daną niszę. Kolonizacja skóry przez mikroorganizmy jest zmienna. Wyróżnia się mikroflorę stałą, rezydującą przejściowo oraz przejściową, która u zdrowych osób pozostaje w równowadze i chroni przed rozwojem mikroorganizmów patogennych. Zaburzenie mikrobiomu może prowadzić do rozwoju chorób zapalnych, a przywracanie prawidłowego profilu bakteryjnego ma znaczenie w terapii. Zaburzenie mikrobiomu skóry obserwowano dermatozach zapalnych: atopowym zapaleniu skóry, łuszczycy, trądziku pospolitym , trądziku różowatym, łojotokowym zapaleniu skóry. Doktorantka zwraca uwagę na trądzik różowaty, chorobę zapalną o niepoznanej do końca, zapewne wieloczynnikowej etiologii. Ze względu na dobry efekt terapeutyczny antybiotyków uważa się że drobnoustroje mogą odgrywać znaczącą rolę w patogenezie schorzenia. Atopowe zapalenie skóry to przewlekła, nawrotowa, zapalna choroba, w części przypadków o ciężkim, obniżającym jakość życia, przebiegu. U podłoża choroby leżą czynniki genetyczne, immunologiczne i środowiskowe w tym mikroflora zasiedlająca skórę. U pacjentów z AZS obserwuje się zmniejszenie bioróżnorodności flory bakteryjnej i wzmożoną kolonizację przez *Staphylococcus aureus*. Obecność gronkowca i obecność wydzielanych przez bakterię toksyn oraz superantygenów powoduje powstanie odpowiedzi immunologicznej i produkcję IgE , nasilenia stanu zapalnego i uszkodzenie bariery naskórkowej. Stosowanie terapii przeciwbakteryjnej u pacjentów z atopowym zapaleniem

skóry takich jak środki odkażające w tym roztworu podchlorynu sodu powoduje poprawę stanu chorobowego. Działanie roztworu podchlorynu sodu nie jest do końca wyjaśnione. Jego działanie prawdopodobnie nie ogranicza się do funkcji dezynfekcyjnej. Wstęp rozprawy doktorskiej świadczy o dobrym przygotowaniu Doktorantki do przeprowadzenia zaplanowanych badań.

Cel pracy został jasno przedstawiony.

W rozdziale materiał i metody Doktorantka przedstawiła metodykę, którą posługiwała się w poszczególnych fragmentach pracy. W części opublikowanej w postaci artykułu pogładowego, dotyczącego składu mikrobiomu skóry, jelit i krwi u chorych z trądzikiem różowatym przeanalizowano publikacje trzech medycznych baz danych (PubMed, Scopus, Web of Science) zgodnie z zasadami PRIMSA. Doktorantka z 185 wybrała do analizy 6 artykułów, w których opublikowano badania z udziałem 115 chorych, u których oceniono mikrobiom skóry, 10 chorych - mikrobiom krwi, 23 chorych - mikrobiom jelit.

Kolejne części rozprawy doktorskiej obejmują badania z udziałem pacjentów. W celu wykazania częstości występowania *Staphylococcus aureus* na skórze pacjentów z AZS przebadano 50 chorych, u których oceniono nasilenie choroby z użyciem wskaźnika EASI i SCORAD i pobrano materiał do badania mikrobiologicznego. W laboratorium mikrobiologicznym identyfikowano bakterie znajdujące się na powierzchni chorobowo zmianionej skóry i wykonywano antybiogram. Następnie oceniano skuteczność kąpieeli podchlorynowych. W tej części pracy brało udział 54 pacjentów z AZS, 27 z nich, dodatkowo do standardowej terapii, zalecono kąpiele podchlorynowe 2 x w tygodniu przez 6 tygodni. Z zastosowaniem odpowiednich obliczeń statystycznych, porównano efekt terapii w grupie chorych stosujących i niestosujących roztwór podchlorynu sodu. W kolejnej części pracy zbadano mikrobiom skóry pacjentów chorujących na świerzbiczkę guzkową, i porównano jego skład do mikrobiomu u osób z AZS i zdrowych. W badaniu brało udział 24 pacjentów ze świerzbiczką guzkową, 14 z atopowym zapaleniem skóry i 9 osób zdrowych. Szczepy bakterii identyfikowano metodą molekularną (PCR). Wygenerowano metryki różnorodności mikroorganizmów alfa i beta. Różnorodność alfa wykazuje równomierność i bogactwo mikroorganizmów w danym środowisku czyli wewnątrz próbki, różnorodność beta odzwierciedla różnorodność międzypróbkową. Przeprowadzono analizę ANCOM identyfikując taksony bakterii na poziomie typu, klasy, rzędu, rodziny i rodzaju.

W wynikach pierwszej części rozprawy doktorskiej, opublikowanej jako praca pogładowa, Doktorantka wykazała że publikacje medyczne dowodzą tego, że mikrobiomy skóry, krwi i jelit u chorych z trądzikiem różowatym są odmienne od mikrobiomów u osób zdrowych. Zwróciła równocześnie uwagę na to, że wyniki badań różnych autorów są rozbieżne. W artykule pogładowym Doktorantka zamieściła 1 rycinę i 6 tabel, które ułatwiają prześledzenie treści. Część badawcza doktoratu z udziałem pacjentów została opublikowana w 4 artykułach. Doktorantka uzyskała bardzo ciekawe wyniki. Wykazała że zasiedlenie skóry przez *Staphylococcus aureus* występuje u chorych na AZS z większym nasileniem zmian skórnych i większym świądem. Bardzo cenną obserwacją, mającą znaczenie w postępowaniu klinicznym jest ocena oporności szczepów *S. aureus* zasiedlających skórę chorych na AZS. Ponad 10 % szczepów była oporna na erytromycynę, klindamycynę, amikacynę/gentamycynę. Kolejna część pracy doktorskiej dotyczyła kąpieli w roztworze podchlorynu sodu jako terapii pomocniczej u chorych z AZS. Doktorantka potwierdziła pozytywny efekt terapeutyczny tej metody postępowania, pomimo braku redukcji zasiedlenia skóry przez gronkowca. W publikacji tej części badań, treść została dodatkowo przedstawiona w 2 tabelach. Trzecia część pracy jest pierwszym metagenomicznym badaniem mikrobiomu skóry w świerzbiączce guzkowej. Po określeniu profilu genetycznego mikrobiomu, nie stwierdzono różnorodności alfa natomiast wykazano różnorodność beta pomiędzy grupami chorych na świerzbiączkę guzkową, atopowe zapalenie skóry i osób zdrowych. Po wyodrębnieniu taksonów bakterii i przeprowadzeniu analizy ANCOM wskazano większe zasiedlenie *Staphylococcus* u chorych ze świerzbiączką guzkową i atopowym zapaleniem skóry w porównaniu ze zdrowymi. W publikacji doktorantka wyniki przedstawiła graficznie za pomocą 6 kolorowych rycin.

Omówienie przeprowadzone jest w sposób prawidłowy i logiczny. Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością poruszanych zagadnień. Wyniki swoich badań zestawiała z aktualnymi doniesieniami literaturowymi. W ciekawy sposób starała się wyjaśnić pozytywny efekt kliniczny terapii z zastosowaniem kąpieli w roztworze podchlorynu sodu. Jak wykazała pomimo braku eradykacji lub ograniczenia ilości *Staphylococcus aureus* na powierzchni skóry u chorych z AZS, dochodzi do poprawy w zakresie stanu zapalnego skóry i zmniejszenia dolegliwości świądowych. Doktorantka wskazała na możliwość poprawy funkcji bariery naskórkowej i zmianę ekspresji mediatorów stanu zapalnego pod wpływem roztworu podchlorynu sodu.

Spis piśmiennictwa obejmuje 38 pozycji, aktualnych, i prawidłowo cytowanych.

W rozprawie doktorskiej zamieszczone jest streszczenie w języku polskim i angielskim. Autorka w sposób sprawny i zwięzły przedstawia w nich badania własne i wyniki pracy.

W oparciu o przeprowadzone badania Doktorantka sformułowała 5 wniosków. Stwierdziła że mikrobiom chorych na trądzik różowaty różni się od osób zdrowych jednak w piśmiennictwie istnieje wiele nieścisłości. U chorych na atopowe zapalenie skóry i świerzbiączkę guzkową *Staphylococcus* stanowi częsty składnik mikroflory bakteryjnej skóry. Kąpiele w roztworze podchlorynu sodu są cenną metodą wspomagającą leczenie chorych na AZS, pomimo, że nie redukują w sposób istotny liczby kolonii gronkowca złocistego. Skład mikrobiomu skóry chorych na świerzbiączkę guzkową jest odmienny od mikrobiomu osób zdrowych i jest zdominowany przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus*. Sformułowane przez Doktorantkę wnioski są zasadne, znajdują odzwierciedlenie w przeprowadzonych badaniach i wynikach.

Podsumowując, rozprawę doktorską lek. Klaudii Tutki oceniam bardzo pozytywnie. Temat badań podjęty przez Doktorantkę jest ważny, dotyczy częstych schorzeń dermatologicznych, które w znacznym stopniu obniżają jakość życia. Wyniki badań mają duże znaczenie praktyczne. Doktorantka zrealizowała postawione sobie cele badawcze, poprawnie dobrała i zastosowała metody badawcze, wykazała się bardzo dobrą znajomością tematyki zagadnienia. Autorka zatem umie zaplanować, i przeprowadzić badania naukowe, omówić własne wyniki w porównaniu z wynikami innych autorów, oraz prawidłowo sformułować wnioski końcowe. Rozprawa spełnia warunki sformułowane w art. 187. Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Przedkładam zatem Radzie Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego wniosek o dopuszczenie lek. Klaudii Tutki do dalszych etapów przewodu doktorskiego i równocześnie wnioskuję o wyróżnienie.

Dr hab. n. med. Anita Hryniewicz-Gwóźdź

Anita Hryniewicz-Gwóźdź