

Stanisław Jarmuda

„Ocena udziału roztoczy *Demodex folliculorum* i laseczek
Bacillus oleronius w patogenezie trądziku różowatego”

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor: prof. dr hab. n. med. Ryszard Żaba

Katedra i Klinika Dermatologii
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Poznań 2013

Składam serdeczne podziękowania promotorowi pracy
Panu Prof. dr hab. n. med. Ryszardowi Żabie
za okazaną życzliwość, opiekę merytoryczną oraz pomoc udzieloną mi
w trakcie przygotowywania niniejszej pracy

Składam serdeczne podziękowania
Panu Prof. dr hab. n. med. Andrzejowi Szkaradkiewiczowi
Kierownikowi Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
za umożliwienie realizacji
istotnych dla pracy badań naukowych

SPIS TREŚCI

Wykaz częściej używanych skrótów	7
1. Wstęp	9
1.1. Definicja trądziku różowatego	9
1.2. Rys historyczny schorzenia	9
1.3. Epidemiologia trądziku różowatego	10
1.4. Klasyfikacja i kryteria rozpoznania trądziku różowatego	12
1.5. Postacie trądziku różowatego	13
1.6. Etiopatogeneza trądziku różowatego	16
1.7. Hipotezy dotyczące etiopatogenezy schorzenia	16
1.7.1. Hipoteza o zaburzeniach naczyniowych	16
1.7.2. Hipoteza o dysregulacji immunologicznej	18
1.7.3. Hipoteza o wpływie czynników zewnętrznych	19
1.7.4. Hipoteza o degeneracji tkanki łącznej	20
1.7.5. Hipoteza o zaburzeniach w obrębie jednostki włosowo-łojowej	21
1.7.6. Hipoteza o udziale substancji chemicznych i pożywienia	21
1.7.7. Hipoteza o udziale mikroorganizmów	22
1.7.7.1. Roztocza <i>Demodex</i>	22
1.7.7.2. <i>Bacillus oleronius</i>	28
1.7.7.3. <i>Helicobacter pylori</i>	29
1.7.7.4. <i>Chlamydia pneumoniae</i>	31
1.8. Leczenie trądziku różowatego	31
1.8.1. Leczenie miejscowe	31
1.8.2. Leczenie ogólne	33
1.8.3. Psychoterapia	34
2. Cele pracy	35
3. Materiał i metody	36
3.1. Materiał	36
3.1.1. Grupy badane	36
3.1.2. Zeskrobiny naskórka.....	36
3.1.3. Surowica krwi do badań	37

3.2. Metody.....	37
3.2.1. Badanie podmiotowe	37
3.2.2. Badanie przedmiotowe	37
3.2.3. Badania dodatkowe	38
3.2.3.1. Badanie metodą standaryzowanej biopsji powierzchni skóry twarzy (SSSB)	38
3.2.3.2. Badanie poziomu wydzielania łoju przez skórę twarzy	38
3.2.4. Badania mikrobiologiczne	38
3.2.4.1. Izolacja bakterii i identyfikacja fenotypowa	38
3.2.4.2. Ekstrakcja DNA	39
3.2.4.3. Wykrywanie genu dla 16S rRNA <i>Bacillus oleronius</i>	39
3.2.5. Badanie surowiczych stężeń interleukiny 17A	40
3.2.6. Badanie reaktywności surowic krwi z białkami bakterii <i>Bacillus oleronius</i>	41
3.2.6.1. Przygotowanie białek bakteryjnych do analizy	41
3.2.6.2. Wykrywanie przeciwciał w surowicy przy użyciu metody Western blot	41
3.2.7. Analiza statystyczna	42

4. Wyniki 43

4.1. Wyniki badania podmiotowego, przedmiotowego i badań dodatkowych	43
4.1.1. Analiza liczby, wieku i płci pacjentów z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej	43
4.1.2. Analiza częstości występowania odmian trądziku różowatego w grupie badanej	45
4.1.3. Analiza czasu trwania objawów trądziku różowatego u pacjentów z grupy badanej	47
4.1.4. Analiza częstości występowania poszczególnych stopni nasilenia zmian skórnych u pacjentów z grupy badanej	48
4.1.5. Analiza liczebności roztoczy <i>Demodex folliculorum</i> na skórze twarzy u pacjentów z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej	49
4.1.6. Analiza liczebności roztoczy <i>Demodex folliculorum</i> na skórze twarzy w zależności od wieku pacjentów z grupy badanej	51
4.1.7. Analiza liczebności roztoczy <i>Demodex folliculorum</i> na skórze twarzy w zależności od stopnia nasilenia zmian skórnych u pacjentów z grupy badanej	53
4.1.8. Analiza poziomu wydzielania łoju przez skórę twarzy u pacjentów z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej	55
4.1.9. Analiza ilości wydzielania łoju przez skórę twarzy u pacjentów z grupy badanej w zależności od płci	55

4.1.10. Analiza poziomu wydzielania łoju przez skórę twarzy u pacjentów z grupy badanej w zależności od liczebności roztoczy <i>Demodex folliculorum</i>	56
4.2. Wyniki badań mikrobiologicznych	57
4.2.1. Analiza wyników badań inkubacji zeskrabin naskórka pobranych od pacjentów z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej	57
4.2.2. Analiza wieku pacjentów, czasu trwania objawów, liczebności roztoczy <i>Demodex folliculorum</i> na skórze twarzy oraz poziomu wydzielania łoju przez skórę twarzy w zależności od wyników badań inkubacji zeskrabin naskórka pobranych od pacjentów z grupy badanej	60
4.3. Wyniki badań surowicznych stężeń interleukiny 17A	61
4.3.1. Analiza stężeń surowicznych interleukiny 17A u pacjentów z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej	61
4.3.2. Analiza stężeń surowicznych interleukiny 17A u pacjentów z grupy badanej w zależności od wieku i liczebności roztoczy <i>Demodex folliculorum</i> na skórze twarzy	62
4.3.3. Analiza stężeń surowicznych interleukiny 17A u pacjentów z grupy badanej w zależności od odmiany trądziku różowatego	64
4.4. Wyniki badań reaktywności surowic krwi z białkami bakterii <i>Bacillus oleronius</i>	65
4.4.1. Analiza częstości reaktywności surowic krwi z białkami bakterii <i>Bacillus oleronius</i> w grupie badanej i kontrolnej	65
4.4.2. Analiza częstości reaktywności surowic krwi z białkami bakterii <i>Bacillus oleronius</i> w grupie badanej w zależności od stopnia nasilenia zmian skórnych	67
4.4.3. Analiza częstości reaktywności surowic krwi z białkami bakterii <i>Bacillus oleronius</i> w grupie badanej w zależności od wieku, czasu trwania objawów, liczebności roztoczy <i>Demodex folliculorum</i> na skórze twarzy, stężenia łoju wydzielanego przez skórę twarzy oraz surowiczego stężenia interleukiny 17A	68
4.4.4. Analiza częstości reaktywności surowic krwi z białkami bakterii <i>Bacillus oleronius</i> w grupie kontrolnej w zależności od wieku, liczebności roztoczy <i>Demodex folliculorum</i> na skórze twarzy, stężenia łoju wydzielanego przez skórę twarzy oraz surowiczego stężenia interleukiny 17A	72

5. Omówienie wyników badań i dyskusja 74

5.1. Omówienie wyników badania podmiotowego i przedmiotowego	74
5.2. Omówienie wyników badań dodatkowych i ocena wpływu stanu łojetokowego na liczebność roztoczy <i>Demodex folliculorum</i> na skórze twarzy	76
5.3. Omówienie wyników badań mikrobiologicznych i ocena roli roztoczy <i>Demodex folliculorum</i> jako potencjalnych wektorów dla bakterii <i>Bacillus oleronius</i>	80
5.4. Omówienie wyników badań surowicznych stężeń interleukiny 17A	87
5.5. Omówienie wyników badań reaktywności surowic krwi z białkami bakterii <i>Bacillus oleronius</i>	90

5.6. Podsumowanie dyskusji	93
6. Wnioski	95
7. Streszczenie	96
8. Summary	100
9. Wykaz tabel i rycin	103
9.1. Wykaz tabel	103
9.2. Wykaz rycin	105
10. Piśmiennictwo	107
11. Załączniki	121
11.1. Formularz świadomej zgody pacjenta	122

Wykaz częściej używanych skrótów

AMPs	Antimicrobial Peptides - peptydy o działaniu przeciwdrobnoustrojowym
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor - zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów
CD	Cluster of Differentiation - cząsteczka różnicowania komórek
DNA	Deoxyribonucleic Acid - kwas deoksyrybonukleinowy
ETR	Erythematoteleangiectatic Rosacea - odmiana rumieniowo-teleangiektatyczna trądziku różowatego
FGF	Fibroblast Growth Factor - czynnik wzrostu fibroblastów
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
H₂O₂	Hydrogen Peroxide - nadtlenek wodoru
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule - cząsteczka adhezji międzykomórkowej
IL	Interleukina
Ig	Immunoglobulina
kDa	kilo Dalton
MMP	Matrix Metalloproteinase - metaloproteinaza tkankowa
n	liczba badanych
NO	Nitric Oxide - tlenek azotu
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule - płytkowo-śródbłonkowe molekuly adhezyjne
PCR	Polymerase Chain Reaction - reakcja łańcuchowa polimerazy
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells - komórki jednojądrzaste krwi obwodowej
PPR	Papulopustular Rosacea - odmiana grudkowo-krostkowa trądziku różowatego
pz	pary zasad
RNA	Ribonucleic Acid - kwas rybonukleinowy
ROS	Reactive Oxygen Species - reaktywne formy tlenu
SSSB	Standardized Skin Surface Biopsy - metoda standaryzowanej biopsji powierzchni skóry

Th	T helper - limfocyty T pomocnicze
TNF	Tumor Necrosis Factor - czynnik martwicy guza
TLR	Toll Like Receptor - receptor toll-like
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor - czynnik wzrostu śródbłónka naczyń
UV	Ultraviolet - ultrafiolet
WHO	World Health Organization - Światowa Organizacja Zdrowia

1. Wstęp

1.1. Definicja trądziku różowatego

Trądzik różowaty (rosacea) jest przewlekłą, wielofazową chorobą zapalną skóry twarzy, przebiegającą często z okresami zaostrzeń i remisji (Wilkin i wsp. 2002). Wykwity skórne są u pacjentów zlokalizowane w obrębie wystających części twarzy: na policzkach, nosie, brodzie oraz na czole (Powell 2005, Burgdorf i wsp. 2010). Pierwszym i podstawowym objawem trądziku różowatego jest rumień, początkowo o charakterze przelotnym, a w późniejszych stadiach schorzenia utrwalony. Po różnym okresie trwania choroby na jego podłożu zaczynają się pojawiać wykwity wtórne, takie jak teleangiektazje, grudki i krosty, obrzęk, a niekiedy także zmiany przerostowe, tzw. phyma (Crawford i wsp. 2004). Objawom skórnyom ze zmienną częstością mogą towarzyszyć dolegliwości oczne, dotyczące najczęściej obojga oczu i mogące przybierać różne nasilenie – od łagodnego uczucia wzmożonego pieczenia oczu aż do poważnych uszkodzeń rogówki (Quarterman i wsp. 1997).

1.2. Rys historyczny schorzenia

Współcześnie trądzik różowaty jest chorobą dość dobrze znaną i rozpoznawaną przez lekarzy różnych specjalności (Robak i wsp. 2010). Historycznie, wraz z trądzikiem pospolitym, był on zaliczany do chorób łojotokowych skóry. Nawiązania do trądziku różowatego odnaleźć można w licznych dziełach literatury i sztuki, gdzie często stanowił inspirację dla artystów i pisarzy (Robak i wsp. 2010).

W literaturze medycznej pierwsze wzmianki na temat trądziku różowatego pojawiają się u arabskich autorów medycznych, takich jak Rhazes i Avicenna, którzy następnie wiedzę o jednostce chorobowej zwanej przez nich „albedsanem” przekazywali lekarzom z włoskich uniwersytetów (de Bersaques 1995). Pierwszego medycznego opisu trądziku różowatego dokonał w dziele „La Grande Chirurgie”, żyjący w XIV wieku, francuski chirurg Guy de Chauliac (1300-1368). Pojawiający się na skórze policzków, nosa i czoła rumień określał on terminem „goutterose”, czyli różowe kropkowanie (Robak i wsp. 2010). Innymi historycznymi określeniami trądziku różowatego były: łacińska nazwa „gutta rosa” czy angielskie określenie „pimples of wine”, gdyż pojawianie się wykwitów chorobowych było często, aczkolwiek niesłusznie, kojarzone z nadużywaniem alkoholu (de Bersaques 1995). Paryski chirurg Ambroise Pare (1510-1590) w leczeniu rosacea jako pierwszy zalecał unikanie picia wina, stosowania ostrych przypraw oraz nagłych zmian temperatury. Pisał on, że objawy trądziku różowatego ulegają zaostrzeniu zimą, ponieważ chłodne powietrze

powoduje zamknięcie ujść mieszków włosowych, a pozostała pod skórą ich zawartość prowokuje powstawanie wykwitów skórnych (de Bersaques 1995). Na podstawie charakterystycznych cech klinicznych, w 1891 roku Henri G. Piffard (1842-1919) po raz pierwszy odróżnił trądzik różowaty od trądziku zwykłego, traktując obie jednostki jako odmienne schorzenia (Robak i wsp. 2010). Na przestrzeni wieków zmieniało się podejście w kwestii leczenia trądziku różowatego. Począwszy od XVI wieku w terapii miejscowej schorzenia zaczęto stosować maści. Wcześniejszymi sposobami leczenia rosacea były upusty krwi z żył ramiennych oraz z okolic skóry twarzy objętych procesem chorobowym (de Bersaques 1995). Stosowano także terapię z użyciem pijawek, które przystawiano pacjentom do chorobowo zmienionych obszarów skóry twarzy (Robak i wsp. 2010).

1.3. Epidemiologia trądziku różowatego

Trądzik różowaty jest dość częstą dermatozą. Na podstawie badań populacyjnych określa się częstość jego występowania w przedziale od 2% w Niemczech (Schaefer i wsp. 2008) do 10% w Szwecji (Berg i wsp. 1989). Najczęściej obserwowaną odmianą rosacea jest postać rumieniowo-teleangiektatyczna, występująca u 81% osób badanych (Berg i wsp. 1989). Badania oparte na analizie skierowań pacjentów do leczenia szpitalnego w różnych ośrodkach dermatologicznych wykazały, że częstość występowania trądziku różowatego wynosi od 0,5 do 3% (Powell 1998, Gupta i Chaudhry 2005, Kyriakis i wsp. 2005).

Według niektórych autorów, obie płcie w podobnym stopniu są dotknięte przez trądzik różowaty (Schaefer i wsp. 2008, Kyriakis i wsp. 2005), zaś według innych dotyka on głównie kobiety (Berg i wsp. 1989, Jansen i Plewig 1997, Burgdorf i wsp. 2010), u których chorobę rozpoznaje się nawet trzy razy częściej niż u mężczyzn (Berg i wsp. 1989). Można to wytłumaczyć w ten sposób, że kobiety częściej niż mężczyźni korzystają z konsultacji dermatologicznych (Feldman i wsp. 2001). Sam przebieg schorzenia jest natomiast cięższy u mężczyzn, u których częściej dochodzi do rozwoju zmian guzowatych typu phyma (Kyriakis i wsp. 2005).

Mimo że trądzik różowaty może rozwinąć się u przedstawicieli wszystkich ras, to zdecydowanie częściej jest spotykany u ludzi rasy białej, z jasnym I lub II fototypem skóry według Fitzpatricka (Del Rosso 2006). Rzadkie są natomiast przypadki występowania rosacea u osób o ciemnej karnacji (Rosen i Stone 1987).

Początek pojawiania się objawów rosacea zwykle przypada na 30-50 rok życia (Powell 2005). W populacji można wyróżnić trzy grupy wiekowe występowania schorzenia. W grupie pierwszej, obejmującej osoby w wieku poniżej 35 lat, liczba przypadków rosacea

wśród przedstawicieli obu płci kształtuje się na podobnym, niewysokim poziomie. W przedziale wiekowym 35-50 lat zaobserwować można znaczny wzrost zachorowalności na trądzik różowaty, szczególnie wśród kobiet. Natomiast w trzecim przedziale wiekowym, u osób powyżej 50 roku życia, zachorowalność na trądzik różowaty jest największa, ze zbliżoną liczbą nowych przypadków choroby u obojga płci (Kyriakis i wsp. 2005).

Trądzik różowaty jest schorzeniem osób dorosłych, ale może również występować u dzieci (Kroshinsky i Glick 2006), zwłaszcza z jasną karnacją. Charakteryzuje się występowaniem na skórze wypukłych części twarzy wykwitów grudkowo-krostkowych, na podłożu rumieniowym. W odróżnieniu od trądziku różowatego występującego u osób dorosłych, do postawienia rozpoznania odmiany dziecięcej rosacea musi być spełnione więcej niż jedno kryterium diagnostyczne (Kroshinsky i Glick 2006, Chamailard i wsp. 2008, Frieden i wsp. 1989).

Dolegliwości oczne, towarzyszące objawom skórny trądziku różowatego, występują u wielu pacjentów, choć często bywają nierozpoznane (Kligman 1997). Zmiany w narządzie wzroku stwierdza się nawet u 58% pacjentów z rosacea - dotyczą one zwykle obojga oczu i występują w różnym nasileniu (Quarterman i wsp. 1997). Objawy oczne pojawiają się jako pierwsze, przed wystąpieniem zmian skórnych, u około 20% pacjentów z trądzikiem różowatym; u 27% chorych zmiany skórne i dolegliwości oczne pojawiają się równolegle; a u 53% chorych jako pierwsze występują objawy skórne (Borrie 1953).

Mimo że trądzik różowaty nie należy do schorzeń zagrażających życiu, to jednak może negatywnie wpływać na stan psychiczny i społeczne funkcjonowanie pacjentów (Chodkiewicz i wsp. 2007, Tyc-Zdrojewska i wsp. 2011). U chorych na trądzik różowaty często stwierdza się występowanie zaburzeń lękowych i depresyjnych, spowodowanych koniecznością unikania czynników i sytuacji mogących prowadzić do zaostrzenia zmian skórnych na tak eksponowanej części ciała, jaką jest twarz (Chodkiewicz i wsp. 2007). Pacjenci z rosacea deklarują też mniejsze zadowolenie ze swojego życia, zaniżone poczucie własnej wartości i często uskarżają się na problemy w życiu osobistym (Chodkiewicz i wsp. 2007, Abram i wsp. 2009, Tyc-Zdrojewska i wsp. 2011).

1.4. Klasyfikacja i kryteria rozpoznania trądziku różowatego

Rozpoznanie trądziku różowatego jest oparte na przeprowadzonym przez lekarza badaniu podmiotowym i przedmiotowym pacjenta oraz na dokładnej ocenie objawów klinicznych (Powell 2005). Z uwagi na dużą różnorodność w zakresie dolegliwości i objawów skórnych prezentowanych przez chorych, w roku 2002 Międzynarodowe Towarzystwo Trądziku Różowatego (National Rosacea Society) powołało specjalną komisję, która opracowała standardowy system klasyfikacji trądziku różowatego (Wilkin i wsp. 2002). Stanowi on dokument systematyzujący kryteria diagnostyczne schorzenia i dzielący trądzik różowaty na postacie:

- **rumieniową z teleangiektazjami** (erythematoteleangiectatic rosacea, ETR),
- **grudkowo-krostkową** (papulopustular rosacea, PPR),
- **postać z dominacją zmian przerostowych** (phymatous rosacea),
- **postać oczną** (ocular rosacea) oraz wariant schorzenia
- **ziarniniakowaty trądzik różowaty** (granulomatous rosacea, GR) (Wilkin i wsp. 2002, Wilkin i wsp. 2004).

Kryteria diagnostyczne trądziku różowatego zostały natomiast podzielone na:

- pierwszorzędowe (rumień przelotny, tzw. flushing, rumień trwały, grudki, krosty i teleangiektazje), których obecność na wypukłych częściach okolicy środkowej twarzy upoważnia do rozpoznania trądziku różowatego;
- drugorzędowe (uczucie pieczenia lub szczypania, obrzęk, obecność tarczki, uczucie wysuszenia skóry, objawy oczne, objawy zlokalizowane pozatwarzowo i zmiany przerostowe), wspomagające proces stawiania diagnozy (Wilkin i wsp. 2002).

Autorzy raportu stwierdzili, że u chorego cierpiącego na jedną z odmian rosacea mogą również występować objawy charakterystyczne dla innej postaci tego schorzenia, np. rumień i teleangiektazje, charakterystyczne dla postaci rumieniowej, mogą być obecne na skórze u pacjentów z odmianą grudkowo-krostkową oraz guzową rosacea (Wilkin i wsp. 2002). Niezależnie od obecności lub braku objawów skórnych, w każdej postaci trądziku różowatego mogą również pojawić się dolegliwości oczne. Stwierdzono też, że nie następuje przemiana jednego podtypu trądziku różowatego w inny, choć możliwa jest progresja ciężkiej postaci grudkowo-krostkowej lub ziarniniakowej do postaci z dominacją zmian przerostowych (Wilkin i wsp. 2002).

Z grupy trądziku różowatego wyłączono takie schorzenia, jak: trądzik różowaty piorunujący (rosacea fulminans), indukowane steroidami trądzikopodobne zmiany skórne

(steroid-induced acneiform eruption) oraz zapalenie okołoustne skóry (perioral dermatitis) (Wilkin i wsp. 2002).

W celu obiektywnego monitorowania procesu leczenia pacjentów, grupa ekspertów z National Rosacea Society zaproponowała (w 2004 roku) użyteczny w praktyce klinicznej system oceny stopnia nasilenia objawów trądziku różowatego. W systemie tym objawy pierwszorzędowe podlegają ocenie: od wartości 0 (brak objawów), poprzez 1 (łagodne nasilenie), 2 (umiarkowane nasilenie) aż do 3 (znaczne nasilenie objawów); zaś w przypadku objawów drugorzędowych stwierdza się ich obecność lub brak (Wilkin i wsp. 2004).

1.5. Postacie trądziku różowatego

Postać rumieniowa z teleangiektazjami charakteryzuje się występowaniem na skórze centralnych partii twarzy objawu rumienia, określanego jako przelotny (jeśli trwa do 10 minut) lub utrwalony (jeśli utrzymuje się przez trzy miesiące lub dłużej) (Crawford i wsp. 2004). W początkowym okresie choroby epizody pojawiania się rumienia trwają krótko i są najczęściej wywołane przez określone czynniki zewnętrzne. Stopniowo czas trwania i częstotliwość pojawiania się rumienia rośnie, aż do rozwoju rumienia trwałego i pojawienia się rozszerzonych naczyń krwionośnych – teleangiektazji (Crawford i wsp. 2004). Objawami towarzyszącymi rumieniowi może być obrzęk i złuszczenie naskórka, zaś sam rumień może się rozszerzać na okolice pozatwarzowe skóry oraz obejmować swym zasięgiem skórę szyi i dekoltu (Marks i Jones 1969). Czynnikiem wywołującym pojawienie się rumienia u chorych mogą być: ekspozycja na sytuacje stresowe, spożycie gorącego napoju, posiłku lub alkoholu, stosowanie ostrych przypraw, wykonywanie intensywnych ćwiczeń fizycznych oraz narażenie skóry twarzy na oddziaływanie gorącego lub zimnego powietrza (Crawford i wsp. 2004). U pacjentów często stwierdza się zwiększoną wrażliwość skóry na składniki kosmetyków (Lonne-Rahm i wsp. 1999). Szczególnie ważne jest, aby w codziennej praktyce klinicznej różnicować rumień występujący na twarzy osób z trądzikiem różowatym ze zmianami o typie rumienia, obecnymi na skórze twarzy w innych jednostkach dermatologicznych (Izickson i wsp. 2006).

Postać grudkowo-krostkowa trądziku różowatego jest też nazywana jego klasyczną odmianą i charakteryzuje się występowaniem na skórze środkowej części twarzy symetrycznie rozmieszczonych wykwitów grudkowych i krostkowych, leżących na podłożu utrwalonego rumienia (Crawford i wsp. 2004). W tej odmianie rosacea obserwuje się również - wywołany przewlekłym stanem zapalnym - obrzęk i zgrubienie skóry twarzy oraz delikatne złuszczenie naskórka. W odróżnieniu od odmiany rumieniowej rosacea, rzadziej stwierdza się

występowanie na skórze twarzy teleangiektazji i epizodów rumienia napadowego (Powell 2005). Ta odmiana trądziku różowatego wymaga różnicowania z zapaleniem okołoustnym oraz łojotokowym zapaleniem skóry. Może też klinicznie przypominać trądzik pospolity, ale od acne vulgaris różni się brakiem zaskórników (Crawford i wsp. 2004).

Postać z dominacją zmian przerostowych jest rzadko występującą odmianą trądziku różowatego, charakteryzującą się obecnością w różnych częściach twarzy oraz pozatwarzowo niebolesnych wykwitów guzowatych (Powell 2004, Powell 2005). Obecność zmian guzowatych jest spowodowana nasilonym procesem przerostu gruczołów łojowych i elementów tkanki łącznej oraz pogrubieniem skóry, powodującym widoczne zniekształcenia różnych fragmentów twarzy (Crawford i wsp. 2004). Zmiany przerostowe mogą być zlokalizowane na nosie (rhinophyma), na brodzie (gnathophyma), na czole (glabellaphyma), na powiekach (blepharophyma) lub w obrębie małżowin usznych (otophyma). Pokrywająca zmiany guzowate skóra jest lśniąca i zawiera wyraźnie rozszerzone ujścia gruczołów łojowych. Najczęstszą odmianą choroby jest guzowaty przerost nosa, który około dwudziestokrotnie częściej występuje u mężczyzn i tylko w pojedynczych przypadkach jest opisywany u kobiet (Roberts i Ward 1985, Bogdanowski i wsp. 1996). Rhinophyma stanowi dla pacjentów nie tylko defekt natury estetycznej, ale może również utrudniać swobodne oddychanie (Szymańska-Skrzypek i wsp. 2005). Rhinophyma może występować jako izolowana manifestacja rosacea i wówczas wymaga różnicowania z takimi chorobami obejmującymi okolice nosa jak sarkoidoza, rak podstawnokomórkowy i kolczystokomórkowy oraz chłoniak złośliwy (Murphy i wsp. 1998). Czasami dopiero badanie histopatologiczne pozwala na postawienie właściwej diagnozy (Murphy i wsp. 1998).

Postać oczna trądziku różowatego może występować jako odmiana izolowana lub też zmiany oczne mogą towarzyszyć każdej innej odmianie trądziku różowatego i - według danych z literatury - mogą być obecne u 3% do 58% chorych na rosacea (Starr i Macdonald 1969, Quarterman i wsp. 1997, Kałużna 2004, Oltz i Check 2011). Oczny trądzik różowaty charakteryzuje się występowaniem raczej nieswoistych objawów i dolegliwości, takich jak uczucie swędzenia, pieczenia lub suchości oczu. Dodatkowo może występować światłowstręt, obniżona ostrość wzroku, uczucie obecności ciała obcego w oku, zwiększone łzawienie oraz przekrwienie spojówek (Kałużna 2004). U pacjentów z ocznym trądzikiem różowatym często dochodzi do rozwoju zapaleń spojówek, zapaleń brzegów powiek oraz nawracających gradówek i jęczmieni, mających związek z występującą nawet u 78% pacjentów dysfunkcją gruczołów Meiboma (Akpek E i wsp. 1997). Mimo przeprowadzenia wielu badań,

etiopatogeneza zmian ocznych w trądziku różowatym nadal nie została wyjaśniona (Raszeja-Kotelba i wsp. 2004, Stone i Chodosh 2004).

Ziarniniakowaty trądzik różowaty stanowi nietypową odmianę rosacea i został przez ekspertów wyróżniony jako tzw. wariant tego schorzenia. Charakteryzuje się obecnością różnej wielkości twardych, żółtych, brązowych lub czerwonych grudek lub guzków, wykazujących niekiedy tendencję do rozpadu i bliznowacenia (Wilkin i wsp. 2002). Zmiany chorobowe mogą występować zarówno na podłożu zapalnym, jak i w skórze niezmienionej. Lokalizują się najczęściej na bocznych powierzchniach policzków, dolnych powiekach, wokół otworów naturalnych lub poza twarzą (Helm i wsp. 1991). W przypadku tej odmiany trądziku różowatego do postawienia rozpoznania wymagany jest wynik badania histopatologicznego skóry uzyskanej ze zmian, a nie - jedynie obraz kliniczny (Jaworek i wsp. 2006).

Eksperci z National Rosacea Society wyłączyli z grupy schorzeń należących do trądziku różowatego i jako osobne jednostki chorobowe wyodrębnili następujące:

Trądzik różowaty piorunujący (rosacea fulminans) nazywany również pyoderma faciale, stanowi jednostkę chorobową o nieustalonej przyczynie. Rozpoczyna się nagle: od wykwitów skórnych w postaci skupionych grudek, guzów i krost oraz od wystąpienia rumienia i obrzęku twarzy (O'Leary i Kierland 1940, Sielska i Saneczko 2003). W przebiegu schorzenia nie stwierdza się występowania dolegliwości ocznych. Objawom miejscowym często towarzyszą objawy ogólne i gorączka (Romiti i wsp. 2000). Zmiany chorobowe najczęściej lokalizują się na policzkach i brodzie, a w przypadkach o cięższym przebiegu mogą zajmować nawet całą powierzchnię twarzy (Massa i Su 1982). Wykwity mają tendencję do stopniowego, trwającego do kilku miesięcy ustępowania i częstego pozostawiania blizn. Rosacea fulminans najczęściej dotyka młode kobiety w wieku od 20 do 40 lat (Sielska i Saneczko 2003) i stanowi jedną z dwóch postaci rosacea, w schemacie leczenia których dopuszcza się stosowanie preparatów steroidowych w połączeniu z izotretinoiną oraz dapsonu (Firooz i wsp. 2001).

Trądzik różowaty posteroიდowy (rosacea poststeroida) jest chorobą wywołaną długotrwałym stosowaniem miejscowych preparatów steroidowych, szczególnie odmian fluorowanych (Sielska i Saneczko 2003). Charakteryzuje się obecnością licznych wykwitów krostkowych występujących na podłożu rumieniowym, ścieńczeniem naskórka oraz pojawieniem się teleangiektazji i rozszerzonych naczyń krwionośnych. Leczenie tej dermatozy jest trudne, a pierwszym etapem terapii jest zaprzestanie miejscowego aplikowania steroidu (Sielska i Saneczko 2003).

Zapalenie okołoustne (dermatitis perioralis) charakteryzuje się występowaniem na skórze niewielkich, czerwono-brunatnych grudek z krostą na szczycie, leżących na podłożu rumieniowym (Sielska i Saneczko 2003). Wykwity te lokalizują się wokół ust i między fałdami nosowo-policzkowymi. Nie pojawiają się natomiast w strefie 5-7mm w pobliżu czerwieni wargowej. Zmianom skórnym może towarzyszyć subiektywne odczucie pieczenia skóry twarzy (Sielska i Saneczko 2003, Burgdorf i wsp. 2010, Kaszuba i Adamski 2011).

1.6. Etiopatogeneza trądziku różowatego

Mimo przeprowadzenia licznych badań naukowych, etiopatogeneza trądziku różowatego pozostaje wciąż niewyjaśniona (Yamasaki i Gallo 2009). Nie zostały do końca poznane mechanizmy patogenetyczne, leżące u podstaw powstania i rozwoju zmian skórnych. Wiadomo, że w rozwoju tej choroby odgrywają rolę różne, często kontrowersyjne czynniki (Crawford i wsp. 2004). Wymienia się kilka hipotez, mówiących o udziale w patogenezie tego schorzenia określonych czynników, takich jak: zaburzenia naczyniowe, zaburzenia immunologiczne, degeneracja elementów tkanki łącznej, zaburzenia w obrębie struktury jednostki włosowo-łojowej, czynniki zewnętrzne (klimatyczne), czynniki chemiczne i żywieniowe. Z uwagi na obserwowane przypadki rodzinnego występowania schorzenia, bierze się także pod uwagę udział czynników genetycznych w jego patogenezie (Bamford 2001). Istnieje również zyskująca coraz więcej zwolenników hipoteza, która wskazuje na możliwy udział w etiopatogenezie schorzenia niektórych czynników infekcyjnych (Crawford i wsp. 2004, Szkaradkiewicz i wsp. 2012).

1.7. Hipotezy dotyczące etiopatogenezy schorzenia

1.7.1. Hipoteza o zaburzeniach naczyniowych

Według tej teorii, powstawanie zmian skórnych w trądziku różowatym jest związane z patologią skórnych naczyń krwionośnych (Crawford i wsp. 2004). W początkowej fazie trwania trądziku różowatego zaburzenia naczyniowe manifestują się głównie pod postacią napadowego zaczerwienienia skóry twarzy, spowodowanego nadreaktywnością naczyń krwionośnych. Zjawisko to określa się mianem „flushing” (Wilkin 1994), a występuje ono najczęściej wraz z ekspozycją na sytuacje stresowe, ze spożyciem alkoholu lub ostrych przypraw, z narażeniem na wpływ wysokiej temperatury, a u kobiet - dodatkowo w okresie menopauzy (Buechner 2005). Flushing, które jest spowodowane nagłym rozszerzeniem naczyń krwionośnych skóry twarzy, może być wyzwolone w wyniku stymulacji nerwowej (za

pośrednictwem bodźców z układu nerwowego) oraz w efekcie uruchomienia mechanizmu humoralnego (poprzez oddziaływanie na mięśniówkę gładką naczyń) (Crawford i wsp. 2004). Mierząc wielkość skórno przepływu naczyniowego w reakcji na pobudzenie dwoma rodzajami bodźców: na drodze stymulacji nerwowej (podwyższenie temperatury w jamie ustnej) oraz bezpośrednią stymulację mięśni gładkich naczyń (test z kwasem nikotynowym) w dwóch różnych okolicach ciała (tj. w okolicy przedramienia i na twarzy) u pacjentów z trądzikiem różowatym, uzyskano - proporcjonalny do pobudzenia - wzrost przepływu krwi w naczyniach krwionośnych obu okolic ciała, choć wystąpienie objawu rumienia odnotowano jedynie w obrębie skóry twarzy (Wilkin 1988). Ograniczenie występowania objawu flushing do obszaru skóry twarzy wyjaśniono wówczas faktem istnienia tam większej liczby naczyń krwionośnych oraz ich bardziej powierzchownym umiejscowieniem (Wilkin 1981, Wilkin 1988).

U chorych z rosacea wykazano też zwiększoną w stosunku do osób zdrowych wartość wielkości przepływu naczyniowego w obszarach skóry twarzy, objętych zmianami chorobowymi (Sibenge i Gawkrödger 1992, Guzman-Sanchez i wsp. 2007) oraz stwierdzono - spowodowane prawdopodobnie nadreaktywnością naczyń skóry twarzy - zjawisko ustępowania rumienia na skórze twarzy po miejscowej aplikacji preparatów zawierających agonistów receptora α_1 -adrenergicznego (Shanler i Ondo 2007). Sugerowano, że przyczyną występowania objawu rumienia na skórze twarzy może być dysregulacja dotycząca mechanizmów termoregulacji (Brinnel i wsp. 1989). W warunkach fizjologicznych, w przypadku hipertermii - dla zachowania odpowiedniego schłodzenia struktur wewnątrzczaszkowych - obserwuje się odruchowy wzrost ilości przepływającej krwi z obszarów twarzy do mózgu (Crawford i wsp. 2004). Zbadano, w jaki sposób hipertermia wpływa na wzrost przepływu krwi w układzie żył kątowych twarzy, odprowadzających krew z obszarów skóry twarzy najczęściej objętych procesem chorobowym. Stwierdzono, że w odpowiedzi na hipertermię u chorych na trądzik różowaty nie obserwuje się wzrostu przepływu krwi w tych naczyniach, w przeciwieństwie do osób zdrowych (Brinnel i wsp. 1989). Wykazano również, że poddani działaniu wysokiej temperatury otoczenia, pacjenci z trądzikiem różowatym prezentowali szybsze niż osoby zdrowe pojawienie się rumienia na skórze twarzy (Nagasaka i wsp. 1998), a u chorych z odmianą rumieniową stwierdzono, że podwyższona temperatura w większym stopniu niż kofeina wywołuje pojawienie się objawu przelotnego rumienia (Wilkin 1981). Tłumaczono to w ten sposób, że podczas spożywania gorącego pokarmu następuje wymiana ciepła pomiędzy jamą ustną a naczyniami szyjnymi, z których do podwzgórza przekazywany jest sygnał informujący o wzroście temperatury.

Reakcją podwzgorza na ten impuls jest rozszerzenie naczyń (wazodylatacja), objawiające się wystąpieniem rumienia (Wilkin 1981).

Nadmierne rozszerzenie naczyń krwionośnych skóry obserwowane u chorych na trądzik różowaty może mieć również związek ze zwiększonym miejscowo stężeniem neuropeptydów, w szczególności substancji P (Crawford i wsp. 2004). Jej podwyższone stężenie stwierdzono zarówno wokół naczyń kapilarnych zlokalizowanych w warstwie brodawkowej skóry (Kurkcuoglu i Alaybeyi 1991), jak i w surowicach chorych z rosacea (Powell i wsp. 1993). Należąca do neurokinin substancja P może być uwalniana przez obwodowe włókna nerwowe w reakcji na bodźce zewnętrzne i może powodować m.in. rozszerzenie naczyń krwionośnych oraz stymulować rozwój reakcji zapalnej u pacjentów z rosacea (Kurkcuoglu i Alaybeyi 1991).

U chorych na trądzik różowaty - poza wzmożoną reaktywnością naczyń - można także obserwować zjawisko nadmiernego ich powstawania (Gomaa i wsp. 2007). Porównując obszary skóry zmienionej chorobowo oraz obszary skóry zdrowej, stwierdzano istotne zwiększenie ekspresji markerów pobudzających neowaskularyzację w obszarach skóry objętych zmianami chorobowymi (Gomaa i wsp. 2007). Może to oznaczać, że u tych pacjentów intensywność angiogenezy w chorej skórze jest większa w porównaniu do skóry wolnej od zmian skórnych, a wzmożona proliferacja może dotyczyć zarówno naczyń krwionośnych, jak i limfatycznych (Gomaa i wsp. 2007).

1.7.2. Hipoteza o dysregulacji immunologicznej

Według innej teorii, kluczowym elementem patogenezы trądziku różowatego może być nieprawidłowa, patologicznie nasilona odpowiedź wrodzonego układu odpornościowego (Yamasaki i Gallo 2009). Wrodzony układ odpornościowy, stanowiący istotny element systemu obronnego organizmu, opiera się na zdolności do szybkiej identyfikacji i zniszczenia czynnika obcego, a aktywacja jego elementów następuje między innymi w wyniku działania czynników środowiskowych (np. promieniowanie UV) czy mikroorganizmów i odbywa się poprzez aktywację receptorów toll-like (TLR) (Takeda K i wsp. 2003, Meylan i wsp. 2006). Rezultatem ich aktywacji jest produkcja prozapalnych cytokin oraz uwalnianie czynnika przeciwbakteryjnego – katelicydyny (Dorschner i wsp. 2001).

Katelicydyny, stanowiące grupę białek antybakteryjnych wyzwalanych w zakażeniach skóry, posiadają zdolność do modyfikacji miejscowej reakcji zapalnej oraz wywierają miejscowe działanie naczyniotwórcze. Ludzka katelicydyna (LL-37) - poza działaniem przeciwbakteryjnym - może również indukować rozwój stanu zapalnego oraz zwiększać

przepuszczalność naczyń krwionośnych (Chen i wsp. 2006). Stwierdzono, że u chorych na trądzik różowaty ekspresja katelicydyny w skórze twarzy osiąga poziom dziesięciokrotnie wyższy od poziomu prawidłowego oraz że wyższe są też poziomy specyficznych proteaz aktywujących katelicydyny (Yamasaki i wsp. 2007). W organizmie człowieka enzymem odpowiedzialnym za aktywację katelicydyny oraz za proces trawienia elementów utkania zewnątrzkomórkowego jest kallikreina 5 (KLK 5) (Michael i wsp. 2005). Obecność tej proteazy serynowej stwierdza się w zdrowym naskórku jedynie w komórkach jego warstwy rogowej i ziarnistej, zaś u pacjentów z rosacea występuje ona także w innych warstwach. Kallikreina 5 (KLK 5) odpowiada za trawienie białek wchodzących w skład połączeń międzykomórkowych, przez co może prowadzić do złuszczenia komórek naskórka (Caubet i wsp. 2004, Descargues i wsp. 2006). Znaczenie kallikreiny 5 (KLK 5) w patogenezie trądziku różowatego nie zostało jeszcze ostatecznie zbadane, chociaż wydaje się, że jej podwyższone poziomy tkankowe mogą mieć wpływ na kształtowanie obrazu histologicznego choroby. Może ona bowiem przyczyniać się do zaostrzania objawów trądziku różowatego zarówno poprzez aktywację katelicydyn, jak i trawienie elementów budulcowych tkanki łącznej, prowadząc w ten sposób do jej patologicznego remodelingu (Yamasaki i Gallo 2009).

1.7.3. Hipoteza o wpływie czynników zewnętrznych

Przypuszczenia o roli czynników zewnętrznych (klimatycznych) w patogenezie rosacea wzięły się z obserwacji wskazujących na to, że choroba występuje częściej u osób zawodowo narażonych na wpływ wysokiej temperatury (Soybe 1950). Wśród czynników zewnętrznych mogących mieć rzeczywisty wpływ na przebieg trądziku różowatego, pierwsze miejsce zajmuje promieniowanie ultrafioletowe (UV) (Crawford i wsp. 2004). Na jego rolę może wskazywać obserwowane u większości chorych rozmieszczenie wykwitów chorobowych na wypukłych segmentach środkowej części twarzy, częstsze występowanie rosacea u osób z jasną skórą i niebieskimi oczyma, zaostrzenie się objawów chorobowych w okresie wczesnowiosennym oraz występowanie zmian histologicznych o typie elastozy posłonecznej w pobranych wycinkach skórnych (Soybe 1950, Marks i Harcourt-Webster 1969). Wyniki przeprowadzonych badań wykazały jednak, że zaostrzenie objawów skórnych pod wpływem działania promieniowania słonecznego obserwuje się zaledwie u 17-31% pacjentów z rosacea (Berg i wsp. 1989).

Przypuszcza się, że ekspozycja skóry na promienie UV może prowadzić do nasilenia intensywności procesu angiogenezy w skórze (Brauchle i wsp. 1996). Efektem działania promieni UV może być uwolnienie z keratynocytów czynników proangiogennych, takich jak

VEGF (naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu) czy bFGF (zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów), których znaczne źródło stanowią komórki naskórka (Detmar i wsp. 1994, Ballaun i wsp. 1995). Następstwem ekspozycji skóry na działanie promieniowania UV może być również wzrost sktywnych form tlenu (ROS) w komórkach naskórka. Ich podwyższony poziom wykryto w biopsjach skórnych pochodzących od pacjentów z trądzikiem różowatym, a spadek ich poziomu odnotowywano po przeprowadzeniu kuracji azytromycyną (Bakar i wsp. 2007).

Poza obserwowanym pod wpływem promieniowania UV wzrostem wytwarzania w skórze czynnika VEGF, wzmagającego proces angiogenezy, nawet niskie dawki UVB przyczyniają się do aktywacji w zdrowych keratynocytach metaloproteinaz tkankowych (MMP-1, MMP-3 i MMP-9) (Bielenberg i wsp. 1998). Enzymy te mogą wpływać na powstawanie i zaostrzanie zmian skórnych w trądziku różowatym. Poprzez degradację struktur białkowych obecnych w przestrzeniach międzykomórkowych mogą przyczyniać się do zmniejszania grubości skóry i rozszerzania naczyń krwionośnych (Vincent i Eris 2004). Poprzez dostarczanie produktów degradacji tkanki łącznej, wykazujących silne właściwości proangiogenne, mogą również nasilać rozwój lokalnego stanu zapalnego w tkankach (Vincent i Eris 2004, Quan i wsp. 2009).

1.7.4. Hipoteza o degeneracji tkanki łącznej

Konsekwencją wzmożonego działania metaloproteinaz tkankowych może być degradacja białek ważnych dla struktury tkanki łącznej, które stanowią podporę i „rusztowanie” dla sieci naczyń krwionośnych (Yamasaki i Gallo 2009). Wyniki badań wycinków skórnych, pobranych od chorych na trądzik różowaty, wskazują na współistnienie w obrazie histopatologicznym równocześnie dwóch zjawisk: degeneracji elementów macierzy pozakomórkowej oraz obecności uszkodzonych naczyń krwionośnych (Helm i wsp. 1991, Marks i Harcourt-Webster 1969, Neumann i Frithz 1998). Niewyjaśniona jest kwestia, który z procesów zachodzi w skórze jako pierwszy. Według jednej z hipotez, zjawiskiem pierwotnym są zmiany w okołonaczyniowej tkance łącznej (Marks i Harcourt-Webster 1969), a czynnikiem inicjującym rozwój zmian w tkankach może być promieniowanie UV, które przyczynia się do niszczenia sieci okołonaczyniowych włókien elastycznych i kolagenowych, zaś obserwowane objawy kliniczne, takie jak teleangiektazje, przetrwały rumień czy głęboki obrzęk, są konsekwencją słabego osadzenia naczyń (Marks i Harcourt-Webster 1969).

Inna teoria, oparta o wyniki badań przeprowadzonych na modelach zwierzęcych, zakłada, że niszczenie naczyń krwionośnych jest procesem pierwotnym w stosunku do

wtórnie przebiegających zaburzeń w strukturze macierzy pozakomórkowej (Nakamura i Johnson 1968). W tym przypadku defekt naczyńowy mógłby prowadzić do odkładania się w przestrzeni pozanaczyńowej różnych substancji (białek osocza, mediatorów zapalenia, produktów przemian metabolicznych), których obecność poza naczyniami powodowałaby rozwój stanu zapalnego i wzmożoną degradację białek macierzy pozakomórkowej (Crawford i wsp. 2004).

1.7.5. Hipoteza o zaburzeniach w obrębie jednostki włosowo-łojowej

Zaburzenia w obrębie struktur jednostki włosowo-łojowej wydają się mieć znaczenie w rozwoju zmian przerostowych typu rhinophyma (Aloi i wsp. 2000). W badaniach histopatologicznych wycinków skóry, pochodzących od chorych z odmianami rumieniową oraz grudkowo-krostkową, zmiany w obrębie mieszków włosowych wykazano jedynie w 20% przypadków, a nacieki okołomieszkowe - w 51% wycinków. Nacieki limfohistiocytarne w biopsjach skórnych miały częstsze umiejscowienie wokół naczyń niż wokół mieszków włosowych (Marks i Harcourt-Webster 1969). Jednak wysoka skuteczność leczenia zmian skórnych w trądziku różowatym - przy użyciu preparatów antybiotykowych i nadtlenku benzoilu, aktywnych wobec organizmów zasiedlających ujścia mieszków włosowych - może sugerować, że mikroorganizmy bytujące w obrębie różnych struktur budujących jednostkę włosowo-łojową mogą mieć istotne znaczenie w patogenezie trądziku różowatego (Crawford i wsp. 2004).

1.7.6. Hipoteza o udziale substancji chemicznych i pożywienia

Spożywanie określonych składników pokarmowych może mieć wpływ na przebieg trądziku różowatego, choć i u osób zdrowych może prowadzić do pojawienia się wykwitów skórnych przypominających rosacea (Crawford i wsp. 2004). U pacjentów z trądzikiem różowatym pojawianie się zmian skórnych o typie napadowego rumienia może być spowodowane spożyciem gorących pokarmów, ostrych przypraw, małych dawek alkoholu lub niektórych preparatów farmaceutycznych (Crawford i wsp. 2004). Spożywanie większych ilości kwasu nikotynowego może nawet u osób zdrowych powodować wystąpienie nagłego rumienia na skórze twarzy (Wilkin 1988). Miejscowe stosowanie preparatów steroidowych może skutkować pojawieniem się na skórze wykwitów trądzikopodobnych (Guin 1981), zaś donosowe aplikowanie preparatów steroidowych, skutecznych w leczeniu sezonowego nieżyty błony śluzowej nosa, może wywoływać nagle zaczerwienienia skóry twarzy (Egan i wsp. 1999). Zażywanie amiodaronu może się wiązać z częstszym występowaniem gradówek

(Reifler i wsp. 1987), a przyjmowanie dużych dawek witamin B₆ i B₁₂ - prowadzi do pojawienia się na skórze zmian rumieniowych, przypominających rosacea (Sherertz 1991).

1.7.7. Hipoteza o udziale mikroorganizmów

Od wielu lat nie ustaje dyskusja na temat możliwości udziału w etiopatogenezie trądziku różowatego różnych mikroorganizmów bytujących na skórze człowieka. Kwestia ta stała się przedmiotem wielu badań naukowych, choć nie udało się znaleźć jednoznacznego dowodu na ich patogenność (Lazaridou i wsp. 2011). Wśród wymienianych mikroorganizmów najczęściej rozważa się rolę dwóch drobnoustrojów: roztoczy z rodzaju *Demodex* oraz bakterii *Helicobacter pylori* (Jarmuda i wsp. 2012).

1.7.7.1. Roztocza *Demodex*

Obecność roztoczy *Demodex folliculorum* na skórze ludzkiej wykryli Henle i Berger w 1841 roku. Pierwszego szczegółowego opisu tych organizmów dokonał w 1842 roku niemiecki dermatolog Gustav Simon, który badał pod mikroskopem wydzielinę uzyskaną z gruczołów łojowych (Lacey i wsp. 2011, Jarmuda i wsp. 2012). Zaobserwował on w wydzielinie mikroorganizm robakowatego kształtu, wykazujący ruch i posiadający odnóża w swej przedniej części (Rycina 1.) (Lacey i wsp. 2011). W 1843 roku Richard Owen wprowadził termin „*Demodex*” dla podkreślenia miejsca występowania i obserwowanych cech tego mikroorganizmu. Do skonstruowania jego nazwy użył słów zaczerpniętych z języka greckiego, tj. ‘demo’ i ‘dex’, które miały oznaczać „nudnego robaka żyjącego w tłuszczu” (Lacey i wsp. 2011, Jarmuda i wsp. 2012). Istnienia dwóch odrębnych gatunków nużeńca ludzkiego dowiodła w 1963 roku Akbulatova (Akbulatova 1963), zaś dokładnego ich opisu anatomicznego dokonali Desch i Nutting w 1972 roku (Desch i Nutting 1972, Desch i Nutting 1977).



Rycina 1. Obraz mikroskopowy nużeńca ludzkiego (*Demodex folliculorum*), mikroskop świetlny, oryginalne powiększenie 100x, preparat własny.

Nużeńce (*Demodex*) są pajęczakami, należącymi do rzędu roztoczy (Bielenin i Białczyk 1993). Obecnie znanych jest już ponad 100 różnych gatunków roztoczy *Demodex*. Wszystkie są organizmami wysoce wyspecjalizowanymi i obligatoryjnie związanymi ze swoimi gospodarzami. Na różnych rejonach skóry jednego żywiciela mogą występować różne gatunki nużeńców (Lacey i wsp. 2009). Uważa się, że na skórze człowieka mogą bytować dwa gatunki nużeńców (Bielenin i Białczyk 1993). Oba mają robakowaty kształt i ciało pokryte cienkim oskórkiem. Większy z nich, osiągający rozmiary 0,3-0,4 mm długości, to *Demodex folliculorum*. Ma kształt wydłużony i występuje w ujściach mieszków włosowych, gdzie tworzy skupiska po kilka roztoczy. Mniejszy z nużeńców, kształtu wrzecionowatego, to *Demodex brevis* osiągający rozmiary 0,2-0,3 mm i posiadający krótsze odnóża. Bytuje on najczęściej samotnie, umiejscowiony w głębi gruczołu łojowego w skórze twarzy lub w gruczole Meiboma, umiejscowionym w obrębie powiek (Raszeja-Kotelba i wsp. 2004). Odżywia się komórkami gruczołowymi i powoduje ich zniszczenie. Z powodu tak głębokiego umiejscowienia, *Demodex brevis* jest trudny do wydobycia bez naruszenia ciągłości tkanek i dlatego jego wpływ na organizm ludzki oraz rola w patogenezie chorób skóry jest słabiej poznana (Raszeja-Kotelba i wsp. 2004).

Wykazano, że oba gatunki nużeńca różnią się pomiędzy sobą w rozmieszczeniu na skórze człowieka (Bohdanowicz i Raszeja-Kotelba 2001). Mimo że pod względem liczby na skórze, *Demodex folliculorum* jest wyraźnie liczniejszy, to jednak *Demodex brevis* zajmuje większy obszar na ciele. Inna jest również proporcja częstości występowania *Demodex brevis* do *Demodex folliculorum*, która u mężczyzn wynosi 1 : 4, a u kobiet 1 : 10 (Bohdanowicz i Raszeja-Kotelba 2001). Objawy kliniczne są zależne również od gatunku nużeńca. *Demodex*

folliculorum powoduje głównie rumień i złuszczenie naskórka, podczas gdy *Demodex brevis* jest przyczyną pojawiania się umiejscowionych symetrycznie wykwitów grudkowo-krostkowych (Akilov i wsp. 2005).

Ponieważ we wszystkich stadiach rozwojowych głównym pożywieniem nużeńców są komórki naskórka oraz składniki łoju, zamieszkują one rejony skóry szczególnie bogate w gruczoły łojowe – skórę twarzy, tzn. nos, policzki, czoło oraz brodę. Mogą również występować w przewodzie słuchowym zewnętrznym, na skórze klatki piersiowej lub okolic genitalnych (Raszeja-Kotelba i wsp. 2004). W przedniej części ciała nużeńców znajduje się gnathosoma z aparatem gębowym, a resztę ciała stanowi podosoma i opithosoma (Jing i wsp. 2005). Na gnathosomie *Demodex folliculorum* posiada ostre, sztylcikowe i bardziej niż *Demodex brevis* rozwinięte szczękoczułki (chelicery), służące do krojenia i pobierania pokarmu oraz nogogłaszczki (pedipalpy) służące do przytrzymywania pokarmu. U obu gatunków na podosomie znajdują się 4 pary odnóży (Jing i wsp. 2005). Za pomocą szczękoczułków nużeńce przecinają komórki nabłonka skóry gospodarza, a następnie wydzielają na zewnątrz enzymy lityczne w celu dokonania wstępnego trawienia pokarmu, po czym zasysają do przewodu pokarmowego płynne, uprzednio rozpuszczone składniki (Desch i Nutting 1977). Odżywianie się roztoczy prowadzi do niszczenia komórek naskórka z jednoczesnym naruszeniem bariery naskórkowej, co umożliwia nużeńcom przenikanie do głębszych warstw skóry i przy tej okazji stymulowanie receptorów Toll-like (TLR) (Schauber i wsp. 2007). Przypuszcza się, że wśród enzymów trawiennych wydzielanych przez nużeńca znajdują się enzymy proteolityczne (proteazy). Na powierzchni nużeńców wykryto bowiem obecność złogów surowiczej immunoglobuliny IgD oraz dwóch inhibitorów surowicznych proteaz (α -1-antytrypsyny i α -1-antychymotrypsyny), które mogą stanowić swoistą odpowiedź obronną organizmu gospodarza na te roztocza (Tsutsumi 2004). Podobnego rodzaju proteazy, produkowane przez roztocza kurzu domowego, zostały opisane u chorych na atopowe zapalenie skóry. Uważa się, że powodują one podrażnienie skóry (Deleuran i wsp. 1998).

Nużeńce ludzkie na wszystkich etapach swojego rozwoju unikają światła słonecznego. Z wnętrza mieszków włosowych wychodzą jedynie nocą, aby z prędkością ok. 16 mm/godzinę wędrować po powierzchni skóry w poszukiwaniu partnera do rozrodu (Lacey i wsp. 2011). Cykl życiowy nużeńców składa się z pięciu stadiów rozwojowych i trwa ok. 14-18 dni. Kopulacja odbywa się przy wejściu do mieszka włosowego, po czym samica przemieszcza się do wnętrza gruczołu łojowego, gdzie składa jaja, z których po ok. 60

godzinach wylęgają się larwy. Kolejnymi stadiami rozwojowymi nużeńców są protonimfy i nimfy (Lacey i wsp. 2009, Spickett 1961).

Obecność roztoczy *Demodex* jest stwierdzana u przedstawicieli wszystkich ras ludzkich oraz na różnych szerokościach geograficznych (Lacey i wsp. 2009). Prawdopodobnie do przeniesienia ich z człowieka na człowieka dochodzi podczas bezpośredniego kontaktu, przez stosowanie wspólnych przyborów toaletowych lub ręczników oraz poprzez kurz. Kolonizacja skóry następuje już w dzieciństwie lub we wczesnej dorosłości. Nie znaleziono ich jedynie na skórze noworodków (Bonnar i wsp. 1993, Borowska i wsp. 2003).

Do wykrywania roztoczy *Demodex* stosowane są różne metody diagnostyczne, lecz do najważniejszych należą:

- **metoda preparatu bezpośredniego** - z powierzchni skóry pobiera się zeszkrobiny naskórka, umieszcza się je na szkiełku podstawowym i dodaje kilka kropli 20% roztworu KOH; tak przygotowany preparat przykrywa się szkiełkiem nakrywkowym i ogląda w mikroskopie świetlnym w powiększeniu 40x i 100x (Bohdanowicz i Raszeja-Kotelba 2001);

- **metoda standaryzowanej biopsji powierzchni skóry (SSSB)** - ma na celu określenie gęstości pasożytów na 1 cm² i umożliwia stwierdzenie żywych, poruszających się roztoczy *Demodex*; najpierw na szkiełko podstawowe z oznaczoną uprzednio powierzchnią 1 cm² nanosi się kroplę kleju cyjanoakrylatowego i tak przygotowane szkiełko przykładają się do skóry twarzy w miejscu obecności zmian skórnych; po 30 sekundach delikatnie usuwa się szkiełko i - po dodaniu kropli olejku imersyjnego oraz nałożeniu szkiełka nakrywkowego - uzyskany preparat ogląda się pod mikroskopem świetlnym przy użyciu imersji (Bohdanowicz i Raszeja-Kotelba 2001).

Odsetek osób, których skóra jest skolonizowana przez nużeńca ludzkiego, jest wysoki i wynosi w populacji od 20% do 80% oraz wzrasta między drugą a szóstą dekadą życia, po czym utrzymuje się na stałym poziomie aż do ósmej dekady (Elston 2010). Co ciekawe, odsetek osób ze skórą skolonizowaną jest niski u młodych dorosłych, u których produkcja łożu - potencjalnego składnika pożywienia roztoczy - jest bardzo wysoka (Ozdemir i wsp. 2005).

Obecność roztoczy *Demodex* na skórze twarzy u większości ludzi nie prowadzi do rozwoju objawów chorobowych (Akilov i Mumcuoglu 2003). Dlatego tuż po odkryciu roztocza *Demodex* były postrzegane jako organizmy żyjące w symbiozie z człowiekiem (Lacey i wsp. 2009). Dobrze udokumentowana została natomiast rola chorobotwórcza roztoczy *Demodex canis*, które u psów wywołują nużycę – poważną i potencjalnie śmiertelną

chorobę, związaną z obecnością wielu objawów skórnych i ocznych, spowodowaną istnieniem u psów określonego defektu immunologicznego (Gortel 2006). Infestacja nużeńcami u innych ssaków przebiega bezobjawowo i obecnie nie wiadomo, czy przynoszą one gospodarzowi szkodę czy pożytek (Lacey i wsp. 2011).

W roku 1930 opisano jednostkę chorobową, zwaną „pityriasis folliculorum”, której rozwój powiązano z bytowaniem nużeńca ludzkiego na skórze twarzy (Ayres 1930). Choroba charakteryzowała się występowaniem na skórze twarzy niewielkich, łuszczących się, przymieszkowych grudek, obecnością uczucia suchości skóry i świądu. Wykwity skórne były zlokalizowane głównie na policzkach, zazwyczaj jednostronnie, choć mogły dotyczyć także powiek (Ayres 1930). W roku 1961 wyróżniono jednostkę chorobową, zwaną nużycą („rosacea-like demodicidosis”), spowodowaną nasilonym rozwojem *Demodex folliculorum* i charakteryzującą się występowaniem rumienia, suchości i łuszczenia przymieszkowego (Ayres i Ayres 1961). Jak wykazały późniejsze badania, „pityriasis folliculorum” stanowiła najłagodniejszą a zarazem najczęstszą postać nużycy, na tyle dyskretną i mało znaną, że często bywała niediagnozowana. Pityriasis folliculorum charakteryzuje się obecnością objawu dyskretnego rumienia oraz dużej ilości nużeńców na cm^2 (nawet do 61 roztoczy), w porównaniu do odmiany grudkowo-krostkowej trądziku różowatego (do 36 roztoczy na cm^2) (Forton i wsp. 2005, Forton 2012). Ponieważ schorzenie dotyczy zazwyczaj osób starszych, sugeruje się, że tak znaczny stopień proliferacji i zagęszczenia nużeńców w pityriasis folliculorum może być związany z fizjologicznie obniżonym poziomem odporności (Forton i wsp. 2005, Forton 2012).

W innych schorzeniach także odnotowano obecność zwiększonej gęstości roztoczy na skórze twarzy, przekraczającą pięć roztoczy na cm^2 (Hsu i wsp. 2009). Zaczęto wówczas podejrzewać, że obecność roztoczy *Demodex* może mieć związek z aktualnym stanem immunologicznym ustroju, a nadmierny ich rozwój może się przyczyniać do rozwoju chorób skóry (Akilov i Mumcuoglu 2003). Stwierdzono, że apoptoza leukocytów wzrastała proporcjonalnie do wzrostu liczby roztoczy *Demodex*, co może być wynikiem lokalnej immunosupresji, wywołanej przez nużeńce i ułatwiającej im przeżycie (Akilov i Mumcuoglu 2003, Akilov i Mumcuoglu 2004). Zwiększoną liczebność roztoczy *Demodex* na skórze twarzy stwierdzono u osób z obniżonym poziomem odporności, np. chorych z zapaleniem okołoustnym skóry, spowodowanym długotrwałym stosowaniem miejscowych preparatów steroidowych lub immunomodulujących (Fujiwara i wsp. 2010), u pacjentów poddawanych terapii immunosupresyjnej, np. u otrzymujących chemioterapię dzieci chorych na białaczkę (Ivy i wsp. 1995), u pacjentów zakażonych wirusem HIV i chorych z AIDS (Aquilina i wsp.

2002, Dominey i wsp. 1989) oraz u pacjentów przewlekle dializowanych (Karincaoglu i wsp. 2005). Co ciekawe, mimo że ciąża jest związana z fizjologicznie obniżonym poziomem odporności, to u ciężarnych nie zaobserwowano ani większego niż w populacji zdrowej stopnia kolonizacji skóry nużeńcem ludzkim, ani też zmiany w ilości nużeńców na cm^2 w zależności od trymestru ciąży (Aydingoz i wsp. 2000). Obecność roztoczy *Demodex* wydawała się też nie mieć związku z patogenezą trądziku pospolitego, ponieważ obecności nużeńców nie stwierdzono w zawartości mikrozaskórników (Okay i wsp. 2006).

Zwiększona infestacja skóry twarzy nużeńcem ludzkim jest również uznawana za czynnik etiologiczny w patogenezie trądziku różowatego. U chorych na tę chorobę średnie zagęszczenie nużeńca na skórze twarzy wynosiło 10,8 roztocza/ cm^2 , a w grupie osób zdrowych - 0,7 roztocza/ cm^2 (Forton i Seys 1993). Jednak gdy wziąć pod uwagę wszystkie typy trądziku różowatego, to okazuje się, że istotnie statystycznie zwiększona ilość roztoczy na cm^2 występuje jedynie w odmianie grudkowo-krostkowej rosacea (Forton i Seys 1993). Co ciekawe, podwyższona liczba nużeńców na cm^2 koreluje też z obecnością u pacjentów niespecyficznym objawów skórnych, takich jak świąd twarzy z rumieniem lub bez rumienia, obecność wykwitów grudkowo-krostkowych bez cech teleangiektazji lub zaczerwienienia, ale bez pełnego obrazu rosacea (Karincaoglu i wsp. 2004).

Wydaje się, że obecność roztoczy *Demodex* na powierzchni skóry nie jest tak istotna, jak ich obecność w obrębie mieszków włosowych (Ayres i Ayres 1961). Badając wycinki histopatologiczne skóry pobrane od osób zdrowych, roztocza *Demodex* stwierdzano w co dziesiątej biopsji skóry twarzy, choć wewnątrz mieszków włosowych odsetek ten wynosił 12% (Aylesworth i wsp. 1982). Jednak w wycinkach skórnych, w których mieszki włosowe wykazywały cechy zapalenia, obecność roztoczy *Demodex folliculorum* została wykazana w 42% i tylko w 10% mieszków nieobjętych stanem zapalnym. Okazało się, że 83% wszystkich mieszków zawierających roztocza *Demodex* wykazywało cechy zapalenia (Aylesworth i wsp. 1982). Nie odpowiedziano jednak na pytanie, czy *Demodex folliculorum* wywołuje stan zapalny w mieszku włosowym, czy raczej chętniej zasiedla mieszki już objęte stanem zapalnym (Vollmer 1996).

Zwiększona liczba roztoczy *Demodex*, którą obserwuje się u chorych z trądzikiem różowatym, może zatem przyczyniać się do rozwoju objawów tej choroby (Crawford i wsp. 2004). Proponowanych jest kilka mechanizmów patogenego działania omawianych mikroorganizmów. Mogą one prowadzić do rozdęcia mieszków włosowych poprzez mechaniczną ich blokadę oraz wywoływać rozwój hiperkeratozy wewnątrz mieszkowej (Lacey i wsp. 2009). Obecność ich chitynowego szkieletu zewnętrznego może się przyczyniać

do powstawania w skórze ziarniniaków, a produkty przemiany materii roztoczy mogą aktywować elementy wrodzonego układu odpornościowego lub stymulować układ immunologiczny w mechanizmie reakcji typu opóźnionej nadwrażliwości (Lacey i wsp. 2009).

1.7.7.2. *Bacillus oleronius*

Hipoteza o patogenności nużeńca ludzkiego przewiduje, że mikroorganizm ten może stanowić bierny wektor dla innego drobnoustroju, wywołującego objawy chorobowe w przebiegu trądziku różowatego (Hsu i wsp. 2009). Zastanawiano się nad skutecznością działania doustnych preparatów tetracyklin, których stosowanie powodowało istotną poprawę stanu klinicznego chorych na trądzik różowaty (Lacey i wsp. 2009). Te antybiotyki, znane od 1948 roku, posiadają wiele unikalnych właściwości. Za główny mechanizm ich skutecznego działania w terapii rosacea uważano początkowo nieswoiste działanie przeciwzapalne (Sapadin i Fleischmajer 2006, Marks 1968). Leki te nie wykazują działania wobec roztoczy *Demodex folliculorum*, nie redukują ich liczebności na skórze, lecz równocześnie hamują chemotaksję i migrację neutrofilów (Esterly i wsp. 1978) oraz wpływają na proces angiogenezy dzięki hamowaniu aktywności metaloproteinaz tkankowych (szczególnie MMP-8 i MMP-9) (Hanemaaijer i wsp. 1998).

Ponieważ jednak inne preparaty o działaniu przeciwzapalnym, jak preparaty steroidowe czy takrolimus, mogą prowadzić do rozwoju lub zaostrzenia objawów trądziku różowatego (Antille i wsp. 2004), skuteczność działania tetracyklin próbowano wytłumaczyć istnieniem nieznanego czynnika bakteryjnego, mogącego uczestniczyć w patogenezie rosacea. Zastanawiano się nad tym, dla jakiego mikroorganizmu roztocze *Demodex* może stanowić wektor. Nie udało się wykazać w roztoczach *Demodex* obecności DNA Gram-ujemnej bakterii wewnątrzkomórkowej *Wolbachia pipientis*, szeroko rozpowszechnionej i wykrywanej uprzednio wewnątrz różnych gatunków roztoczy i nicieni (Borgo i wsp. 2009). Natomiast z wnętrza nużeńca ludzkiego, pobranego od jednego z czterdziestoosobowej grupy pacjentów z odmianą grudkowo-krostkową trądziku różowatego, udało się wyizolować bakterię *Bacillus oleronius* (Lacey i wsp. 2007). Gatunek ten jest przetrwalnikującą laseczką Gram-ujemną, wyodrębnioną w obrębie rodzaju *Bacillus*, należącego do rodziny *Bacillaceae* (Szkaradkiewicz 2011). Opisany po raz pierwszy w roku 1995, *Bacillus oleronius* został wyizolowany z końcowego odcinka jelita termitów *Reticulitermes santonensis*, u których prawdopodobnie spełnia rolę symbiotyczną (Kuhnigk i wsp. 1995).

Bacillus oleronius produkuje dwa białka antygenowe, które były zdolne do pobudzania proliferacji obwodowych komórek jednojądrzastych (PBMC) u 16 z 22 (73%) pacjentów z odmianą grudkowo-krostkową rosacea oraz jedynie u 5 z 17 (29%) pacjentów zdrowych (Lacey i wsp. 2007). Znacznie większa częstość pobudzania komórek jednojądrzastych w grupie pacjentów z rosacea może wskazywać na to, że ich układ immunologiczny mógł mieć wcześniejszy kontakt z antygenami bakterii *Bacillus oleronius* (Lacey i wsp. 2007). Dodatkowo, surowice krwi pochodzące od sześciu pacjentów z odmianą grudkowo-krostkową trądziku różowatego wykazywały reaktywność z dwoma wyizolowanymi od bakterii białkami (62-kDa i 83-kDa) (Lacey i wsp. 2007). W innym doświadczeniu badano surowice pobrane od 59 pacjentów z rozpoznaniem trądzikiem różowatym i wykazano istotną statystycznie korelację między dodatnią reakcją ich surowicy z antygenami *Bacillus oleronius* a obecnością roztoczy *Demodex* na rzęsach i obecnością zmian skórnych na twarzy (Li i wsp. 2010). Wyniki jeszcze innych badań wykazały, że białka pochodzące od *Bacillus oleronius* mogą stanowić czynnik aktywujący neutrofile (O'Reilly i wsp. 2012). Taka aktywacja granulocytów obojętnochłonnych mogłaby mieć miejsce wówczas, gdyby uwolnione z roztoczy białka bakterii *Bacillus oleronius* przedostały się poza mieszki włosowe do otaczających tkanek, co mogłoby skutkować rozwojem miejscowego stanu zapalnego w tkance okołomieszkowej (O'Reilly i wsp. 2012).

1.7.7.3. *Helicobacter pylori*

Wiele kontrowersji budzi rola bakterii *Helicobacter pylori* w patogenezie trądziku różowatego. Jest to kolonizująca błonę śluzową żołądka Gram-ujemna spiralna pałeczka, wyodrębniona w obrębie rodzaju *Helicobacter*, należącego do rodziny *Helicobacteraceae* (Szkaradkiewicz 2011). Produkuje liczne enzymy, w tym intensywnie wytwarza ureazę, powodującą kataboliczny rozkład mocznika do amoniaku i CO₂. W ten sposób wytwarza wokół siebie alkaiczne środowisko, pozwalające jej przeżyć w warunkach niskiego pH soku żołądkowego. Naturalnym rezerwuarem *Helicobacter pylori* jest człowiek, a zakażenie tą bakterią stwierdza się u 30–40% mieszkańców Europy Zachodniej oraz u 90% mieszkańców krajów rozwijających się (Deroń i Kieć-Świerczyńska 2002). *Helicobacter pylori* stanowi jedyny patogen bakteryjny, który został uznany przez WHO jako karcinogen I klasy, zwiększający ryzyko rozwoju raka żołądka (Szkaradkiewicz 2011).

Przypuszczenie o możliwym udziale *Helicobacter pylori* w patogenezie trądziku różowatego wysunięto na podstawie obserwacji klinicznych. U chorych na rosacea stwierdzano między innymi różne zaburzenia żołądkowo-jelitowe (chorobę wrzodową,

zapalenie błony śluzowej żołądka), sezonowość pojawiania się zaostrzeń rosacea (podobnie jak w chorobie wrzodowej) oraz skuteczność terapii metronidazolem (Marks i wsp. 1967, Szlachcic 2002). Wyniki niektórych badań wskazały na wyższy niż w zdrowej populacji stopień infekcji *Helicobacter pylori* u osób z trądzikiem różowatym (Rebora i wsp. 1995), choć inne badania nie potwierdziły takich obserwacji (Herr i You 2000). Eradykacja *Helicobacter pylori* w jednych przypadkach skutkowałą poprawą w zakresie zmian skórnych (Utas i wsp. 1999), a innym razem poprawy nie obserwowano (Herr i You 2000).

Wśród bakterii *Helicobacter pylori* wyizolowano szczepy różniące się poziomem wirulencji. W zależności od obecności lub braku czynników zjadliwości dzieli się je na dwa typy. U bakterii typu I, obejmującego 60-80% szczepów *Helicobacter pylori*, stwierdza się wytwarzanie silnie immunogennego białka CagA o aktywności cytotoksycznej. Ponadto typ I produkuje cytotoksynę wakuolizującą - VacA, której sekrecja jest zsynchronizowana z translokacją CagA do komórki nabłonka żołądka. Bakterie typu II nie wytwarzają cytotoksyn (Crabtree i wsp. 1995). Co więcej, jedynie obecność szczepu typu I jest związana z uwalnianiem substancji wazoaktywnych oraz niektórych cytokin, w tym IL-8, silnego czynnika aktywującego i chemotaktycznego dla neutrofilii. W badaniu przeprowadzonym na 60 chorych na trądzik różowaty i współistniejącą infekcją *Helicobacter pylori*, u 67% z nich stwierdzono obecność szczepu CagA (+) oraz podwyższone osoczowe wartości TNF- α i IL-8. Natomiast w grupie kontrolnej obecność szczepu CagA (+) stwierdzono w 32% przypadków (Szlachcic i wsp. 1999). Po leczeniu eradykacyjnym *Helicobacter pylori* obserwowano poprawę w zakresie objawów trądziku różowatego, jak również normalizację poziomów wartości TNF- α i IL-8 (Lazaridou i wsp. 2011). Na podstawie wyników tych badań spekulowano, że zjadliwy szczep CagA (+) *Helicobacter pylori* może mieć udział w wywoływaniu objawów rosacea poprzez podnoszenie osoczowych stężeń wybranych cytokin (Szlachcic i wsp. 1999).

Inna koncepcja dotycząca patogenności *Helicobacter pylori* zakłada, że ta bakteria posiada zdolność do zwiększania osoczowego poziomu reaktywnych form tlenu (ROS – reactive oxygen species) (Baz i wsp. 2004) oraz przyczynia się do uwalniania cytokin prozapalnych w mechanizmie zależnym od aktywacji receptorów TLR2 i TLR4 w komórkach nabłonkowych błony śluzowej żołądka (Kawahara i wsp. 2001, Smith i wsp. 2003). Następnie, reaktywne formy tlenu mogą w różny sposób przyczyniać się do rozwoju zmian skórnych, między innymi hamując inhibitory metaloproteinaz tkankowych (Vincent i Eris 2004).

1.7.7.4. *Chlamydia pneumoniae*

Bakterią, którą również podejrzewa się o udział w patogenezie trądziku różowatego, jest *Chlamydia pneumoniae*. Gatunek ten należy do rodzaju *Chlamydia*, rodziny *Chlamydiaceae* i stanowi patogen układu oddechowego (Szkardkiewicz 2011). W badaniach przeprowadzonych na grupie dziesięciu osób z rozpoznaniem trądzikiem różowatym, przez 5 do 19 tygodni uczestnikom podawano doustne preparaty azytromycyny (Fernandez-Obregon i Patton 2007). Przed włączeniem leczenia u 4 na 10 pacjentów stwierdzono w biopsji policzkowej antygeny *Chlamydia pneumoniae*, zaś w surowicy 8 na 10 pacjentów stwierdzono obecność przeciwciał tej bakterii. Nie udało się natomiast (przy użyciu metody PCR) wykryć obecności DNA *Chlamydia pneumoniae* w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej. Jednak u wszystkich pacjentów leczonych azytromycyną odnotowano poprawę stanu klinicznego, od umiarkowanego do znacznego stopnia (Fernandez-Obregon i Patton 2007).

1.8. Leczenie trądziku różowatego

Z powodu różnorodności objawów i złożonej etiopatogenezy, leczenie trądziku różowatego jest procesem długotrwałym i trudnym. Według rekomendacji ekspertów z Rosacea International Expert Group, postępowanie terapeutyczne w tej chorobie ma charakter głównie objawowy i powinno być dostosowane do objawów indywidualnych, typowych dla danego pacjenta (Elewski i wsp. 2011). Na kompleksowe postępowanie powinny się składać trzy elementy: edukacja pacjenta, pielęgnacja skóry oraz leczenie. W terapii trądziku różowatego stosuje się preparaty podawane ogólnie i miejscowo (Elewski i wsp. 2011). Każdej odmianie trądziku różowatego zostały przyporządkowane określone algorytmy postępowania (Pelle i wsp. 2004). Edukacja pacjenta polega na zrozumiałym objaśnieniu patomechanizmu choroby oraz na wyjaśnieniu jego roli w procesie leczniczym. Pacjent nie tylko powinien stosować się do zaleceń lekarskich, lecz również unikać sytuacji, w których byłby narażony na działanie czynników wywołujących pojawianie się objawów na skórze twarzy (Elewski i wsp. 2011).

1.8.1. Leczenie miejscowe

Celem terapii preparatami miejscowymi jest zmniejszenie intensywności odczuwanych przez pacjenta dolegliwości, takich jak pieczenie lub świąd oraz uzyskanie poprawy w zakresie stopnia nasilenia zmian skórnych (Elewski i wsp. 2011). Preparatami

zarejestrowanymi przez FDA (Food and Drug Administration) do leczenia trądziku różowatego są:

- Metronidazol – najczęściej stosowany środek w terapii miejscowej, wykazujący działanie przeciwzapalne, antybakteryjne i prawdopodobnie immunomodulujące (Buechner 2005, Elewski 2007). Jest dobrze tolerowany i szczególnie skuteczny w leczeniu odmiany grudkowo-krostkowej rosacea oraz w zapobieganiu nawrotom pojawiania się zmian skórnych. Posiada natomiast ograniczoną skuteczność w leczeniu teleangiektazji. Wykazano, że zastosowany miejscowo redukuje nasilenie rumienia i zmian zapalnych w stopniu porównywalnym do przyjmowanych doustnie preparatów tetracyklin (Nielsen 1983).

- Kwas azelainowy – posiada właściwości antybakteryjne, przeciwzapalne i keratolityczne. Jest stosowany w leczeniu trądziku pospolitego, trądziku różowatego oraz w terapii przebarwień (Frampton i Wagstaff 2004). Skutecznie redukuje rumień i zmiany zapalne, szczególnie u pacjentów z odmianą grudkowo-krostkową rosacea; a 15% kwas azelainowy w podłożu żelowym wykazuje większą skuteczność niż metronidazol w kontrolowaniu nasilenia rumienia i zmian zapalnych (Szepietowski i Reich 2003).

- 10% sulfacetamid sodu w połączeniu z 5% siarką - wykazuje działanie komedolityczne, keratolityczne i przeciwbakteryjne, a domieszka siarki zapewnia działanie przeciw nużeńcom. Skutecznie redukuje objaw rumienia i zmiany zapalne (Sauder i wsp. 1997), przy czym najlepsze efekty wykazuje wówczas, gdy jest stosowany jako składnik żelu do mycia twarzy w terapii łączonej z preparatami miejscowymi metronidazolu (Pelle i wsp. 2004).

W miejscowej terapii trądziku różowatego stosuje się ponadto nadtlenek benzoylu, który skutecznie łagodzi nasilenia objawów grudkowych i krostkowych, choć niekiedy może wywoływać podrażnienia skóry (Pelle i wsp. 2004). Stosuje się również miejscowe preparaty antybiotyków: klindamycyny i erytromycyny (Gauwerky i wsp. 2009) oraz preparaty retinoidów, szczególnie - nowszej generacji, jak adapalen, które są na ogół dobrze tolerowane przez chorych (Altinyazar i wsp. 2005). Ostrożnie natomiast należy podchodzić do stosowania preparatów inhibitorów kalcyneuryny, bowiem takrolimus i pimekrolimus - mimo że odznaczają się skutecznością w leczeniu trądziku różowatego posterooidowego (Chu 2005) - mogą u pacjentów nasilać lub wyzwać objawy trądziku różowatego (Antille i wsp. 2004).

W terapii trądziku różowatego, szczególnie w okresie remisji choroby, wykorzystuje się też zabiegi z użyciem pulsującego lasera barwnikowego (IPL). Zabiegi te zmniejszają nasilenie rumienia i likwidują teleangiektazje, przez co korzystnie wpływają na wygląd i samopoczucie chorych (Uszyńska-Jast i May 1999).

Istotne znaczenie w terapii trądziku różowatego ma również odpowiednia pielęgnacja skóry twarzy, pozwalająca uniknąć kolejnych nawrotów choroby. Zależnie od stopnia zaawansowania choroby może być stosowana jako postępowanie główne (w początkowym okresie) lub uzupełniająca - w okresie zaostrenia zmian (Zegarska i Placek 2004). Na pielęgnację skóry składa się mycie twarzy z użyciem płynów micelarnych lub żeli do mycia dla skóry wrażliwej, stosowanie odpowiednich kremów pielęgnacyjnych i fotoprotekcyjnych oraz unikanie narażenia skóry na oddziaływanie niekorzystnych czynników zewnętrznych, takich jak wysokie lub niskie temperatury bądź palenie tytoniu. Chorych należy poinformować, iż do pielęgnacji skóry twarzy nie powinni używać mydła. Preparaty kosmetyczne przeznaczone dla chorych na trądzik różowaty powinny być przez nich dobrze tolerowane i zawierać substancje czynne, takie jak: witamina C, witamina K, witamina PP (Zegarska i Placek 2004). Jako uzupełnienie leczenia i pielęgnacji na istniejące już zmiany skórne wskazane jest stosowanie makijażu kamuflującego, który umożliwia szybką poprawę wyglądu skóry (Gupta i Chaudhry 2005). Preparaty stosowane do makijażu korekcyjnego powinny być dostosowane do pory roku oraz zawierać w swoim składzie substancje czynne, istotne w pielęgnacji skóry chorych na trądzik różowaty (Szpanka i wsp. 2012).

1.8.2. Leczenie ogólne

W przypadkach braku efektu za pomocą leczenia miejscowego, stosuje się terapię preparatami podawanymi ogólnie. Głównymi lekami stosowanymi w terapii ogólnej są tetracykliny (Elewski i wsp. 2011). Te antybiotyki o działaniu bakteriostatycznym posiadają wyjątkowe właściwości, które czynią je lekami niezwykle skutecznymi w terapii przewlekłych chorób zapalnych. Tetracykliny hamują chemotaksję neutrofilii, redukują aktywność kolagenazy, fosfolipazy A2 i metaloproteinaz oraz przyczyniają się do redukcji poziomu prozapalnych cytokin (IL-1 β i TNF- α) (Sapadin i Fleischmajer 2006). Najczęściej są podawane w dawkach początkowych: tetracyklina 250-1000 mg/dobę, doksycyklina 100-200 mg/dobę i - niedostępna w Polsce - minocyklina 100-200 mg/dobę (Raszeja-Kotelba i wsp. 2004). Po 2-4 tygodniach terapii dawki należy zredukować i pozostawić na takim poziomie, przy którym lek wykazuje już tylko działanie przeciwzapalne. Tetracykliny w dawkach minimalnych (tzw. subantimicrobial dose) i doksycyklina w dawce przeciwzapalnej (2 x 20mg/dobę) powodują znamienne większą niż placebo redukcję całkowitej liczby zmian zapalnych u chorych z rosacea (Del Rosso i wsp. 2007). Antybiotykami stosowanymi w przypadkach braku tolerancji tetracyklin są makrolidy: erytromycyna, klarytromycyna i

azytromycyna, których działanie polega na hamowaniu chemotaksji neutrofilów (Labro 1998).

Często w terapii rosacea stosuje się też doustne preparaty metronidazolu (Saihan i Burton 1980). W leczeniu cięższych odmian trądziku różowatego, jak postać z dominacją zmian przerosłych, w trądziku ziarniniakowatym czy w rosacea fulminans, znajdują zastosowanie doustne preparaty retinoidów (Żaba i Grzybowski 1999). Wykazują one korzystny efekt leczniczy, ponieważ zmniejszają produkcję VEGF przez keratynocyty, działając w ten sposób antyangiogennie (Weninger i wsp. 1998). Na ogół są dobrze tolerowane i powodują długotrwałą remisję objawów, choć początek ich działania jest późniejszy niż preparatów antybiotykowych. Stosowana w ciężkich odmianach trądziku różowatego izotretinoina jest podawana w dawkach 0,2-0,3mg/kg m.c. na dzień, przez okres od 4 do 6 miesięcy, co przynosi poprawę w postaci ustąpienia grudek i krost obserwowaną u 88% pacjentów (Żaba i Grzybowski 1999). W terapii trądziku różowatego wykorzystuje się też metody zabiegowe. Redukcję w zakresie zmian zapalnych na skórze uzyskuje się stosując pulsacyjny laser barwnikowy, który działa na powierzchownie leżące naczynia i przynosi dobre efekty w terapii odmiany rumieniowej rosacea (Butterwick i wsp. 2006). Natomiast do leczenia postaci z dominacją zmian przerosłych zarezerwowane są metody chirurgiczne (Redett i wsp. 2001).

1.8.3. Psychoterapia

Trądzik różowaty jest zaliczany do chorób psychogennych (Chodkiewicz i wsp. 2007). Chorzy na rosacea często wymagają specjalistycznej opieki psychologicznej lub psychiatrycznej. Niektórzy z nich powinni mieć możliwość uczestnictwa w grupach wsparcia. Natomiast ci chorzy, u których stwierdza się głębsze zaburzenia funkcjonowania psychicznego, powinni być kierowani na szczególnie skuteczną terapię poznawczo-behawioralną (Chodkiewicz i wsp. 2007).

2. Cele pracy

Mimo istotnego postępu w zakresie rozumienia patomechanizmu trądziku różowatego oraz mimo wprowadzenia nowoczesnych metod leczenia, schorzenie to nadal stanowi znaczny problem diagnostyczny i terapeutyczny. W badaniach własnych postanowiono poddać ocenie udział wybranych czynników etiologicznych w patogenezie schorzenia, w tym ocenić w jaki sposób stan łojotokowy wpływa na liczebności roztoczy *Demodex folliculorum* na skórze twarzy u chorych na trądzik różowaty oraz u osób zdrowych. W badaniu innych autorów z wnętrza nużeńca ludzkiego wyizolowano już wcześniej bakterię *Bacillus oleronius* (Lacey i wsp. 2007), ale brak jest doniesień na temat porównania wyhodowanego szczepu ze szczepem referencyjnym *Bacillus oleronius* (Lacey i wsp. 2007, Kuhnigk i wsp. 1995). Dlatego też w badaniach własnych chcąc odpowiedzieć na pytanie, czy roztocza *Demodex* mogą stanowić wektor dla bakterii *Bacillus oleronius*, do określenia przynależności taksonomicznej bakterii posłużono się wybranymi metodami molekularnymi. Badania mówiące, że istnieniu silnej korelacji pomiędzy obecnością roztoczy *Demodex* u pacjentów z zapaleniem brzegów powiek a zwiększonymi poziomami interleukiny 17 we łzach (Kim i wsp. 2011) skłoniły autora tej pracy do poddania ocenie surowiczych stężeń prozapalnej interleukiny 17, która stymulując proces angiogenezy, może odgrywać istotną rolę w powstawaniu objawów naczyniowych trądziku różowatego. Poddano też badaniu surowice krwi pochodzące od osób chorych na trądzik różowaty i osób zdrowych, aby ocenić, czy białka bakterii *Bacillus oleronius* zdolne są do wywołania humoralnej odpowiedzi immunologicznej.

Cele pracy:

1. Ocena wpływu stanu łojotokowego na liczebności roztoczy *Demodex folliculorum* na skórze twarzy u chorych z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej
2. Ocena roli roztoczy *Demodex folliculorum* jako potencjalnych wektorów dla bakterii *Bacillus oleronius*
3. Ocena poziomów surowiczych stężeń interleukiny 17A u pacjentów z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej
4. Ocena reaktywności surowic krwi z białkami bakterii *Bacillus oleronius* u pacjentów z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej.

3. Materiał i metody

3.1. Materiał

3.1.1. Grupy badane

3.1.1.1 Grupa badana

Badaniom poddano grupę 100 chorych na trądzik różowaty, w tym 60 kobiet i 40 mężczyzn, w wieku od 20 do 83 lat, hospitalizowanych w Klinice Dermatologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu lub leczonych ambulatoryjnie w Poradni Dermatologicznej przy Klinice Dermatologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, w okresie od 1 lutego do 16 grudnia 2011 roku. Średni wiek chorych na trądzik różowaty wynosił 47,13 lat, średni wiek kobiet z tej grupy wynosił 44,83 lat, a mężczyzn - 50,58 lat.

Badania zostały zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną działającą przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwała nr 546/10 z 17 czerwca 2010 roku). Przed włączeniem do badań wszyscy uczestnicy otrzymali wyczerpującą informację dotyczącą celu i zakresu badań oraz wyrazili na piśmie zgodę na udział w badaniu (załącznik). Kryterium włączającym do badań dla obu grup był ujemny wynik badania rzęs w kierunku obecności roztoczy *Demodex folliculorum*. Chorzy włączeni do badań - co najmniej przez miesiąc przed badaniem - nie mogli być leczeni ogólnie doustnymi preparatami antybiotykowymi, retinoidami, glikokortykosteroidami ani sulfonami.

3.1.1.1 Grupa kontrolna

Grupę kontrolną stanowiło 40 zdrowych ochotników, w tym 24 kobiety i 16 mężczyzn, w wieku od 15 do 72 lat. Średni wiek osób z grupy kontrolnej wynosi 30,35 lat, w tym średni wiek kobiet - 32,46 lat, a mężczyzn - 30,35 lat.

3.1.2. Zeskrobiny naskórka

Zeskrobiny naskórka uzyskiwano poprzez delikatne zeskrobywanie jałowym skalpelem powierzchni skóry twarzy (okolice skóry policzków, nosa i czoła). Tak uzyskany materiał umieszczano na szkiełku podstawowym, przykrywano szkiełkiem nakrywkowym i oglądano pod mikroskopem przy powiększeniu 10-40x. Wynik pozytywny oznaczał obecność w badanym materiale co najmniej 5 dorosłych form roztoczy *Demodex folliculorum*. Przynależność taksonomiczną roztoczy do gatunku *Demodex folliculorum* określano

każdorazowo w oparciu o dane z literatury oraz na podstawie analizy obserwowanych cech budowy anatomicznej roztocza (Desch i Nutting 1971, 1972; Bielenin i Białczyk, 1993).

3.1.3. Surowica krwi do badań

Od osób chorych i zdrowych jednorazowo pobrano 10 ml krwi obwodowej na skrzep, odwirowano, a uzyskaną po odwirowaniu próbkę surowicy rozdzielano na 3 części, które następnie przechowywano w opisanych probówkach, w temperaturze – 80⁰C do momentu przeprowadzenia oznaczeń.

3.2. Metody

3.2.1. Badanie podmiotowe

W badaniu podmiotowym przeprowadzano wywiad z chorymi. Uwzględniano między innymi wiek, czas trwania choroby oraz przebieg dotychczasowego leczenia.

3.2.2. Badanie przedmiotowe

Wszyscy pacjenci z grupy badanej zostali poddani przedmiotowemu badaniu dermatologicznemu, w którym oceniano obecność, lokalizację, rodzaj i nasilenie wykwitów skórnych, takich jak: rumień, grudki, krosty, teleangiektazje oraz zmiany przerostowe. Klinicznego podziału trądziku różowatego dokonano przy zastosowaniu klasyfikacji ustalonej na podstawie Standardów Klasyfikacji Trądziku Różowatego, wydanych pod auspicjami National Rosacea Society. Uwzględniając rodzaj oraz lokalizację wykwitów skórnych stwierdzonych u zbadanych pacjentów, wyodrębniono następujące postaci trądziku różowatego: I – postać rumieniową z teleangiektazjami, II – postać grudkowo-krostkową, III – postać oczną, IV – postać z dominacją zmian przerostowych.

Na końcową ocenę stanu klinicznego pacjentów wpływał stopień nasilenia zmian skórnych obserwowanych u chorych. Oceny stopnia nasilenia zmian skórnych u chorych na trądzik różowaty dokonano w oparciu o skalę punktową, zgodną ze Standardami Oceny Stopnia Nasilenia Zmian Skórnych w Przebiegu Trądziku Różowatego (z 2004 roku), wydanych pod auspicjami National Rosacea Society. Do oceny nasilenia objawów rumienia, teleangiektazji, zmian przerostowych i zmian ocznych przyjmowano następujące kryteria punktowe: 0 - brak zmian chorobowych, 1 - słabe nasilenie, 2 - umiarkowane nasilenie, 3 - znaczne nasilenie. W przypadku wykwitów grudkowych i krostkowych obliczano ich liczbę w obrębie połowy skóry twarzy, według skali punktowej: 0 - brak zmian chorobowych (brak

wykwitów), 1 - obecność 1-5 wykwitów (słabe nasilenie), 2 - obecność 6-10 wykwitów (umiarkowane nasilenie), 3 - obecność powyżej 10 wykwitów (znaczne nasilenie) (Wilkin i wsp. 2002, Wilkin i wsp. 2004).

3.2.3. Badania dodatkowe

3.2.3.1. Badanie metodą standaryzowanej biopsji powierzchni skóry twarzy (SSSB)

W badaniu tym oceniano ilość roztoczy *Demodex folliculorum* na 1 cm² powierzchni skóry twarzy policzka. Na szkiełko podstawowe z obrysowanym wcześniej kwadratem o boku 1 cm nanoszono kroplę kleju cyjanoakrylowego (Super Glu[®]), a następnie przykładano szkiełko do skóry twarzy i dociskano. Po 30 sekundach szkiełko delikatnie usuwano, nakładano kroplę olejku immersyjnego, przykrywano preparat szkiełkiem nakrywkowym i oglądano w mikroskopie świetlnym w powiększeniu 10x i 40x. Oceniano liczbę pasożytów na 1 cm² (Bohdanowicz i Raszeja-Kotelba 2001).

3.2.3.2. Badanie poziomu wydzielania łoju przez skórę twarzy

Badanie to polegało na pomiarze doraźnego poziomu wydzielania łoju skórniego przy użyciu aparatu The Sebumeter[®] SM 815 Courage-Khazaka (Courage-Khazaka electronic GmbH, Köln, Germany). Badanie przeprowadzano w warunkach zalecanych przez producenta. Na powierzchnię skóry policzka przykładano na 30 sekund fragment taśmy o grubości 0,1 mm, umieszczonej na waleczku sondy zaopatrzonej w sprężynę gwarantującą stały nacisk na powierzchnię skóry. Po usunięciu sondy z powierzchni skóry i umieszczeniu jej w sebumetrze, aparat dokonuje pomiaru ilości wydzielanego łoju. Otrzymany wynik w mikrogramach na cm² oznaczał: poniżej 70 µg/cm² - skórę suchą, 70-180 µg/cm² - skórę normalną, powyżej 180 µg/cm² - skórę tłustą.

3.2.4. Badania mikrobiologiczne

3.2.4.1. Izolacja bakterii i identyfikacja fenotypowa

Pobrane od pacjentów próbki zeszkobin naskórka były inkubowane przez 24 godziny w bulionie hodowlanym (Difco, Franklin Lakes, NJ, USA), w temperaturze 37°C. Następnie, wyrosłe bakterie przenoszono na podłoża stałe: agar tryptozowo-sojowy (Difco) oraz agar z 5% krwią baranią i inkubowano w temperaturze 37°C przez 24-48 godzin. Wzrost kolonii był oceniany makroskopowo i mikroskopowo (preparaty barwione metodą Grama). Bakterie *Bacillus oleronius* identyfikowano na podstawie następujących cech: laseczki średniej

wielkości barwiącej się Gram-ujemnie, tworzące przetrwalniki, nie mające zdolności ruchu w kropli wiszącej oraz nieposiadające wici i rosnące w warunkach tlenowych (Kuhnigk i wsp. 1995). Do badania obecności wici zastosowano odczynnik BD Flagella Stain Droppers (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). Identyfikacja była ostatecznie potwierdzana przy użyciu metody PCR (Szkaradkiewicz 2011, Szkaradkiewicz i wsp. 2012).

3.2.4.2. Ekstrakcja DNA

Do izolacji DNA użyto zestawu Sherlock AX (A&A Biotechnology). Zestaw opiera się na zdolności wiązania się DNA do krzemionki w wysokich stężeniach soli chaotropowych. Pobrane w badaniu zeszkrobiny naskórka umieszczano w 1,5 ml jałowej probówce (Eppendorf), do której dodawano 0,7 ml roztworu lizującego i 20 µl Proteinyazy K. Całość wymieszano i inkubowano w temperaturze 37°C przez 20 minut. Następnie pobierano roztwór z próbki i nanoszono na kolumnę do oczyszczania DNA. Wirowano 1 min. przy 10-15 tys. rpm. Kolumnę przenoszono do próbki 2 ml i dodawano 0,5 ml roztworu płuczającego. Wirowano 1 min. przy 10-15 tys. rpm. Kolumnę ponownie przenoszono do nowej próbki 2 ml i dodawano 0,5 ml roztworu płuczającego. Wirowano 2 min. przy 10-15 tys. rpm. Osuszoną minikolumnę umieszczano w nowej probówce 1,5 ml i dodawano na dno kolumny 150 µl buforu elucyjnego (10mM TRIS.HCl, pH 8.5), uprzednio ogrzanego do temperatury 75°C. Inkubowano 3 minuty w temperaturze pokojowej, po czym wirowano 1 min. przy 10-15 tys. rpm. Minikolumnę usuwano, a oczyszczone DNA znajdujące się w probówce przechowywano w temperaturze -20°C do czasu przeprowadzenia dalszych analiz (Szkaradkiewicz i wsp. 2012).

3.2.4.3. Wykrywanie genu dla 16S rRNA *Bacillus oleronius*

W badaniach molekularnych wykrywano fragment genu dla 16S rybosomalnego RNA *Bacillus oleronius*. Do zaprojektowania starterów reakcji PCR wykorzystano sekwencję DNA *Bacillus oleronius*, dostępną w bazie NCBI Nucleotide database (AY988598.1, GI:62546254) oraz program NCBI PRIMERBLAST (Albert R.A. 2011). Specyficzność starterów określono przy użyciu programu BLAST. Analiza sekwencji genu dla 16S rRNA *Bacillus oleronius* wykazała bliskie pokrewieństwo do dwóch innych gatunków: *Bacillus licheniformis* i *Bacillus sporothermodurans*, będących jednakże - w odróżnieniu od *Bacillus oleronius* - laseczkami Gram-dodatnimi. Startery zostały zsyntetyzowane przez firmę DNA Gdańsk. Zastosowano następujące startery reakcji PCR:

- BO1: 5'-AACGGCTCACCAAGGCGACG-3' (20 nukleotydów)

- BO2: 5'-TCCGGACAACGCTTGCCACC-3' (20 nukleotydów).

DNA kontrolne zostało wyizolowane ze szczepu referencyjnego *Bacillus oleronius* (Kuhnigk i wsp. 1995) (ATCC 700005), zakupionego w ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA).

Na 1 próbkę przygotowywano następującą mieszaninę reakcyjną:

- 40,5 µl buforu zawierającego MgCl₂
- 5 µl mieszaniny dNTPs
- po 1 µl starterów
- 2 µl DNA
- 0,5 µl polimerazy termostabilnej.

W przypadku kontroli pozytywnej dodawano 2 µl DNA kontrolnego. Reakcję PCR przeprowadzano w termocyklerze Mastercycler gradient (Eppendorf), w następujących warunkach amplifikacji:

- 2 min 94°C (wstępna denaturacja)
- 30 s 94°C (denaturacja)
- 60 s 60°C (dołączanie starterów)
- 60 s 72°C (elongacja)
- 5 min 72°C (wydłużanie końcowe).

Liczba cykli w reakcji PCR wynosiła 35. Produkt PCR poddawano elektroforezie w 2% żelu agarozowym i odczytywano wynik po barwieniu bromkiem etydyny. Za wynik pozytywny przyjmowano obecność produktu reakcji PCR o wielkości 299 par zasad (Szkaradkiewicz i wsp. 2012).

Badania mikrobiologiczne, w tym: izolacja bakterii, ich identyfikacja fenotypowa, ekstrakcja DNA oraz wykrywanie genu dla 16S rRNA *Bacillus oleronius*, zostały przeprowadzone w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Kierownikiem Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej UM w Poznaniu jest Pan prof. dr hab. med. Andrzej Szkaradkiewicz.

3.2.5. Badanie surowiczych stężeń interleukiny 17A

Poziomy surowiczego stężenia IL-17A badano łącznie w 140 surowicach, z czego 100 surowic pochodziło od pacjentów z trądzikiem różowatym, a 40 surowic pochodziło od osób zdrowych z grupy kontrolnej. Badania wykonano gotowymi zestawami „Human IL-17 Immunoassay” (R&D, USA), przeznaczonymi do ilościowej oceny surowiczego stężenia ludzkiej IL-17, zgodnie z metodyką podaną przez producenta. Zestaw zawiera

rekombinowaną ludzką IL-17, uzyskaną w wyniku ekspresji tego białka w komórkach *E. coli*. W celu analizy stężenia IL-17 наносzono po 100 µl roztworu Assay Diluent na kolejne dołki płytki mikrotitracyjnej, a następnie - po 100 µl standardów i surowic. W dalszej kolejności płytkę inkubowano przez 3 h w temperaturze pokojowej. Po trzykrotnym płukaniu w załączonym do zestawu buforze płuczącym, dodawano po 200 µl koniugatu (poliklonalne przeciwciało przeciwko IL-17 sprzężone z peroksydazą chrzanową) i ponownie inkubowano przez 60 minut w tych samych warunkach. Po kolejnym etapie płukania dodawano po 200 µl substratu (woda utleniona i czterometylobenzydyna) i inkubowano - chroniąc przed światłem - przez 30 minut w tych samych warunkach. W celu zatrzymania reakcji dodawano 50 µl roztworu zatrzymującego reakcję (2N kwas siarkowy). Wyniki oceniano fotometrycznie przy długości fali 450 nm, stosując jako długość referencyjną 540 nm, przy użyciu czytnika do ELISA. Do każdej reakcji wykreślono odpowiednie krzywe standardowe, z których odczytywano surowicze stężenie IL-17. Oznaczenia zostały przeprowadzone zgodnie z wytycznymi podanymi przez producenta zestawu.

3.2.6. Badanie reaktywności surowic krwi z białkami bakterii *Bacillus oleronius*

3.2.6.1. Przygotowanie białek bakteryjnych do analizy

Kultura bakteryjna *Bacillus oleronius* została inkubowana w 250 ml płynnej pożywki hodowlanej, w temperaturze 30°C przez 48 godzin. Uzyskane - poprzez wirowanie w 4000 g przez 20 minut - komórki bakterii zebrano i przemyto w roztworze PBS (pH 7.2). Do komórek dodano bufor do lizy zawierający 0.2% Triton-X 100 z dodanymi inhibitorami proteaz i pozostawiono na 1 godzinę w temperaturze 4°C przed sonikacją, przeprowadzoną przy użyciu sonikatora (Sonopuls HD 2200; Bandelin, Berlin, Germany). W celu oddzielenia preparatu białka, zawiesina komórek została następnie zwirowana przez 2 minuty, w 6000 g, w temperaturze 4°C. Następnie (metodą Bradforda) oceniano stężenie białka, a do próbek dodano buforu denaturującego (1µg/µl), zgodnie z opisami (Lacey i wsp. 2007, O'Reilly i wsp. 2012).

3.2.6.2. Wykrywanie przeciwciał w surowicy przy użyciu metody Western blot

Białka bakterii *Bacillus oleronius* (15µg/kieszonkę) były rozdzielane na 12.5% żelu akrylamidowym, metody przez SDS-PAGE (SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Po elektroforezie, białka *Bacillus oleronius* przeniesiono na membrany nitrocelulozowe, które pocięto na paski. Następnie membrany zostały przemyte

i na tak przygotowane membrany nałożono pojedyncze próbki badanej surowicy z przeciwciałem pierwszorzędowym (rozcieńczone 1/100 w buforze) oraz pozostawiono przez noc, w temperaturze 4°C. Po przemyciu roztworem TBS-Tween, membranę inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej z przeciwciałem drugorzędowym anti-human IgG-HRP (Sigma Aldrich Chemical Co. Ltd, Poole, U.K.), rozcieńczonym 1/1000 w buforze. Immuno-reaktywne prążki białkowe uwidoczniono poprzez inkubację pasków membran nitrocelulozowych przez 10 minut z 10 mg tetrahydrochlorku diaminobenzyny (DAB) w 15 ml buforu Tris-HCL (pH 7) zawierającym 15 µl nadtlenu wodoru. Następnie paski przemywano w wodzie destylowanej i suszono zgodnie z opisami (Lacey i wsp. 2007, O'Reilly i wsp. 2012). Analizy wykonywano używając ślepych prób surowicy.

Badania zostały przeprowadzone w National University of Ireland Maynooth, Co. Kildare, Ireland, Department of Biology. Kierownikiem Zakładu jest Pan dr Kevin Kavanagh.

3.2.7. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki badań klinicznych zostały poddane analizie statystycznej z zastosowaniem programu STATISTICA PL 9.0 firmy StatSoft. Takie parametry jak wiek, czas wystąpienia pierwszych objawów, poziom wydzielanego łoju, liczba roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² oraz poziom stężenia IL-17, przedstawiono za pomocą średniej z odchyleniem standardowym oraz wartości minimalnej i maksymalnej. Dla tych parametrów sprawdzono również zgodność z rozkładem normalnym za pomocą testu Shapiro-Wilka. W przypadku wystąpienia zgodności z rozkładem normalnym porównania dwóch grup wykonano testem t-Studenta, natomiast w przypadku braku zgodności z rozkładem normalnym - za pomocą nieparametrycznego testu Manna-Whitneya. Porównanie więcej niż dwóch grup wykonano za pomocą testu Kruskala-Wallisa ze względu na brak zgodności z rozkładem normalnym. Występowanie zależności między parametrami wyrażonymi w skali nominalnej lub porządkowej (rodzaj trądziku, nasilenie zmian, liczby próbek pozytywnych i negatywnych surowicy) sprawdzono za pomocą testu Chi-kwadrat. Pomiędzy poziomem wydzielania łoju oraz wiekiem pacjentów a liczbą roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry sprawdzono korelacje za pomocą testu korelacji rang Spearmana. Za istotne statystycznie uznano wyniki o poziomie istotności statystycznej mniejszej od 0,05 ($p < 0,05$).

4. Wyniki

4.1. Wyniki badania podmiotowego, przedmiotowego i badań dodatkowych

4.1.1. Analiza liczby, wieku i płci pacjentów z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej

W grupie 100 pacjentów z trądzikiem różowatym kobiety stanowiły 60% ogółu (n=60), zaś mężczyźni - 40% (n=40). Średni wiek pacjentów z grupy badanej wyniósł 47,13 lat. Średni wiek kobiet z grupy badanej wyniósł 44,83 lat. Maksymalny wiek kobiet wyniósł 81 lat, a minimalny - 20 lat. Średni wiek mężczyzn z grupy badanej wyniósł 50,58 lat, maksymalny - 83 lata, zaś minimalny - 21 lat. W grupie badanej nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy średnim wiekiem kobiet a średnim wiekiem mężczyzn (test t-Studenta, p=0,0614) (Rycina 2.). Dane mówiące o liczbie i wieku pacjentów z grupy badanej przedstawiono w tabeli I. W grupie badanej znajdowało się 14 osób poniżej 30 roku życia, 41 osób w wieku 30-50 lat i 45 osób powyżej 50 roku życia. Dane mówiące o liczbie pacjentów w poszczególnych grupach wiekowych przedstawiono w tabeli II.

W grupie kontrolnej (40 osób zdrowych) kobiety stanowiły 60% ogółu (n=24), a mężczyźni - 40% (n=16). Średni wiek osób z tej grupy wyniósł 30,35 lat. Średni wiek kobiet wynosił 32,46 lat, ich maksymalny wiek - 72 lata, a minimalny - 15 lat. Średni wiek mężczyzn z grupy kontrolnej wynosił 27,19 lat, maksymalny - 47 lat, a minimalny - 19 lat. W grupie kontrolnej nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy średnim wiekiem kobiet a średnim wiekiem mężczyzn (test Manna-Whitneya, p=0,3888) (Rycina 2.). Dane mówiące o liczbie i wieku osób z grupy kontrolnej przedstawiono w tabeli III.

Tabela I. Liczba i wiek pacjentów z grupy badanej z podziałem na płeć.

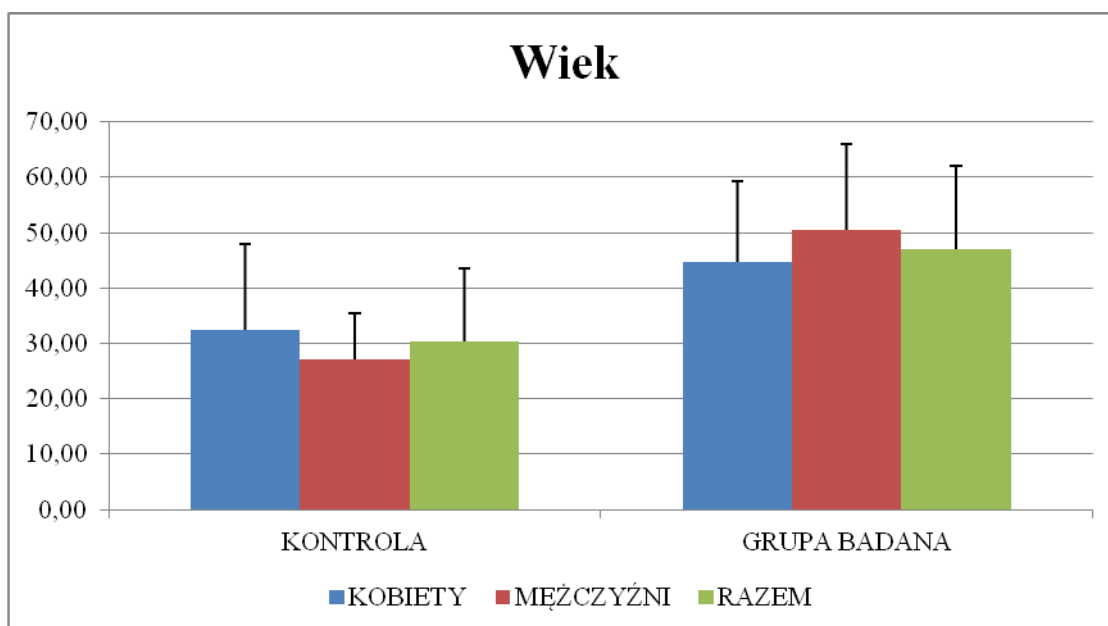
LICZBA I WIEK CHORYCH NA TRĄDZIK RÓŻOWATY					
	N	ŚREDNIA	MINIMUM	MAKSIMUM	ODCH. STD.
KOBIETY	60	44,83	20,00	81,00	14,55
MEŹCZYŹNI	40	50,58	21,00	83,00	15,33
RAZEM	100	47,13	20,00	83,00	15,05

Tabela II. Liczba pacjentów w poszczególnych grupach wiekowych.

PRZEDZIAŁY WIEKOWE W GRUPIE BADANEJ				
	N	PONIŻEJ 30 r.ż.	POMIĘDZY 30 a 50 r.ż.	POWYŻEJ 50 r.ż.
RAZEM	100	14	41	45

Tabela III. Liczba i wiek osób z grupy kontrolnej z podziałem na płeć.

LICZBA I WIEK CHORYCH Z GRUPY KONTROLNEJ					
	N	ŚREDNIA	MINIMUM	MAKSIMUM	ODCH. STD.
KOBIETY	24	32,46	15,00	72,00	15,39
MĘŻCZYŻNI	16	27,19	19,00	47,00	8,31
RAZEM	40	30,35	15,00	72,00	13,16



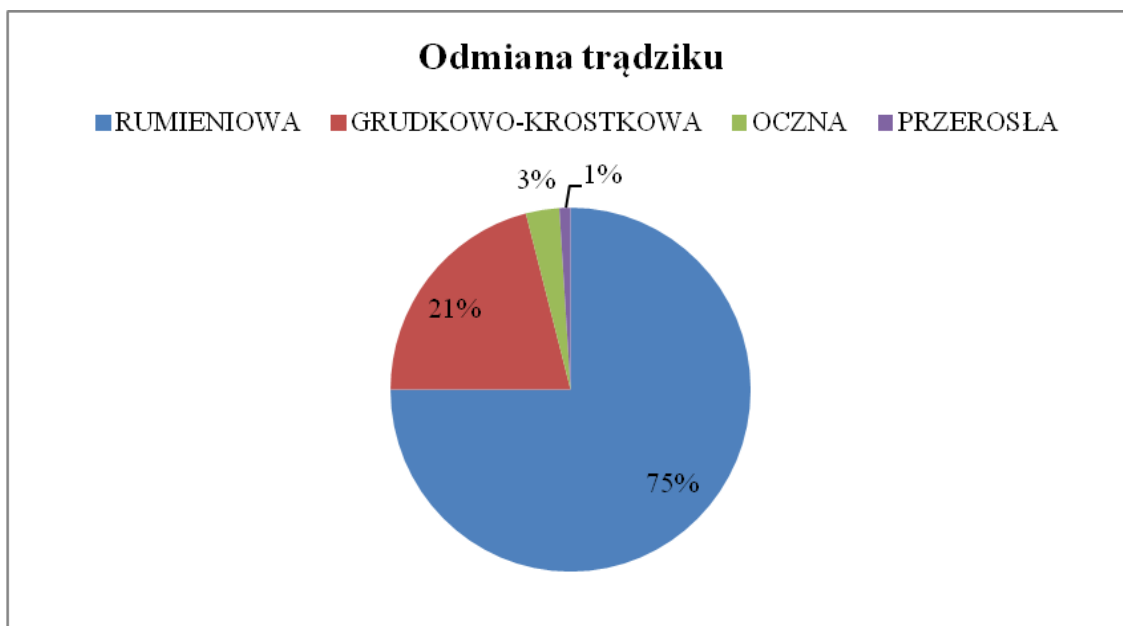
Rycina 2. Struktura wiekowa chorych z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej z podziałem na płeć.

4.1.2. Analiza częstości występowania odmian trądziku różowatego w grupie badanej

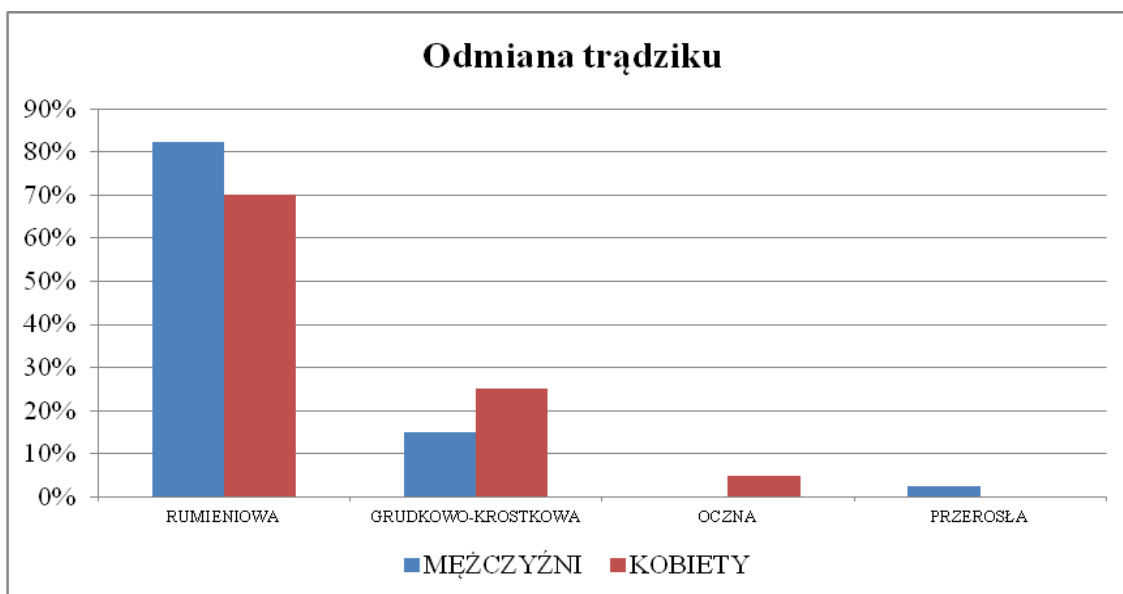
U 75% pacjentów (n=75) z grupy badanej stwierdzono obecność odmiany rumieniowej trądziku różowatego, która dominowała zarówno wśród kobiet (70%) (n=40), jak i wśród mężczyzn (82,5%) (n=33). U 21% pacjentów z grupy badanej (n=21) stwierdzono obecność odmiany grudkowo-krostkowej trądziku różowatego, która występowała u 25% kobiet (n=15) i 15% mężczyzn (n=6). Obecność odmiany ocznej stwierdzono u 3% pacjentów (n=3), a odmiany przerosłej - u 1% pacjentów (n=1) z grupy badanej (Rycina 3.). Dane mówiące o częstości występowania poszczególnych odmian trądziku różowatego wśród pacjentów z grupy badanej przedstawiono w tabeli IV. W grupie badanej nie wykazano istotnej statystycznie zależności pomiędzy płcią pacjentów a występowaniem odmian trądziku różowatego (test Chi-kwadrat=5,1428 przy p=0,1616) (Rycina 4.).

Tabela IV. Częstość występowania poszczególnych odmian trądziku różowatego w grupie badanej.

ODMIANA TRĄDZIKU		MEŹCZYŹNI	KOBIETY	RAZEM
RUMIENIOWA	Liczba	33	42	75
	% z kolumny	82,50%	70,00%	
	% z wiersza	44,00%	56,00%	
	% z całości	33,00%	42,00%	75,00%
GRUDKOWO-KROSTKOWA	Liczba	6	15	21
	% z kolumny	15,00%	25,00%	
	% z wiersza	28,57%	71,43%	
	% z całości	6,00%	15,00%	21,00%
OCZNA	Liczba	0	3	3
	% z kolumny	0,00%	5,00%	
	% z wiersza	0,00%	100,00%	
	% z całości	0,00%	3,00%	3,00%
PRZEROSŁA	Liczba	1	0	1
	% z kolumny	2,50%	0,00%	
	% z wiersza	100,00%	0,00%	
	% z całości	1,00%	0,00%	1,00%
OGÓŁ	Liczba	40	60	100
	% z całości	40,00%	60,00%	



Rycina 3. Procentowy udział poszczególnych odmian trądziku różowatego w grupie badanej.



Rycina 4. Procentowy udział kobiet i mężczyzn w poszczególnych odmianach trądziku różowatego w grupie badanej.

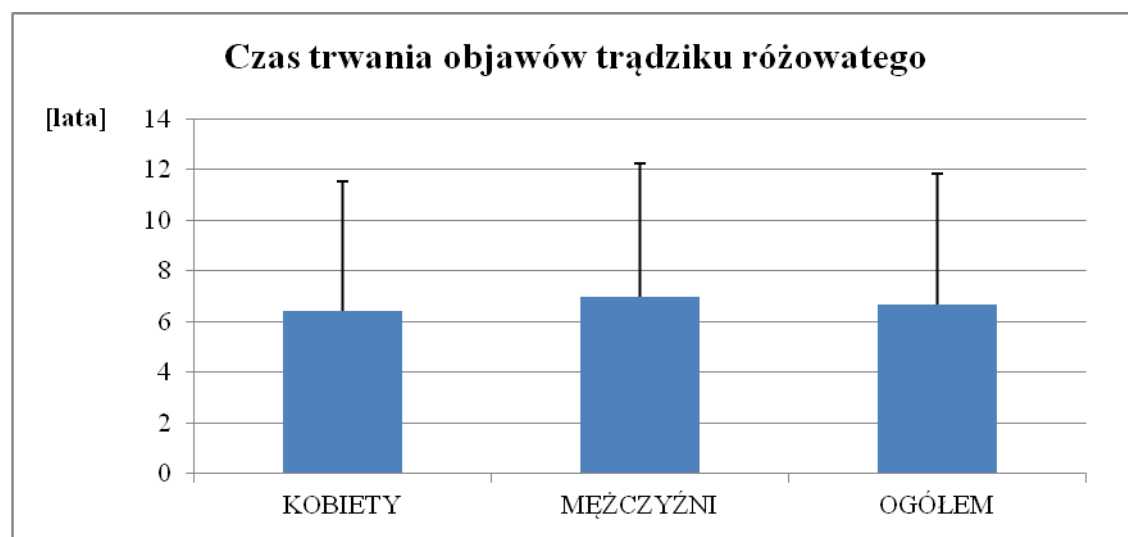
4.1.3. Analiza czasu trwania objawów trądziku różowatego u pacjentów z grupy badanej

Czas trwania objawów choroby w grupie badanej wyniósł średnio 6,65 lat. Czas trwania objawów trądziku różowatego u kobiet wynosił od 3 miesięcy do 22 lat, zaś u mężczyzn - od pół roku do 18 lat. Średnio proces chorobowy trwał u kobiet 6,44 lat, a u mężczyzn - 6,98 lat. Dane mówiące o czasie trwania objawów choroby u pacjentów z grupy badanej przedstawiono w tabeli V.

W grupie badanej nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy czasem trwania trądziku różowatego u kobiet a czasem trwania trądziku różowatego u mężczyzn (test Manna-Whitneya, $p = 0,6615$) (Rycina 5.).

Tabela V. Czas trwania objawów choroby u pacjentów z trądzikiem różowatym.

CZAS TRWANIA OBJAWÓW TRĄDZIKU RÓŻOWATEGO					
	N	ŚREDNIA	MINIMUM	MAKSIMUM	ODCH. STD.
KOBIETY	60	6,44	0,25	22,00	5,10
MEŻCZYŻNI	40	6,98	0,50	18,00	5,28
RAZEM	100	6,65	0,25	22,00	5,16



Rycina 5. Czas trwania choroby u pacjentów z grupy badanej z podziałem na płeć.

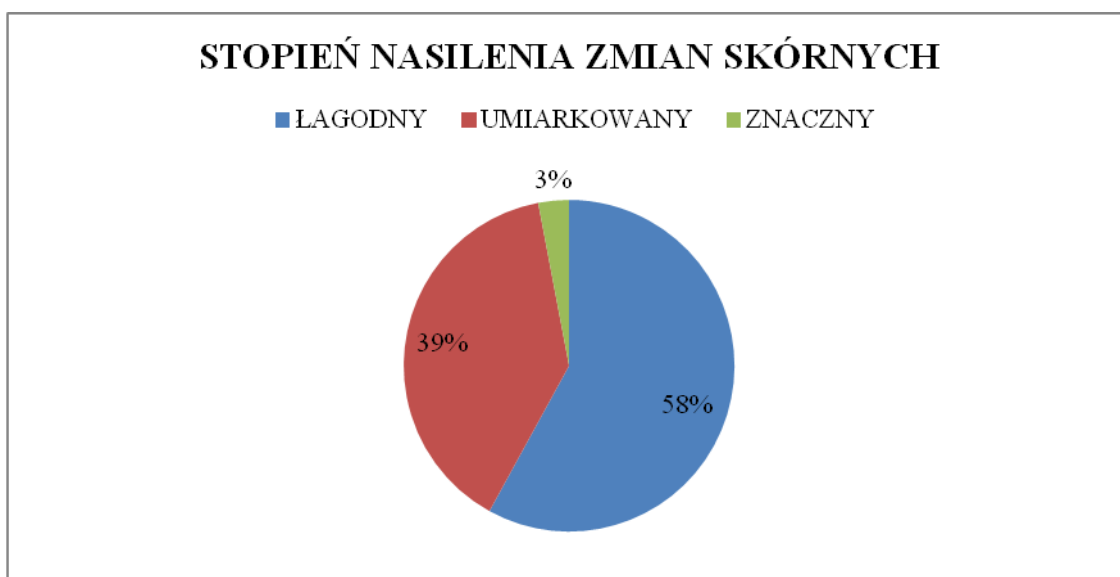
4.1.4. Analiza częstości występowania poszczególnych stopni nasilenia zmian skórnych u pacjentów z grupy badanej

W grupie badanej pacjenci z łagodnym nasileniem zmian skórnych stanowili 58% (n=58) ogółu badanych, pacjenci z umiarkowanym nasileniem - 39% (n=39), a pacjenci ze znacznym nasileniem - 3% (n=3) (Rycina 6). Łagodne nasilenie zmian występowało u 57,5% (n=23) mężczyzn i 58,33% (35) kobiet; umiarkowane nasilenie zmian występowało u 40% (n=16) mężczyzn i 38,33% (n=23) kobiet; zaś nasilenie znaczne występowało u 2,5% (n=1) mężczyzn i 3,33% (n=2) kobiet. Dane mówiące o stopniu nasilenia zmian skórnych u pacjentów z grupy badanej przedstawiono w tabeli VI.

Nie stwierdzono statystycznie istotnej zależności pomiędzy stopniem nasilenia intensywności zmian skórnych a płcią pacjentów (test Chi-kwadrat=0,0755, p=0,9629).

Tabela VI. Częstość występowania poszczególnych stopni nasilenia zmian skórnych u pacjentów z grupy badanej z podziałem na płeć.

STOPIEŃ NASILENIA ZMIAN SKÓRNYCH		MĘŻCZYŹNI	KOBIETY	RAZEM
ŁAGODNY	Liczba	23	35	58
	% z kolumny	57,50%	58,33%	
	% z wiersza	39,66%	60,34%	
	% z całości	23,00%	35,00%	58,00%
UMIARKOWANY	Liczba	16	23	39
	% z kolumny	40,00%	38,33%	
	% z wiersza	41,03%	58,97%	
	% z całości	16,00%	23,00%	39,00%
ZNACZNY	Liczba	1	2	3
	% z kolumny	2,50%	3,33%	
	% z wiersza	33,33%	66,67%	
	% z całości	1,00%	2,00%	3,00%
OGÓŁ	Liczba	40	60	100
	% z całości	40,00%	60,00%	



Rycina 6. Rozkład stopnia nasilenia zmian trądzikowych u pacjentów z grupy badanej.

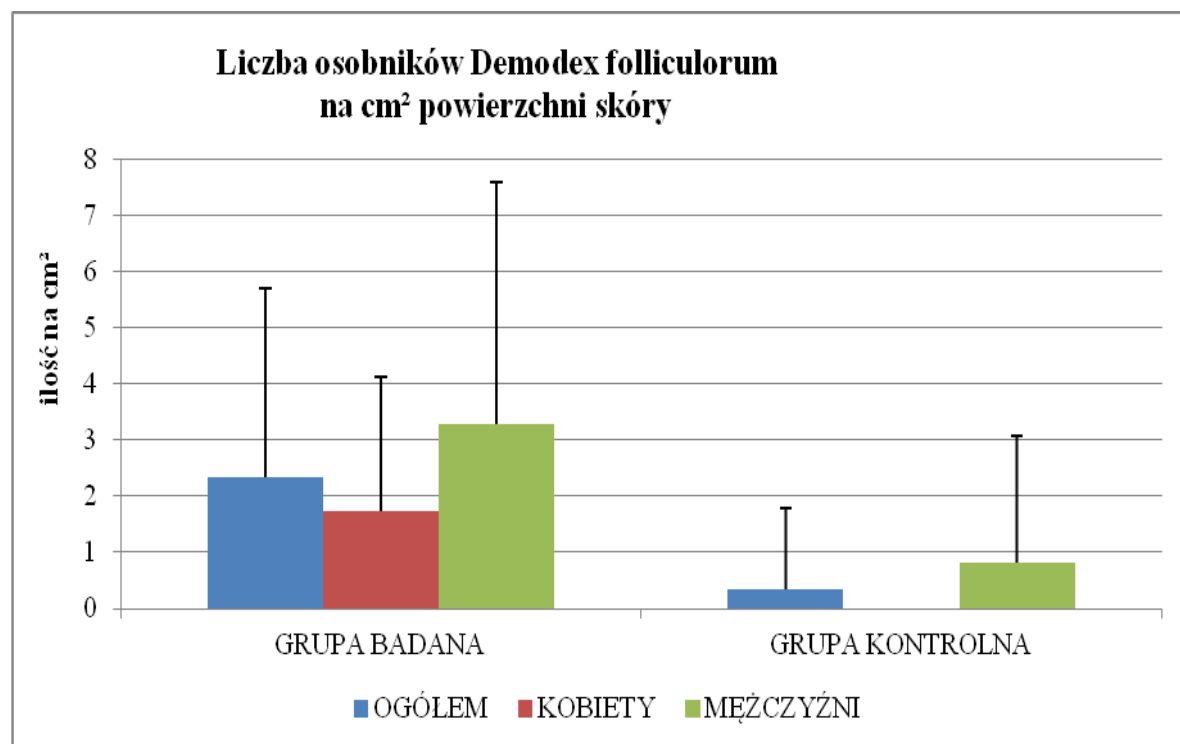
4.1.5. Analiza liczebności roztoczy *Demodex folliculorum* na skórze twarzy u pacjentów z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej

U pacjentów z grupy badanej stwierdzono występowanie średnio 2,34 roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry, zaś u osób z grupy kontrolnej stwierdzono występowanie średnio 0,33 roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry. Wykazano statystycznie istotną różnicę w średniej liczbie roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry pomiędzy pacjentami z grupy badanej i osobami z grupy kontrolnej (test Manna – Whitneya, p=0,0001) (Rycina 7.).

Wśród kobiet z grupy badanej stwierdzono występowanie średnio 1,72 roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry, a wśród mężczyzn - średnio 3,28 roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry. Dane mówiące o liczbie roztoczy *Demodex folliculorum* na skórze twarzy w grupie badanej i kontrolnej przedstawiono w tabeli VII. Stwierdzono statystycznie istotną różnicę w średniej liczbie roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry pomiędzy populacją kobiet a populacją mężczyzn z grupy badanej (test Manna-Whitneya, p=0,0215) (Rycina 7.). W grupie kontrolnej nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w zakresie średniej liczby roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry pomiędzy populacją kobiet a populacją mężczyzn (test Manna-Whitneya, p=0,1921).

Tabela VII. Liczba roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² w grupie badanej i kontrolnej, z podziałem na płeć.

LICZBA ROZTOCZY <i>DEMODEX FOLLICULORUM</i> NA cm ²					
	N	Średnia	Minimum	Maksimum	Odch. Std.
OGÓLEM	140	1,76	0,00	22,00	3,08
KOBIETY	84	1,23	0,00	10,00	2,16
MĘŻCZYŻNI	56	2,57	0,00	22,00	3,97
GRUPA BADANA	100	2,34	0,00	22,00	3,36
KOBIETY Z GRUPY BADANEJ	60	1,72	0,00	10,00	2,39
MĘŻCZYŻNI Z GRUPY BADANEJ	40	3,28	0,00	22,00	4,30
GRUPA KONTROLNA	40	0,33	0,00	9,00	1,46
KOBIETY Z GRUPY KONTROLNEJ	24	0,00	0,00	0,00	0,00
MĘŻCZYŻNI Z GRUPY KONTROLNEJ	16	0,81	0,00	9,00	2,26

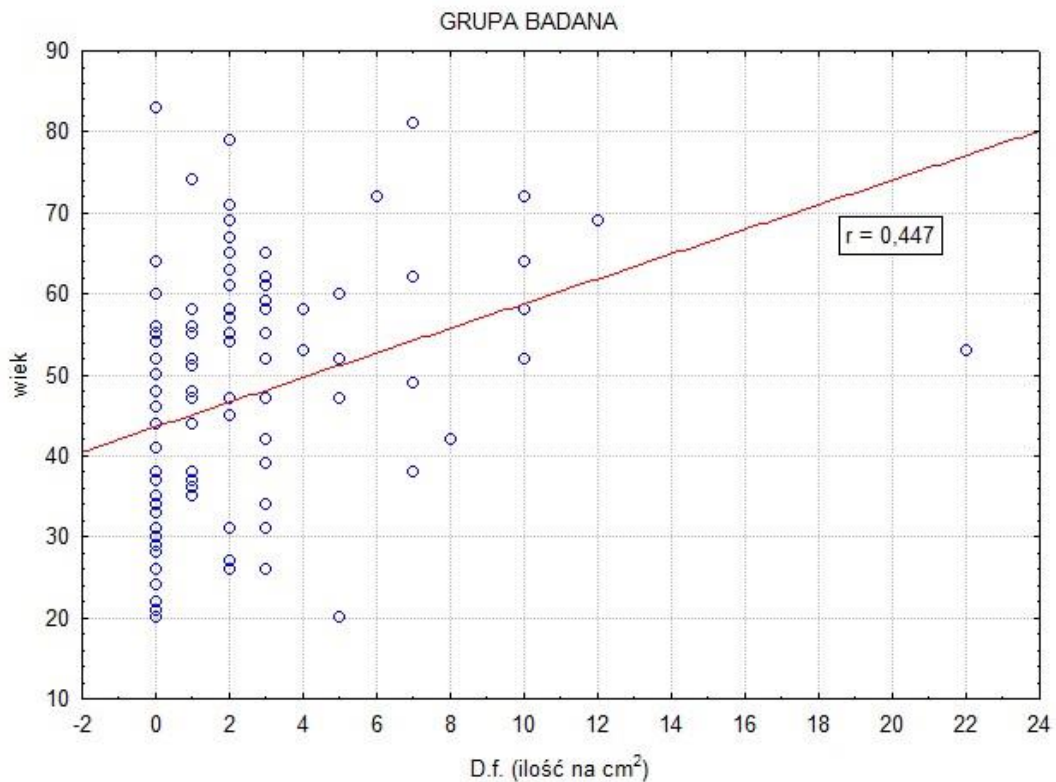


Rycina 7. Liczba roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² skóry w grupie badanej i grupie kontrolnej z podziałem na płeć.

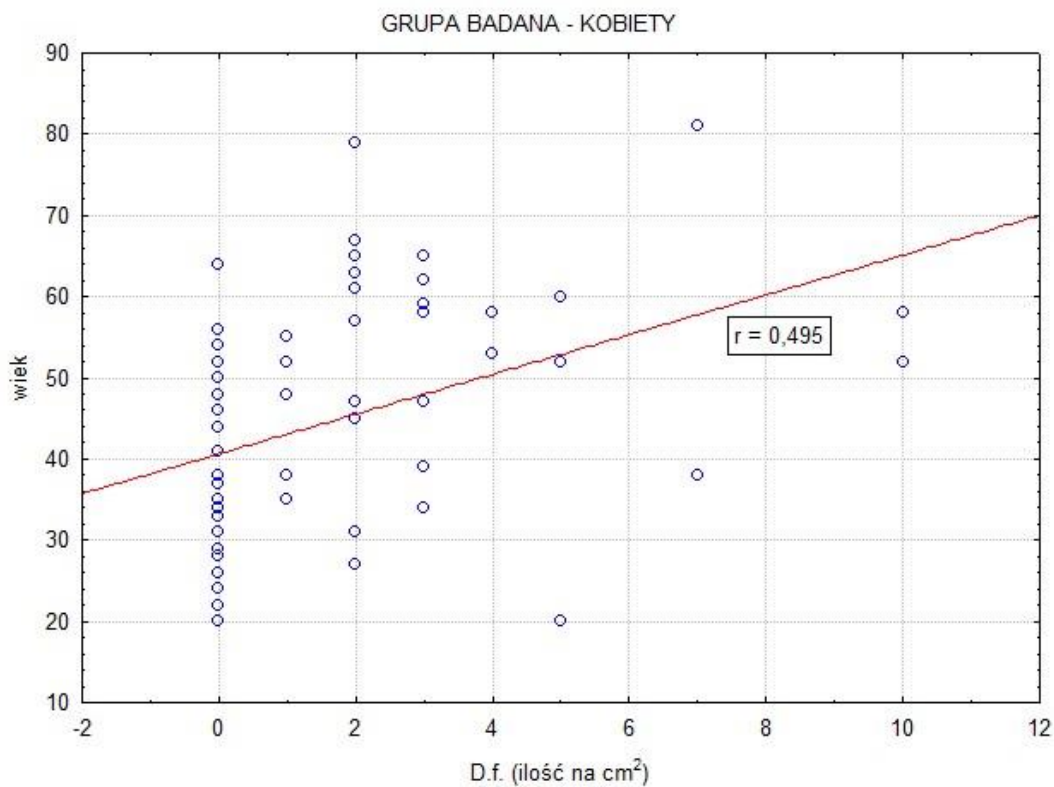
4.1.6. Analiza liczebności roztoczy *Demodex folliculorum* na skórze twarzy w zależności od wieku pacjentów z grupy badanej

Za pomocą testu korelacji rang Spearmana wykazano:

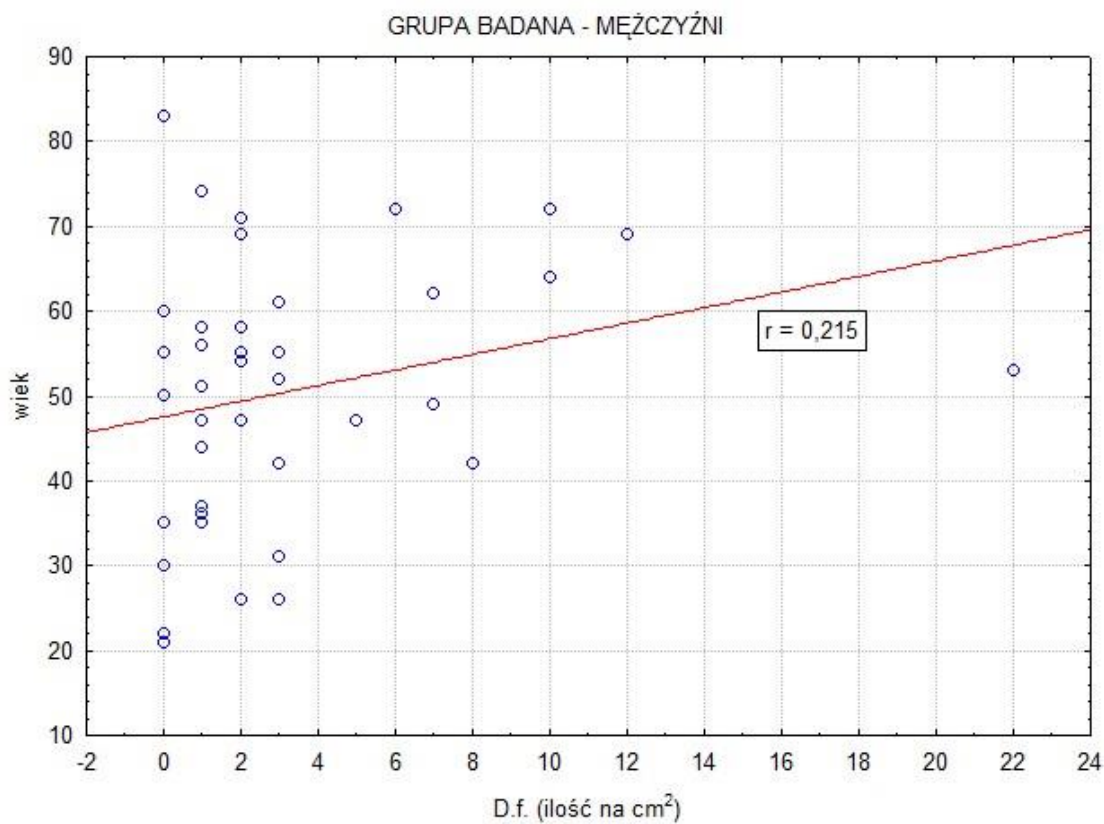
- istnienie przeciętnej korelacji pomiędzy wiekiem pacjentów a ilością roztoczy *Demodex folliculorum* na cm^2 powierzchni skóry twarzy u pacjentów z grupy badanej ($r=0,4470$, $p=0,0001$) (Rycina 8.)
- istnienie przeciętnej korelacji pomiędzy wiekiem pacjentów a ilością roztoczy *Demodex folliculorum* na cm^2 powierzchni skóry twarzy w populacji kobiet z grupy badanej ($r=0,4949$, $p=0,0001$) (Rycina 9.)
- brak korelacji pomiędzy wiekiem pacjentów a ilością roztoczy *Demodex folliculorum* na cm^2 powierzchni skóry twarzy w populacji mężczyzn z grupy badanej (Rycina 10.).



Rycina 8. Wykres rozrzutu liczby roztoczy *Demodex folliculorum* w relacji do wieku chorych z grupy badanej.



Rycina 9. Wykres rozrzutu liczby roztoczy *Demodex folliculorum* w relacji do wieku chorych kobiet z grupy badanej.



Rycina 10. Wykres rozrzutu liczby roztoczy *Demodex folliculorum* w relacji do wieku chorych mężczyzn z grupy badanej.

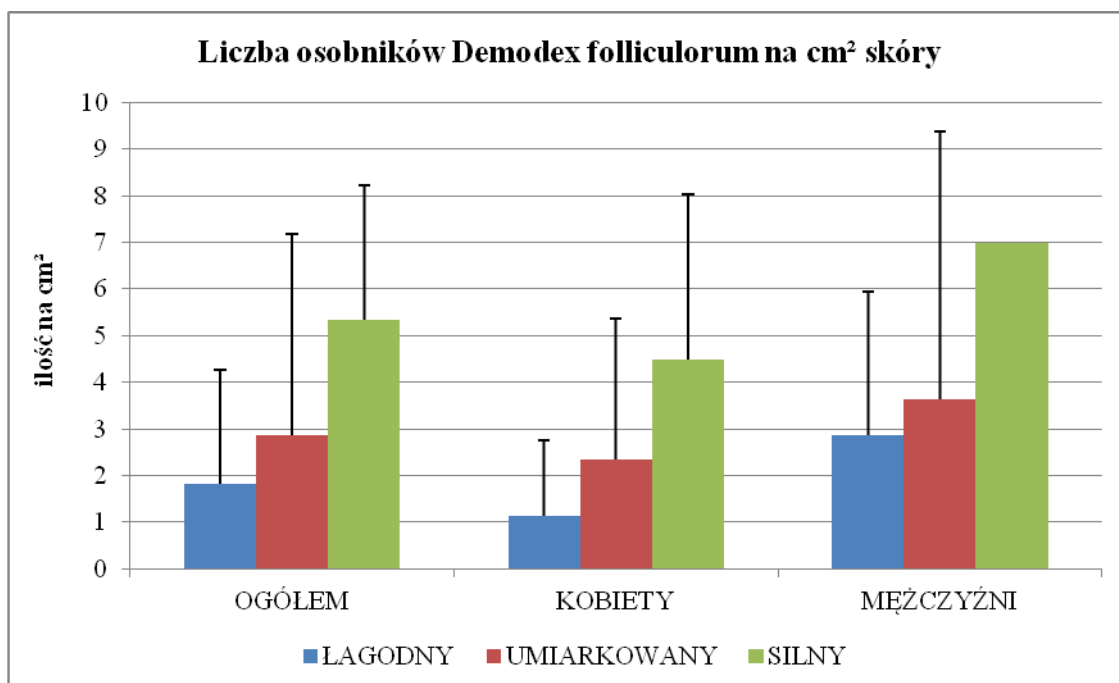
4.1.7. Analiza liczebności roztoczy *Demodex folliculorum* na skórze twarzy w zależności od stopnia nasilenia zmian skórnych u pacjentów z grupy badanej

W grupie badanej stwierdzono występowanie średnio 1,83 roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry twarzy u pacjentów z łagodnym nasileniem zmian skórnych; 2,87 roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry twarzy u pacjentów z umiarkowanym nasileniem zmian oraz 5,33 roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry twarzy u pacjentów ze znacznym nasileniem zmian skórnych. Wśród badanych kobiet ze znacznym nasileniem zmian skórnych stwierdzono występowanie średnio 4,5 roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry twarzy, z umiarkowanym nasileniem zmian skórnych - średnio 2,35 roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry twarzy, zaś z łagodnym nasileniem zmian skórnych - 1,14 roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry twarzy. Wśród badanych mężczyzn ze znacznym nasileniem zmian skórnych stwierdzono występowanie średnio 7 roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry twarzy, z umiarkowanym nasileniem zmian skórnych - średnio 3,63 roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry twarzy, zaś z łagodnym nasileniem zmian skórnych - 2,78 roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry twarzy (Rycina 11.). Dane mówiące o liczbie roztoczy *Demodex folliculorum* na cm powierzchni skóry w zależności od stopnia nasilenia zmian skórnych u pacjentów z grupy badanej przedstawiono w tabeli VIII.

Wykazano statystycznie istotną różnicę w zakresie liczby roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² pomiędzy populacją kobiet a populacją mężczyzn z łagodnym nasileniem zmian skórnych ($p=0,0097$) (Rycina 11.). Nie stwierdzono natomiast statystycznie istotnej różnicy w liczbie roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² pomiędzy populacją kobiet a populacją mężczyzn z umiarkowanym nasileniem zmian skórnych ($p=0,6014$). Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy co do liczby roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² pomiędzy pacjentami z łagodnym a pacjentami z umiarkowanym nasileniem zmian skórnych (test Manna-Whitneya, $p=0,3062$), jak również nie wykazano istotnej statystycznie różnicy co do liczby roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² pomiędzy populacjami (odpowiednio) kobiet/mężczyzn z łagodnym nasileniem a kobiet/mężczyzn z umiarkowanym nasileniem zmian skórnych (test Manna-Whitneya; odpowiednio: dla kobiet $p=0,1631$, dla mężczyzn $p=0,8989$) (Rycina 11.). Z powodu zbyt małych liczebności, nie było możliwe porównanie liczby roztoczy *Demodex folliculorum* u pacjentów ze znacznym nasileniem zmian skórnych.

Tabela VIII. Liczba roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry w zależności od stopnia nasilenia zmian skórnych u pacjentów z grupy badanej.

	LICZBA ROZTOCZY <i>DEMODEX FOLLICULORUM</i> NA cm ²					
	NASILENIE ZMIAN	N	ŚREDNIA	MINIMUM	MAKSIMUM	ODCH. STD.
OGÓLEM	ŁAGODNE	58	1,83	0,00	10,00	2,44
	UMIARKOWANE	39	2,87	0,00	22,00	4,32
	ZNACZNE	3	5,33	2,00	7,00	2,89
KOBIECY	ŁAGODNE	35	1,14	0,00	5,00	1,61
	UMIARKOWANE	23	2,35	0,00	10,00	3,01
	ZNACZNE	2	4,50	2,00	7,00	3,54
MEŻCZYŻNI	ŁAGODNE	23	2,87	0,00	10,00	3,08
	UMIARKOWANE	16	3,63	0,00	22,00	5,74
	ZNACZNE	1	7,00	7,00	7,00	0,00



Rycina 11. Rozkład liczby roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² w zależności od stopnia nasilenia zmian skórnych z podziałem na płeć.

4.1.8. Analiza poziomu wydzielania łoju przez skórę twarzy u pacjentów z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej

Stwierdzony w badaniu poziom wydzielania łoju przez skórę twarzy u pacjentów z grupy badanej wyniósł średnio 124,70 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, a u osób z grupy kontrolnej - 198,35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Dane mówiące o poziomie wydzielania łoju przez skórę twarzy u pacjentów z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej przedstawiono w tabeli IX.

Wykazano statystycznie istotną różnicę w zakresie poziomu wydzielania łoju na skórze pomiędzy pacjentami z grupy badanej a osobami z grupy kontrolnej (test Manna-Whitneya, $p=0,0003$).

Tabela IX. Ilość łoju wydzielanego przez skórę twarzy u pacjentów z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej.

RODZAJ GRUPY	POZIOM WYDZIELANIA ŁOJU NA SKÓRZE				
	N	ŚREDNIA	MINIMUM	MAKSIMUM	ODCH.STD
BADANA	100	124,70	0,00	462,00	100,24
KONTROLNA	40	198,35	31,00	362,00	92,34

4.1.9. Analiza ilości wydzielania łoju przez skórę twarzy u pacjentów z grupy badanej w zależności od płci

U kobiet z grupy badanej średnia ilość łoju wydzielanego przez skórę twarzy wyniosła 115,93 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, a u mężczyzn - 137,85 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Dane mówiące o ilości łoju wydzielanego przez skórę twarzy w populacjach kobiet i mężczyzn z grupy badanej przedstawiono w tabeli X.

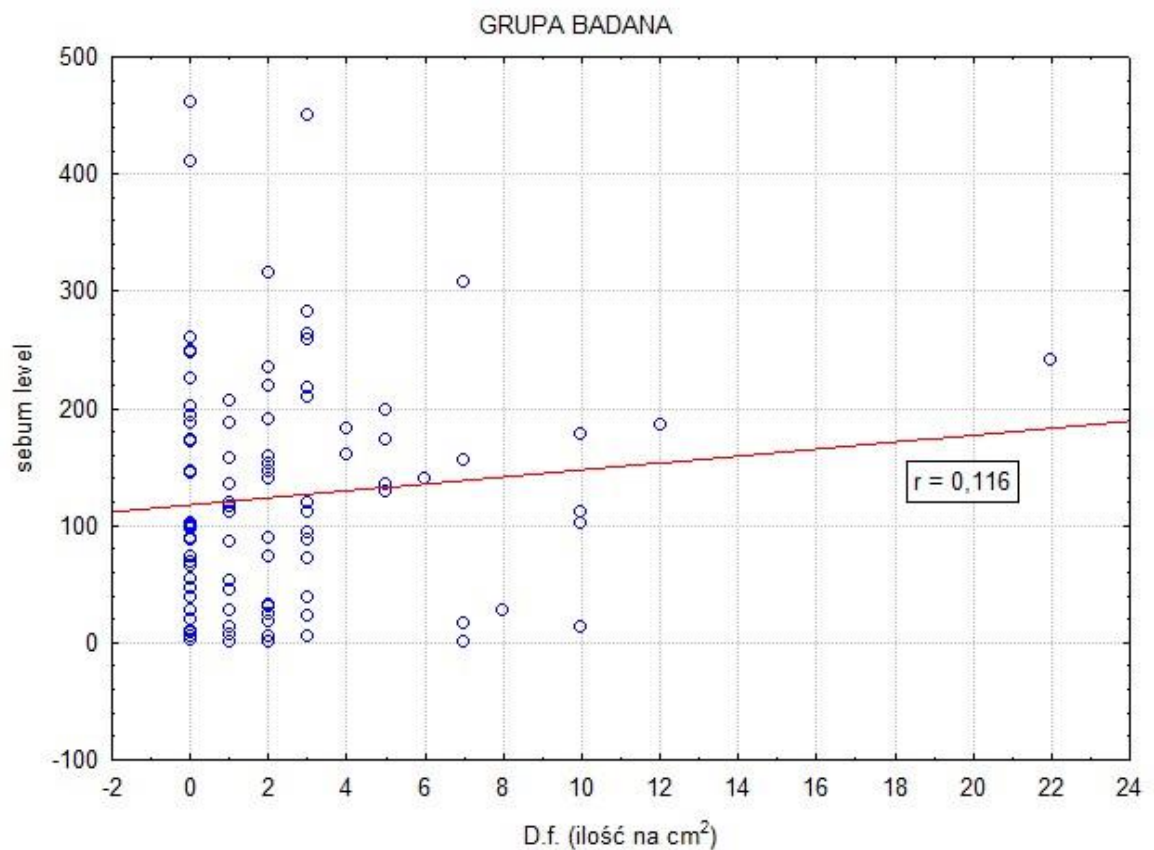
Pomiędzy populacją kobiet a populacją mężczyzn z grupy badanej nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w zakresie ilości łoju wydzielanego przez skórę twarzy (test Manna-Whitneya, $p=0,1764$).

Tabela X. Ilość łoju wydzielanego przez skórę twarzy mężczyzn i kobiet z grupy badanej.

	ILOŚĆ WYDZIELANEGO ŁOJU W GRUPIE BADANEJ				
	N	ŚREDNIA	MINIMUM	MAKSIMUM	ODCH.STD
KOBIETY	60	115,93	0,00	462,00	103,42
MĘŻCZYŹNI	40	137,85	0,00	450,00	95,02

4.1.10. Analiza poziomu wydzielania łoju przez skórę twarzy u pacjentów z grupy badanej w zależności od liczebności roztoczy *Demodex folliculorum*

W grupie badanej stwierdzono brak normalnego rozkładu dla poziomu wydzielanego łoju i liczby roztoczy *Demodex folliculorum* na cm^2 . Współczynnik korelacji wynosi $r=-0,116$ ($p=0,2510$), czyli stwierdzono brak korelacji między poziomem wydzielanego łoju a liczbą roztoczy *Demodex folliculorum* na cm^2 w przypadku pacjentów z trądzikiem różowatym (Rycina 12.).



Rycina 12. Wykres rozrzutu dla liczby roztoczy *Demodex folliculorum* na cm^2 i poziomu wydzielania łoju przez skórę twarzy u pacjentów z grupy badanej.

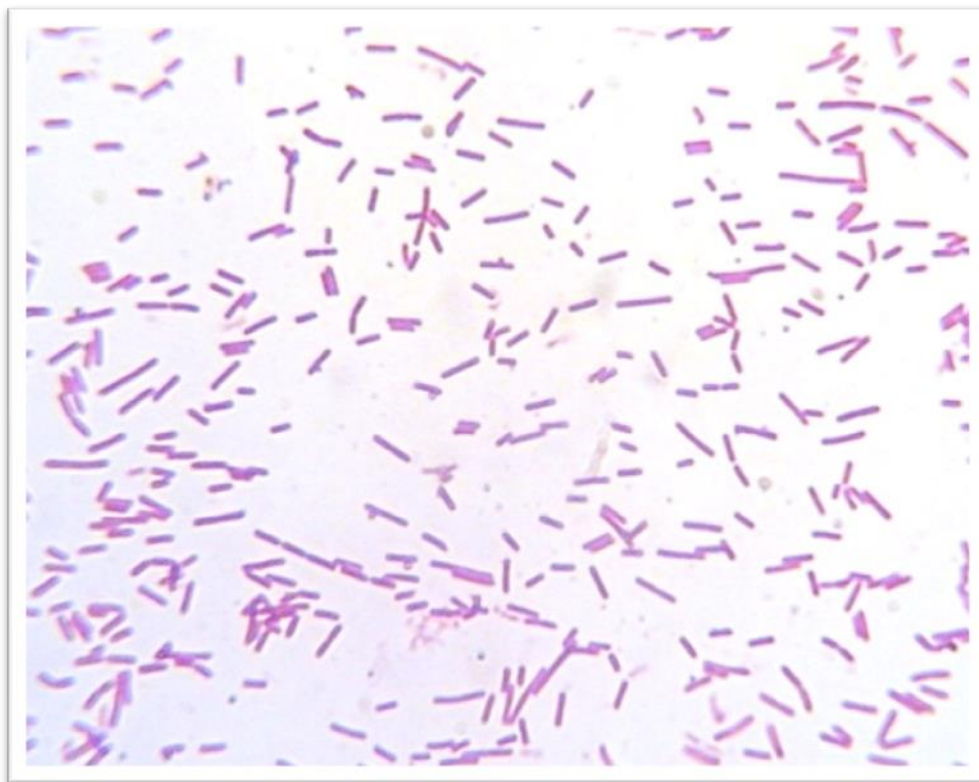
4.2. Wyniki badań mikrobiologicznych

4.2.1. Analiza wyników badań inkubacji zeszkrobów naskórka pobranych od pacjentów z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej

Zeszkroby pobrano od 18 pacjentów z grupy badanej i od 3 osób z grupy kontrolnej. Po inkubacji zeszkrobów na podłożach hodowlanych, uzyskano wzrost szczepów bakteryjnych (Rycina 13., Rycina 14.), których identyfikacja była ostatecznie potwierdzana przy użyciu metody PCR.



Rycina 13. Obraz makroskopowy kolonii bakterii *Bacillus oleronius* wyrosłych na podłożu hodowlanym (agar z 5% krwią baranią).

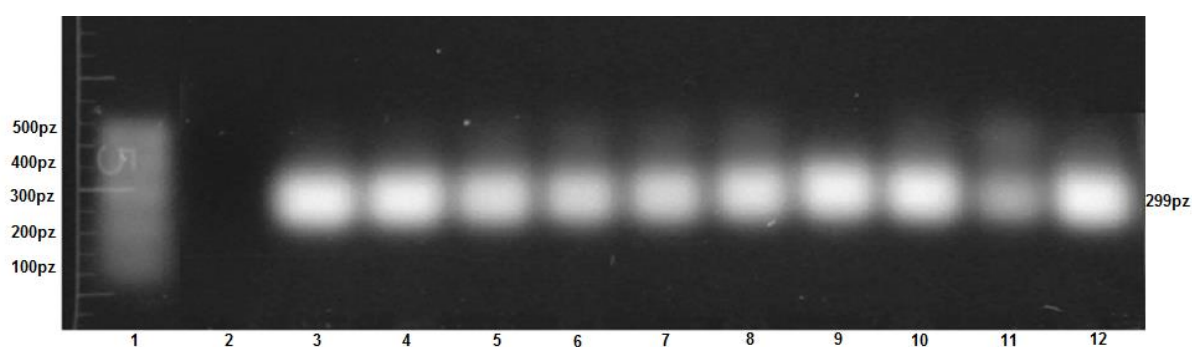


Rycina 14. Obraz mikroskopowy (powiększenie x 1000) wyhodowanych bakterii *Bacillus oleronius*, barwienie metodą Grama – Gram-ujemne laseczki średniej wielkości, rosnące w warunkach tlenowych, tworzące przetrwalniki, niemające zdolności ruchu w kropli wiszącej i nieposiadające wici (Kuhnigk i wsp. 1995).

W wyniku inkubacji zeszkrobów naskórka pochodzących od 18 pacjentów z grupy badanej, wzrost bakterii *Bacillus oleronius* (potwierdzony przy użyciu metody PCR) stwierdzono w 9 przypadkach (Rycina 15.), zaś w wyniku inkubacji zeszkrobów naskórka pochodzących od 3 osób z grupy kontrolnej, wzrost bakterii *Bacillus oleronius* (potwierdzony przy użyciu metody PCR) stwierdzono w 1 przypadku. Dane mówiące o liczbie pozytywnych i negatywnych wyników reakcji PCR w obu grupach przedstawiono w tabeli XI.

Tabela XI. Zestawienie wyników reakcji PCR potwierdzających obecność bakterii *Bacillus oleronius*.

GRUPA	LICZBA UZYSKANYCH ZESKROBIN	WYNIK REAKCJI PCR POTWIERDZAJĄCY OBECNOŚĆ <i>BACILLUS OLERONIUS</i>	N
BADANA	18	POZYTYWNY	9
		NEGATYWNY	9
KONTROLNA	3	POZYTYWNY	1
		NEGATYWNY	2



Rycina 15. Rozdział w żelu agarozowym produktów reakcji PCR dla fragmentu genu 16S rRNA *Bacillus oleronius*. Oczekiwana wielkość produktu 299 pz. Tor 1 – marker wielkości, tor 2 – kontrola negatywna, tor 3 – kontrola pozytywna (produkt PCR dla DNA szczepu referencyjnego *Bacillus oleronius* (Kuhnigk i wsp. 1995) (ATCC 700005), tory od 4 do 9 – produkt PCR uzyskany dla próbek badanych.

4.2.2. Analiza wieku pacjentów, czasu trwania objawów, liczebności roztoczy *Demodex folliculorum* na skórze twarzy oraz poziomu wydzielania łoju przez skórę twarzy w zależności od wyników badań inkubacji zeskróbki naskórka pobranych od pacjentów z grupy badanej

W populacji pacjentów z pozytywnym wynikiem reakcji PCR średni wiek wyniósł 47,89 lat, a w populacji pacjentów z negatywnym wynikiem reakcji PCR - 47 lat. Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy między średnim wiekiem pacjentów z pozytywnym wynikiem reakcji PCR a średnim wiekiem pacjentów z negatywnym wynikiem reakcji PCR (test Manna-Whitneya, $p=0,8811$).

W populacji pacjentów z pozytywnym wynikiem reakcji PCR średni czas trwania objawów choroby wyniósł 6 lat, a w populacji pacjentów z negatywnym wynikiem reakcji PCR - 6,63 lat. Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy pomiędzy średnim czasem trwania choroby u pacjentów z pozytywnym wynikiem reakcji PCR a średnim czasem trwania choroby u pacjentów z negatywnym wynikiem reakcji PCR (test Manna-Whitneya, $p=0,8717$).

W populacji pacjentów z pozytywnym wynikiem reakcji PCR wykazano występowanie średnio 6,89 roztoczy *Demodex folliculorum* na cm^2 powierzchni skóry, a w populacji pacjentów z negatywnym wynikiem reakcji PCR - średnio 1,90 roztoczy *Demodex folliculorum* na cm^2 powierzchni skóry. Wykazano statystycznie istotną różnicę pomiędzy średnią liczbą roztoczy *Demodex folliculorum* na cm^2 powierzchni skóry u pacjentów z pozytywnym wynikiem reakcji PCR a średnią liczbą roztoczy *Demodex folliculorum* na cm^2 powierzchni skóry u pacjentów z negatywnym wynikiem PCR (test Manna-Whitneya, $p=0,0016$).

W populacji pacjentów z pozytywnym wynikiem reakcji PCR stwierdzono średnie stężenie wydzielanego łoju wynoszące $131,67 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, a w populacji pacjentów z negatywnym wynikiem reakcji PCR - $123,09 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Wykazano statystycznie istotną różnicę pomiędzy średnim poziomem łoju wydzielanego przez skórę u pacjentów z pozytywnym wynikiem reakcji PCR a średnim poziomem łoju wydzielanego przez skórę u pacjentów z negatywnym wynikiem reakcji PCR (test Manna-Whitneya, $p=0,0263$). Dane mówiące o wieku pacjentów, czasie trwania objawów choroby, ilości roztoczy *Demodex folliculorum* na cm^2 oraz poziomie wydzielanego łoju w zależności od wyniku reakcji PCR u pacjentów z grupy badanej przedstawiono w tabeli XII.

Tabela XII. Wiek pacjentów, czas trwania objawów choroby, liczba roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² oraz stężenie wydzielanego łoju w zależności od wyniku reakcji PCR.

GRUPA BADANA						
		N	ŚREDNIA	MINIMUM	MAKSIMUM	ODCH. STD
POZYTYWNY WYNIK REAKCJI PCR	WIEK PACJENTÓW	9	47,89	20,00	72,00	17,40
	CZAS TRWANIA OBJAWÓW CHOROBY	9	6,00	1,00	14,00	4,64
	LICZBA ROZTOCZY <i>DEMODEX FOLLICULORUM</i> NA CM ² POWIERZCHNI SKÓRY	9	6,89	0,00	22,00	6,60
	POZIOM WYDZIELANEGO ŁOJU	9	131,67	16,00	258,00	87,94
NEGATYWNY WYNIK REAKCJI PCR	WIEK PACJENTÓW	9	47,00	20,00	83,00	14,99
	CZAS TRWANIA OBJAWÓW CHOROBY	9	6,63	0,25	22,00	5,18
	LICZBA ROZTOCZY <i>DEMODEX FOLLICULORUM</i> NA CM ² POWIERZCHNI SKÓRY	9	1,90	0,00	10,00	2,51
	POZIOM WYDZIELANEGO ŁOJU	9	123,09	0,00	462,00	101,97

4.3. Wyniki badań surowiczych stężeń interleukiny 17A

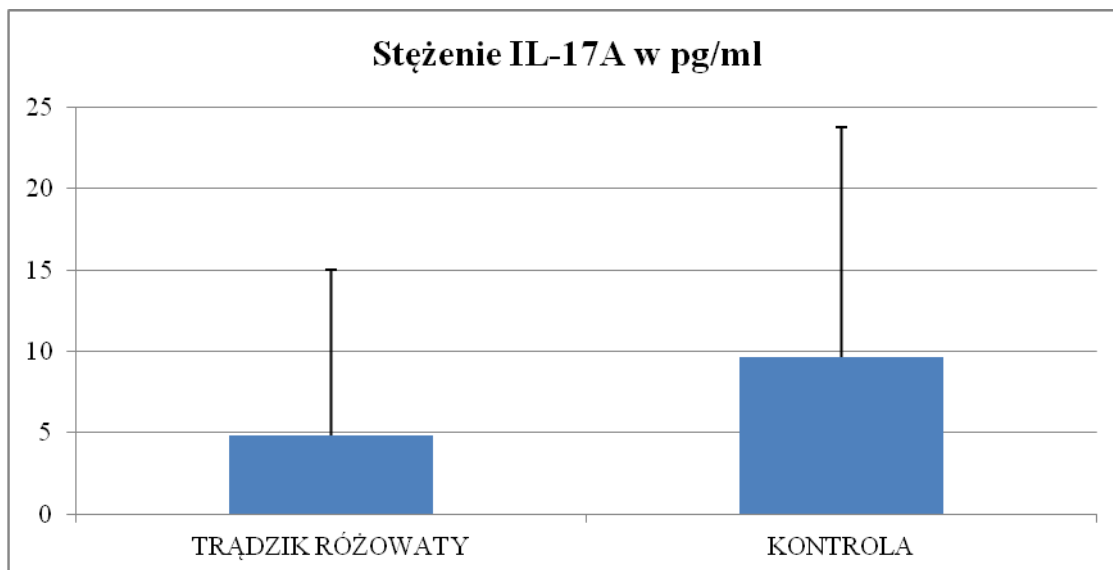
4.3.1. Analiza stężeń surowiczych interleukiny 17A u pacjentów z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej

U pacjentów z grupy badanej średnie stężenie surowicze interleukiny 17A wyniosło 4,85 pg/ml, zaś u osób z grupy kontrolnej - 9,63 pg/ml. Dane mówiące o surowiczych stężeniach interleukiny 17A u pacjentów z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej przedstawiono w tabeli XIII.

Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w zakresie stężeń surowiczych interleukiny 17A pomiędzy pacjentami z grupy badanej a osobami z grupy kontrolnej (test Manna-Whitneya, $p=0,0545$) (Rycina 16.).

Tabela XIII. Surowicze stężenia interleukiny 17A u pacjentów z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej.

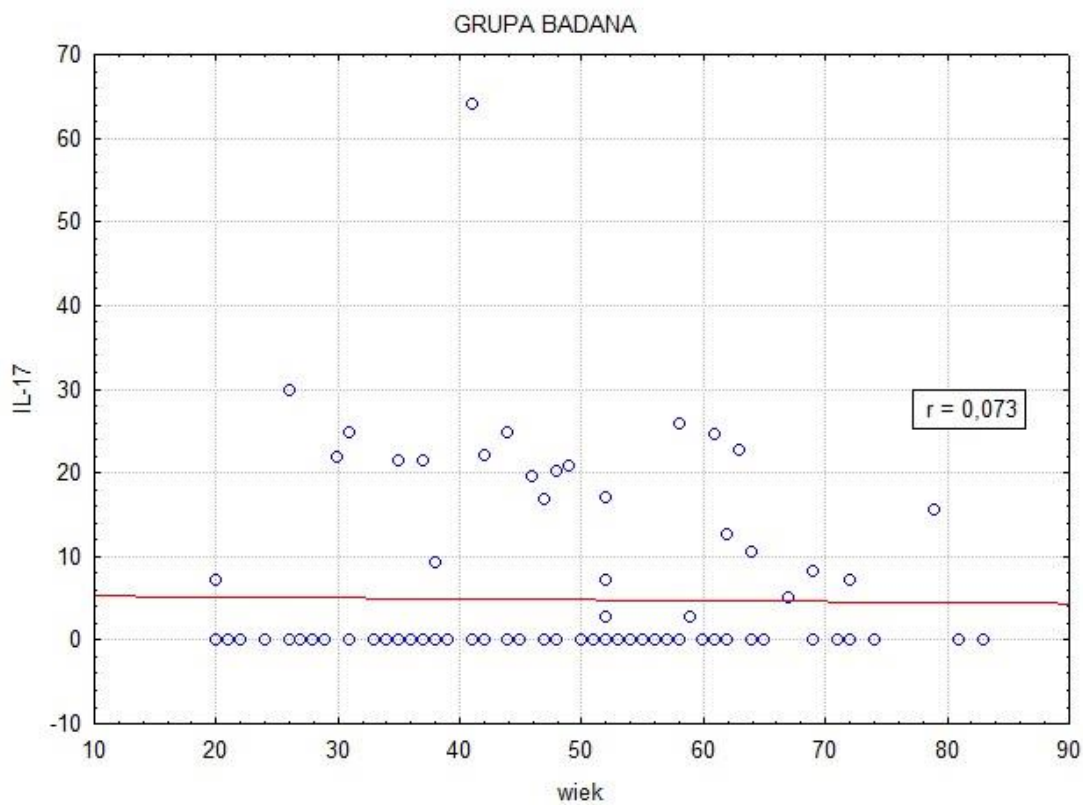
RODZAJ GRUPY	N	SUROWICZE STĘŻENIE IL-17A(w pg/ml)			
		ŚREDNIA	MINIMUM	MAKSIMUM	ODCH.STD
BADANA	100	4,85	0	64,03	10,13
KONTROLNA	40	9,63	0	48,11	14,13



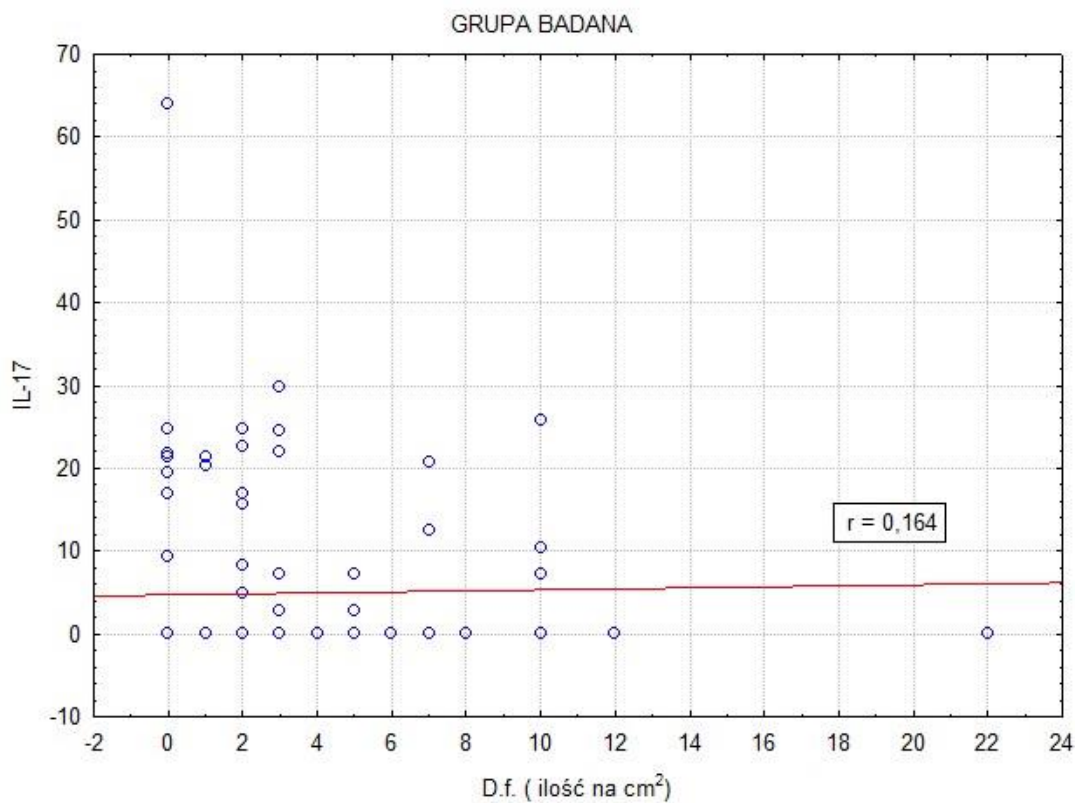
Rycina 16. Wykres średnich surowiczych stężeń IL-17A u pacjentów z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej.

4.3.2. Analiza stężeń surowiczych interleukiny 17A u pacjentów z grupy badanej w zależności od wieku i liczebności roztoczy *Demodex folliculorum* na skórze twarzy

Za pomocą korelacji rang Spearmana wykazano, że współczynnik korelacji między surowiczym stężeniem interleukiny 17A a wiekiem pacjentów z grupy badanej wynosi $r=0,0734$ (przy $p=0,4711$), czyli wynik jest nieistotny statystycznie (Rycina 17.). Wykazano również, że współczynnik korelacji między surowiczym stężeniem interleukiny 17A a ilością roztoczy *Demodex folliculorum* na cm^2 powierzchni skóry wynosi $r=0,1640$ (przy $p=0,1030$), czyli wynik jest również nieistotny statystycznie (Rycina 18.).



Rycina 17. Wykres rozrzutu dla wieku i stężenia surowiczego interleukiny 17A u pacjentów z grupy badanej.



Rycina 18. Wykres rozrzutu liczby roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² skóry policzka i surowiczego stężenia interleukiny 17A u pacjentów z grupy badanej.

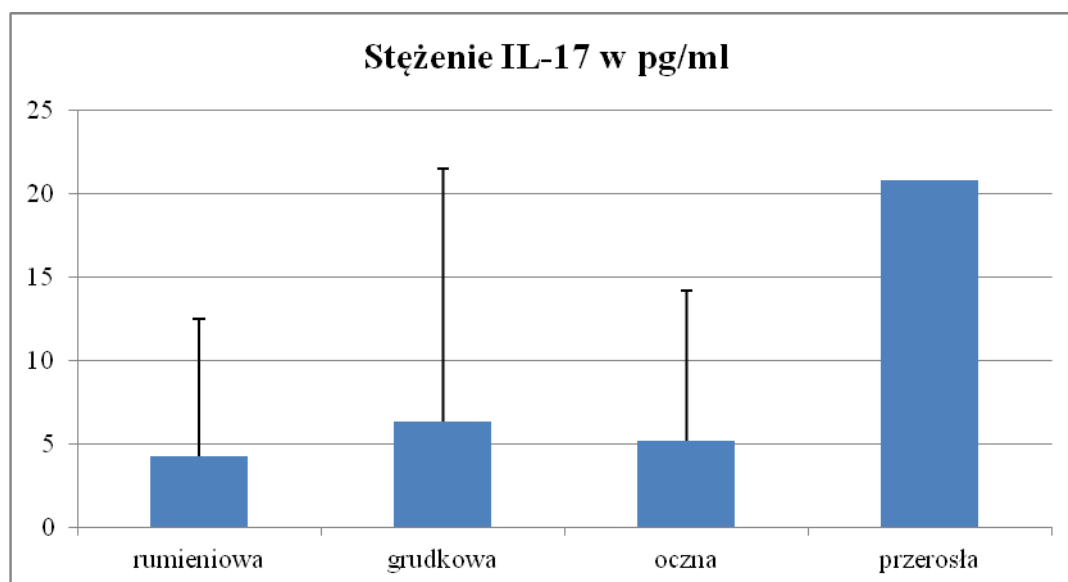
4.3.3. Analiza stężeń surowiczych interleukiny 17A u pacjentów z grupy badanej w zależności od odmiany trądziku różowatego

W grupie badanej najwyższe stężenie surowiczej IL-17A stwierdzono u pacjenta z odmianą przerosłą rosacea (20,79 pg/ml). Średnie stężenie surowiczej IL-17A w populacji pacjentów z odmianą grudkowo-krostkową trądziku różowatego wynosiło 6,31 pg/ml. Średnie stężenie surowiczej IL-17A w populacji pacjentów z odmianą oczną wynosiło 5,19 pg/ml, zaś średnie stężenie surowiczej IL-17A w populacji pacjentów z odmianą rumieniową osiągnęło wartość najniższą, tj. 4,21 pg/ml. Dane mówiące o stężeniach surowiczej IL-17A w zależności od odmiany trądziku różowatego u pacjentów z grupy badanej przedstawiono w tabeli XIV.

Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w zakresie surowiczych stężeń interleukiny 17A pomiędzy populacją pacjentów z odmianą rumieniową a populacją pacjentów z odmianą grudkową trądziku różowatego (test Manna-Whitneya, $p=0,8372$) (Rycina 19.). Z powodu zbyt małej liczebności pacjentów z odmianą oczną i przerosłą, nie było możliwe wykonanie porównania surowiczych stężeń IL-17 w tych grupach.

Tabela XIV. Stężenia surowiczej interleukiny 17A u pacjentów z grupy badanej w zależności od odmiany trądziku różowatego.

ODMIANA TRĄDZIKU RÓŻOWATEGO	N	STĘŻENIE SUROWICZEJ IL-17 W GRUPIE BADANEJ (w pg/ml)			
		ŚREDNIA	MINIMUM	MAKSIMUM	ODCH.STD
RUMIENIOWA	75	4,21	0	29,9	8,29
GRUDKOWO-KROSTKOWA	21	6,31	0	64,03	15,14
OCZNA	3	5,19	0	15,59	9
Z DOMINACJĄ ZMIAN PRZEROSŁYCH	1	20,79	20,79	20,79	0



Rycina 19. Rozkład średnich surowiczych stężeń interleukiny 17A u pacjentów z grupy badanej w zależności od odmiany trądziku różowatego.

4.4. Wyniki badań reaktywności surowic krwi z białkami bakterii *Bacillus oleronius*

4.4.1. Analiza częstości reaktywności surowic krwi z białkami bakterii *Bacillus oleronius* w grupie badanej i kontrolnej

W grupie badanej surowice pochodzące od 82 pacjentów (82% populacji) wykazywały reaktywność z białkami *Bacillus oleronius* (Rycina 20.), a surowice pochodzące od 18 pacjentów z tej grupy (18% populacji) nie wykazywały reaktywności z białkami bakterii. W grupie kontrolnej reaktywność z białkami *Bacillus oleronius* wykazywały surowice pochodzące od 8 osób (20% populacji), a nie wykazywały reaktywności surowice pochodzące od 32 osób (80% populacji). Dane mówiące o liczbie próbek surowicy krwi wykazujących pozytywną i negatywną reaktywność z białkami *Bacillus oleronius* przedstawiono w tabeli XV.

Wykazano statystycznie istotną zależność w zakresie reaktywności surowic krwi z bakteriami *Bacillus oleronius* pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (test Chi-kwadrat 51,2277, $p=0,0001$).

Tabela XV. Liczba próbek surowicy krwi z pozytywnym i negatywnym wynikiem reaktywności z białkami *Bacillus oleronius*, z podziałem na grupę badaną i kontrolną.

RODZAJ GRUPY	LICZBA PRÓBEK WYKAZUJĄCA REAKTYWNOŚĆ	LICZBA PRÓBEK NIEWYKAZUJĄCA REAKTYWNOŚCI	RAZEM
GRUPA BADANA	82	18	100
GRUPA KONTROLNA	8	32	40
OGÓŁ	90	50	140



Rycina 20. Wykrywanie przeciwciał skierowanych przeciwko białkom 83kDa i 62kDa bakterii *Bacillus oleronius* przy użyciu metody Western blot. Surowice wykazują pozytywną reakcję w stosunku do jednego lub drugiego białka bakteryjnego.

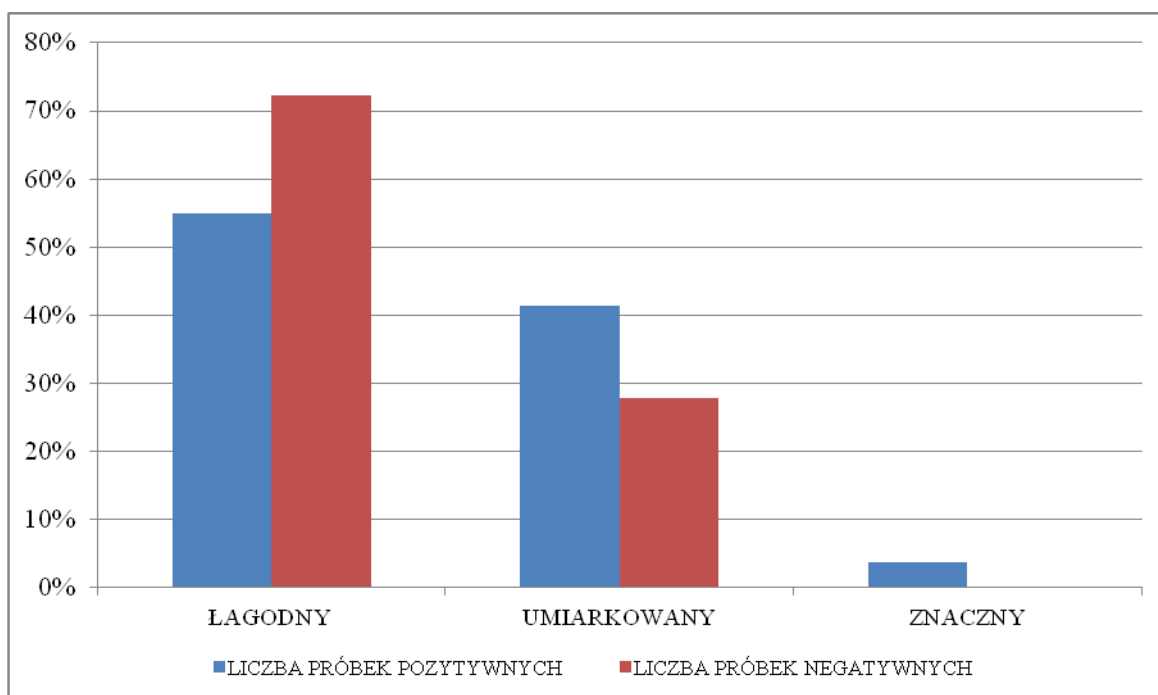
4.4.2. Analiza częstości reaktywności surowic krwi z białkami bakterii *Bacillus oleronius* w grupie badanej w zależności od stopnia nasilenia zmian skórnych

Wśród chorych z pozytywnymi wynikami reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius*, łagodne nasilenie zmian skórnych wykazywało 54,88% pacjentów, umiarkowane - 41,46%, a znaczne - 3,66% (Rycina 21.). Wśród chorych z negatywnymi wynikami reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius*, 72,22% stanowili pacjenci z łagodnym nasileniem zmian skórnych oraz 27,78% - z umiarkowanym (Rycina 21.). Dane mówiące o stopniu nasilenia zmian skórnych w zależności od wyniku reakcji próbek surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* u pacjentów z grupy badanej przedstawiono w tabeli XVI.

Nie stwierdzono statystycznie istotnej zależności pomiędzy stopniem nasilenia intensywności zmian skórnych a wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* (test Chi-kwadrat = 2,1329, p=0,3442).

Tabela XVI. Stopień nasilenia zmian skórnych w zależności od wyniku reakcji próbek surowicy z białkami *Bacillus oleronius* u pacjentów w grupie badanej.

GRUPA BADANA			
STOPIEŃ NASILENIA ZMIAN	LICZBA PRÓBEK POZYTYWNYCH	LICZBA PRÓBEK NEGATYWNYCH	RAZEM
ŁAGODNY	45	13	58
%kolumny	54,88%	72,22%	
%wiersza	77,59%	22,41%	
%ogółu	45,00%	13,00%	58,00%
UMIARKOWANY	34	5	39
%kolumny	41,46%	27,78%	
%wiersza	87,18%	12,82%	
%ogółu	34,00%	5,00%	39,00%
ZNACZNY	3	0	3
%kolumny	3,66%	0,00%	
%wiersza	100,00%	0,00%	
%ogółu	3,00%	0,00%	3,00%
Ogół	82	18	100
%ogółu	82,00%	18,00%	100,00%



Rycina 21. Rozkład procentowy pacjentów z pozytywnymi i negatywnymi wynikami reakcji surowicy w zależności od stopnia nasilenia zmian skórnych.

4.4.3. Analiza częstości reaktywności surowic krwi z białkami bakterii *Bacillus oleronius* w grupie badanej w zależności od wieku, czasu trwania objawów, liczebności roztoczy *Demodex folliculorum* na skórze twarzy, stężenia łoju wydzielanego przez skórę twarzy oraz surowiczego stężenia interleukiny 17A

Średni wiek pacjentów z grupy badanej z pozytywnym wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* wyniósł 48,65 lat, natomiast z negatywnym wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* - 40,22 lat (Rycina 22.). Dane mówiące o wieku, czasie trwania objawów choroby, liczbie roztoczy *Demodex folliculorum*, stężeniu wydzielanego łoju oraz osoczowym stężeniu IL-17 w zależności od wyniku reakcji próbki surowicy z białkami *Bacillus oleronius* w grupie badanej przedstawiono w tabeli XVII. Wykazano statystycznie istotną różnicę pomiędzy średnim wiekiem pacjentów z pozytywnym a średnim wiekiem pacjentów z negatywnym wynikiem reakcji surowicy z białkami *Bacillus oleronius* (test Manna-Whitneya, $p=0,0151$).

Średni czas trwania choroby u pacjentów z grupy badanej z pozytywnym wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* wyniósł 7,13 lat, a z negatywnym wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* - 4,47 lat (Rycina 22.).

Stwierdzono statystycznie istotną różnicę pomiędzy średnim czasem trwania objawów choroby u pacjentów z pozytywnym a średnim czasem trwania objawów choroby pacjentów z negatywnym wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* (test Manna-Whitneya, $p=0,0442$).

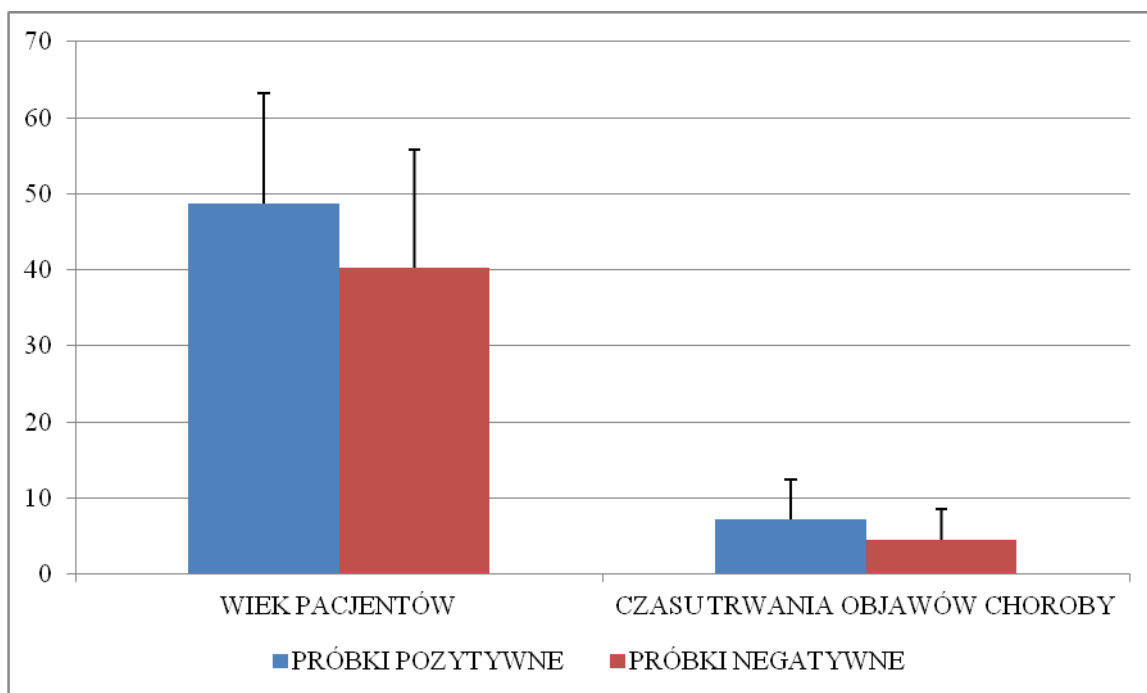
Średnie stężenie wydzielanego łoju u pacjentów z grupy badanej z pozytywnym wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* wynosiło $112,30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, a z negatywnym wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* - $181,17 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Rycina 23.). Stwierdzono statystycznie istotną różnicę pomiędzy średnim stężeniem wydzielanego łoju u pacjentów z pozytywnym a średnim stężeniem wydzielanego łoju u pacjentów z negatywnym wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* (test Manna-Whitneya, $p= 0,0119$).

Średnia liczba roztoczy *Demodex folliculorum* na cm^2 powierzchni skóry u pacjentów z grupy badanej z pozytywnym wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* wynosiła $2,48 \text{ os}/\text{cm}^2$, a z negatywnym wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* - $1,72 \text{ os}/\text{cm}^2$. W populacji pacjentów z pozytywnym wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius*, średnie surowicze stężenie interleukiny 17A wyniosło $4,23 \text{ pg}/\text{ml}$, a z negatywnym wynikiem reakcji surowicy krwi - $7,69 \text{ pg}/\text{ml}$.

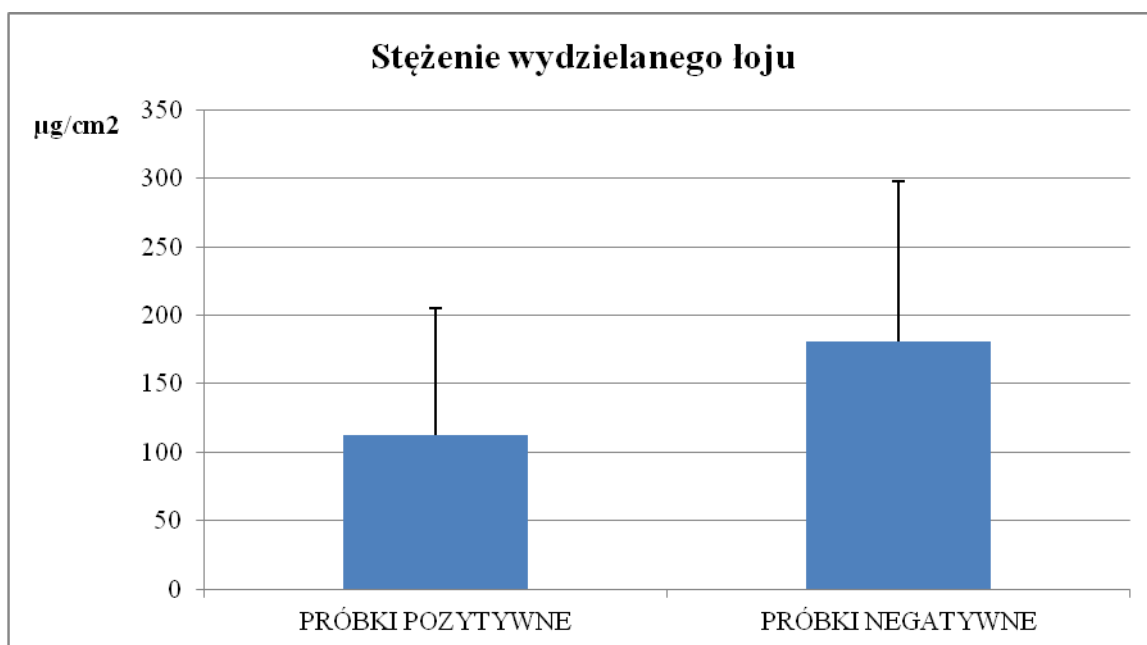
Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w zakresie średniej liczby roztoczy *Demodex folliculorum* na cm^2 pomiędzy populacją pacjentów z pozytywnym a populacją pacjentów z negatywnym wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* (test Manna-Whitneya, $p=0,2862$), jak również nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w zakresie surowiczych stężeń IL-17 pomiędzy populacją pacjentów z pozytywnym a populacją pacjentów z negatywnym wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* (test Manna-Whitneya, $p=0,3996$).

Tabela XVII. Wiek, czas trwania objawów choroby, liczba roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry, poziom wydzielanego łoju oraz surowicze stężenie IL-17A w grupie badanej w zależności od wyniku reakcji próbki krwi z białkami *Bacillus oleronius*.

GRUPA BADANA						
		N	ŚREDNIA	MINIMUM	MAKSIMUM	ODCH. STD
PRÓBK POZYTYWNE	WIEK PACJENTÓW	82	48,65	20,00	83,00	14,58
	CZAS TRWANIA OBJAWÓW CHOROBY	82	7,13	0,25	22,00	5,28
	LICZBA ROZTOCZY <i>DEMODEX FOLLICULORUM</i> NA CM ² POWIERZCHNI SKÓRY	82	2,48	0,00	22,00	3,45
	STĘŻENIE WYDZIELANEGO ŁOJU	82	112,30	0,00	462,00	92,41
	STĘŻENIE SUROWICZE IL-17	82	4,23	0,00	64,03	9,79
PRÓBK NEGATYWNE	WIEK PACJENTÓW	18	40,22	24,00	79,00	15,67
	CZAS TRWANIA OBJAWÓW CHOROBY	18	4,47	0,50	15,00	4,00
	LICZBA ROZTOCZY <i>DEMODEX FOLLICULORUM</i> NA CM ² POWIERZCHNI SKÓRY	18	1,72	0,00	12,00	2,89
	STĘŻENIE WYDZIELANEGO ŁOJU	18	181,17	6,00	450,00	117,09
	STĘŻENIE SUROWICZE IL-17	18	7,69	0,00	29,90	11,47



Rycina 22. Rozkład wieku pacjentów i czasu trwania objawów choroby w zależności od wyniku reakcji próbek surowicy z białkami *Bacillus oleronius* w grupie badanej.



Rycina 23. Rozkład średnich ilości łoju wydzielanego przez skórę twarzy w zależności od wyniku reakcji próbek surowicy z białkami *Bacillus oleronius* w grupie badanej.

4.4.4. Analiza częstości reaktywności surowic krwi z białkami bakterii *Bacillus oleronius* w grupie kontrolnej w zależności od wieku, liczebności roztoczy *Demodex folliculorum* na skórze twarzy, stężenia łoju wydzielanego przez skórę twarzy oraz surowiczego stężenia interleukiny 17A

Średni wiek osób z grupy kontrolnej z pozytywnym wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* wyniósł 30,13 lat, natomiast z negatywnym wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* - 30,41 lat. Dane mówiące o wieku, liczbie roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry, stężeniu wydzielanego łoju oraz osoczym stężeniu IL-17 w zależności od wyniku reakcji próbki surowicy z białkami *Bacillus oleronius* w grupie kontrolnej przedstawiono w tabeli XVIII. Pomiedzy populacją osób z pozytywnym a populacją osób z negatywnym wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w zakresie średniego wieku (test Manna-Whitneya, p= 0,8293).

Średnie stężenie wydzielanego łoju w populacji osób z pozytywnym wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* wynosiło 165,63 µg/cm², a z negatywnym wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* - 206,53 µg/cm². Średnia liczba roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry w populacji osób z pozytywnym wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* wynosiła 0,13 os/cm², a z negatywnym wynikiem reakcji surowicy krwi - 0,38 os/cm². Średnie osocze stężenie IL-1 w populacji osób z pozytywnym wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* 7 wyniosło 8,78 pg/ml, a z negatywnym wynikiem reakcji surowicy krwi - 9,84 pg/ml.

Pomiedzy populacją osób z pozytywnym wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* a populacją osób z negatywnym wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w zakresie parametrów: średnia liczba roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry twarzy (test Manna-Whitneya, p=0,9339), stężenie wydzielanego przez skórę łoju (test Manna-Whitneya, p=0,3420) oraz średnie surowicze stężenie IL-17A (test Manna-Whitneya, p=0,4542).

Tabela XVIII. Wiek, liczba roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry policzka, stężenie wydzielanego łoju oraz surowicze stężenie IL-17 w grupie kontrolnej w zależności od wyniku reakcji próbki z białkami *Bacillus oleronius*.

GRUPA KONTROLA						
		N	ŚREDNIA	MINIMUM	MAKSIMUM	ODCH. STD
PRÓBKI POZYTYWNE	WIEK	8	30,13	15,00	47,00	11,34
	LICZBA ROZTOCZY <i>DEMODEX FOLLICULORUM</i> NA CM ² POWIERZCHNI SKÓRY	8	0,13	0,00	1,00	0,35
	STĘŻENIE WYDZIELANEGO ŁOJU	8	165,63	31,00	315,00	101,86
	STĘŻENIE SUROWICZE IL- 17	8	8,78	0,00	44,20	16,96
PRÓBKI NEGATYWNE	WIEK	32	30,41	18,00	72,00	13,74
	LICZBA ROZTOCZY <i>DEMODEX FOLLICULORUM</i> NA CM ² POWIERZCHNI SKÓRY	32	0,38	0,00	9,00	1,62
	STĘŻENIE WYDZIELANEGO ŁOJU	32	206,53	58,00	362,00	89,66
	STĘŻENIE SUROWICZE IL- 17	32	9,84	0,00	48,11	13,64

5. Omówienie wyników badań i dyskusja

5.1. Omówienie wyników badania podmiotowego i przedmiotowego

Trądzik różowaty stanowi przewlekłą, zapalną chorobę skóry twarzy, charakteryzującą się występowaniem okresów zaostrzeń i remisji (Wilkin i wsp. 2002). Etiologia schorzenia pozostaje wciąż niewyjaśniona, a za czynniki predysponujące do jej rozwoju uważa się między innymi: zaburzenia w obrębie naczyń krwionośnych, zaburzenia immunologiczne, degenerację elementów zewnątrzkomórkowych tkanki łącznej oraz wpływ czynników zewnętrznych (Yamasaki i Gallo 2009). W opinii wielu autorów, rola mikroorganizmów jako potencjalnych czynników przyczynowych w etiopatogenezie trądziku różowatego pozostaje wciąż kontrowersyjna, niemniej jednak w dostępnym piśmiennictwie istnieje wiele doniesień wskazujących na to, że drobnoustroje bytujące na skórze twarzy mogą mieć swój udział w patogenezie tego przewlekłego schorzenia (Yamasaki i Gallo 2009, Lazaridou i wsp. 2011, Jarmuda i wsp. 2012).

Głównym celem badań przedstawionych w niniejszej pracy była odpowiedź na pytanie, czy powszechnie występujące na skórze człowieka roztocza *Demodex folliculorum* mogą stanowić wektor dla Gram-ujemnej bakterii *Bacillus oleronius*, produkującej dwa białka mogące się przyczyniać do rozwoju stanu zapalnego w skórze twarzy u chorych na trądzik różowaty. Dokonano również oceny reaktywności surowic krwi chorych na trądzik różowaty i osób zdrowych z immunogennymi białkami laseczki *Bacillus oleronius*, wyizolowanymi z roztocza *Demodex*. W obu badanych grupach dokonano oceny stanu łojotokowego skóry twarzy i przeanalizowano wpływ ilości produkowanego łoju na rozwój populacji roztoczy *Demodex folliculorum* na skórze twarzy. W surowicy krwi pochodzącej od osób z obu populacji dokonano oznaczenia osoczowego poziomu stężenia prozapalnej interleukiny 17A.

W zbadanej grupie osób z trądzikiem różowatym większość stanowiły kobiety, tj. 60% ogółu (n=60), zaś mężczyźni stanowili 40% ogółu pacjentów (n=40). Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy między średnim wiekiem kobiet a średnim wiekiem mężczyzn (p=0,0614). Uzyskane wyniki pozostają w zgodzie z danymi literaturowymi mówiącymi, że trądzik różowaty częściej występuje u płci żeńskiej (Maciejewska-Udziela 1980; Berg i wsp. 1989). Według niektórych autorów, częstsze rozpoznawanie tego schorzenia u kobiet może być związane z ich wcześniejszym zgłaszaniem się po poradę do lekarzy dermatologów, co prawdopodobnie jest spowodowane większą dbałością o względy wizerunkowo-estetyczne (Rebora 1987). Dane mówiące o wieku badanych chorych (średni wiek wyniósł 47,13 lat) również nie odbiegają od doniesień literaturowych mówiących o tym, iż trądzik różowaty

dotyka przeważnie osób w wieku 30-50 lat (Maciejewska-Udziela 1980, Buechner 2005). W obrębie trzech wyróżnionych przedziałów wiekowych - poniżej 30 roku życia, pomiędzy 30 a 50 rokiem życia i powyżej 50 roku życia – najliczniejszą (45-osobową) grupę stanowili chorzy po 50 roku życia. Trzydziestu lat nie przekroczyło 14 chorych, a 41 pacjentów znajdowało się w przedziale pomiędzy 30 a 50 rokiem życia. Wyniki te są również zgodne z danymi opublikowanymi w piśmiennictwie, mówiącymi o możliwości wystąpienia objawów trądziku różowatego zarówno przed 30, jak i po 50 roku życia (Maciejewska-Udziela 1980, Powell 2005, Del Rosso 2006).

Opierając się na Standardach Klasyfikacji Trądziku Różowatego, wydanych pod auspicjami National Rosacea Society, w zbadanej populacji pacjentów stwierdzono występowanie czterech odmian trądziku różowatego. Najczęściej, bo aż u 75% pacjentów (n=75) rozpoznano odmianę rumieniową trądziku różowatego, która dominowała zarówno w populacji badanych kobiet (70%), n=42, jak i mężczyzn (82,5%), n=33. Obecność odmiany grudkowo-krostkowej trądziku różowatego stwierdzono u 21% pacjentów (n=21), odpowiednio u 15 kobiet i 6 mężczyzn. Uzyskane w badaniach wyniki nie odbiegają zasadniczo od danych z literatury, według których najczęściej (około 81%) stwierdza się rumieniową odmianę trądziku różowatego (Berg i wsp. 1989). Obecność odmiany ocznej stwierdzono jedynie u 3% (n=3) zbadanych pacjentów. Według danych literaturowych, dolegliwości oczne mogą nakładać się na obraz kliniczny innej postaci rosacea i być obecne u 3-58% chorych na trądzik różowaty (Quarterman i wsp. 1997, Kałużna 2004, Szkaradkiewicz i wsp. 2012). Wydaje się, że tak rzadkie występowanie odmiany ocznej w badanej populacji mogło być spowodowane tym, iż jednym z kryteriów włączenia pacjentów do badań był ujemny wynik badania rzęs na obecność roztoczy *Demodex*. Najrzadziej występującą w grupie badanej odmianą, co również pozostaje w zgodzie z danymi literaturowymi, okazała się postać z dominacją zmian przerostowych, stwierdzona u 1 chorego (1% ogółu badanych), manifestująca się klinicznie jako przerost nosa (rhinophyma). Ta postać trądziku różowatego jest charakterystyczna dla mężczyzn i występuje u nich 12-20 krotnie częściej niż u kobiet, charakteryzując się też cięższym niż u kobiet przebiegiem (Bogdanowski i wsp. 1996).

Czas trwania objawów trądziku różowatego wyniósł średnio 6,65 lat i wahał się w badanej populacji następująco: u kobiet od 3 miesięcy do 22 lat, a u mężczyzn od 6 miesięcy do 18 lat. Średni czas trwania procesu chorobowego był porównywalny u obojga płci i wyniósł 6,44 lat w przypadku kobiet oraz 6,98 lat w przypadku mężczyzn. Uzyskane wyniki pozostają w zgodzie z danymi literaturowymi, potwierdzając wnioski płynące z badań innych

autorów, że trądzik różowaty jest wieloletnią dermatozą, charakteryzującą się przewlekłym przebiegiem (Rebora 1987, Wilkin 1993, Wilkin 1994, Powell 2005, Del Rosso 2006).

5.2. Omówienie wyników badań dodatkowych i ocena wpływu stanu łojotokowego na liczebność roztoczy *Demodex folliculorum* na skórze twarzy

Aktualny stan wiedzy na temat fizjologii roztoczy *Demodex* pozwala sądzić, że w większości przypadków są one komensalami skóry człowieka i odżywiają się złuszczoneymi komórkami naskórka oraz składnikami ludzkiego łoju (Lacey i wsp. 2011). Wrodzony system immunologiczny gospodarza (człowieka) wydaje się tolerować ich obecność i utrzymywać pod kontrolą ich liczbę, bez wywoływania nasilonej odpowiedzi zapalnej (Forton 2012). Jeśli jednak liczba roztoczy *Demodex* zamieszkujących pojedynczy mieszek włosowy przekroczy poziom krytyczny, to następuje fizyczne rozdęcie mieszka włosowego i przerwanie ciągłości jego ściany, czego konsekwencją jest uwolnienie zawartości mieszka włosowego do otaczających tkanek (Lacey i wsp. 2011). Prawdopodobnie czynnikami wpływającymi na rozwój populacji roztoczy *Demodex* na skórze ludzkiej twarzy są warunki panujące na jej powierzchni (Ní Raghallaigh i wsp. 2012). Wydaje się, że u chorych z trądzikiem różowatym te warunki wykazują pewną odmienną w stosunku do warunków panujących na twarzy osób zdrowych, bowiem u chorych z odmianą grudkowo-krostkową rosacea stwierdzono między innymi zredukowany poziom nawodnienia i zwiększone pH powierzchni skóry (Lacey i wsp. 2011). U osób z odmianą grudkowo-krostkową trądziku różowatego wykazano ponadto dysfunkcję bariery naskórkowej, charakteryzującą się zwiększoną transepidermalną utratą wody (Dirshka i wsp. 2004) oraz zwiększoną podatnością skóry na podrażnienia (Lonne-Rahm i wsp. 1999).

Wydzielina gruczołów łojowych (łój) jest uznawana za istotny czynnik przyczyniający się do utrzymania integralności bariery skórnej (Zouboulis i wsp. 2008). Ludzki łój jest wytwarzany w gruczołach łojowych i składa się z triglicerydów, diglicerydów, wolnych kwasów tłuszczowych, estrów wosku, skwalenu, cholesterolu oraz jego estrów (Nicolaidis 1974). Skwaleń i estry wosku są unikalnymi składnikami łoju, a do kwasów tłuszczowych obecnych w łoju zalicza się wiele długołańcuchowych kwasów tłuszczowych zawierających w swym składzie powyżej 20 atomów węgla (Stewart i Downing 1991). Warstwa lipidowa pokrywająca powierzchnię naskórka w miejscach o zwiększonej gęstości gruczołów łojowych, w ponad 90% jest złożona z lipidów pochodzących z łoju (Downing i Strauss 1974). Rola łoju w patogenezie trądziku różowatego nie została do tej pory jednoznacznie określona. W przeprowadzonych w 1976 roku badaniach składu łoju u osób z trądzikiem

różowatym i u osób zdrowych nie stwierdzono istotnych różnic w składzie lipidów łoju (Pye i wsp. 1976). Co więcej, wykazano też, że skład łoju pochodzącego od chorych na trądzik różowaty jest prawidłowy i nie ulega zmianie podczas leczenia tetracyklinami (Pye i wsp. 1976). Jednak na potencjalny udział łoju w patogenezie szczególnie odmiany grudkowo-krostkowej rosacea wskazywać mogą pewne obserwacje kliniczne (Ní Raghallaigh i wsp. 2012). Wiadomo, że lokalizacja wykwitów skórnych w tej odmianie trądziku różowatego pokrywa się ściśle z miejscami o zwiększonej ilości gruczołów łojowych (Pagnoni i wsp. 1994). Zmiany chorobowe w odmianie grudkowo-krostkowej rosacea oszczędzają zwykle okolice wokół oczu, ale zajmują brzegi powiek, w których są przecież zlokalizowane zmodyfikowane gruczoły łojowe, zwane gruczołami Meiboma (McCulley i wsp. 1982, Szkaradkiewicz i wsp. 2012). Co więcej, doustne preparaty retinoidów - zmniejszające w istotnym stopniu wydzielanie łoju - cechują się wysoką skutecznością w leczeniu rumienia oraz zmian grudkowo krostkowych u pacjentów z rosacea (Hoting i wsp. 1986). Wszystkie te obserwacje wskazują na to, że podłoże łojotokowe może stanowić czynnik mający swój udział w rozwoju objawów klinicznych trądziku różowatego (Ní Raghallaigh i wsp. 2012).

W badaniach własnych postanowiono poddać ocenie zarówno stan łojotokowy skóry twarzy pacjentów z trądzikiem różowatym i osób zdrowych, jak również zbadać zależność pomiędzy poziomem wydzielania łoju przez skórę twarzy a rozwojem populacji roztoczy *Demodex* na skórze twarzy. W celu określenia liczby roztoczy *Demodex folliculorum* na 1 cm² skóry policzka twarzy, u wszystkich pacjentów z grupy badanej i u osób z grupy kontrolnej przeprowadzono badanie z użyciem metody biopsji cyjanoakrylatowej, która umożliwia stwierdzenie żywych, poruszających się roztoczy i jest standardowo stosowana w celu określenia gęstości pasożytów na 1cm² (Bohdanowicz i Raszeja-Kotelba 2001). W wykonanym badaniu stwierdzono istotną statystycznie różnicę pomiędzy średnią liczbą roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry twarzy u pacjentów z trądzikiem różowatym (2,34 os/cm²) a ilością roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry twarzy u osób z grupy kontrolnej (0,33 os/cm²) (p=0,0001). Jednocześnie, w grupie badanej wykazano istotną statystycznie różnicę w zakresie liczby roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry twarzy pomiędzy populacją mężczyzn (średnio 3,28 os/cm²) a populacją kobiet (średnio 1,72 os/cm²) (p=0,0215). Ponadto, w populacji pacjentów z łagodnym nasileniem zmian skórnych wykazano istotną statystycznie różnicę pomiędzy liczbą roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² u kobiet (1,14 os/cm²) a liczbą roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² u mężczyzn (2,78 os/cm²), (p=0,0097). Wykazano też istnienie przeciętnej korelacji między wiekiem pacjentów a liczbą roztoczy *Demodex folliculorum* na

cm² powierzchni skóry u pacjentów z grupy badanej ($r=0,4470$, $p=0,0001$) i w populacji kobiet z grupy badanej ($r=0,4949$, $p=0,0001$). Co ciekawe, zaobserwowano, że średnia liczba roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry wzrasta wraz ze wzrostem stopnia nasilenia zmian skórnych, wynosząc średnio 1,83 os/cm² u pacjentów z łagodnym; 2,87 os/cm² u pacjentów z umiarkowanym; oraz 5,33 os/cm² powierzchni skóry u pacjentów ze znacznym nasileniem zmian skórnych. Jednak różnica pomiędzy poszczególnymi populacjami pacjentów okazała się zbyt mała, aby osiągnąć poziom istotności statystycznej.

Wyniki badań własnych dotyczące liczby roztoczy *Demodex* na skórze twarzy pozostają w zgodzie z danymi dostępnymi w piśmiennictwie i mówiącymi, że na skórze osób chorych na trądzik różowaty (w porównaniu do populacji zdrowej) stwierdza się zwiększoną obecność roztoczy *Demodex* (Forton i Seys 1993, Bonnar i wsp. 1993, Erbagci i Ozgoztasi 1998, Georgala i wsp. 2001, Powell 2004). Jeśli chodzi o różnice w liczbie roztoczy *Demodex* pomiędzy populacjami kobiet i mężczyzn, to uzyskane wyniki własne również są zgodne z danymi literaturowymi, które mówią o występowaniu roztoczy *Demodex* w większej liczbie na skórze twarzy mężczyzn, co może być związane ze zwiększonym wpływem androgenów na gruczoły łojowe (Aylesworth i Vance 1982). Istnienie korelacji między wiekiem pacjentów a liczbą roztoczy *Demodex* na skórze twarzy jest zgodne z obserwacjami tych autorów, którzy podkreślają, że zarówno rozpowszechnienie rużeców wśród ludzi, jak również ich średnia liczba na cm² skóry twarzy rośnie wraz z wiekiem (Ozdemir i wsp. 2005). Uzyskana w badaniach własnych średnia liczba roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry w grupie osób zdrowych (0,33 os/cm²) okazała się zbliżona do wartości podawanych przez innych autorów, którzy przy użyciu metody biopsji cyjanoakrylatowej na skórze osób zdrowych stwierdzali średnio 0,7 os/cm² (Forton i Seys 1993). Natomiast uzyskana w badaniach własnych wartość średniej liczby roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry w grupie chorych z trądzikiem różowatym (2,34 os/cm²) okazała się mniejsza w stosunku do wielkości stwierdzonych przez innych autorów - odpowiednio: średnio 10,8 os/cm² powierzchni skóry twarzy u chorych na trądzik różowaty oraz 12,8 os/cm² powierzchni skóry twarzy u pacjentów z odmianą grudkowo-krostkową trądziku różowatego (Forton i Seys 1993). Zaistniała różnica między danymi własnymi a literaturowymi może być spowodowana tym, iż jednym z kryteriów włączenia pacjentów do grupy badanej był ujemny wynik badania rzęs na obecność roztoczy *Demodex*, a więc można się spodziewać, że na ich skórze twarzy było obecnych mniej roztoczy *Demodex*.

Poddając ocenie stan łojotokowy skóry twarzy u przedstawicieli obu grup, w badaniach własnych wykazano statystycznie istotną różnicę w zakresie poziomu

wydzielanego łoju pomiędzy populacją pacjentów z trądzikiem różowatym, u których średnie stężenie wydzielanego łoju wyniosło 124,70 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ a populacją osób zdrowych, u których średnie stężenie wydzielanego łoju wyniosło 198,35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($p=0,0003$). Dodatkowo w grupie badanej stwierdzono brak korelacji między poziomem wydzielanego łoju a liczbą roztoczy *Demodex folliculorum* na cm^2 (współczynnik korelacji $r=-0,116$; $p=0,2510$). Na podstawie tych wyników można wysnuć wniosek, że niski poziom wydzielanego łoju korzystnie wpływa na rozwój populacji roztoczy *Demodex* na skórze twarzy, co pozostawałoby w sprzeczności z doniesieniami literaturowymi, które mówią, iż to właśnie wzmożony łojustok sprzyja bytowaniu nużeńców na skórze (Bohdanowicz i Raszeja-Kotelba 2001, Lacey i wsp. 2011). Możliwe jest jednak inne wytłumaczenie zaobserwowanego zjawiska. Być może ilość wydzielanego przez skórę łoju nie stanowi jedyne go czynnika determinującego rozwój populacji roztoczy *Demodex* na skórze ludzkiej twarzy.

Opublikowane ostatnio wyniki badań wskazują na to, że w przypadku chorych z odmianą grudkowo-krostkową rosacea - w porównaniu do populacji osób zdrowych - występują istotne statystycznie różnice w składzie kwasów tłuszczowych powierzchniowej warstwy lipidowej skóry (Ní Raghallaigh i wsp. 2012). W łoju tych chorych stwierdza się podwyższone poziomy kwasu mirystynowego, stanowiącego nasycony kwas tłuszczowy oraz zmniejszone poziomy długołańcuchowych nasyconych kwasów tłuszczowych (Ní Raghallaigh i wsp. 2012). Mimo że te związki są obecne w łoju w małych ilościach, to stanowią jego ważny składnik i odgrywają znaczącą rolę w ochronie powierzchni skóry (Ní Raghallaigh i wsp. 2012). Nasycone kwasy tłuszczowe są bardziej odporne na utlenienie od nienasyconych kwasów tłuszczowych. Ponadto, długołańcuchowe kwasy tłuszczowe zawarte w łoju posiadają silne właściwości hydrofobowe, dzięki czemu wykazują zdolność do zapobiegania utracie wody przez skórę (Ní Raghallaigh i wsp. 2012). Ich brak powoduje, że warstwa rogowa naskórka staje się cieńsza, słabsza i bardziej przepuszczalna dla wody (Cameron i wsp. 2007). Kwas mirystynowy, którego podwyższony poziom stwierdzono u chorych z odmianą grudkowo-krostkową rosacea jest syntetyzowany głównie w gruczołach łojowych i posiada unikalną zdolność do tworzenia wiązań amidowych z niektórymi białkami komórkowymi, modyfikując w ten sposób ich aktywność biologiczną (Johnson i wsp. 1994). Znaczenie faktu zwiększonego stężenia kwasu mirystynowego nie zostało jednak wyjaśnione i wymaga przeprowadzenia dalszych, szerzej zakrojonych badań (Ní Raghallaigh i wsp. 2012). Inne składniki obecne w łoju odgrywają istotną rolę w mechanizmach wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, która u chorych z trądzikiem różowatym wydaje się być zaburzona (Yamasaki i wsp. 2007). Sebocyty posiadają zdolność do wydzielania białek

przeciwbakteryjnych (AMPs), takich jak katelicydyna czy ludzka β -defenzyna-2 oraz prozapalnych cytokin, których produkcja wyraźnie nasila się w obecności bakterii (Lee i wsp. 2008, Nagy i wsp. 2006). Na skład łoju wpływają mikroorganizmy zamieszkujące mieszek włosowy, takie jak *Propionibacterium acnes*, które uwalniają wolne kwasy tłuszczowe z triglicerydów łoju (Marples i wsp. 1971). Wykazano, że bezpośrednie działanie bakteriobójcze posiadają też obecne w łoju kwasy: laurynowy, palmitynowy i oleinowy (Nagy i wsp. 2006). Zarówno pochodzące z łoju wolne kwasy tłuszczowe, jak i peptydy przeciwbakteryjne, stanowią część elementów wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, która zabezpiecza skórę przed kolonizacją jej powierzchni przez drobnoustroje (Drake i wsp. 2008). Nie jest więc wykluczone, że odmienny skład łoju, obserwowany u chorych z odmianą grudkowo-krostkową trądziku różowatego może mieć wpływ na rozwój mikroorganizmów zamieszkujących mieszki włosowe, w tym również roztoczy *Demodex*. Odmiennosc mikrośrodowiska panującego na skórze twarzy osób z trądzikiem różowatym mogłaby stwarzać roztoczom korzystne warunki do rozwoju i przyczyniać się do zwiększonego rozwoju ich populacji u tych chorych (Lacey i wsp. 2011).

5.3. Omówienie wyników badań mikrobiologicznych i ocena roli roztoczy *Demodex folliculorum* jako potencjalnych wektorów dla bakterii *Bacillus oleronius*

Występujące wyłącznie na skórze człowieka roztocza *Demodex folliculorum* i *Demodex brevis* są najczęstszymi pasożytami ludzkiej skóry (Rufli i Mumcuoglu 1981). Gatunek *Demodex folliculorum* zamieszkuje ujścia mieszków włosowych, a *Demodex brevis* żyje głęboko w gruczołach łojowych i gruczołach Meiboma (Lacey i wsp. 2009). Taksonomicznie rodzaj *Demodex* wchodzi w skład rodziny nużeńcowatych (*Demodicidae*), zaliczanych do rzędu roztoczy (*Acarina*) (Bielenin i Białczyk 1993). Na twarzy nużeńce występują głównie na skórze okolicy nosa, brody i policzków (Raszeja-Kotelba i wsp. 2004). U większości osób kolonizacja roztoczami *Demodex* następuje w dzieciństwie (Desch i Nutting 1972). Podejrzewa się, że roztocza *Demodex* mogą odgrywać ważną rolę w patogenezie niektórych chorób, na przykład trądziku różowatego, bowiem u pacjentów z rosacea stwierdza się większą - w porównaniu z osobami zdrowymi - liczbę roztoczy *Demodex* na cm² powierzchni skóry (Bamford 2001, Bonnar i wsp. 1993). Wiele dyskutuje się na temat mechanizmów zjadliwości roztoczy *Demodex*, do których zalicza się mechaniczną blokadę mieszków włosowych oraz rozwój reakcji typu ciała obcego (Lazaridou i wsp. 2011). Obserwowano też rozwój lokalnego stanu zapalnego wokół mieszków zawierających dużą liczbę nużeńców (Elston 2010).

Podaje się, że roztocza *Demodex* mogą się przyczyniać do rozwoju chorób skóry również na zasadzie odmiennego mechanizmu, a mianowicie mogą stanowić wektor dla innych mikroorganizmów (Lacey i wsp. 2011). W czasie swojego życia roztocza odżywiają się głównie komórkami naskórka i wydzieliną gruczołów łojowych. Podczas pobierania pokarmu z powierzchni skóry mogą równocześnie pochłaniać znajdujące się na jej powierzchni różne bakterie, po czym - wewnątrz swoich przewodów pokarmowych - transportować je do mieszków włosowych gospodarza, jak również mogą potencjalnie przyczyniać się do przenoszenia tych mikroorganizmów pomiędzy ludźmi (Powell 2005; Desch i Nutting, 1972). Ponieważ średni czas przeżycia roztoczy jest krótki (14-18 dni), to ich systematyczny rozpad we wnętrzu mieszka włosowego może prowadzić do uwalniania przenoszonych przez nie bakterii i w ten sposób sprzyjać rozwojowi lokalnej odpowiedzi immunologicznej w tkance otaczającej mieszki włosowe (Lacey i wsp. 2011).

W 2007 roku Noreen Lacey i współpracownikom udało się wyizolować z wnętrza roztocza *Demodex folliculorum*, pobranego od pacjenta z odmianą grudkowo-krostkową trądziku różowatego, bakterię *Bacillus oleronius* (Lacey i wsp. 2007). Wcześniej gatunek ten został opisany jako składnik mikroflory jelita termitów *Reticulitermes santonensis* (Kuhnigk i wsp. 1995). Dowiedziono empirycznie, że dwa specyficzne antygenowo białka produkowane przez *Bacillus oleronius* (62kDa and 83kDa) mogą stymulować odpowiedź immunologiczną. Okazało się bowiem, iż ekspozycja komórek jednojądrzastych krwi obwodowej pochodzących od osób z odmianą grudkowo-krostkową rosacea na białka *Bacillus oleronius* powodowała pobudzenie tych komórek w próbkach pochodzących od 73% pacjentów, a w grupie kontrolnej zaledwie u 29%, co sugerowałoby wcześniejszy kontakt tych komórek z białkami bakterii (Lacey i wsp. 2007). W innym natomiast badaniu wykazano pozytywną korelację między reaktywnością surowicy z białkami *Bacillus oleronius* a zapaleniem brzegów powiek związanym z obecnością roztoczy *Demodex* u pacjentów z trądzikiem różowatym (Li i wsp. 2010). Wyniki obu tych badań wskazały na to, że immunogenne białka bakterii *Bacillus oleronius* mogą się przyczyniać do rozwoju zmian chorobowych u chorych z odmianami grudkowo-krostkową i oczną trądziku różowatego (Lacey i wsp. 2007, Li i wsp. 2010).

Mimo że rola, jaką bakterie *Bacillus oleronius* spełniają w organizmach roztoczy, nie została do końca poznana, to sugeruje się, iż te dwa organizmy może łączyć związek symbiotyczny (Lacey i wsp. 2011). Bakterie znajdujące się w przewodzie pokarmowym roztoczy mogą pomagać nuzeniom w trawieniu składników pokarmowych, podobnie jak to ma miejsce u termitów, z których laseczki *Bacillus oleronius* zostały wyizolowane po raz

pierwszy (Kuhnigk i wsp. 1995, Lacey i wsp. 2007). Interesującym faktem z zakresu budowy anatomicznej roztoczy *Demodex* jest brak odbytu (Lacey i wsp. 2011). Stwarza to sytuację, w której raz pochłonięte przez roztocza składniki pokarmowe nie są wydalane na zewnątrz i pozostają w przewodach pokarmowych przez cały okres ich życia (Lacey i wsp. 2011). Jeśli zaś chodzi o bakterie *Bacillus oleronius*, to mogą się one swobodnie rozwijać w sprzyjających warunkach jako odizolowane od układu immunologicznego człowieka aż do momentu, w którym roztocze rozpadnie się w świetle mieszki włosowego. Zatem zwiększona liczba roztoczy *Demodex* na skórze twarzy, którą obserwuje się np. u pacjentów z trądzikiem różowatym, mogłaby powodować, że do tkanek otaczających mieszki włosowe tych osób są uwalniane większe ilości antygenów bakteryjnych (Lacey i wsp. 2011).

W ramach badań własnych postanowiono przeprowadzić eksperyment, który miał na celu wykazanie, czy roztocza *Demodex folliculorum* mogą stanowić wektor dla laseczek *Bacillus oleronius*. Do badań konieczne było uzyskanie żywych roztoczy *Demodex*. Dlatego od pacjentów z grupy badanej i od osób z grupy kontrolnej pobierano zeszkrobiny naskórka, które następnie oceniano pod mikroskopem i poszukiwano w nich roztoczy *Demodex*. W każdym przypadku odnalezienia nużeńca, jego przynależność taksonomiczną do gatunku *Demodex folliculorum* określano na podstawie analizy obserwowanych cech budowy anatomicznej roztocza oraz w oparciu o opisy zamieszczone w literaturze medycznej (Desch i Nutting 1972; Bielenin i Białczyk, 1993). Od pacjentów z grupy badanej pobrano 18 próbek zeszkrobin, zawierających co najmniej 5 roztoczy *Demodex*, zaś od 3 osób z grupy kontrolnej uzyskano zeszkrobiny niezawierające nużeńców. Do badań nie udało się pobrać większej liczby zeszkrobin naskórka. Prawdopodobnie było to spowodowane odmiennością warunków panujących na skórze twarzy pacjentów z rosacea, u których występujące w zwiększonej ilości roztocza *Demodex*, żywiące się złuszczonej komórkami naskórka, są jednocześnie odpowiedzialne za ich systematyczne usuwanie. To zjawisko zostało nawet nazwane „ustawiczną mikro-abrazją powierzchni skóry twarzy”, klinicznie objawiającą się jako jej nadwrażliwość (Forton 2012). Uzyskane od pacjentów zeszkrobiny naskórka inkubowano następnie na podłożach hodowlanych i wyizolowano 10 szczepów bakteryjnych, w tym 9 pochodzących od pacjentów z grupy badanej oraz 1 od osoby z grupy kontrolnej. Wszystkie wyhodowane szczepy szczegółowo oceniano makroskopowo oraz mikroskopowo (preparaty barwione metodą Grama) i stwierdzano obecność rosnących w warunkach tlenowych, średniej wielkości laseczek Gram-ujemnych, tworzących przetrwalniki, nieposiadających wici oraz niemających zdolności ruchu w kropli wiszącej. W żadnym z przypadków nie wyhodowano innych bakterii. W celu określenia przynależności taksonomicznej wyhodowanych szczepów,

w badaniach molekularnych posłużono się metodą 16S rDNA opierającą się na porównywaniu fragmentów sekwencji genu dla 16S rybosomalnego RNA *Bacillus oleronius*. Powielenie sekwencji DNA ze szczepów bakteryjnych do badań uzyskano na drodze reakcji PCR. DNA kontrolne zostało wyizolowane ze szczepu referencyjnego *Bacillus oleronius*. Produkty reakcji PCR poddawano następnie elektroforezie w 2% żelu agarozowym i odczytywano wynik po barwieniu bromkiem etydydy. Za wynik pozytywny, który ostatecznie potwierdzał diagnozę o obecności gatunku *Bacillus oleronius*, przyjmowano obecność produktu reakcji PCR o wielkości 299 par zasad (Szkaradkiewicz i wsp. 2011). Analiza sekwencji genu dla 16S rRNA *Bacillus oleronius* wykazała bliskie pokrewieństwo do dwóch innych gatunków: *Bacillus licheniformis* i *Bacillus sporothermodurans*, które jednak - w odróżnieniu od *Bacillus oleronius* - są laseczkami Gram-dodatnimi.

W prezentowanych badaniach, efektem inkubacji zeszkrobin naskórka zawierających żywe roztocza *Demodex folliculorum* i pochodzących od pacjentów z grupy badanej, był - w dziewięciu przypadkach - wzrost bakterii *Bacillus oleronius*. Taki wynik może oznaczać, że bakteria *Bacillus oleronius* towarzyszy roztoczom *Demodex folliculorum*. Co ciekawe, w jednym przypadku wykazano również wzrost bakterii *Bacillus oleronius* po inkubacji zeszkrobin, które pochodziły od osoby zdrowej i nie zawierały roztoczy *Demodex*. Obserwacja ta mogłaby przeczyć hipotezie o udziale roztoczy *Demodex* w przenoszeniu laseczek *Bacillus oleronius* i świadczyć przeciwko patogennej roli tej bakterii w rozwoju chorób skóry (Szkaradkiewicz i wsp. 2012). Należy jednak pamiętać, że w przypadku braku w próbkach zeszkrobin roztoczy *Demodex*, bakteria *Bacillus oleronius* mogła utrzymywać się na skórze twarzy w stanie spoczynku jako forma przetrwalnikowa. Podobnie jak w przypadku innych przedstawicieli rodzaju *Bacillus*, może ona bowiem występować w dwóch formach: wegetatywnej i przetrwalnikującej (Szkaradkiewicz i wsp. 2012, Kuhnigk i wsp. 1995). Zatem można przypuszczać, że u osoby zdrowej bakteria *Bacillus oleronius* mogła występować na skórze właśnie w formie przetrwalnikowej, która w sprzyjających warunkach podłoża hodowlanego rozwinęła się do formy wegetatywnej, wykrytej następnie w hodowli bakteryjnej (Szkaradkiewicz i wsp. 2012).

O ile mechanizmy chorobotwórczego działania roztoczy *Demodex* zostały dobrze opisane, to efekt wpływu białek bakterii *Bacillus oleronius* na organizm ludzki staje się dopiero przedmiotem zainteresowań badaczy. W trądziku różowatym zjawiskiem o istotnym znaczeniu patogenetycznym wydaje się być lokalnie rozwijający się w obrębie skóry twarzy stan zapalny, stanowiący podłoże do rozwoju charakterystycznych - szczególnie dla odmiany grudkowo-krostkowej rosacea - wykwitów skórnych, takich jak grudki, krosty, zmiany

przerostowe czy włóknienie tkanek (Bamford 2001). Reakcja zapalna stanowi odpowiedź organizmu na obcy antygen lub czynnik uszkodzający i jest spowodowana zaburzeniem równowagi pomiędzy działaniem czynników pro- i przeciwzapalnych (Całkosiński i wsp. 2009). Wydaje się, że w trądziku różowatym zaburzenie regulacji może dotyczyć głównie elementów wrodzonego układu odpornościowego (Bevins i Liu 2007, Yamasaki i Gallo 2009). Skuteczność stosowanych w terapii rosacea leków o działaniu przeciwzapalnym sugeruje, że kluczowymi czynnikami w patogenezie tego schorzenia mogą być komórki biorące udział w odpowiedzi zapalnej, takie jak neutrofile oraz uwalniane przez nie mediatory zapalne. Natomiast obserwowane klinicznie objawy schorzenia mogą być wynikiem neutrofilowego nacieku zapalnego (Miyachi 2001). Tetracykliny czy metronidazol, wykorzystywane często w leczeniu trądziku różowatego, nie są jedynie efektywnie działającymi antybiotykami, lecz wykazują również działanie przeciwzapalne (van Zuuren i wsp. 2007). Tetracykliny przyczyniają się bowiem do redukcji poziomu prozapalnych cytokin (IL-1 β i TNF- α) oraz do hamowania chemotaksji neutrofilii (Sapadin i Fleischmajer 2006, Baldwin 2006). Stosowany w terapii miejscowej metronidazol wykazuje działanie przeciwzapalne oraz przeciwdrobnoustrojowe (Breneman i wsp. 1998). Uważa się, że jest on antyoksydantem, którego działanie w trądziku różowatym jest związane z modyfikowaniem aktywności neutrofilii poprzez hamowanie powstawania i uwalniania reaktywnych form tlenu (Miyachi 2001, Miyachi 2000). Podobnie jest w przypadku kwasu azelainowego, którego kliniczna skuteczność może wynikać z modulującego wpływu na aktywność neutrofilii, co skutkuje hamowaniem produkcji reaktywnych form tlenu (ROS) (Jones 2004).

Neutrofile są bardzo ruchliwymi fagocytami stanowiącymi pierwszą linię obrony wrodzonego układu odpornościowego. Posiadają one zdolność niszczenia wrogich mikroorganizmów poprzez uruchamianie mechanizmu uwalniania reaktywnych form tlenu, wytwarzanych podczas wybuchu oksydacyjnego (Segal 2005). Co ciekawe, w skórze chorych na trądzik różowaty wykrywano wyższe poziomy reaktywnych form tlenu (Bakar i wsp. 2007). Konsekwencją lokalnego nacieku neutrofilowego w tkance może być więc gromadzenie mediatorów stanu zapalnego i rozwoju stanu zapalnego. Z kolei wydzielane przez neutrofile proteazy mogą stanowić czynnik uszkodzający elementy tkanki łącznej, stanowiące podporę dla naczyń krwionośnych, co w efekcie prowadzi do powstawania rumienia oraz teleangiektazji (Millikan 2003, Parodi i wsp. 1980, Wilkin 1988). Jak pokazały badania, ekspozycja neutrofilii na immunogenne białka bakterii *Bacillus oleronius* prowadziła do wzrostu migracji tych granulocytów w kierunku immunogennych białek (O'Reilly i wsp. 2012). Można zatem przypuszczać, że również w warunkach *in vivo* wzmożony napływ

neutrofili będzie następował do miejsc o wysokim stężeniu tych białek (O'Reilly i wsp. 2012). Co więcej, neutrofile eksponowane na białka *Bacillus oleronius* reagowały degranulacją, mierzoną jako wzrost uwalniania MMP-9 i katelicydyny oraz wzrostem produkcji prozapalnych cytokin IL-8 i TNF- α (O'Reilly i wsp. 2012). Produkcja i wydzielanie tych cytokin może skutkować dalszą rekrutacją neutrofili do miejsca dziejącego się zapalenia. Tak więc białka produkowane przez bakterię *Bacillus oleronius* i posiadające silne właściwości immunogenne, mogą prowadzić do rozwoju stanu zapalnego, wywierającego równocześnie szkodliwy wpływ na otaczające tkanki. Uważa się, że „porcja” białek bakteryjnych potrzebna do wywołania reakcji zapalnej w tkance okołomieszkowej może zostać wprowadzona do mieszka przez roztocza *Demodex*, stanowiące wektor dla bakterii *Bacillus oleronius* (O'Reilly i wsp. 2012). Zatem poprzez wprowadzanie immunogennych białek do mieszka włosowego, roztocza *Demodex folliculorum* mogą się przyczyniać do powstania wykwitów skórnych w trądziku różowatym (Lacey i wsp. 2007).

Obserwowana w trądziku różowatym zwiększona gęstość roztoczy *Demodex* na skórze twarzy może wpływać na dostarczanie do mieszków włosowych proporcjonalnie większej ilości białek bakteryjnych (O'Reilly i wsp. 2012). Potwierdzają to badania własne, które wskazują, iż u pacjentów z pozytywnym wynikiem reakcji PCR wykazano istotnie statystycznie wyższą średnią ilość roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry twarzy oraz istotnie wyższy średni poziom wydzielanego łożu. Martwe i rozpadające się w obrębie mieszka włosowego roztocza *Demodex* uwalniają bakterie *Bacillus oleronius* i związane z nimi białka do światła mieszka włosowego. Gdy mieszek włosowy ulega pęknięciu, a immunogenne białka bakteryjne wydostają się do tkanek okołomieszkowych, to mogą tam zapoczątkować rozwój lokalnego stanu zapalnego (O'Reilly i wsp. 2012). Wyniki przeprowadzonych badań pozwalają sądzić, że białka te przyciągają neutrofile, które uwalniając MMP-9 oraz katelicydynę do otaczających tkanek, powodują ich niszczenie. Z kolei cytokiny prozapalne, uwalniane z aktywowanych neutrofili, sprzyjają dalszemu napływowi komórek nacieku zapalnego i w efekcie podtrzymują rozwój i istnienie stanu zapalnego (O'Reilly i wsp. 2012). Antybiotykoterapia stosowana w terapii trądziku różowatego, a szczególnie antybiotyki z grupy tetracyklin mają możliwość redukcji populacji bakterii *Bacillus oleronius*, przenoszonych przez roztocza *Demodex*. Dzięki temu, do tkanek nie są systematycznie uwalniane komórki bakterii i związane z nimi białka. Dodatkowo, dzięki właściwościom przeciwwzapalnym tetracyklin hamowany jest proces chemotaksji neutrofili i produkcji cytokin prozapalnych (Sapadin i Fleischmajer 2006, Baldwin 2006). Po zaprzestaniu podawania antybiotyku, objawy trądziku różowatego mogą stopniowo powracać

(Gupta i Chaudhry 2005). Można to wiązać ze stopniowym odradzaniem się populacji bakterii *Bacillus oleronius* w układzie trawiennym roztoczy *Demodex*. A zatem związek symbiotyczny tych dwóch organizmów może się przyczyniać do sytuacji, że w mieszkach włosowych skóry osób z trądzikiem różowatym białka bakterii *Bacillus oleronius* mogą być obecne w zwiększonej ilości z powodu obecności większej liczby przenoszących tę bakterię roztoczy *Demodex*.

Ten hipotetyczny mechanizm tłumaczy, w jaki sposób aktywacja neutrofilów może indukować rozwój nadmiernego stanu zapalnego i uszkodzenia tkanek (O'Reilly i wsp. 2012). Ponieważ średni czas życia roztoczy *Demodex* jest krótki (średnio 14-18 dni), a ich rozpad ma miejsce głównie w obrębie mieszków włosowych, to właśnie w tych miejscach dochodzi do uwolnienia największej ilości antygenów *Bacillus oleronius* (Lacey i wsp. 2009). Gdy ciągłość ściany mieszka włosowego ulegnie przerwaniu, co może być spowodowane nadmiernym rozdęciem jego ścian, białka bakteryjne zostają uwolnione do otaczających tkanek, gdzie mogą indukować - związany z aktywacją neutrofilów - rozwój stanu zapalnego. Konsekwencją rozwoju stanu zapalnego może być uszkodzenie struktur tkanki łącznej, otaczających mieszek włosowy (Kafienah i wsp. 1998).

Badając szczepy laseczek *Bacillus oleronius* pochodzące od pacjentów chorujących na zapalenie brzegów powiek, potwierdzono wrażliwość tych bakterii na wiele antybiotyków, takich jak cyprofloksacyna, doksycyklina i gentamycyna. Większość szczepów wykazała też wrażliwość na klindamycynę (Szkaradkiewicz i wsp. 2012). Wymienione antybiotyki nie redukują jednak populacji roztoczy *Demodex*, a stosowane podczas kuracji wykazują działanie jedynie w stosunku do bakterii *Bacillus oleronius*. Zapobiegają one uwalnianiu do tkanek okołomieszkowych immunogennych białek. Po odstawieniu antybiotyku zdarza się, że objawy rosacea mogą nawracać. Odradzanie się populacji bakterii *Bacillus oleronius* w przewodach pokarmowych roztoczy jest możliwe, gdyż te drobnoustroje - podobnie jak inne bakterie z rodziny *Bacillus* - mogą występować w dwóch formach: wegetatywnej i przetrwalnikującej (Szkaradkiewicz i wsp. 2012). Możliwe jest więc, że poruszające się po powierzchni skóry roztocza *Demodex*, pożerając obumarłe komórki naskórka, niejako przy okazji wprowadzają do swojego układu pokarmowego endospory *Bacillus oleronius*, które następnie rozwijają się do form wegetatywnych (Szkaradkiewicz i wsp. 2012).

5.4. Omówienie wyników badań surowiczych stężeń interleukiny 17A

Trądzik różowaty jest przewlekłą chorobą o nieustalonej etiologii (Wilkin i wsp. 2002). Istotny wpływ na przebieg tej choroby ma lokalnie rozwijający się stan zapalny (Bamford 2001). Jest to złożony i wieloetapowy proces, w którym bierze udział wiele komórek nacieku zapalnego i w którym zostaje uwolnionych wiele mediatorów, takich jak cytokiny (Całkosiński i wsp. 2009). Na istotne znaczenie stanu zapalnego w patogenezie rosacea wskazuje również histologiczny obraz schorzenia, uzależniony od okresu trwania trądziku różowatego (Maciejewska-Udziela 1980). W początkowym, rumieniowym okresie, jedynymi obserwowanymi w tkance zmianami są drobne nacieki limfohistiocytarne, zlokalizowane w otoczeniu rozszerzonych naczyń krwionośnych oraz obrzęk tkanki łącznej (Maciejewska-Udziela 1980). W późniejszym okresie, wokół mieszków włosowych i gruczołów łojowych zaczynają się tworzyć nacieki złożone z neutrofilii, limfocytów, histiocytów i eozynofili (Maciejewska-Udziela 1980). W biopsjach skórnych, pochodzących od pacjentów prezentujących obraz kliniczny trądziku różowatego, stwierdzono, że w naciekach limfocytarnych większość limfocytów T była zlokalizowana wokół części roztoczy *Demodex*, znajdujących się poza mieszkem włosowym (Rufli i Büchner 1984). Przewaga limfocytów T w naciekach komórkowych, towarzyszących obecności roztoczy *Demodex*, stanowi argument na poparcie teorii, że w rozwoju trądziku różowatego ważną rolę odgrywa również komórkowa odpowiedź odpornościowa ustroju (Kim i wsp. 2011). Obecność roztoczy *Demodex* może mieć u człowieka związek z rozwojem chorób skóry oraz schorzeń dotyczących narządu wzroku, w tym - z rozwojem przewlekłego zapalenia brzegów powiek (Kheirkhah i wsp. 2007). W obrazie klinicznym tej choroby często stwierdza się obecność zaczerwienienia powiek i teleangiektazji na brzegach powiek, zaś pacjenci często skarżą się na świąd, uczucie dyskomfortu w oku oraz pogorszenie funkcji narządu wzroku (Jackson 2008). W badaniach klinicznych patogenezę demodekozy ocznej próbowano wyjaśnić posługując się analizą poziomów cytokin, zawartych we łzach pacjentów z zapaleniem brzegów powiek (Kim i wsp. 2011). Stwierdzono, że poziomy stężeń cytokin: interleukiny 7 (IL-7), interleukiny 12 (IL-12) oraz interleukiny 17 (IL-17) we łzach pochodzących od pacjentów z zapaleniem brzegów powiek i z jednoczesną obecnością roztoczy *Demodex*, były istotnie statystycznie wyższe w porównaniu z poziomami stężeń tych cytokin we łzach pacjentów z zapaleniem brzegów powiek, ale bez obecności roztoczy *Demodex* (Kim i wsp. 2011). U pacjentów z zapaleniem brzegów powiek, lecz bez towarzyszącej infekcji *Demodex*, stwierdzono we łzach istotnie wyższe stężenia interleukiny 7, interleukiny 12 i MIP-1 β w porównaniu do osób zdrowych. Stężenia IL-7 i IL-12 wykazywały różnicę pomiędzy

poszczególnymi badanymi, tj. pacjentami z zapaleniem brzegów powiek i towarzyszącą obecnością roztoczy *Demodex*, pacjentami z zapaleniem brzegów powiek bez obecności roztoczy *Demodex* oraz osobami zdrowymi. Jednakże istotną różnicę w poziomie interleukiny 17 odnotowano wyłącznie pomiędzy populacjami pacjentów z zapaleniem brzegów powiek, różniących się obecnością (bądź brakiem) roztoczy *Demodex*. Może to oznaczać, że zwiększone poziomy interleukiny 17 w tym badaniu były silnie skorelowane z infekcją nużeńcem (Kim i wsp. 2011). Jest więc możliwe, że to infestacja roztoczem *Demodex* indukuje sekrecję interleukiny 17, która może stymulować rozwój reakcji zapalnej bądź alergicznej i skutkować uszkodzeniem powierzchni oka oraz rozwojem teleangiektazji (Kim i wsp. 2011).

W ramach badań własnych postanowiono zbadać, jak zachowują się osoczowe stężenia interleukiny 17 w populacji pacjentów z trądzikiem różowatym oraz w grupie kontrolnej, składającej się z osób zdrowych. Interleukina 17 jest cytokiną prozapalną wykrytą po raz pierwszy w roku 1993 (Rouvier i wsp. 1993). Jej głównym źródłem są limfocyty Th-17, stanowiące subpopulację limfocytów CD4⁺ (Wróbel i wsp. 2005, Aggarwal i wsp. 2003). Interleukina 17 może być syntetyzowana również przez neutrofile, aktywowane monocyty czy komórki NK (Pappu i wsp. 2010, Chen i O'Shea 2008). Rolą limfocytów T pomocniczych CD4⁺ jest regulacja odpowiedzi odpornościowej. Opiszana w 2005 roku populacja limfocytów Th17 stanowi podzbiór limfocytów T pomocniczych, których charakterystyczną cechą jest wydzielanie interleukiny 17 (Hus i wsp. 2010), odgrywającej ważną rolę m.in. w zwalczaniu infekcji bakteryjnych i grzybiczych (Hus i wsp. 2010). Interleukina 17 przyczynia się do uwalniania innych cytokin i chemokin, które wpływają na rekrutację, aktywację i migrację neutrofilów do ogniska infekcji. Uważa się, że limfocyty Th17 odgrywają równie istotną rolę w patogenezie chorób alergicznych, zapalnych oraz są potencjalnymi induktorami reakcji autoimmunologicznych (Bettelli i wsp. 2008, Hus i wsp. 2010). Podwyższone osoczowe stężenie interleukiny 17 stwierdzono w surowicy chorych na RZS, łuszczycę, stwardnienie rozsiane oraz zapalne choroby jelit (Pappu i wsp. 2010). W przypadku alergicznego zapalenia błony śluzowej nosa jest ona uważana za biomarker ciężkości i progresji tego schorzenia (Ciprandi i wsp. 2009).

W kontekście patogenezy trądziku różowatego istotne jest to, że interleukinę 17 uważa się za ogniwo łączące syntetyzującą ją limfocyty T ze zjawiskiem wtórnego, zwiększonego napływu neutrofilów do miejsca reakcji zapalnej. Wykazano bowiem, że w układzie oddechowym podwyższonej aktywności interleukiny 17 towarzyszy zwiększony lokalnie napływ neutrofilów, spowodowany wzrostem wydzielania czynników chemotaktycznych i

czynników wzrostu (G-CSF, GM-CSF) dla neutrofilii (Semik-Orzech i wsp. 2006). Dla prowadzonych rozważań ważne jest również to, iż interleukinę 17 uważa się za cytokinę mogącą w sposób pośredni stymulować proces angiogenezy, ponieważ nasila produkcję przez fibroblasty takich czynników, jak VEGF, MIP-2, NO czy prostaglandyny (Wróbel i wsp. 2005). Interleukina 17 - jako potencjalnie angiogenna chemokina - może więc odgrywać znaczącą rolę w formowaniu się nowych naczyń krwionośnych i teleangiektazji w spojówkach. Obserwuje się to u chorych z zapaleniem brzegów powiek i jednoczesną infekcją roztocząmi *Demodex*. W piśmiennictwie istnieją doniesienia na temat współwystępowania demodekozy i zmian skórnych, takich jak teleangiektazje, przekrwienie oraz rumień (Kheirkhah i wsp. 2007, Erbagci i Ozgoztasi 1998, Hsu i wsp. 2009). Również zapalenie brzegów powiek z obecnością roztoczy *Demodex* cechuje się przekrwieniem spojówek i obecnością teleangiektazji na brzegach powiek (Kheirkhah i wsp. 2007).

W badaniach własnych dokonano oceny poziomu surowiczych stężeń interleukiny 17A, którą obecnie uważa się za prototypową interleukinę dla rodziny IL-17, obejmującej 6 cytokin (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E i IL-17F), przy czym nazwy IL-17 i IL-17A są traktowane jako tożsame (Pappu i wsp. 2010). Wykazano, że u pacjentów z grupy badanej surowicze stężenie IL-17A wynosiło średnio 4,85 pg/ml i nie różniło się istotnie od średniego surowiczego stężenia IL-17A u osób z grupy kontrolnej, które wynosiło 9,63 pg/ml ($p=0,0545$). W grupie badanej nie wykazano także istotnych statystycznie różnic w średnim surowiczym stężeniu IL-17A pomiędzy populacją pacjentów z odmianą rumieniową a populacją pacjentów z odmianą grudkowo-krostkową trądziku różowatego ($p=0,8372$). Natomiast surowiczych poziomów IL-17A w populacjach pacjentów z odmianą oczną i przerosłą nie można było porównać z pozostałymi populacjami z powodu zbyt małej liczebności tych grup. Stwierdzono też brak istotnej statystycznie różnicy w zakresie surowiczych poziomów IL-17A pomiędzy populacją pacjentów z pozytywnym a populacją pacjentów z negatywnym wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* ($p=0,3996$), jak również brak korelacji pomiędzy stężeniem surowiczej IL-17A a wiekiem pacjentów ($p=0,4711$) oraz pomiędzy stężeniem surowiczej IL-17A a liczbą roztoczy *Demodex folliculorum* na cm^2 skóry policzka (przy $p=0,1030$) u pacjentów z grupy badanej.

Uzyskane wyniki badań własnych, dotyczące poziomów surowiczych stężeń interleukiny 17A, wskazują na brak istotnych statystycznie różnic w zakresie wielkości tego parametru pomiędzy poszczególnymi populacjami z obu badanych grup. To może sugerować, że w trądziku różowatym nie dochodzi do istotnych zmian poziomów interleukiny 17A we krwi, choć jednocześnie nie stanowi dowodu na brak znaczenia tej cytokiny w

patogenezie schorzenia. Jak bowiem wiadomo, w trądziku różowatym zjawisko stanu zapalnego jest ograniczone do miejsc występowania widocznych wykwitów skórnych, a więc do okolic skóry twarzy lub - w odmianie ocznej rosacea - do narządu wzroku. Interleukina 17 może więc odgrywać rolę lokalnego czynnika zaangażowanego w proces powstawania zmian skórnych, podobnie jak ma to miejsce w zapaleniu brzegów powiek, gdzie wykrywa się zmiany poziomu cytokin zapalnych w płynie łzowym (Kim i wsp. 2011). Dodatkowym argumentem potwierdzającym znaczenie interleukiny 17 w patogenezie zapalenia brzegów powiek może być fakt, że we wspomnianym wcześniej badaniu poziom tej interleukiny w płynie łzowym - początkowo podwyższony - uległ obniżeniu wskutek leczenia mającego na celu eradykację roztoczy *Demodex*. To sugeruje istnienie silnego związku między obecnością roztoczy *Demodex* a zmianą poziomu IL-17 we łzach (Kim i wsp. 2011). Jest więc możliwe, że obecność roztoczy *Demodex folliculorum* bytujących w mieszkach włosowych skóry twarzy lub w obrębie rzęs na brzegach powiek może stymulować sekrecję tej cytokiny, która następnie indukuje rozwój reakcji zapalnej oraz sprzyja powstawaniu nowych naczyń krwionośnych, czego przejawem są teleangiektazje, widoczne w przebiegu tej choroby (Kim i wsp. 2011).

5.5. Omówienie wyników badań reaktywności surowic krwi z białkami bakterii *Bacillus oleronius*

Jak wiadomo, u chorych na trądzik różowaty obserwuje się zwiększoną liczbę roztoczy *Demodex* na skórze twarzy, w porównaniu do osób zdrowych (Bonnar i wsp. 1993, Erbagci i Ozgoztasi 1998). Dlatego też można się spodziewać, że u tych chorych z rozpadających się roztoczy do mieszków włosowych będą uwalniane większe ilości bakterii *Bacillus oleronius*, których białka – jak wspomniano wcześniej – posiadają silne właściwości immunogenne (O'Reilly i wsp. 2012, O'Reilly i wsp. 2012). Zarówno u pacjentów z odmianą grudkowo-krostkową (Lacey i wsp. 2007), jak i u pacjentów z odmianą oczną (Li i wsp. 2010), wykazano istotnie statystycznie większą reaktywność surowicy krwi z białkami pochodzącymi od bakterii *Bacillus oleronius*, wyizolowanej z roztocza *Demodex*, pochodzącego od pacjenta z odmianą grudkowo-krostkową rosacea. W badaniu przeprowadzonym na grupie chorych z odmianą rumieniową trądziku różowatego oceniano również reaktywność surowicy krwi w stosunku do białek 62 kDa i 83 kDa, przy użyciu metody Western blot (O'Reilly i wsp. 2012). Wykazano, że w populacji 26 osób z trądzikiem różowatym surowica pochodząca od 21 pacjentów (80%) wykazywała reaktywność z białkami *Bacillus oleronius*, a w grupie kontrolnej, złożonej z 22 osób, reaktywność

wykazywała surowica pochodząca jedynie od 9 osób (40%). Stwierdzony istotny statystycznie większy odsetek reaktywności surowic u pacjentów z rosacea w porównaniu do grupy kontrolnej może sugerować, że białka bakteryjne mogą wyzwać również humoralną odpowiedź układu immunologicznego i prowadzić do produkcji przeciwciał skierowanych przeciwko białkom bakteryjnym (O'Reilly i wsp. 2012).

W ramach badań własnych postanowiono ocenić reaktywność surowic krwi pochodzących od chorych na trądzik różowaty oraz od osób zdrowych, z białkami bakterii *Bacillus oleronius* przy użyciu metody Western blot. Do badań użyto surowicy krwi pobranej od wszystkich uczestników badań, a jako antygeny zostały użyte białka bakterii *Bacillus oleronius*, wyizolowane z roztocza *Demodex*, pochodzącego od pacjenta z odmianą grudkowo-krostkową rosacea (Lacey i wsp. 2007). Stwierdzono, że u pacjentów z trądzikiem różowatym reaktywność z białkami *Bacillus oleronius* wykazywała surowica krwi pochodząca od 82 pacjentów (82% badanej populacji), a w grupie kontrolnej złożonej z osób zdrowych reaktywność wykazywała surowica pochodząca jedynie od 8 badanych (20% populacji). A zatem surowica krwi pochodząca od pacjentów z trądzikiem różowatym w statystycznie istotny sposób wykazywała reaktywność z białkami *Bacillus oleronius* ($p=0,0001$). Wyniki uzyskane z badań własnych pozostają w zgodzie z doniesieniami literaturowymi mówiącymi o istnieniu pozytywnej korelacji między reaktywnością surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* a rozpoznaniem klinicznym trądziku różowatego (Lacey i wsp. 2007, Li i wsp. 2010, O'Reilly i wsp. 2012). Wydaje się zatem prawdopodobne, że białka bakterii *Bacillus oleronius* mogą wywoływać nie tylko lokalną aktywację neutrofilii (O'Reilly i wsp. 2012), lecz również wyzwać w organizmie człowieka humoralną odpowiedź immunologiczną, związaną z produkcją przeciwciał (O'Reilly i wsp. 2012). Dodatkowo, w badaniach własnych wykazano istnienie pewnych ciekawych i statystycznie istotnych różnic w zakresie wybranych parametrów pomiędzy populacją pacjentów z pozytywnymi a populacją pacjentów z negatywnymi wynikami reakcji surowicy z białkami *Bacillus oleronius*. Chorzy z pozytywnymi wynikami reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* charakteryzowali się istotnie statystycznie wyższym wiekiem w stosunku do pacjentów z negatywnym wynikiem reakcji surowicy krwi. Okazało się bowiem, że średni wiek w grupie z wynikiem pozytywnym wyniósł 48,65 lat, a w grupie z wynikiem negatywnym - 40,22 lat ($p=0,0151$). Poza tym pacjenci z pozytywnymi wynikami reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* charakteryzowali się istotnie statystycznie dłuższym czasem trwania choroby, który wyniósł średnio 7,13 lat u pacjentów z pozytywnym i 4,47 lat u pacjentów z negatywnym wynikiem reakcji surowicy krwi ($p=0,0442$). Może to

sugerować, że do rozwinięcia humoralnej odpowiedzi immunologicznej dochodzi po dłuższym czasie trwania choroby; lub też, że do ujawnienia widocznych klinicznie objawów chorobowych i wytworzenia przeciwciał wymagana jest obecność zwiększonej ilości antygenów bakteryjnych oraz odpowiednio długi czas trwania stanu zapalnego w tkankach. A takie właśnie warunki panują na skórze twarzy chorych z trądzikiem różowatym. Możliwe jest też, że u osób zdrowych zbyt mała liczba roztoczy, a co za tym idzie - mała ilość antygeny bakteryjnego, nie wystarcza do rozwoju lokalnego stanu zapalnego ani do rozwinięcia się odpowiedzi immunologicznej typu humoralnego (O'Reilly i wsp. 2012).

Inna interesująca obserwacja stwierdzona w badaniach własnych dotyczy różnicy w zakresie poziomu wydzielania łożu pomiędzy populacjami pacjentów z pozytywnym i negatywnym wynikiem reakcji surowicy krwi z immunogennymi białkami *Bacillus oleronius*. Wśród pacjentów z pozytywnymi wynikami reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius* stwierdzono istotnie statystycznie niższy poziom wydzielanego łożu, wynoszący średnio 112,30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Natomiast wśród osób z negatywnym wynikiem reakcji surowicy, ten poziom wyniósł średnio 181,17 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($p=0,0119$). Nie można jednak stwierdzić, czy ta istotna statystycznie różnica w stężeniu łożu wynika z preferowania przez roztocza *Demodex* skóry o odmiennym składzie i niższym poziomie łożu, czy też stwierdzony niższy poziom łożu jest wynikiem zasiedlania skóry przez roztocza *Demodex*. Chociaż wydaje się, że odmiennosc warunków panujących na skórze osób z trądzikiem różowatym pozostaje w związku z występowaniem u nich większej liczby roztoczy *Demodex*. Zwiększona liczba roztoczy *Demodex* prowadzi w konsekwencji do systematycznego dostarczania do mieszków włosowych zwiększonych ilości białek *Bacillus oleronius*, które po przekroczeniu bariery ściany mieszka włosowego mogą wywoływać odpowiedź zapalną w mechanizmie zależnym początkowo od aktywacji neutrofilów. Po bliżej nieokreślonym czasie, obecność białek bakteryjnych w tkankach skutkuje wytworzeniem przeciwciał przez organizm człowieka (O'Reilly i wsp. 2012). Jednak w badaniach własnych pomiędzy populacjami pacjentów z pozytywnymi a populacją pacjentów z negatywnymi reakcjami surowicy krwi z antygenami bakteryjnymi nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy ani w zakresie średniej ilości roztoczy *Demodex folliculorum* na cm^2 ($p=0,2862$), ani w zakresie surowicznych poziomów interleukiny 17A ($p=0,3996$). Należy też podkreślić, iż wyniki badań własnych pozostają w zgodzie z wcześniejszymi doniesieniami, które mówią, że roztocza *Demodex* stanowią niezależny czynnik etiopatogenetyczny chorób narządu wzroku, zaś przenoszone przez nie bakterie najprawdopodobniej działają na organizm człowieka we własnym zakresie (Szkardkiewicz i wsp. 2012).

5.6. Podsumowanie dyskusji

Podsumowując omówienie wyników przedstawionych w niniejszej pracy, należy zwrócić uwagę na kilka bardzo ważnych kwestii dotyczących trądziku różowatego. Jest to choroba często spotykana, dotykająca od 2% (Schaefer i wsp. 2008) do nawet 10% populacji (Berg i wsp. 1989). Choć trądzik różowaty nie należy do schorzeń zagrażających życiu, to jednak ze względu na przewlekły charakter choroby oraz fakt, że dotyka tak widocznej części ciała jak twarz, może wywierać silny wpływ na stan psychiczny, poczucie własnej wartości i samoocenę pacjentów (Chodkiewicz i wsp. 2007). Mimo przeprowadzenia licznych badań, mających na celu ustalenie czynnika (lub czynników) prowadzących do rozwoju choroby, jej patogenezę pozostaje wciąż nierozpoznana, a leczenie ma nadal charakter głównie objawowy (Elewski i wsp. 2011). Należy podkreślić, że znalezienie skutecznego leku na trądzik różowaty lub trafnego narzędzia diagnostycznego stanowiłoby wielką korzyść dla chorych.

Dlatego też celem niniejszej pracy stała się ocena udziału bakterii *Bacillus oleronius* i roztoczy *Demodex folliculorum* w patogenezie trądziku różowatego. Celem, jaki postawił sobie autor tej pracy, była również próba znalezienia czynnika, który stanowiłby „brakujące ogniwo”, łączące ze sobą w logiczną całość aktualne hipotezy na temat patogenezы trądziku różowatego, zmierzające do wyjaśnienia różnorodności objawów klinicznych obserwowanych w przebiegu tego schorzenia. Co do roztoczy *Demodex*, to były one podejrzewane o udział w patogenezie schorzeń skóry w zasadzie od momentu ich odkrycia w 1841 roku (Bonnar i wsp. 1993). Natomiast laseczki *Bacillus oleronius* zaczęto podejrzewać o udział w patogenezie dermatoz zapalnych dopiero wtedy, gdy udało się je wyizolować z roztocza *Demodex*, pobranego od pacjenta z grudkowo-krostkową odmianą rosacea (Lacey i wsp. 2007). Prezentowane w niniejszej pracy wyniki badań własnych wskazują, że roztocza *Demodex folliculorum* mogą stanowić wektor dla bakterii *Bacillus oleronius*. Wykazano również, że na skórze twarzy pacjentów z trądzikiem różowatym roztocza te występują w większej liczbie niż u osób zdrowych. Wydaje się więc, że na powierzchni skóry tych pacjentów mogą występować odmienne warunki fizyczne, sprzyjające rozwojowi populacji roztoczy. Być może są to warunki związane z odmiennym składem łożu, choć w tej materii należy przeprowadzić kolejne, pogłębione badania. Zwiększona liczba roztoczy *Demodex* może w konsekwencji prowadzić do dostarczania do wnętrza mieszków włosowych proporcjonalnie większej ilości antygenów bakteryjnych. Białka produkowane przez bakterie *Bacillus oleronius* posiadają, jak wiadomo, silne właściwości immunogenne i są zdolne do aktywacji neutrofilów oraz do rozwoju lokalnego stanu zapalnego, co zostało potwierdzone empirycznie (Lacey i wsp. 2007, O'Reilly i wsp. 2012).

Koncepcja udziału bakterii *Bacillus oleronius* tłumaczyłaby zatem rozwój wielu objawów klinicznych obserwowanych w trądziku różowatym. Wydaje się, że wykwity zapalne (grudki i krosty) mogą bezpośrednio wynikać z rozwijającego się zapalenia, zaś objawy naczyniowe schorzenia (rumień i teleangiektazje) mogą mieć związek z degradacją białek strukturalnych tkanki łącznej, stanowiących swoiste „rusztowanie” dla sieci naczyń krwionośnych. Trwający przez wiele lat okołomieszkowy stan zapalny skutkuje stopniowym niszczeniem elementów rusztowania tkanki łącznej, na którym są osadzone naczynia skórne (Yamasaki i Gallo 2009). Występowanie bakterii *Bacillus oleronius* można więc uznać za pewne „ogniwo łączące” kilka hipotez (teorię naczyniową, teorię o zaburzeniach immunologicznych i teorię o udziale mikroorganizmów), dotyczących patogenezy trądziku różowatego. Możliwe, że wieloletnia ekspozycja organizmu na antygeny *Bacillus oleronius* też prowadzi do rozwoju odpowiedzi humoralnej i wytworzenia przeciwciał, a brak możliwości szybkiego wyleczenia choroby wiąże się z niemożnością odbudowy w krótkim czasie sieci włókien kolagenowych i elastycznych, podtrzymujących naczynia. Wydaje się również, że czasowe ustępowanie zapalnych objawów rosacea podczas stosowania terapii antybiotykowej może być tłumaczone przerwaniem łańcucha zmian patologicznych, zachodzących w tkance otaczającej mieszki włosowe.

Jest oczywiste, że dla potwierdzenia teorii o udziale bakterii *Bacillus oleronius* w patogenezie trądziku różowatego wymagane jest przeprowadzenie dalszych, szerzej zakrojonych badań. Wyniki i wnioski przedstawione w niniejszej pracy mają głównie na celu wskazanie kierunków, w których mogliby podążać kolejni badacze. Wydaje się, że kwestią interesującą byłaby w przyszłości ocena innych następstw wynikających z bytowania roztoczy *Demodex* na skórze człowieka, w tym - weryfikacja innych aspektów wpływu antygenów bakterii *Bacillus oleronius* na ludzki układ immunologiczny. Ostateczna ocena udziału bakterii *Bacillus oleronius*, jak i przenoszących ją roztoczy *Demodex*, w patogenezie trądziku różowatego mogłaby mieć w przyszłości duże znaczenie praktyczne i pomogłaby w opracowaniu nowych strategii postępowania leczniczego w trądziku różowatym, na czym skorzystałoby głównie chorzy.

6. Wnioski

1. Stan łojotokowy skóry wpływa na liczebność roztoczy *Demodex folliculorum* na skórze twarzy, lecz stężenie produkowanego przez skórę łoju nie stanowi jedyne go czynnika determinującego wzrost populacji roztoczy *Demodex*.
2. Roztocza *Demodex folliculorum* stanowią wektor dla laseczek *Bacillus oleronius*, produkujących immunogenne białka zdolne do pobudzania komórek układu odpornościowego.
3. Interleukina 17A może odgrywać rolę jedynie lokalnego czynnika, zaangażowanego w proces powstawania wykwitów skórnych w trądziku różowatym.
4. Białka bakterii *Bacillus oleronius* posiadają potencjał wyzwalania humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Te bakterie mogą odgrywać istotną rolę w patomechanizmie trądziku różowatego.

7. Streszczenie

Trądzik różowaty (rosacea) jest przewlekłym schorzeniem zapalnym, obejmującym swym zasięgiem skórę centralnej części twarzy (policzki, nos, broda, czoło) i przebiegającym z okresami zaostrzeń i remisji. Podstawowym objawem schorzenia jest rumień - początkowo przelotny, a następnie utrwalony - na którego podłożu często pojawiają się teleangiektazje i wykwity zapalne, takie jak grudki, krosty, obrzęk oraz (czasami) zmiany przerostowe, tzw. phyma. Objawom skórnyemu nierzadko mogą towarzyszyć dolegliwości oczne, dotyczące najczęściej obojga oczu i występujące w różnym nasileniu. Trądzik różowaty jest znany od starożytności i stanowi częstą dermatozę, dotykającą głównie kobiety, u których jest obserwowany trzy razy częściej niż u mężczyzn. Przeważnie występuje u ludzi rasy białej z jasnym fototypem skóry. Początek pojawiania się objawów trądziku różowatego przypada zwykle na 30-50 rok życia, a najczęściej stwierdzaną jego postacią jest odmiana rumieniowo-teleangiektatyczna. U mężczyzn przebieg schorzenia jest wyraźnie cięższy i częściej dochodzi u nich do powstania zmian przerostowych.

Trądzik różowaty jest schorzeniem wpływającym negatywnie na stan psychiczny pacjentów, którzy deklarują mniejsze zadowolenie ze swojego życia, zaniżone poczucie własnej wartości i często uskarżają się na problemy w życiu osobistym. Mimo znacznego postępu wiedzy, patogenezę trądziku różowatego pozostaje wciąż niewyjaśniona, a jego leczenie nadal ma charakter głównie objawowy. Wśród hipotez dotyczących patogenezы tego schorzenia, wymienia się teorię o możliwym udziale niektórych czynników infekcyjnych.

Celem niniejszej pracy była ocena udziału wybranych czynników etiologicznych – bakterii *Bacillus oleronius* i roztoczy *Demodex folliculorum* – w patogenezie trądziku różowatego. Postanowiono zbadać wpływ stanu łojotokowego skóry na liczebność roztoczy *Demodex folliculorum* na skórze twarzy, ocenić rolę roztoczy *Demodex folliculorum* jako potencjalnych wektorów dla bakterii *Bacillus oleronius*, zbadać (u pacjentów z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej) stężenia surowicze interleukiny 17A oraz ocenić reaktywność surowic krwi z białkami bakterii *Bacillus*.

Badaniom poddano grupę 100 chorych na trądzik różowaty, hospitalizowanych w Klinice Dermatologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu lub leczonych ambulatoryjnie w Poradni Dermatologicznej przy Klinice Dermatologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Grupę kontrolną stanowiło 40 zdrowych ochotników. Materiał do badań stanowiły zeszkrobiny naskórka i surowica krwi. Zastosowano następujące metody badawcze i diagnostyczne: badanie podmiotowe, badanie przedmiotowe oraz badania dodatkowe, takie jak: badanie

metodą standaryzowanej biopsji powierzchni skóry twarzy (SSSB), badanie poziomu wydzielania łoju przez skórę twarzy, badania mikrobiologiczne, badanie surowiczych stężeń interleukiny 17A oraz badanie reaktywności surowic krwi z białkami bakterii *Bacillus oleronius*. Uzyskane wyniki badań klinicznych poddano analizie statystycznej z zastosowaniem programu Statistica PL 9.0 firmy StatSoft.

W grupie badanej oraz w grupie kontrolnej nie wykazano różnic pomiędzy średnim wiekiem kobiet a średnim wiekiem mężczyzn. U kobiet i u mężczyzn z grupy badanej nie wykazano różnicy pomiędzy czasem trwania choroby oraz nie wykazano zależności pomiędzy płcią pacjentów a występowaniem odmian trądziku różowatego, jak również nie stwierdzono zależności pomiędzy stopniem nasilenia intensywności zmian skórnych a płcią pacjentów. Wykazano, że liczba roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry twarzy jest znamienne wyższa u chorych na trądzik różowaty w porównaniu do osób zdrowych, a wśród chorych na trądzik różowaty liczba roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry jest znamienne wyższa wśród mężczyzn. Uzyskano przeciętną korelację między wiekiem pacjentów a liczbą roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry u pacjentów z grupy badanej, przeciętną korelację między wiekiem pacjentów a liczbą roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry wśród kobiet z grupy badanej oraz nie uzyskano korelacji między wiekiem pacjentów a liczbą roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry wśród mężczyzn z grupy badanej.

Wykazano, że liczba roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry twarzy jest znamienne wyższa u mężczyzn z łagodnym nasileniem zmian skórnych, w porównaniu do kobiet z łagodnym nasileniem zmian skórnych. Nie stwierdzono natomiast istotnych statystycznie różnic w liczbie roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry pomiędzy kobietami i mężczyznami z umiarkowanym nasileniem zmian skórnych oraz pomiędzy pacjentami z łagodnym a pacjentami z umiarkowanym nasileniem zmian skórnych, również z uwzględnieniem podziału na płeć. Na skórze osób z grupy kontrolnej wykazano istotnie wyższy poziom wydzielania łoju, w porównaniu do pacjentów z grupy badanej. W grupie badanej nie stwierdzono korelacji między poziomem wydzielanego łoju a liczbą roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² oraz nie stwierdzono różnic pomiędzy kobietami i mężczyznami z grupy badanej w zakresie poziomu łoju wydzielanego przez skórę twarzy.

W wyniku inkubacji zeskróbki naskórki, pochodzących od 18 pacjentów z grupy badanej i 3 osób z grupy kontrolnej, w 10 przypadkach stwierdzono wzrost bakterii *Bacillus oleronius*, potwierdzony następnie przy użyciu metody PCR. U pacjentów z pozytywnym wynikiem reakcji PCR wykazano istotnie wyższą średnią liczbę roztoczy *Demodex*

folliculorum na cm² powierzchni skóry oraz istotnie wyższy średni poziom wydzielanego łoju. Pomiędzy pacjentami z pozytywnym a pacjentami z negatywnym wynikiem reakcji PCR nie wykazano natomiast różnicy w zakresie średniego wieku ani średniego czasu trwania objawów choroby. Pomiędzy pacjentami z grupy badanej a osobami z grupy kontrolnej nie wykazano istotnych różnic w zakresie poziomów surowiczych stężeń interleukiny 17A. W grupie badanej nie uzyskano korelacji między surowiczym stężeniem interleukiny 17A a wiekiem pacjentów oraz nie uzyskano korelacji między surowiczym stężeniem interleukiny 17A a ilością roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry twarzy. Wykazano też, że średnie surowicze poziomy stężenie interleukiny 17A u pacjentów z różnymi odmianami trądziku różowatego nie różnią się znamienne.

Analizując częstość reaktywności surowic krwi z białkami bakterii *Bacillus oleronius* stwierdzono, że surowice pochodzące od pacjentów z trądzikiem różowatym istotnie statystycznie częściej wykazywały reaktywność z białkami bakteryjnymi. W grupie badanej nie wykazano zależności pomiędzy stopniem nasilenia intensywności zmian skórnych a wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius*. Pomiędzy populacjami pacjentów, które różniły się wynikiem reakcji surowicy z białkami *Bacillus oleronius*, nie wykazano różnic w zakresie średniej liczby roztoczy *Demodex folliculorum* na cm², jak również w zakresie stężeń surowiczych IL-17A. Stwierdzono natomiast, że pacjenci z pozytywnym wynikiem reakcji surowicy z białkami byli statystycznie starsi, o dłuższym czasie trwania objawów choroby oraz o niższym średnim poziomie łoju wydzielanego przez skórę twarzy. W grupie kontrolnej nie wykazano różnicy pomiędzy populacjami osób, które różniły się wynikiem reakcji surowicy krwi z białkami *Bacillus oleronius*, w zakresie średniego wieku oraz w zakresie takich parametrów, jak średnia liczba roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry twarzy, poziom łoju wydzielanego przez skórę oraz średnie stężenie w surowicy IL-17A.

W oparciu o uzyskane wyniki badań własnych wysunięto następujące wnioski:

- Stan łojotokowy skóry wpływa na liczebność roztoczy *Demodex folliculorum* na skórze twarzy, lecz poziom produkowanego przez skórę łoju nie stanowi jedynego czynnika determinującego wzrost populacji roztoczy *Demodex*.
- Roztocza *Demodex folliculorum* stanowią wektor dla laseczek *Bacillus oleronius*, produkujących immunogenne białka zdolne do pobudzania komórek układu odpornościowego.

- Interleukina 17A może odgrywać rolę jedynie lokalnego czynnika zaangażowanego w proces powstawania wykwitów skórnych w trądziku różowatym.
- Białka bakterii *Bacillus oleronius* posiadają potencjał wyzwalania humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Te bakterie mogą odgrywać istotną rolę w patomechanizmie trądziku różowatego.

8. Summary

Rosacea is a chronic inflammatory dermatosis, usually affecting the central part of the face (cheeks, nose, chin, forehead), with periods of exacerbation and remission. The basic manifestations of the disease include erythema, first flushing and then permanent, followed by telangiectasias and inflammatory lesions such as papules, pustules, edema and, occasionally, phyma. The symptoms may be accompanied by ocular complaints, usually in both eyes and at various stages of disease advancement. Rosacea has been known since antiquity. It is a popular dermatosis and affects mainly women, who are diagnosed threefold more often than men. Rosacea is predominantly observed in Caucasians with white phenotype. It usually affects people between the ages of 30 and 50, with erythematotelangiectatic rosacea being the most common. The disease appears to have a more severe course in males, who are more prone to developing phyma lesions.

Rosacea is an example of a disease that may have a negative influence on the emotional and mental well-being of patients, who very often admit to being less satisfied with their lives, to having lowered self-esteem and experiencing problems in their personal lives. Despite considerable advances in medicine, the pathogenesis of rosacea remains elusive and the treatment is mainly symptomatic. The hypothesis about a possible role of some infectious factors in the etiopathogenesis of rosacea is among many theories about its pathogenesis.

The aim of the dissertation was to determine the role of selected etiologic factors – *Bacillus oleronius* and *Demodex folliculorum* mites – in the pathogenesis of rosacea. The author evaluated the following: the impact of the sebaceous condition of the skin on the number of *Demodex* mites on the facial skin; the role of *Demodex* as potential vectors for the *Bacillus oleronius* bacterium; the level of serum interleukin 17A concentrations in study group patients and controls; and the reactivity of sera to *Bacillus* proteins.

One hundred rosacea patients hospitalized at the Dermatology Clinic, PUMS, or treated at the out-patient Dermatology Clinic, PUMS, were enrolled in the study. Forty healthy volunteers without skin changes constituted the control group. Samples of epithelial scrapings and blood sera were extracted and analyzed. The following study and diagnostic methods were used: anamnesis, physical examination and additional tests (Standardized Skin Surface Biopsy (SSSB), level of sebum secretion on the facial skin test, microbiological test, evaluation of serum interleukin 17A concentrations and blood sera reactivity to *Bacillus oleronius* proteins) were performed in all patients. The obtained results of clinical examinations were statistically analyzed with Statistica PL 9.0 (StatSoft).

No differences between mean ages of women and men from the study and control groups were found. In the study group, no differences between duration of the disease in women and in men, no correlation between patient gender and type of rosacea, and no dependence between the intensity of skin lesions and patient gender were noted. The number of *Demodex folliculorum* mites per cm² of the facial skin was found to be significantly higher in rosacea patients than in healthy controls. In the study group, the number of *Demodex folliculorum* mites per cm² of the facial skin was found to be significantly higher in men. An average correlation between patient age and the number of *Demodex folliculorum* mites per cm² of the facial skin in patients from the study group, and an average correlation between patient age and the number of *Demodex folliculorum* mites per cm² of the facial skin in women from the study group were found, whereas no correlation between patient age and the number of *Demodex folliculorum* mites per cm² of the facial skin in men from the study group was noted. The number of *Demodex folliculorum* mites per cm² of the facial skin was significantly higher in men with mild severity of skin lesions in comparison to women with mild severity of skin lesions. No statistically significant differences in the number of *Demodex folliculorum* mites per cm² of the skin between women and men with moderate severity of skin lesions and between patients with mild and patients with moderate severity of skin lesions, regardless of their gender.

The skin of controls was found to secrete significantly more sebum in comparison to the study group patients. Within the study group, no correlation between the level of sebum secretion and the number of *Demodex* mites per cm² of the facial skin was noted, and no differences in the levels of sebum secretion between women and men from the study group were observed as well.

As a result of the incubation of the epithelial cells obtained from 18 rosacea patients and 3 controls, an increase in the number of *Bacillus oleronius*, later confirmed by PCR, was noted in 10 cases. In patients with positive PCR, a significantly higher mean number of *Demodex* mites per cm² of the facial skin and significantly elevated mean levels of sebum secretion were observed. No differences regarding mean patient age and mean symptom duration between PCR-positive and PCR-negative patients were found.

Also, no significant differences in serum interleukin 17A concentrations between study and control group patients were observed. In the study group, there was no correlation between serum interleukin 17A concentrations and the patient age, and no correlation between serum interleukin 17A concentrations and the number of *Demodex* mites per cm² of the facial

skin. Mean serum interleukin 17A levels in rosacea patients with different types of the disease proved to not differ significantly.

The analysis of frequency of blood sera reactivity to *Bacillus oleronius* proteins revealed that sera from rosacea patients statistically significantly more often showed reactivity to bacterial proteins. In the study group, no dependency was found between the skin lesion severity and the result of blood serum reactivity to *Bacillus oleronius* proteins. No differences in the mean number of *Demodex* mites per cm² as well as IL-17A sera concentrations between patient populations with different results of sera reactivity to *Bacillus* proteins were noted. However, patients with positive results of serum reactivity to proteins proved to be statistically significantly older, with longer time of symptom manifestation and lower mean level of sebum secretion on the face. In the control group, no difference in mean age and selected parameters (mean number of *Demodex* mites per cm² of the facial skin, level of secreted sebum and mean serum IL-17A concentration) between patients with different results of serum reactivity to *Bacillus oleronius* was found.

The following conclusions were drawn on the basis of the study results:

- Sebaceous condition of the skin seems to have an influence on the number of *Demodex folliculorum* on the facial skin, however the level of sebum secretion does not constitute the only factor determining the increase of *Demodex* population.
- *Demodex folliculorum* mites appear to be a vector for *Bacillus oleronius*, producing immunogenic proteins that are able to stimulate immune system cells.
- Due to lack of differences in serum interleukin 17A concentrations in the study and the control groups, it seems safe to conclude that the cytokine might play the role of only a local factor involved in the process of skin lesion development in the course of rosacea.
- *Bacillus oleronius* proteins appear to have the potential to trigger humoral immunologic response and these bacteria might in fact be playing a significant role in the pathophysiology of rosacea.

9. Wykaz tabel i rycin

9.1. Wykaz tabel

Tabela I. Liczba i wiek pacjentów z grupy badanej z podziałem na płeć.

Tabela II. Liczba pacjentów w poszczególnych grupach wiekowych.

Tabela III. Liczba i wiek osób z grupy kontrolnej z podziałem na płeć.

Tabela IV. Częstość występowania poszczególnych odmian trądziku różowatego w grupie badanej.

Tabela V. Czas trwania objawów choroby u pacjentów z trądzikiem różowatym.

Tabela VI. Częstość występowania poszczególnych stopni nasilenia zmian skórnych u pacjentów z grupy badanej z podziałem na płeć.

Tabela VII. Liczba roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² w grupie badanej i kontrolnej, z podziałem na płeć.

Tabela VIII. Liczba roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry w zależności od stopnia nasilenia zmian skórnych u pacjentów z grupy badanej.

Tabela IX. Ilość łoju wydzielanego przez skórę twarzy u pacjentów z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej.

Tabela X. Ilość łoju wydzielanego przez skórę twarzy mężczyzn i kobiet z grupy badanej.

Tabela XI. Zestawienie wyników reakcji PCR potwierdzających obecność bakterii *Bacillus oleronius*.

Tabela XII. Wiek pacjentów, czas trwania objawów choroby, liczba roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² oraz stężenie wydzielanego łoju w zależności od wyniku reakcji PCR.

Tabela XIII. Surowicze stężenia interleukiny 17A u pacjentów z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej.

Tabela XIV. Stężenia surowiczej interleukiny 17A u pacjentów z grupy badanej w zależności od odmiany trądziku różowatego.

Tabela XV. Liczba próbek surowicy krwi z pozytywnym i negatywnym wynikiem reaktywności z białkami *Bacillus oleronius*, z podziałem na grupę badaną i kontrolną.

Tabela XVI. Stopień nasilenia zmian skórnych w zależności od wyniku reakcji próbek surowicy z białkami *Bacillus oleronius* u pacjentów w grupie badanej.

Tabela XVII. Wiek, czas trwania objawów choroby, liczba roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry, poziom wydzielanego łoju oraz surowicze stężenie IL-17A w grupie badanej w zależności od wyniku reakcji próbki krwi z białkami *Bacillus oleronius*.

Tabela XVIII. Wiek, liczba roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² powierzchni skóry policzka, stężenie wydzielanego łoju oraz surowicze stężenie IL-17 w grupie kontrolnej w zależności od wyniku reakcji próbki z białkami *Bacillus oleronius*.

9.2. Wykaz rycin

Rycina 1. Obraz mikroskopowy nużeńca ludzkiego (*Demodex folliculorum*), mikroskop świetlny, oryginalne powiększenie 100x, preparat własny.

Rycina 2. Struktura wiekowa chorych z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej z podziałem na płeć.

Rycina 3. Procentowy udział poszczególnych odmian trądziku różowatego w grupie badanej.

Rycina 4. Procentowy udział kobiet i mężczyzn w poszczególnych odmianach trądziku różowatego w grupie badanej.

Rycina 5. Czas trwania choroby u pacjentów z grupy badanej z podziałem na płeć.

Rycina 6. Rozkład stopnia nasilenia zmian trądzikowych u pacjentów z grupy badanej.

Rycina 7. Liczba roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² skóry w grupie badanej i grupie kontrolnej z podziałem na płeć.

Rycina 8. Wykres rozrzutu liczby roztoczy *Demodex folliculorum* w relacji do wieku chorych z grupy badanej.

Rycina 9. Wykres rozrzutu liczby roztoczy *Demodex folliculorum* w relacji do wieku chorych kobiet z grupy badanej.

Rycina 10. Wykres rozrzutu liczby roztoczy *Demodex folliculorum* w relacji do wieku chorych mężczyzn z grupy badanej.

Rycina 11. Rozkład liczby roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² w zależności od stopnia nasilenia zmian skórnych z podziałem na płeć.

Rycina 12. Wykres rozrzutu dla liczby roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² i poziomu wydzielania łoju przez skórę twarzy u pacjentów z grupy badanej.

Rycina 13. Obraz makroskopowy kolonii bakterii *Bacillus oleronius* wyrosłych na podłożu hodowlanym (agar z 5% krwią baranią).

Rycina 14. Obraz mikroskopowy (powiększenie x 1000) wyhodowanych bakterii *Bacillus oleronius*, barwienie metodą Grama – Gram-ujemne laseczki średniej wielkości, rosnące w warunkach tlenowych, tworzące przetrwalniki, niemające zdolności ruchu w kropli wiszącej i nieposiadające wici (Kuhnigk i wsp. 1995).

Rycina 15. Rozdział w żelu agarozowym produktów reakcji PCR dla fragmentu genu 16S rRNA *Bacillus oleronius*. Oczekiwana wielkość produktu 299 pz. Tor 1 – marker wielkości, tor 2 – kontrola negatywna, tor 3 – kontrola pozytywna (produkt PCR dla DNA szczepu

referencyjnego *Bacillus oleronius* (Kuhnigk i wsp. 1995) (ATCC 700005), tory od 4 do 9 – produkt PCR uzyskany dla próbek badanych.

Rycina 16. Wykres średnich surowiczych stężeń IL-17A u pacjentów z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej.

Rycina 17. Wykres rozrzutu dla wieku i stężenia surowiczego interleukiny 17A u pacjentów z grupy badanej.

Rycina 18. Wykres rozrzutu liczby roztoczy *Demodex folliculorum* na cm² skóry policzka i surowiczego stężenia interleukiny 17A u pacjentów z grupy badanej.

Rycina 19. Rozkład średnich surowiczych stężeń interleukiny 17A u pacjentów z grupy badanej w zależności od odmiany trądziku różowatego.

Rycina 20. Wykrywanie przeciwciał skierowanych przeciwko białkom 83kDa i 62kDa bakterii *Bacillus oleronius* przy użyciu metody Western blot. Surowice wykazują pozytywną reakcję w stosunku do jednego lub drugiego białka bakteryjnego.

Rycina 21. Rozkład procentowy pacjentów z pozytywnymi i negatywnymi wynikami reakcji surowicy w zależności od stopnia nasilenia zmian skórnych.

Rycina 22. Rozkład wieku pacjentów i czasu trwania objawów choroby w zależności od wyniku reakcji próbek surowicy z białkami *Bacillus oleronius* w grupie badanej.

Rycina 23. Rozkład średnich ilości łoju wydzielanego przez skórę twarzy w zależności od wyniku reakcji próbek surowicy z białkami *Bacillus oleronius* w grupie badanej.

10. Piśmiennictwo

Abram K., Silm H., Maaroos HI., Oona M.: Subjective disease perception and symptoms of depression in relation to healthcare-seeking behaviour in patients with rosacea. *Acta Derm Venereol* 2009; 89: 488-491.

Aggarwal S., Ghilardi N., Xie MH., de Sauvage FJ., Gurney AL.: Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 2003; 278:1910-4.

Akbulatova L.K.: The pathogenic role of *Demodex* mite and the clinical form of demodicosis in man. *Vest Derm Vener, Moscow* 1963; 40: 57-61.

Akilov O.E., Butov Y.S., Mumcuoglu K.Y.: A clinico-pathological approach to the classification of human demodicosis. *J Dtsch Dermatol Ges* 2005; 3: 607-614.

Akilov O.E., Mumcuoglu K.Y.: Association between human demodicosis and HLA class I. *Clin Exp Dermatol* 2003; 28: 70-73.

Akilov O.E., Mumcuoglu K.Y.: Immune response in demodicosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004; 18: 440-444.

Akpek E.K., Merchant A., Pinar V., Foster C.S.: Ocular rosacea. Patient characteristics and follow-up. *Ophthalmology* 1997; 104: 1863-1867.

Albert R.A.: *Bacillus oleronius* strain ATCC 700005 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. 2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY988598.1>.

Aloi F., Tomasini C., Soro E., Pippione M.: The clinicopathologic spectrum of rhinophyma. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42: 468-472.

Altinyazar H.C., Koca R., Tekin N.S., Eştürk E.: Adapalene vs. Metronidazole gel for the treatment of rosacea. *Int J Dermatol* 2005; 44: 252-255.

Antille C., Saurat J.H., Lübke J.: Induction of rosaceiform dermatitis during treatment of facial inflammatory dermatoses with tacrolimus ointment. *Arch Dermatol* 2004; 140: 457-460.

Aquilina C, Viraben R, Sire S. Ivermectin-responsive *Demodex* infestation during human immunodeficiency virus infection. A case report and literature review. *Dermatology* 2002; 205: 394-397.

Aydingoz I.E., Dervent B., Guney O.: *Demodex folliculorum* in pregnancy. *Int J Dermatol* 2000; 39: 743-745.

Aylesworth R., Vance J.C.: *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis* in cutaneous biopsies. *J Am Acad Dermatol* 1982; 7: 583-589.

Ayres S.: Pityriasis folliculorum (*Demodex*). *Arch Dermatol Syphilol* 1930; 21: 19-24.

- Ayres S. Jr., Ayres S. III.: Demodectic eruptions (demodicidosis) in the human. 30 years' experience with two commonly unrecognized entities: Pityriasis folliculorum (*Demodex*) and acne rosacea (*Demodex* type). Arch Dermatol 1961; 83: 816-827.
- Bakar O., Demircay Z., Yuksel M., Haklar G., Sanisoglu Y.: The effect of azithromycin on reactive oxygen species in rosacea. Clin Exp Dermatol 2007; 32: 197-200.
- Baldwin H.E.: Oral therapy for rosacea. J Drugs Dermatol 2006; 5: 16-21.
- Ballaun C., Weninger W., Uthman A., Weich H., Tschachler E.: Human keratinocytes express the three major splice forms of vascular endothelial growth factor. J Invest Dermatol 1995; 104: 7-10.
- Bamford J.T.: Rosacea: Current thoughts on origin. Semin Cutan Med Surg 2001; 20: 199-206.
- Baz K., Cimen M.Y., Kokturk A., Aslan G., Ikizoglu G., Demirseren D.D., Kanik A., Atik U.: Plasma reactive oxygen species activity and antioxidant potential levels in rosacea patients: correlation with seropositivity to Helicobacter pylori. Int J Dermatol 2004; 43: 494-497.
- Berg M., Liden S.: An epidemiological study of rosacea. Acta Derm Venerol 1989; 69: 419-423.
- Bielenberg D.R., Bucan C.D., Sanchez R.: Molecular regulation of UVB-induced cutaneous angiogenesis. J Invest Dermatol 1998; 111: 864-872.
- Bettelli E., Korn T., Oukka M., Kuchroo V.K.: Induction and effector functions of T(H)17 cells. Nature 2008; 453: 1051-1057.
- Bevins C.L., Liu F.T.: Rosacea: skin innate immunity gone awry? Nat Med 2007; 13: 904-906.
- Bielenin I., Białczyk E.: Infestacje nużeńców (Demodicidae, Acarina) i ich znaczenie gospodarcze, sanitarne i epidemiologiczne. Przegl Zool 1993; 37: 187-197.
- Bogdanowski T., Rubisz-Brzezińska J., Wyględowska-Kania M.: Niezwykły przypadek guzowatości nosa u kobiety. Przegl Dermatol 1996; 83: 71-74.
- Bohdanowicz D., Raszeja-Kotelba B.: *Demodex* w etiopatogenezie niektórych chorób skóry. Post Dermatol Alergol 2001; 18: 51-53.
- Bonnar E., Eustace P., Powell F.C.: The *Demodex* mite population in rosacea. J Am Acad Dermatol. 1993; 28: 443-448.
- Borgo S.N., Sattler E.C., Hogardt M., Adler K., Plewig G.: PCR analysis for *Wolbachia* in human and canine *Demodex* mites. Arch Dermatol Res 2009; 301: 747-752.
- Borowska K., Antyszko M., Zabielski S.: Etiopatogeneza trądziku różowatego ze szczególnym uwzględnieniem roztoczy z rodzaju *Demodex*. Lek Wojsk 2003; 79: 235-238.
- Borrie P.: Rosacea with special reference to its ocular manifestations. Br J Dermatol 1953; 65: 458-463.

- Burgdorf W.H.C., Plewig G., Wolff H.H., Landthaler M.: Choroby przydatków skóry. [w] Braun-Falco. Dermatologia. Tom II. Czelej; Lublin 2010: 1018-1041.
- Brauchle M., Funk J.O., Kind P., Werner S.: Ultraviolet B and H₂O₂ are potent inducers of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. *J Biol Chem* 1996; 271: 21793-21797.
- Breneman D.L., Stewart D., Hevia O., Hino P.D., Drake L.A.: A double-blind, multicenter clinical trial comparing efficacy of once-daily metronidazole 1 percent cream to vehicle in patients with rosacea. *Cutis* 1998; 61: 44-47.
- Brinell H., Friedel J., Caputa M., Carbanac M., Grosshans E.: Rosacea: disturbed defense against brain overheating. *Arch Dermatol Res* 1989; 281: 66-72.
- Buechner S.A.: Rosacea: an update. *Dermatology* 2005; 210: 100-108.
- Butterwick K.J., Butterwick L.S., Han A.: Laser and light therapies for acne rosacea. *J Drugs Dermatol* 2006; 5: 35-9.
- Całkosiński I., Dobrzyński M., Całkosińska M., Seweryn E., Bronowicka-Szydełko A., Dzierzba K., Ceremuga I., Gamian A.: Charakterystyka odczynu zapalnego. *Post Hig Med Dosw* 2009; 63: 395-408.
- Cameron D.J., Tong Z., Yang Z., Kaminoh J., Kamiyah S., Chen H., Zeng J., Chen Y., Luo L., Zhang K.: Essential role of Elovl4 in very long chain fatty acid synthesis, skin permeability barrier function, and neonatal survival. *Int J Biol Sci* 2007; 3: 111-119.
- Caubet C., Jonca N., Brattsand M., Guerrin M., Bernard D., Schmidt R., Egelrud T., Simon M., Serre G.: Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 1235-1244.
- Chamaillard M., Mortemousque B., Boralevi F., Marques da Costa C., Aitali F., Taïeb A., Léauté-Labrèze C.: Cutaneous and ocular signs of childhood rosacea. *Arch Dermatol* 2008; 144: 167-171.
- Chen X., Niyonsaba F., Ushio H., Nagaoka I., Ikeda S., Okumura K., Ogawa H.: Human cathelicidin LL-37 increases vascular permeability in the skin via mast cell activation, and phosphorylates MAP kinases p38 and ERK in mast cells. *J Dermatol Sci* 2006; 43: 63-66.
- Chen Z., O'Shea J.J.: Regulation of IL-17 production in human lymphocytes. *Cytokine*. 2008; 41: 71-78.
- Chodkiewicz J., Salamon M., Miniszewska J., Woźniacka A.: Psychospołeczne aspekty funkcjonowania osób chorych na trądzik różowaty. *Przeegl Lek* 2007; 64: 997-1001.
- Chu C.Y.: The use of 1% pimecrolimus cream for the treatment of steroid-induced rosacea. *Br J Dermatol* 2005;152: 396-399.
- Ciprandi G., De Amici M., Murdaca G., Fenoglio D., Ricciardolo F., Marseglia G., Tosca M.: Serum interleukin-17 levels are related to clinical severity in allergic rhinitis. *Allergy*. 2009; 64: 1375-8.

- Crabtree J.E., Covacci A., Farmery S.M., Xiang Z., Tompkins D.S., Perry S., Lindley I.J., Rappuoli R.: Helicobacter pylori induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. J Clin Pathol 1995; 48: 41-45.
- Crawford G.H., Pelle M.T., James W.D.: Rosacea: I. Etiology, pathogenesis, and subtype classification. J Am Acad Dermatol 2004; 51: 327-341.
- de Bersaques J.: Historical Notes on Rosacea. European Journal of Dermatology. 1995; 5: 16-22.
- Deleuran M., Ellingsen A.R., Paludan K., Schou C., Thestrup-Pedersen K.: Purified Der p1 and p2 patch tests in patients with atopic dermatitis: evidence for both allergenicity and proteolytic irritancy. Acta Derm Venereol 1998; 78: 241-243.
- Del Rosso J.Q.: Adjunctive skin care in the management of rosacea: cleansers, moisturizers, and photoprotectants. Cutis 2005; 75 (suppl 3): 17-21.
- Del Rosso J.Q.: Update on rosacea pathogenesis and correlation with medical therapeutic agents. Cutis 2006; 78: 97-100.
- Del Rosso J.Q., Webster G.F., Jackson M., Rendon M., Rich P., Torok H., Bradshaw M.: Two randomized phase III clinical trials evaluating anti-inflammatory dose doxycycline (40-mg doxycycline, USP capsules) administered once daily for treatment of rosacea. J Am Acad Dermatol 2007; 56: 791-802.
- Deroń E., Kieć-Świerczyńska M.: Rola Helicobacter pylori w powstawaniu chorób skóry. Medycyna Pracy, 2002; 53: 333-337.
- Descargues P., Deraison C., Prost C., Fraitag S., Mazereeuw-Hautier J., D'Alessio M., Ishida-Yamamoto A., Bodemer C., Zambruno G., Hovnanian A.: Corneodesmosomal cadherins are preferential targets of stratum corneum trypsin- and chymotrypsin-like hyperactivity in Netherton syndrome. J Invest Dermatol 2006; 126: 1622-1632.
- Desch C., Nutting W.B.: *Demodex folliculorum* (Simon) and *Demodex brevis* Akbulatova of man: redescription and reevaluation. J Parasitol 1972; 58: 169-177.
- Desch C., Nutting W.B.: Morphology and functional anatomy of *Demodex folliculorum* (Simon) of man. Acarologia 1977; 19: 422-462.
- Detmar M., Brown L.F., Claffey K.P., Yeo K.T., Kocher O., Jackman R.W., Berse B., Dvorak H.F.: Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. J Exp Med 1994; 180: 1141-1146.
- Dirshka T., Tronnier H., Folster-Holst R.: Epithelial barrier function and atopic diathesis in rosacea and perioral dermatitis. Br J Dermatol 2004; 150:1136-41.
- Dominey A., Rosen T., Tschen J.: Papulonodular demodicidosis associated with acquired immunodeficiency syndrome. J Am Acad Dermatol 1989; 20: 197-201.
- Dorschner R.A., Pestonjamas V.K., Tamakuwala S., Ohtake T., Rudisill J., Nizet V., Agerberth B., Gudmundsson G.H., Gallo R.L.: Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A Streptococcus. J Invest Dermatol 2001; 117: 91-97.

- Downing D.T., Strauss J.S.: Synthesis and composition of surface lipids of human skin. *J Invest Dermatol* 1974; 62: 228–244.
- Drake D.R., Brogden K.A., Dawson D.V., Wertz P.W.: Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface. *J Lipid Res* 2008; 49: 4–11.
- Egan C.A., Rallis T.M., Meadows K.P., Krueger G.G.: Rosacea induced by beclomethasone dipropionate nasal spray. *Int J Dermatol* 1999; 38: 133-134.
- Elewski B.E.: Percutaneous absorption kinetics of topical metronidazole formulations in vitro in the human cadaver skin model. *Adv Ther* 2007; 24: 239–246.
- Elewski B.E., Draelos Z., Dréno B., Jansen T., Layton A., Picardo M.: Rosacea - global diversity and optimized outcome: proposed international consensus from the Rosacea International Expert Group. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25: 188-200.
- Elston D.M.: *Demodex* mites: facts and controversies. *Clin Dermatol.* 2010; 28:502-504.
- Erbagci Z., Ozgoztasi O.: The significance of *Demodex folliculorum* density in rosacea. *Int J Dermatol* 1998; 37: 421–425.
- Esterly N.B., Furey N.L., Flanagan L.E.: The effect of antimicrobial agents on leucocyte chemotaxis. *J Invest Dermatol*, 1978; 70: 51-55.
- Feldman S.R., Hollar C.B., Gupta A.K., Fleischer A.B. Jr.: Women commonly seek care for rosacea: dermatologists frequently provide the care. *Cutis* 2001; 68: 156-160.
- Fernandez-Obregon A., Patton D.L.: The role of *Chlamydia pneumoniae* in the etiology of acne rosacea: response to the use of oral azithromycin. *Cutis* 2007; 79: 163-167.
- Firooz A., Firoozabadi M.R., Dowlati Y.: Rosacea fulminans (pyoderma faciale): successful treatment of a 3-year-old girl with oral isotretinoin. *Int J Dermatol* 2001; 40: 203-205.
- Forton F., Germaux M.A., Brasseur T., De Liever A., Laporte M., Mathys C., Sass U., Stene J.J., Thibaut S., Tytgat M., Seys B.: Demodicosis and rosacea: epidemiology and significance in daily dermatologic practice. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52: 74-87.
- Forton F., Seys B.: Density of *Demodex folliculorum* in rosacea: a casecontrol study using standardized skin-surface biopsy. *Br J Dermatol* 1993; 128: 650-659.
- Forton F.M.: Papulopustular rosacea, skin immunity and *Demodex*: pityriasis folliculorum as a missing link. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2012; 26: 19-28.
- Frampton J.E., Wagstaff A.J.: Azelaic acid 15% gel: in the treatment of papulopustular rosacea. *Am J Clin Dermatol* 2004; 5: 57-64.
- Frieden I.J., Prose N.S., Fletcher V., Turner M.L.: Granulomatous perioral dermatitis in children. *Arch Dermatol* 1989; 125: 369-373.
- Fujiwara S, Okubo Y, Irisawa R, Tsuboi R. Rosaceiform dermatitis associated with topical tacrolimus treatment. *J Am Acad Dermatol.* 2010; 62:1050-1052.

- Gauwerky K., Klövekorn W., Korting H.C., Lehmann P., Meigel E.M., Reinel D., Ruzicka T., Schaller M., Schöfer H., Tietze J.: Rosacea. *J Dtsch Dermatol Ges* 2009; 7: 996-1003.
- Georgala S., Katoulis A.C., Kylafis G.D., Koumantaki-Mathioudaki E., Georgala C., Aroni K.: Increased density of *Demodex folliculorum* and evidence of delayed hypersensitivity reaction in subjects with papulopustular rosacea. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001; 15: 441-444.
- Gomaa A.H., Yaar M., Eyada M.M., Bhawan J.: Lymphangiogenesis and angiogenesis in non-phymatous rosacea. *J Cutan Pathol* 2007; 34: 748-753.
- Gortel K.: Update on canine demodicosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2006; 36: 229-241.
- Guin J.D.: Complications of topical hydrocortisone. *J Am Acad Dermatol* 1981; 4: 417-422.
- Gupta A.K., Chaudhry M.M.: Rosacea and its management: an overview. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005; 19: 273-285.
- Guzman-Sanchez D.A., Ishiujii Y., Patel T., Fountain J., Chan Y.H., Yosipovitch G.: Enhanced skin blood flow and sensitivity to noxious heat stimuli in papulopustular rosacea. *J Am Acad Dermatol* 2007; 57: 800-805.
- Hanemaaijer R., Visser H., Koolwijk P., Sorsa T., Salo T., Golub L.M.: Inhibition of MMP synthesis by doxycycline and chalcally modified tetracyclines (CMTs) in human endothelial cells. *Adv Dent Res* 1998; 12: 114-118.
- Helm K.F., Menz J., Gibson L.E., Dicken C.H.: A clinical and histopathologic study of granulomatous rosacea. *J Am Acad Dermatol* 1991; 25: 1038-1043.
- Herr H., You C.H.: Relationship between *Helicobacter pylori* and rosacea: it may be a myth. *J Korean Med Sci* 2000; 15: 551-4.
- Hoting E., Paul E., Plewig G.: Treatment of rosacea with isotretinoin. *Int J Dermatol* 1986; 25:660-3.
- Hsu C.K., Hsu M.M.-L., Lee J.Y.: Demodicosis: A clinicopathological study. *J Am Acad Dermatol* 2009; 60: 453-462.
- Hus I., Maciąg E., Roliński J.: Znaczenie limfocytów Th17 w odporności przeciwnowotworowej. *Post Hig Med Dosw* 2010; 64: 244-250.
- Ivy S.P., Mackall C.L., Gore L., Gress R.E., Hartley A.H.: Demodicidosis in childhood acute lymphoblastic leukemia; an opportunistic infection occurring with immunosuppression. *J Pediatr* 1995; 127: 751-754.
- Izikson L., English J.C. 3rd, Zirwas M.J.: The flushing patient: differential diagnosis, workup, and treatment. *J Am Acad Dermatol* 2006; 55: 193-208.
- Jackson W.B.: Blepharitis: current strategies for diagnosis and management. *Can J Ophthalmol* 2008; 43: 170-179.
- Jansen T., Plewig G.: Rosacea: classification and treatment. *J R Soc Med* 1997; 90: 144-150.

- Jarmuda S., O'Reilly N., Zaba R., Jakubowicz O., Szkaradkiewicz A., Kavanagh K.: Potential role of *Demodex* mites and bacteria in the induction of rosacea. *J Med Microbiol.* 2012; 61: 1504-10.
- Jaworek A.K., Wojas-Pelc A., Obtulowicz A.: Ziarniniakowaty trądzik różowaty – analiza przypadku klinicznego. *Dermatol Estet*, 2006; 8(47): Suppl 390.
- Jing X., Shuling G., Ying L.: Environmental scanning electron microscopy observation of the ultrastructure of *Demodex*. *Microsc Res Tech* 2005; 68:284-289.
- Johnson D.R., Bhatnagar R.S., Knoll L.J., Gordon J.I.: Genetic and biochemical studies of protein N-myristoylation. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 869–914.
- Jones D.: Reactive oxygen species and rosacea. *Cutis* 2004; 74: 17–20.
- Kafienah W., Buttle D.J., Burnett D., Hollander A.P.: Cleavage of native type I collagen by human neutrophil elastase. *Biochem J* 1998; 330: 897–902.
- Kałużna L.: Zmiany oczne w trądziku różowatym. *Dermatol Estet* 2004; 4: 162-8.
- Karıncaoglu Y., Bayram N., Aycan O., Esrefoglu M.: The clinical importance of *Demodex folliculorum* presenting with nonspecific facial signs and symptoms. *J Dermatol* 2004; 31: 618–626.
- Karıncaoglu Y., Esrefoglu Seyhan M., Bayram N., Aycan O., Taskapan H.: Incidence of *Demodex folliculorum* in patients with end stage chronic renal failure. *Renal Failure* 2005; 27: 495-499.
- Kaszuba A., Adamski Z.: *Leksykon dermatologiczny. Tom II.* Czelej Lublin 2011.
- Kawahara T., Kuwano Y., Teshima-Kondo S., Kawai T., Nikawa T., Kishi K., Rokutan K.: Toll-like receptor 4 regulates gastric pit cell responses to *Helicobacter pylori* infection. *J Med Invest* 2001; 48:190-197.
- Kheirkhah A., Casas V., Li W., Raju V.K., Tseng S.C.: Corneal manifestations of ocular *Demodex* infestation. *Am J Ophthalmol* 2007; 143: 743-749.
- Kim J.T., Lee S.H., Chun Y.S., Kim J.C.: Tear cytokines and chemokines in patients with *Demodex* blepharitis. *Cytokine* 2011; 53: 94-99.
- Kligman A.M.: Ocular rosacea: current concepts and therapy. *Arch Dermatol* 1997;133: 89-90.
- Kroshinsky D., Glick S.A.: Pediatric rosacea. *Dermatol Ther* 2006; 19: 196–201.
- Kuhnigk T., Borst E.M., Breunig A., König H., Collins M.D., Hutson R.A., Kämpfer P.: *Bacillus oleronius* sp.nov., a member of the hindgut flora of the termite *Reticulitermes santonensis* (Feytaud). *Can J Microbiol* 1995; 41: 699-706.
- Kurkcuoğlu N., Alaybeyi F.: Substance P immunoreactivity in rosacea. *J Am Acad Dermatol* 1991; 25: 725-726.

- Kyriakis K.P., Palamaras I., Terzoudi S., Emmanuelides S., Michailides C., Pagana G.: Epidemiologic aspects of rosacea. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53: 918–919.
- Labro M.T.: Anti-inflammatory activity of macrolides: a new therapeutic potential? *J Antimicrob Chemother* 1998; 41(Supl B): 37-46.
- Lacey N., Delaney S., Kavanagh K., Powell F.C.: Mite-related bacterial antigens stimulate inflammatory cells in rosacea. *Br J Dermatol* 2007; 157: 474-481.
- Lacey N., Kavanagh K., Tseng S.C.: Under the lash: *Demodex* mites in human diseases. *Biochem (Lond)* 2009; 31: 2-6.
- Lacey N., Ní Raghallaigh S., Powell F.C.: *Demodex* mites - commensals, parasites or mutualistic organisms? *Dermatology*. 2011; 222: 128-30.
- Lazaridou E., Giannopoulou C., Fotiadou C., Vakirlis E., Trigoni A., Ioannides D.: The potential role of microorganisms in the development of rosacea. *J Dtsch Dermatol Ges* 2011; 9: 21-25.
- Lee D.Y., Yamasaki K., Rudsil J., Zouboulis C.C., Park G.T., Yang J.M., Gallo R.L.: Sebocytes express functional cathelicidin antimicrobial peptides and can act to kill propionibacterium acnes. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 1863-1866.
- Li J., O'Reilly N., Sheha H., Katz R., Raju V.K., Kavanagh K., Tseng S.C.: Correlation between ocular *Demodex* infestation and serum immunoreactivity to *Bacillus* proteins in patients with Facial rosacea. *Ophthalmology*. 2010; 117: 870-877.
- Lonne-Rahm S.B., Fischer T., Berg M.: Stinging and rosacea. *Acta Derm Venereol* 1999; 79: 460-461.
- Maciejewska-Udziela B.: Trądzik różowaty (rosacea). Część I. Epidemiologia, klinika, etiopatogeneza. *Probl Lek* 1980; 19: 107-118.
- Marks R.: Concepts in the pathogenesis of rosacea. *Br J Dermatol* 1968; 80:170-177.
- Marks R., Jones E.W.: Disseminated rosacea. *Br J Dermatol* 1969; 81: 16-28.
- Marks R., Beard R.J., Clark M.L., Kwok M., Robertson W.B.: Gastrointestinal observations in rosacea. *Lancet* 1967; 1: 739-43.
- Marks R., Harcourt-Webster J.N.: Histopathology of rosacea. *Arch Dermatol* 1969; 100: 683-91.
- Marples R.R., Downing D.T., Kligman A.M.: Control of free fatty acids in human surface lipids by *Corynebacterium acnes*. *J Invest Dermatol* 1971; 56:127–131.
- Massa M., Su W.: Pyoderma faciale: A clinical study of twenty-nine patients. *J Am Acad Dermatol* 1982; 6: 84-91.
- McCulley J.P., Dougherty J.M., Deneau D.G.: Classification of chronic blepharitis. *Ophthalmology* 1982; 89:1173–1180.

- Meylan E., Tschopp J., Karin M.: Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 2006; 442: 39-44.
- Michael I.P., Sotiropoulou G., Pampalakis G., Magklara A., Ghosh M., Wasney G., Diamandis E.P.: Biochemical and enzymatic characterization of human kallikrein 5 (hK5), a novel serine protease potentially involved in cancer progression. *J Biol Chem* 2005; 280: 14628-14635.
- Millikan L.: The proposed inflammatory pathophysiology of Rosacea: implications for treatment. *Skinmed* 2003; 2: 43-47.
- Miyachi Y.: Pharmacologic modulation of neutrophil functions. *Clin Dermatol* 2000;18: 369-373.
- Miyachi Y.: Potential antioxidant mechanism of action for metronidazole: implications for rosacea management. *Adv Ther* 2001;18: 237-243.
- Murphy A., O'Keane J.C., Blayney A., Powell F.C.: Cutaneous presentation of nasal lymphoma: a report of two cases. *J Am Acad Dermatol* 1998; 38: 310-313.
- Nagasaka T., Brinell H., Hales J.R., Ogawa T.: Selective brain cooling in hyperthermia: the mechanisms and medical implications. *Med Hypotheses* 1998; 50: 203-211.
- Nagy I., Pivarcsi A., Kis K., Koreck A., Bodai L., McDowell A., Seltsmann H., Patrick S., Zouboulis C.C., Kemény L.: Propionibacterium acnes and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. *Microbes Infect.* 2006; 8: 2195-2205.
- Nakamura K., Johnson W.C.: Ultraviolet light induced connective tissue changes in rat skin: a histopathologic and histochemical study. *J Invest Dermatol* 1968; 51: 253-258.
- Neumann E., Frithz A.: Capillaropathy and capillaroneogenesis in the pathogenesis of rosacea. *Int J Dermatol* 1998; 37: 263-266.
- Nicolaides N.: Skin lipids: their biochemical uniqueness. *Science* 1974; 186: 19-26.
- Nielsen P.: A double-blind study of 1% metronidazole cream versus systemic oxytetracycline therapy for rosacea. *Br J Dermatol* 1983; 109: 63-65.
- Ní Raghallaigh S., Bender K., Lacey N., Brennan L., Powell F.C.: The fatty acid profile of the skin surface lipid layer in papulopustular rosacea. *Br J Dermatol* 2012; 166: 279-287.
- Okyay P., Ertabaklar H., Savk E., Erfug S.: Prevalence of *Demodex folliculorum* in young adults: relation with sociodemographic/hygienic factors and acne vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2006; 20: 474-476.
- O'Leary P., Kierland R.: Pyoderma faciale. *Arch Dermatol Syphilol* 1940; 41: 451-462.
- Oltz M., Check J.: Rosacea and its ocular manifestations. *Optometry*, 2011; 82(2): 92-103.
- O'Reilly N., Bergin D., Reeves E.P., McElvaney N.G., Kavanagh K.: Demodex-associated bacterial proteins induce neutrophil activation. *Br J Dermatol* 2012; 166: 753-760.

- O'Reilly N., Menezes N., Kavanagh K.: Positive correlation between serum immunoreactivity to *Demodex*-associated *Bacillus* proteins and erythematotelangiectatic rosacea. *Br J Dermatol* 2012; 167: 1032-1036.
- Ozdemir M.H., Aksoy U., Sonmez E., Akisu C., Yorulmaz C., Hilal A.: Prevalence of *Demodex* in health personnel working in the autopsy room. *Am J Forensic Med Pathol* 2005; 26: 18-23.
- Pagnoni A., Kligman A.M., el Gammal S., Stoudemayer T.: Determination of density of follicles on various regions of the face by cyanoacrylate biopsy: correlation with sebum output. *Br J Dermatol* 1994; 131: 862-865.
- Pappu R., Ramirez-Carrozzi V., Ota N., Ouyang W., Hu Y.: The IL-17 family cytokines in immunity and disease. *J Clin Immunol* 2010; 30: 185-195.
- Parodi A., Guarrera M., Rebora A.: Flushing in rosacea: an experimental approach. *Arch Dermatol Res* 1980; 269: 269-273.
- Pelle M.T., Crawford G.H., James W.D.: Rosacea: II. Therapy. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51: 499-512.
- Powell F.C., Corbally N., Powell D.: Substance P and rosacea. *J Am Acad Dermatol* 1993; 28: 132-133.
- Powell F.C.: Epidemiologic data, triggering factors and clinical stages of rosacea. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1998; 11: 107.
- Powell F.C.: Rosacea and the pilosebaceous follicle. *Cutis* 2004; 74(suppl): 9-12, 32-34.
- Powell F.C.: Rosacea. *N Engl J Med* 2005; 352: 793-803.
- Quarterman M.J., Johnson D.W., Abele D.C., Leshner J.L. Jr., Hull D.S., Davis L.S.: Ocular rosacea. Signs, symptoms, and tear studies before and after treatment with doxycycline. *Arch Dermatol* 1997; 133: 49-54.
- Pye R.J., Meyrick G., Burton J.L.: Skin surface lipid composition in rosacea. *Br J Dermatol* 1976; 94:161-164.
- Quan T., Qin Z., Xia W., Shao Y., Voorhees J.J., Fisher G.J.: Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2009; 14: 20-24.
- Raszeja-Kotelba B., Jenerowicz D., Izdebska J.N., Bowszyc-Dmochowska M., Tomczak M., Dembińska M.: Niektóre aspekty zakażenia skóry nużeńcem ludzkim. *Wiadomości Parazytologiczne* 2004; 50: 41-54.
- Raszeja-Kotelba B, Pecold K, Pecold-Stępniewska H., Dadej I.: Oczny trądzik różowaty - aktualne dane etiopatogenetyczne, kliniczne i terapeutyczne oraz opis trzech przypadków. *Post Dermatol Alergol* 2004; 21: 144-150.
- Rebora A.: Rosacea. *J Invest Dermatol* 1987; 88: 56-60.
- Rebora A., Drago F., Parodi A.: May *Helicobacter pylori* be important for dermatologists? *Dermatology* 1995; 191: 6-8.

- Redett R.J., Manson P.N., Goldberg N., Girotto J., Spence R.J.: Methods and results of rhinophyma treatment. *Plast Reconstr Surg* 2001; 107: 1115-1123.
- Reifler D.M., Verdier D.D., Davy C.L., Mostow N.D., Wendt V.E.: Multiple chalazia and rosacea in a patient treated with amiodarone. *Am J Ophthalmol* 1987; 103: 594-595.
- Robak E., Kulczycka L.: Trądzik różowaty – współczesne poglądy na patomechanizm i terapię. *Post Hig Med Dosw* 2010; 64: 439-450.
- Roberts J.O., Ward C.M.: Rhinophyma. *J R Soc Med* 1985; 78: 678-681.
- Romiti R., Jansen T., Heldwein W., Plewig G.: Rosacea fulminans in a patient with Crohn's disease: a case report and review of the literature. *Acta Derm Venereol* 2000; 80: 127-129.
- Rosen T., Stone M.S.: Acne rosacea in blacks. *J Am Acad Dermatol* 1987; 17: 70-73.
- Rouvier E., Luciani M.F., Mattéi M.G., Denizot F., Golstein P.: CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol* 1993; 150: 5445-5456.
- Rufli T., Büchner S.A.: T-cell subsets in acne rosacea lesions and the possible role of *Demodex folliculorum*. *Dermatologica* 1984; 169: 1-5.
- Rufli T., Mumcuoglu Y.: The hair follicle mites *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis*: biology and medical importance. *Dermatologica* 1981; 162: 1-11.
- Saihan E.M., Burton J.L.: A double-blind trial of metronidazole versus oxytetracycline therapy for rosacea. *Br J Dermatol* 1980; 102: 443-445.
- Sapadin A.N., Fleischmajer R.: Tetracyclines: Nonantibiotic properties and their clinical implications. *J Am Acad Dermatol* 2006; 5: 258-265.
- Sauder D.N., Miller R., Gratton D., Danby W., Griffiths C., Phillips S.B., et al. The treatment of rosacea: the safety and efficacy of sodium sulfactemide 10 % and sulfur 5 % lotion (Novacet) is demonstrated in a double-blind study. *J Dermatol Treat* 1997; 8: 79-85.
- Schaefer I., Rustenbach S.J., Zimmer L., Augustin M.: Prevalence of skin diseases in a cohort of 48,665 employees in Germany. *Dermatology* 2008; 217: 169-172.
- Schauber J., Dorschner R.A., Coda A.B., Büchau A.S., Liu P.T., Kiken D., Helfrich Y.R., Kang S., Elalieh H.Z., Steinmeyer A., Zügel U., Bikle D.D., Modlin R.L., Gallo R.L.: Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2007; 117: 803-811.
- Segal A.W.: How neutrophils kill microbes. *Annual review of immunology* 2005; 23: 197-223.
- Semik-Orzech A., Barczyk A., Pierzchała W.: Rola cytokin z rodziny interleukiny 17 w rozwoju alergicznej reakcji zapalnej w układzie oddechowym. *Pneumonol Alergol Pol* 2006; 74: 409-413.

- Shanler S.D., Ondo A.L.: Successful treatment of the erythema and flushing of rosacea using a topically applied selective alpha 1-adrenergic receptor agonist, oxymetazoline. *Arch Dermatol* 2007; 143: 1369-1371.
- Sherertz E.F.: Acneiform eruption due to “megadose” vitamins B6 and B12. *Cutis* 1991; 48: 119-20.
- Sibenge S., Gawkrödger D.J.: Rosacea: a study of clinical patterns, blood flow, and the role of *Demodex folliculorum*. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26: 590-593.
- Sielska H., Saneczko M.: Trądzik różowaty - postacie nietypowe. *Post Dermatol Alergol* 2003; 20: 374-379.
- Smith M.F.Jr., Mitchell A., Li G., Ding S., Fitzmaurice A.M., Ryan K., Crowe S., Goldberg J.B.: Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 32552-32560.
- Soybe P.: Aetiology and pathogenesis of rosacea. *Acta Derm Venereol* 1950; 30: 137-53.
- Spickett S.G.: Studies on *Demodex folliculorum* Simon. *Parasitology* 1961; 51: 181-192.
- Starnes T., Robertson M.J., Sledge G., Kelich S., Nakshatri H., Broxmeyer H.E., Hromas R.: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. *J Immunol* 2001; 167: 4137-40.
- Starr P.A., Macdonald A.: Oculocutaneous aspects of rosacea. *Proc R Soc Med* 1969; 62: 9-11.
- Stewart M.E., Downing D.T.: Chemistry and function of mammalian sebaceous lipids. *Adv Lipid Res* 1991; 24:263–301.
- Stone D.U., Chodosh J.: Ocular rosacea: an update on pathogenesis and therapy. *Curr Opin Ophthalmol* 2004; 15: 499-502.
- Szepietowski J., Reich A.: Kwas azelainowy w podłożu żelowym: zastosowanie w trądziku zwykłym i różowatym. *Dermatologia Kliniczna* 2003, 5: 223-226.
- Szkaradkiewicz A.: Mikrobiologia lekarska. Repetytorium z bakteriologii. Wydawnictwo Naukowe UM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2011.
- Szkaradkiewicz A., Chudzicka-Strugała I., Karpiński T.M., Goślińska-Pawłowska O., Tułeczka T., Chudzicki W., Szkaradkiewicz A.K., Żaba R.: *Bacillus oleronius* and *Demodex* mite infestation in patients with chronic blepharitis. *Clin Microbiol. Infect.* 2012; 18: 1020–1025.
- Szlachcic A.: The link between *Helicobacter pylori* infection and rosacea. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2002; 16: 328-333.
- Szlachcic A., Sliwowski Z., Karczewska E., Bielański W., Pytko-Polonczyk J., Konturek S.J.: *Helicobacter pylori* and its eradication in rosacea. *J Physiol Pharmacol* 1999; 50: 777-786.

- Szpanka J., Dębowska R., Bazela K., Kaźmierczak E., Eris I.: Makijaż korekcyjny: ocena właściwości korygujących oraz pielęgnacyjnych fluidu intensywnie kryjącego. *Dermatol Estet* 2012; 3: 177-184.
- Szymańska-Skrzypek A., Burduk A., Betlejewski S.: Rhinophyma - diagnosis and treatment. *Otolaryngol Pol* 2005; 59: 581-584.
- Takeda K., Kaisho T., Akira S.: Toll-like receptors. *Ann Rev Immunol* 2003; 21: 335-76.
- Tsutsumi Y.: Deposition of IgD, alpha-1-antitrypsin and alpha-1-antichymotrypsin on *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis* infesting the pilosebaceous unit. *Pathol Int* 2004; 54: 32-34.
- Tyc-Zdrojewska E., Trznadel-Grodzka E., Kaszuba A.: Wpływ przewlekłych chorób skóry na jakość życia pacjentów. *Dermatologia Kliniczna* 2011; 13: 155-160.
- Uszyńska-Jast M., May H., Pulsujący laser barwnikowy w leczeniu trądziku różowatego. *Dermatol Estet* 1999; 4: 154-157
- Utas S., Ozbakir O., Turasan A., Utas C.: Helicobacter pylori eradication treatment reduces the severity of rosacea. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40: 433-435.
- van Zuuren E.J., Gupta A.K., Gover M.D., Graber M., Hollis S.: Systematic review of rosacea treatments. *J Am Acad Dermatol* 2007; 56: 107-115.
- Vincent C., Eris I.: Inhibitory metaloproteinaz w trądziku różowatym. *Dermatol Estet* 2004; 6: 25-28.
- Vollmer R.T.: *Demodex*-associated folliculitis. *Am J Dermatopathol* 1996;18:589-591.
- Weninger W., Rendell M., Mildner M., Tschachler E.: Retinoids downregulate vascular endothelial growth factor / vascular permeability factor production by normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 907-911.
- Wilkin J.K.: Oral thermal-induced flushing in erythematotelangiectatic rosacea. *J Invest Dermatol* 1981; 76: 15-18.
- Wilkin J.K.: Recognizing and managing rosacea. *Drug Ther* 1993; 23: 41-49.
- Wilkin J.K.: Rosacea. Pathophysiology and treatment. *Arch Dermatol* 1994; 130: 359-362.
- Wilkin J.K.: Why is flushing limited to a mostly facial cutaneous distribution? *J Am Acad Dermatol* 1988; 19: 309-313.
- Wilkin J., Dahl M., Detmar M., Drake L., Feinstein A., Odom R., Powell F.: Standard classification of rosacea: Report of the National Rosacea Society Expert Committee on the Classification and Staging of Rosacea. *J Am Acad Dermatol* 2002; 46: 584-587.
- Wilkin J., Dahl M., Detmar M., Drake L., Liang M.H., Odom R., Powell F.: National Rosacea Society Expert Committee. Standard grading system for rosacea: report of the National Rosacea Society Expert Committee on the classification and staging of rosacea. *J Am Acad Dermatol* 2004; 50: 907-912.

Wróbel T., Mazur G., Linder K., Ziółkowska J., IL-17 as a mediator of inflammation and angiogenesis. *Adv Clin Exp Med* 2005; 14: 555–558.

Yamasaki K., Di Nardo A., Bardan A., Murakami M., Ohtake T., Coda A., Dorschner R.A., Bonnart C., Descargues P., Hovnanian A., Morhenn V.B., Gallo R.L.: Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. *Nat Med* 2007; 13: 975-980.

Yamasaki K., Gallo R.L.: The molecular pathology of rosacea. *J Dermatol Sci* 2009; 55: 77-81.

Zegarska B., Placek W.: Zasady pielęgnacji skóry w przebiegu trądziku różowatego. *Dermatol Estet* 2004; 5: 281-285.

Zouboulis C.C., Baron J.M., Böhm M., Kippenberger S., Kurzen H., Reichrath J., Thielitz A.: Frontiers in sebaceous gland biology and pathology. *Exp Dermatol.* 2008; 17: 542-551.

Żaba R., Grzybowski G.: Leczenie trądziku różowatego izotretinoiną. *Dermatol Estet* 1999; 1: 106-111.

11. Załączniki

11.1. Formularz świadomej zgody pacjenta

FORMULARZ ŚWIADOMEJ ZGODY PACJENTA

Oświadczam, że dobrowolnie wyrażam zgodę na udział w badaniu pt. „**Rola bakterii *Bacillus oleronius* i roztoczy *Demodex folliculorum* w patogenezie trądzika różowatego**”.

1. Osoba prowadząca to badanie wyjaśniła mi w pełni jego cel, przebieg i przewidywany czas trwania.
2. Potwierdzam, że otrzymałem(am) i zapoznałem się z Kartą Informacji dla Pacjenta.
3. Miałem(am) możliwość zadania osobie prowadzącej badania wszelkich pytań związanych z badaniem i rozumiem wszystkie uzyskane wyjaśnienia.
4. Uprzedzony(a) o ewentualnych niepożądanych następstwach zdrowotnych wyrażam zgodę na pobranie ode mnie około 10 ml krwi oraz wycinka 1 mm skóry chorobowo zmienionej dla celów badawczych.
5. Zgadzam się na przedstawienie wyników otrzymanych w trakcie badania odpowiednim władzom medycznym i ich publikację w czasopiśmie medycznych, jednak bez ujawniania moich danych osobowych.
6. Mam świadomość, że mój udział w badaniu jest dobrowolny i że mogę wycofać swoją zgodę na udział w nim w dowolnym momencie, bez podawania przyczyny i bez żadnych konsekwencji.

Poznań, dnia

.....
(czytelny podpis pacjenta lub jego ustawowego przedstawiciela)

Ja niżej podpisany(a) wyjaśniłem(am) założenia i cel badania oraz odpowiedziałem(am) na wszystkie pytania oraz wątpliwości chorego.

Poznań, dnia

.....
(czytelny podpis osoby prowadzącej badanie)