

**Michalina Nowak- Gabryel**

„Ocena udziału roztoczy *Demodex* spp.  
w etiopatogenezie  
wybranych chorób narządu wzroku”

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor: dr hab. n. med. Jarosław Kocięcki, prof. UM

Katedra Okulistyki i Klinika Okulistyczna  
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego  
w Poznaniu

Poznań 2017

# SPIS TREŚCI

Wykaz stosowanych skrótów.....	4
1. Wstęp.....	6
1.1 Rys historyczny dotyczący zarażenia nużeńcem.....	6
1.2 Epidemiologia demodekozy.....	7
1.3 Budowa i rozwój nużeńca.....	8
1.4 Patogeneza i obraz kliniczny.....	14
1.5 Diagnostyka nużeńca.....	16
1.6 Anatomia aparatu ochronnego narządu wzroku.....	16
1.7 Obraz kliniczny chorób narządu wzroku, które mogą być wywołane obecnością roztoczy <i>Demodex spp.</i> .....	23
1.7.1 Przewlekłe zapalenie brzegów powiek.....	23
1.7.2 Nieprawidłowy wzrost rzęs.....	26
1.7.3 Madaroza (madarosis).....	27
1.7.4 Zespół suchego oka.....	27
1.7.5 Jęczmień.....	29
1.7.6 Gradówka.....	30
2. Cele pracy.....	31
3. Pacjenci.....	32
4. Metody.....	34
4.1 Badanie podmiotowe.....	34
4.2 Badanie przedmiotowe.....	36
4.2.1 Badanie odcinka przedniego oka.....	36
4.2.2 Badanie dna oka.....	38
4.2.3 Ocena jakościowa filmu łzowego.....	38
4.2.4 Ocena ilościowa filmu łzowego.....	39
4.3 Badania dodatkowe.....	39
4.3.1 Diagnostyka nużeńca.....	39
4.3.2 Oznaczenie stężenia IL-12p70 oraz IL-17A we łzach.....	43
4.3.3 Badanie flory bakteryjnej worka spojówkowego.....	45
5. Analiza statystyczna.....	47

6. Wyniki.....	48
6.1 Część I - Pacjenci objawowi oraz bezobjawowi.....	48
6.1.1 Analiza wyników badania podmiotowego.....	48
6.1.2 Analiza wyników badania przedmiotowego.....	50
6.1.3 Wyniki badań dodatkowych.....	55
a) Wyniki badania na obecność nużeńca.....	55
b) Wyniki badań immunologicznych.....	59
c) Wyniki badań mikrobiologicznych.....	61
6.2 Część II- pacjenci z nużeńcem oraz pacjenci bez nużeńca.....	62
6.2.1 Analiza wyników badania podmiotowego.....	62
6.2.2 Analiza wyników badania przedmiotowego.....	64
6.2.3 Wyniki badań dodatkowych.....	71
a) wyniki badań immunologicznych.....	71
b) wyniki badań mikrobiologicznych.....	72
6.2.4 Analizy dodatkowe.....	74
7. Dyskusja.....	78
8. Wnioski.....	96
9. Streszczenie.....	97
10. Summary.....	100
11. Piśmiennictwo.....	103
12. Załączniki.....	111

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- AIDS** Acquired Immunodeficiency Syndrome - zespół nabytego niedoboru odporności
- AMP** Antimicrobial peptides - peptydy przeciwdrobnoustojowe
- BCC** Basal Cell Carcinoma - rak podstawno-komórkowy
- CALT** Conjunctiva- Associated Limfoid Tissue - Tkanka limfatyczna spojówki
- CBA** Cytometric Bead Array
- CD** Cluster of Differentiation - cząsteczka różnicowania komórek
- EALT** Eye Associated Limfoid Tissue - tkanka limfatyczna oka
- G-CSF** Granulocyte Colony-Stimulating Factor - Czynn timer stymulujący tworzenie kolonii granulocytów
- HAEM** Agar czekoladowy
- HIV** Human Immunodeficiency Virus- ludzki wirus niedoboru odporności
- HSV-1** Herpes Simplex Virus - wirus opryszczki pospolitej
- IF** interferon
- Ig** immunoglobulina
- IL** interleukina
- LIPCOF** Lip Parallel Conjunctival Folds - fałdy spojówkowe równoległe do brzegu powieki
- MGD** Meibomian Gland Dysfunction - dysfunkcja gruczołów Meiboma
- MIP 1B** Macrophage inflammatory protein 1 beta- białko zapalne makrofagów 1beta
- MMPs** Matrix Metaloproteinase - metaloproteinaza tkankowa
- MUC** mucyna
- n** liczba danych
- NFκB** Nuclear Factor kappa B - czynnik jądrowy kappa B
- NKT** Natural Killer T-cells - limfocyty NK
- OSDI** Ocular Surface Disease Index - Wskaźnik chorób powierzchni oka
- PAMP** Pathogen-Associated Molecular Patterns - wzorce molekularne związane z patogenami
- (p)Ig** Polymeric Immunoglobulin - polimeryczna immunoglobulina
- (p)IgR** Polymeric Immunoglobulin Receptor - receptor polimerycznej

immunoglobuliny

- PRR** Pattern Recognition Receptors - receptory rozpoznające wzorce (patogeny)
- sIg** secretory Immunoglobulin - wydzielnicza immunoglobulina
- TBUT** tear break-up test - test przzerwania ciągłości filmu łzowego
- Th** T helper cells - limfocyty T (grasiczozależne) pomocnicze
- TLR** Toll- like receptors - błonowe receptory należące do receptorów rozpoznających wzorce
- TNF** Tumor Necrotizing Factor - czynnik martwicy nowotworów
- TSA** agar tryptozowo-sojowy
- TSB** Trypticasein Soy Broth - bulion tryptozowo-sojowy
- VEGF** Vascular endothelial Growth Factor - czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego
- ZSO** Zespół Suchego Oka

# 1. Wstęp

## 1.1 Rys historyczny dotyczący zarażenia nużeńcem

Nużeniec (*Demodex spp.*) jest pasożytem należącym do roztoczy. Po raz pierwszy został zidentyfikowany przez Bergera w listopadzie 1841 roku, podczas badania woskowiny z przewodu słuchowego zewnętrznego [1]. W tym samym roku Henle zaobserwował, iż roztocza obecne są również na skórze twarzy. Od tego czasu opisano około 140 gatunków tego pasożyta [2].

W 1842 roku niemiecki dermatolog Gustav Simon jako pierwszy opisał wielopostaciowość *Demodex folliculorum*. Dokonał tego na podstawie badania pod mikroskopem wydzieliny z gruczołów łojowych skóry okolicy nosa [2,3]. Opisał on nużeńca jako mikroorganizm robakowatego kształtu, który wykazywał ruch i składał się z głowy, odnóży oraz tułowia zbudowanego z części przedniej i tylnej. Po nim podobnych obserwacji dokonali również inni autorzy, tacy jak Wilson (1844), Hirst (1919) oraz Fuss (1933, 1935, 1937) [1].

Termin *Demodex* wprowadzony został w roku 1843 przez Richarda Owena. Wywodził się z języka greckiego i składał z dwóch członów: „demo” (gr.: tłuszcz) oraz „dex” (gr.: kornik/nudny robak), co miało oznaczać „nudnego robaka żyjącego w tłuszczu” i doskonale opisywało formę oraz miejsce występowania tego organizmu [3,4].

Związek nużeńca z narządem wzroku zaobserwował w 1875 roku Beclar, który stwierdził obecność nużeńca ludzkiego na brzegach powiek, natomiast dziesięć lat później Burchard odkrył, iż nużeńce mogą być obecne w gradówce. Cykl życiowy nużeńca ludzkiego został opisany przez Spicketta w 1961 r.

*Demodex brevis* po raz pierwszy opisany został znacznie później, bo w 1963 roku przez Akbulatovę, wówczas jednak uważany był za jeden z dwóch podgatunków *Demodex folliculorum*, tj. *Demodex folliculorum brevis* [5].

Dopiero w roku 1972 Desch i Nutting dokonali pierwszego dokładnego opisu anatomicznego obu gatunków nużeńca ludzkiego [5,6]

## 1.2 Epidemiologia demodekozy

Obecność nużeńca odnotowywana jest u wszystkich ras ludzkich, na różnych szerokościach geograficznych [7,8]. Jest on ektopasożytem należącym do grupy organizmów najczęściej zasiedlających skórę człowieka. Do zarażenia się nużeńcem może dojść przez kontakt bezpośredni ze skórą zarażonej osoby lub pośrednio, za pomocą pościeli, ręczników, kosmetyków lub kurzu (który zawierać może jaja nużeńca). Istnieją również doniesienia na temat możliwości przeniesienia nużeńca wśród osób pracujących przy użyciu mikroskopów [9].

Nie odnotowano różnic w częstości występowania nużeńca ze względu na płeć [10,11,12], natomiast istnieje różnica w proporcji częstości występowania gatunków *Demodex brevis* i *Demodex folliculorum*, która u mężczyzn wynosi 1:4, natomiast u kobiet 1:10 [13].

Odnotowano, iż odsetek zarażeń nużeńcem wzrasta wraz z wiekiem pacjentów. Liu i wsp. donoszą o obecności roztoczy na skórze u 84% pacjentów powyżej 60 r.ż., podczas gdy u badanych powyżej 70 r.ż. odsetek zarażenia wynosił 100 % [14].

Według innych doniesień, odsetek osób zarażonych nużeńcem wynosi od 20% do 80% i wzrasta pomiędzy drugą a szóstą dekadą życia, po czym utrzymuje się na stałym poziomie do 80 r.ż. [15]. Co ciekawe, pasożyty nie występują na skórze noworodków, choć odnotowano zasiedlanie przez roztocza gruczołów łojowych skóry we wczesnym dzieciństwie oraz w wieku dojrzewania poprzez zarażenie od dorosłych członków rodziny. Niska częstość występowania nużeńca u dzieci może mieć związek z wydzielaniem niewielkiej ilości łoju przez gruczoły łojowe Zeissa i gruczoły tarczkowe Meiboma [16,17,18,19]. Interesujący jest fakt niskiego odsetka występowania pasożyta na skórze osób w wieku dojrzewania, u których produkcja łoju jest bardzo wysoka [20].

Istnieją badania na temat predyspozycji genetycznej do zarażenia nużeńcem, w których wykazano, że osoby z fenotypem HLA-Cw2 i HLACw4 są mniej odporne na zarażenie niż osoby z fenotypem HLA-A2. Może mieć to związek z obniżeniem prawidłowej liczby limfocytów NK [19,21]. Odnotowano również zależność pomiędzy występowaniem demodekozy a występowaniem fenotypu A3-Cw4, A3-Cw2, A3-B17, A3-B35 oraz B35-Cw4 [22]. Do zajęcia większej powierzchni skóry przez pasożyta może dojść u osób z fenotypem A2. Osoby te posiadają wyższy poziom limfocytów CD8+, wyższą aktywność leukocytów oraz niższe stężenie IgA. Natomiast wyższa

średnia gęstość pasożytów mogąca prowadzić do poważnego uszkodzenia skóry występuje częściej u osób z fenotypem Cw2. U tych pacjentów występuje podwyższony poziom aktywności fagocytarnej oraz obniżony poziom CD3+ [23]. Wykazano również, że u pacjentów z demodekozą poziom CD95+ jest podwyższony, natomiast CD3+,CD4+, CD8+ oraz CD16+, a także stosunek CD3+/CD20+ obniżony [19,22]. Zauważono, że osoby z fenotypem Cw2 oraz Cw4 mają większe ryzyko rozwinięcia objawów klinicznych demodekozy.

Objawy kliniczne związane z obecnością nużeńca na skórze i brzegach powiek różnią się w zależności od gatunku. *Demodex folliculorum* może powodować rumień i złuszczenie się naskórka, a u nasady rzęs może wystąpić pojawienie się tzw. łupieżu cylindrycznego oraz przekrwienia brzegów powiek. *Demodex brevis* powoduje symetrycznie rozmieszczone wykwity grudkowo-krostkowe na powiekach oraz zaburzenia w działalności wydzielniczej gruczołów Meiboma i powikłania z tym związane.

### 1.3 Budowa i rozwój nużeńca

Nużeniec (*Demodex spp.*) jest to pajęczak należący do roztoczy (*Acarina*), rodziny nużeńcowatych (*Demodiacidae*). Ma kształt robakowaty, a ciało pokryte oskórkiem. Zbudowany jest z dwóch części: szyjno-głowej oraz tułowia połączonego z ogonem. Część przednią nużeńca stanowi trapezoidalna *gnathosoma* posiadająca aparat gębowy i będąca morfologicznie dopasowaną do pokarmu, jakim żywi się ten pasożyt. Znajdują się na niej szczękoczułki (chelicery) oraz nogogłaszczki (pedipalpy). Szczękoczułki są ostre, sztyletowate i służą nużeńcom do pobierania oraz krojenia pokarmu. Nogogłaszczki natomiast biorą udział w przytrzymywaniu zdobytgo pożywienia. Pozostałą część ciała nużeńca stanowią *podosoma* (z czterema krótkimi, wałeczkowatymi parami odnóży zakończonymi pazurkami) oraz charakterystycznie prążkowana *opithosoma*, która jest silnie wydłużona i może stanowić nawet 80 % długości pasożyta [24]. Co ciekawe, organizm nużeńców zawiera przewód pokarmowy, który nie jest zakończony odbytem. Strawiony pokarm jest usuwany na zewnątrz organizmu po śmierci pasożyta, podczas jego rozpadu [3].

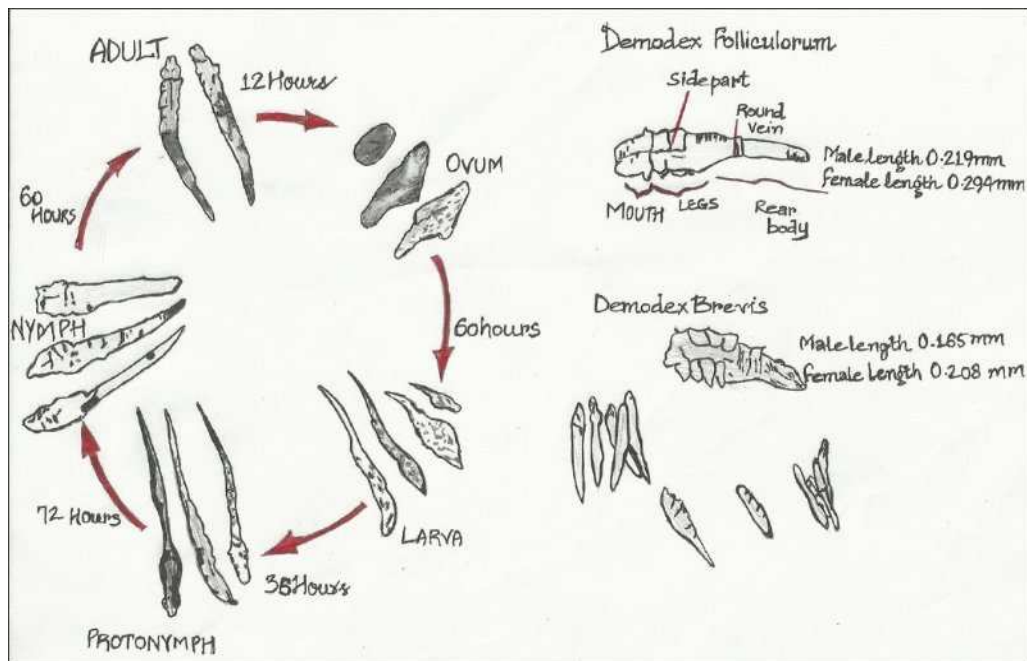
Do tej pory opisano ponad 100 gatunków, z czego wszystkie są wysoce wyspecjalizowane i obligatoryjnie związane ze swoimi żywicielami, do których należą zwierzęta domowe (psy, koty), hodowlane (konie, bydło, owce, kozy, świnie, króliki),

dzikie (łośie, jelenie, sarny), gryzonie (chomiki, szczury, myszy) i nietoperze. Tylko dwa z opisanych dotąd gatunków, tj. nużeniec ludzki (*Demodex folliculorum*) oraz nużeniec krótki (*Demodex brevis*)(Tab.I) bytują na człowieku. Gatunki występujące u zwierząt nie są chorobotwórcze dla człowieka, natomiast nużeńce ludzkie nie pasożytują na zwierzętach.

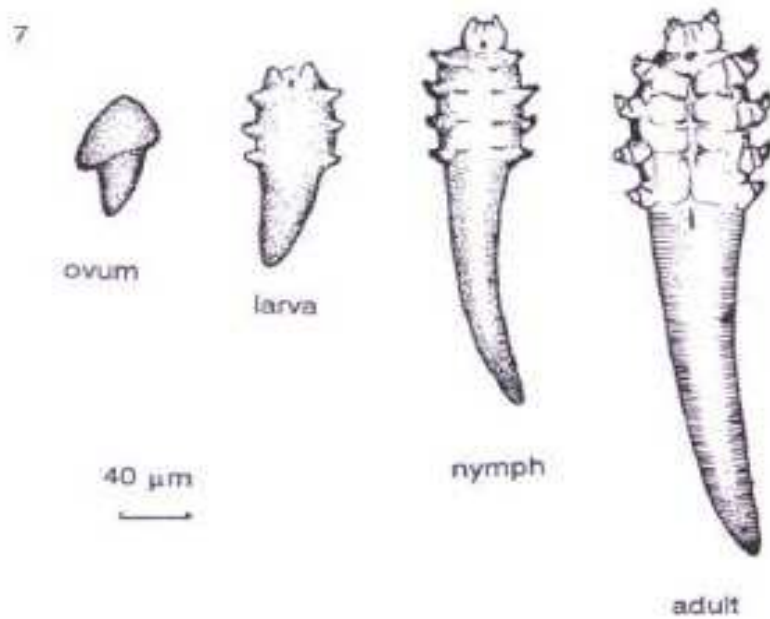
Nużeniec ludzki osiąga 0,3-0,4 mm długości, a jego postać larwalna ma długość 280-365  $\mu\text{m}$ . Dokładne wymiary podał w swojej pracy Hom, według którego długość dorosłych osobników wynosi 286  $\mu\text{m}$ , larwy mierzą 283  $\mu\text{m}$ , protonimfy osiągają długość 364  $\mu\text{m}$ , przy zachowaniu takiej samej szerokości jak osobniki dorosłe, natomiast nimfy i deutonimfy są zarówno dłuższe jak i 20% szersze, osiągając 392  $\mu\text{m}$  długości [25]. Samice nużeńców są nieco większe od samców. Pasożyt ten ma podłużny kształt i umiejscawia się w ujściach mieszków włosowych. Bytuje w skupiskach, najczęściej po kilka osobników.

Drugi z omawianych pasożytów, tj. nużeniec krótki, osiąga długość 0,2-0,3 mm i posiada krótsze odnóża. Jego larwy mają wymiary od 105 do 165  $\mu\text{m}$ . Zazwyczaj żyje samotnie, zasiedlając gruczoły łojowe skóry twarzy oraz gruczoły Meiboma, których ujścia znajdują się na brzegach powiek. Mimo, że nużeniec ludzki występuje liczniej na skórze i brzegach rzęs, nużeniec krótki zasiedla większy obszar na ciele.

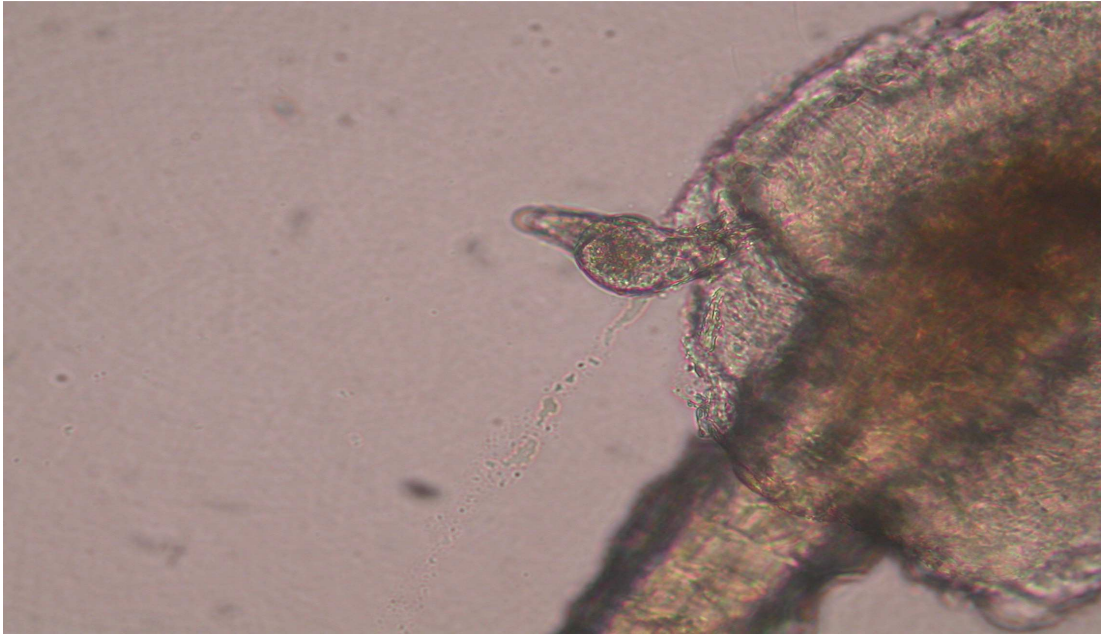
Cykl rozwojowy nużeńca trwa około 14 do 18 dni i zachodzi na jednym żywicielu (Ryc.1, Ryc.2). Do kopulacji dochodzi na powierzchni skóry, przy wejściu do mieszka włosowego. Następnie samice przemieszczają się do wnętrza gruczołu łojowego, gdzie składają około 20 jaj o wielkości 50-60  $\mu\text{m}$  (Ryc.3). Po około 60 godzinach wylęgają się z nich beznożne larwy, które po pewnym czasie przybierają postać 6-nożnych protonimf. Wydostają się one ponownie do ujścia mieszka włosowego, a następnie linieją na powierzchni skóry, przeobrażając się w 8-nożne nimfy (Ryc.4) [7,26]. Nimfy linieją dwukrotnie i w ten sposób przeobrażają się w dojrzałe samce i samice (Ryc.5, Ryc.6) [7].



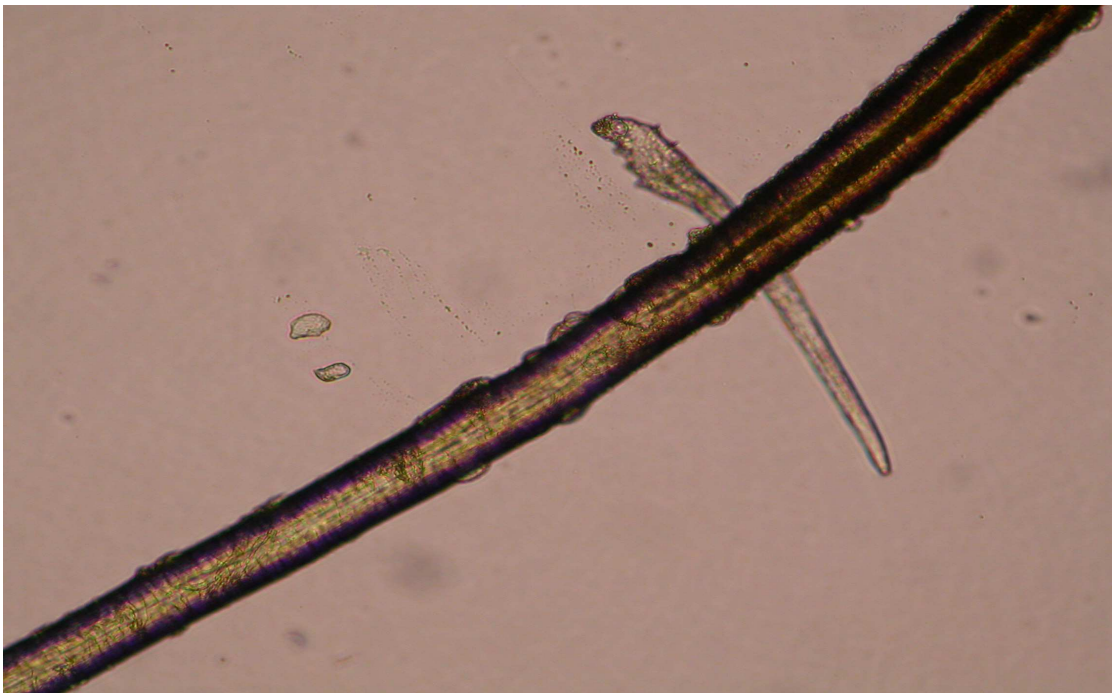
Rycina 1. Cykl życiowy nużeńca. (Parvaiz Anwar Rather, Iffat Hassan: Human *Demodex* Mite: The Versatile Mite of Dermatological Importance, Indian J Dermatol. 2014 Jan-Feb; 59(1): 60–66.)



Rycina 2. Fazy rozwoju nużeńca: jajo, larwa, nimfa, osobnik dorosły. (English, F. et al. (2006) The natural history of demodectic mites on the skin of the eyelid margin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2(2) 132-136)



Rycina 3. Obraz mikroskopowy jaja nużeńca ludzkiego (*Demodex folliculorum*), mikroskop świetlny, mat. własny.



Rycina 4. Obraz mikroskopowy nimfy nużeńca ludzkiego (*Demodex folliculorum*)-mikroskop świetlny, mat. własny.

Na każdym z etapów rozwojowych nużeńce unikają światła słonecznego, a ich ruch odbywa się nocą. Wychodzą wówczas z mieszków włosowych i wędrują po powierzchni skóry z prędkością 16 mm/godzinę w poszukiwaniu partnera do rozrodu [3]. Wędrują tylko samce, natomiast samice pozostają w mieszku włosowym lub gruczole łojowym. W ciemnym i wilgotnym środowisku nużeńce cechują się dość dużą żywotnością i mogą przeżyć nawet do 21 dni [26].



Rycina 5. Obraz mikroskopowy nimfy nużeńca w trakcie linienia - mikroskop świetlny ( materiał własny)



Rycina 6. Obraz mikroskopowy nużeńca ludzkiego (*Demodex folliculorum*) - osobniki dorosłe, nimfy oraz jajo - mikroskop świetlny ( materiał własny).



Rycina 7. Obraz mikroskopowy nużeńca ludzkiego (*Demodex folliculorum*) osobniki dorosłe, nimfy oraz jajo- mikroskop świetlny, (materiał własny).

We wszystkich stadiach rozwojowych nużeńca jego pożywienie stanowią komórki naskórka oraz składniki łoju i w związku z tym nużeniec zasiedla rejony bogate w gruczoły łojowe, jak skóra twarzy (nos, policzki, czoło, broda), przewód słuchowy zewnętrzny oraz skóra klatki piersiowej i okolic genitalnych.

Przy użyciu szczękoczułek roztocza przecinają komórki nabłonka skóry gospodarza, następnie wydzielają na zewnątrz enzymy lityczne (wśród nich proteazy) trawiąc w ten sposób wstępnie pokarm, po czym rozpuszczone, płynne składniki zasysają do przewodu pokarmowego [6]. W ten sposób dochodzi do niszczenia komórek naskórka oraz naruszenia bariery naskórkowej.

Tabela I. Nużeniec - cechy charakterystyczne gatunków występujących u człowieka.

	<i>Demodex folliculorum</i>	<i>Demodex brevis</i>
Rozmiary	300- 400 $\mu\text{m}$	250-280 $\mu\text{m}$
Miejsce bytowania w okolicy oczu	-mieszki włosowe rzęs i brwi - gruczoły łojowe Zeissa - żyją gromadnie	-gruczoły tarczkowe Meiboma - żyją pojedynczo
Główne dolegliwości	przewlekłe przednie zapalenie brzegów powiek	tylne zapalenie brzegów powiek

#### 1.4 Patogeneza i obraz kliniczny

Chorobotwórczość nużeńca jest tematem dyskusji naukowców od wielu lat, ale tylko roztocza *Demodex canis* pasożytujące u psów zostały dokładnie opisane jako organizmy chorobotwórcze. Wywołują one nużycę, tj. chorobę związaną z występowaniem objawów skórnych i ocznych, która może prowadzić nawet do śmierci zarażonych osobników, co najprawdopodobniej związane jest z istnieniem u psów określonego defektu immunologicznego [27].

Tuż po odkryciu nużeńca był on uznawany za organizm żyjący w symbiozie z człowiekiem [7]. Akilov i Mumcuglu w 2004 stwierdzili, że obecność roztoczy *Demodex* na skórze u większości pacjentów nie prowadzi do rozwoju objawów choroby [28]. Niektórzy podejrzewają, że ludzie zarażają się nużeńcem w młodym wieku, a dopiero wraz z upływem lat dochodzi do nasilenia inwazji i rozwoju jej objawów

klinicznych [12].

Naukowcy zaproponowali kilka teorii możliwych mechanizmów chorobotwórczości nużeńca.

1. Bezpośrednie uszkodzenie:
  - mikroabrazje mogą prowadzić do hiperplazji nabłonka i odczynowej hiperkeratynizacji wokół podstawy rzęs (powstanie łupieżu cylindrycznego),
  - zaczopowanie kanalików wyprowadzających gruczołów łojowych, co prowadzi do deficytu składowej lipidowej filmu łzowego (*Demodex brevis*),
  - spożywanie komórek nabłonka w mieszkach włosowych powoduje ich rozdęcie, a w następstwie wypadanie lub nieprawidłowy wzrost rzęs (*Demodex folliculorum*) [29,7].
2. U żywiciela dochodzi do rozwoju reakcji zapalnej będącej odpowiedzią na obecność chityny pasożyta jako ciała obcego [29].
3. Obecność roztoczy oraz ich metabolitów może stymulować odpowiedź humoralną żywiciela i wydzielanie mediatorów reakcji immunologicznych [29]. Tsutsumi w 2004 zaobserwował na powierzchni nużeńców obecność złogów surowiczej immunoglobuliny IgD, a także dwóch inhibitorów surowicznych proteaz (alfa-1-antytrypsyny i alfa-1-antychymotrypsyny) [30]. Na tej podstawie można przypuszczać, że wśród enzymów trawiennych wydzielanych przez nużeńca znajdują się proteazy (enzymy proteolityczne), a organizm gospodarza wytwarza swoistą odpowiedź obronną na te roztocza [8,30]. Analogiczne proteazy wydzielane są przez roztocza kurzu domowego i powodują podrażnienie skóry u chorych na atopowe zapalenie skóry.
4. Istnieją doniesienia sugerujące, iż obecność nużeńca indukuje zmiany w poziomie cytokin obecnych we łzach, zwłaszcza IL-17, która może indukować zapalenie brzegów powiek oraz powierzchni oka. Jest ona również odpowiedzialna za wytwarzanie VEGF-A, co może powodować powstawanie teleangiektazji na brzegach powiek [31].
5. Roztocza mogą stanowić wektor w rozprzestrzenianiu się drobnoustrojów, a tym samym modyfikować skład populacji bakterii, które zasiedlają brzegi powiek. Obecność bakterii na powierzchni nużeńca podczas badań przy użyciu mikroskopu elektronowego opisali już Norn (1970, 1972) oraz English i wsp. (1970), natomiast Wolf i wsp. (1988) zaobserwowali wewnątrz odwłoka nużeńca obecność zarodników grzybowych [32,33].

Uważa się, że roztocza *Demodex* mogą mieć udział w etiopatogenezie chorób skóry, takich jak trądzik różowaty (*pityriasis folliculorum*), zwłaszcza w jego odmianie grudkowo-krostkowej.

W obrębie narządu wzroku nużeniec może przyczyniać się do rozwoju przewlekłego zapalenia brzegów powiek i spojówek, nieprawidłowego wzrostu rzęs (*trichiasis*), ich wypadania (*madarosis*), punktowatych erozji nabłonka i owrzodzeń rogówki, tworzenia się łuszczyki rogówki, objawów suchego oka, a poprzez zaczopowanie i zainfekowanie gruczołów Maiboma – do nawracających jęczmieni i gradówek.

## 1.5 Diagnostyka nużeńca

Istnieje wiele metod służących do wykrywania obecności nużeńca w obrębie narządu wzroku. Wśród nich najpopularniejsze i najważniejsze to:

- pobranie rzęs od pacjenta, umieszczenie ich na szkiełku podstawowym i oglądanie pod mikroskopem w powiększeniu 40x
- metoda preparatu bezpośredniego, polegająca na pobraniu zeszkobin naskórka, umieszczeniu na szkiełku podstawowym, zakropleniu 20% KOH i oglądaniu w mikroskopie świetlnym w powiększeniu 40x i 100x [13].

## 1.6 Anatomia aparatu ochronnego narządu wzroku

Narząd wzroku złożony jest z kilku barier, których zadaniem jest zapobieganie infekcji bez wywoływania stanu zapalnego. Jest to tzw. składowa pasywna odporności i tworzą ją bariery: anatomiczna, fizyczna i chemiczna.

Z kolei składowa aktywna odporności złożona jest z elementów komórkowych oraz wydzielniczych, których zadaniem jest wywoływanie zapalenia ukierunkowanego na eliminację patogenu.

Przeszkodę anatomiczną stanowi głównie aparat ochronny oka, w którego skład wchodzi powieki, film łzowy oraz nabłonek rogówki.

Ze względu na fakt, że zarówno biotop, jak i występowanie ewentualnej patologii związanej z obecnością nużeńca związane są z aparatem ochronnym oka – niezwykle

istotna wydaje się być dokładna znajomość anatomii tej części narządu wzroku.

### **a) Powieki**

Powieki stanowią barierę mechaniczną, chroniącą oko przed środowiskiem zewnętrznym. Poprzez mruganie, zapobiegają wnikaniu szkodliwych mikroorganizmów mogących wywołać infekcję.

Powieki pokryte są skórą, która przechodzi płynnie w otaczającą je skórę okolicy oczodołu. Grubość skóry pokrywającej powiekę wynosi od 0,5 mm na brzegu powieki do 1 mm na brzegu oczodołowym. Brzeg powiekowy pokryty jest rzęsami (na powiece górnej ich liczba wynosi ok. 200 natomiast na powiece dolnej ok.100). Rzęsy odnawiają się co 2-5 miesięcy, natomiast po wyrwaniu odrastają po około 2 miesiącach. Na brzegu powieki, w miejscu połączenia skóry i bł. śluzowej, wzdłuż bruzdy, naskórek ostro przechodzi w nabłonek wielowarstwowy płaski nierogowaciejący i właśnie w tym miejscu znajdują się ujścia gruczołów Meiboma [34,35].

W skórze powiek znajdują się holokrynowe gruczoły śluzowe i ekrynowe gruczoły potowe, a przy brzegu powieki znajdują się apokrynowe gruczoły potowe Molla i liczne gruczoły łojowe Zeissa [34].

W głębszych warstwach górnej i dolnej powieki umiejscowione są tarczki. Ich grubość wynosi 0,75 mm, natomiast wysokość wynosi odpowiednio 10 mm i 4 mm. Tarczki stanowią strukturalną podstawę przyczepów mięśni i przegrody oczodołowej. W każdej tarczce zatopione są gruczoły Meiboma. Są one zbudowane z wielu płacików, które otwierają się do wspólnego przewodu wyprowadzającego. Od tarczki do okostnej brzegu oczodołu rozciąga się przegroda oczodołowa, która oddziela mięśnie okrężne od ciała tłuszczowego oczodołu [34,35].

### **b) Spojówka**

Worek spojówkowy złożony jest z:

1. spojówki gałkowej
2. sklepień (górnego i dolnego)
3. fałdu półksiężycowatego leżącego przyśrodkowo (tj. w kącie przyśrodkowym)
4. spojówki powiekowej.

Spojówka gałkowa- to cienka i przejrzysta struktura, zbudowana z dwóch części:

- części twardówkowej – rozciągającej się od załamka spojówki do rąbka rogówki
- części rąbkowej – pierścień o szerokości 3 mm w miejscu połączenia nabłonka spojówki z nabłonkiem rogówki.

Strefa przejściowa- pomiędzy spojówką powiekową a gałkową, zbudowana jest z następujących części:

- załamek górny spojówki- na poziomie brzegu oczodołu, około 8-10 mm od rąbka rogówki
- załamek dolny spojówki, zlokalizowany 8 mm od rąbka rogówki
- załamek boczny spojówki, położony 14 mm od rąbka rogówki
- w części przyśrodkowej brak załamka - zastąpiony jest przez mięsko łożowe i fałd półksiężycowaty.

Mięsko łożowe to spoista masa tkankowa zawierająca drobne włoski i gruczoły łojowe.

Spojówka powiekowa – złożona jest z trzech warstw:

- połączenie śluzowo-skórne: umieszczone jest do tyłu od ujść gruczołów Meiboma, jest strefą przejściową pomiędzy nabłonkiem wielowarstwowym płaskim rogowaciejącym brzegu powieki i nabłonkiem wielowarstwowym płaskim nierogowaciejącym spojówki
- spojówka tarczkowa: ściśle przylega do tarczki
- spojówka oczodołowa: rozciągnięta jest od tarczki do załamka

Nabłonek spojówki obejmuje:

- nabłonek wielowarstwowo sześcienny w okolicy tarczek
- nabłonek walcowaty w okolicy sklepień
- nabłonek płaski w obrębie spojówki gałkowej

Komórki nabłonka są ze sobą połączone za pomocą desmosomów oraz ścisłych połączeń międzykomórkowych (tight junction), co stanowi barierę fizyczną dla drobnoustrojów. 10% komórek podstawnych nabłonka spojówki stanowią komórki kubkowe. Najliczniej występują w obrębie tarczkowej i dolnonosowej spojówki gałkowej i są rozrzucone śródnabłonkowo. Zawierają one ziarna mucyny oraz trójkątne jądra komórkowe. Oprócz komórek kubkowych, które występują pojedynczo lub w małych skupiskach, możemy również wyróżnić komórki dendrytyczne oraz limfocyty [34.35].

Istota właściwa spojówki składa się z luźnej tkanki łącznej, natomiast tkanka limfatyczna spojówki (Conjunctiva-Associated Limfoid Tissue-CALT) występuje w obrębie sklepień i składa się z limfocytów i innych leukocytów. Mediatorami pomiędzy oddziaływaniem limfocytów i komórek nabłonkowych śluzówki są czynniki wzrostu, cytokiny oraz neuropeptydy [ 36].

Bariera fizyczna nabłonka spojówki uzupełniana jest przez warstwę mucyn, które produkowane przez komórki nabłonka są związane z błonami komórkowymi (glikokaliks) oraz mucyn niezwiązanych, wydzielanych przez komórki kubkowe.

Spojówka jest strukturą mającą bardzo rozwinięty układ odpornościowy. Za pomocą receptorów rozpoznających wzorce (pattern recognition receptors-PRR) rozpoznaje antygeny pochodzące z rozpadu komórek oraz antygeny PAMP (Patogen-Associated Molecular Patterns). Następnie efektory, którymi są rozpuszczalne białka i peptydy, zwalczają drobnoustroje poprzez wiązanie się z nimi i niszczenie ich ściany komórkowej lub poprzez zaburzenie wewnątrzkomórkowego metabolizmu. Jeżeli jednak antygen poradzi sobie z przedostaniem przez barierę fizykochemiczną, zostaje połączony z receptorem z rodziny TLR (Toll-like receptors). Nabłonek spojówki podobnie jak komórki rąbka rogówki, zawiera różne formy receptora TLR: 1,2,3,5,6, z czego TLR 2 jest wykrywany tylko w warunkach stymulacji IF-gamma lub wyciągiem z błony bakteryjnej. Dochodzi do związania ligandu i stymulacji kaskady zależnej od MyD88, a następnie aktywacji transkrypcyjnego czynnika jądrowego kappa B (NFkB). Konsekwencją całego procesu jest produkcja cytokin zapalnych: interleukiny 6 (IL-6), interferonu gamma (IF-gamma) oraz czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF-alfa). Cytokiny zapalne powodują produkcję chemokin, molekuł adhezyjnych oraz indukowanego AMP. Aktywacja specyficznych dla antygenów bakteryjnych TLR, która może nastąpić u alergików u których wtórnie doszło do kolonizacji bakteryjnej, jest istotnym czynnikiem wywołującym objawy.

Spojówkowy AMP, podobnie jak LL-37, jest aktywny przeciw *Pseudomonas Aeruginosa*, *Staphylococcus Aureus*, *Stahylococcus Epidermidis* oraz HSV-1 i adenowirusom [37]

### **c) Rogówka**

Jest to przezroczysta, beznaczyniowa i silnie unerwiona tkanka o wymiarach 11-12 mm na 10-11 mm. Stanowi 1/6 przednią część gałki ocznej. Jest strukturą asferyczną, a jej średni promień krzywizny wynosi 7,8 mm, natomiast jej moc łamiąca to 43 dioptrie

[34,35].

Rogówka jest odżywana przez naczynia krwionośne rąbka, glukozę dyfundującą z cieczy wodnistej i natleniana tlenem dyfundującym przez film łzowy. Ze względu na awaskularność oraz bardzo małą ilość komórek prezentujących antygen, rogówka ma status tkanki uprzywilejowanej immunologicznie. Bierze ona udział w reakcjach immunologicznych za pośrednictwem immunologicznych elementów humoralnych oraz komórkowych. Te z kolei przedostają się do niej z naczyń okołorąbkowych. Zbudowana jest z sześciu warstw:

A. nabłonek - wielowarstwowy płaski nierogowaciejący, o ścisłych połączeniach, co ma wpływ na przejrzystość rogówki. Składa się z 5-6 warstw. Posiada mikrokosmki i mikrofałdy, które zanurzają się w filmie łzowym zatrzymując go i utrzymując wilgotność komórek. Stanowi on pierwszą linię obrony przed patogenami. Zadaniem komórek nabłonka jest rozpoznanie antygeny, indukcja odpowiedzi zapalnej poprzez stymulację produkcji i wydzielanie prozapalnych cytokin i chemokin, wydzielanie substancji miejscowo toksycznych dla drobnoustrojów oraz przyspieszenie gojenia się rany. Odgrywa on rolę w regulowaniu odpowiedzi zapalnej poprzez ekspresję receptorów TLR.

B. warstwa Bowmana - jest to warstwa bezkomórkowa, zbudowana z włókien kolagenowych typu I oraz III zanurzonych w substancji międzykomórkowej i posiadająca grubość 8-12  $\mu\text{m}$ .

C. istota właściwa rogówki (zrąb) - stanowi 90% grubości rogówki. Jest to struktura przezroczysta, włóknista, zwarta, o regularnym utkaniu komórek oraz makromolekuł, co jest konieczne do utrzymania przejrzystości rogówki. Zbudowana jest z macierzy pozakomórkowej utworzonej z kolagenu (głównie I, a także III, V i VI) oraz proteoglikanów, keratocytów (fibroblastów rogówkowych) i włókien nerwowych [34,35].

D. warstwa Dua- nowo odkryta warstwa rogówki będąca acelularną strukturą o grubości 10,15 +/- 3,6  $\mu\text{m}$ . Jest ona złożona 5-8 blaszek kolagenu (głównie kolagenu typu D), który jest upakowany w wiązki ułożone w różnych kierunkach i jest w stanie wytrzymać ciśnienie 200 kPa [38].

E. błona Descemeta

F. śródbłonek - złożony z jednej warstwy heksagonalnych komórek ściśle do siebie przylegających. Oddzielony od zrębu błoną podstawną zwaną błoną Descemeta o grubości 10-12  $\mu\text{m}$

#### **d) Film łzowy**

Film łzowy stanowi ochronę powierzchni gałki ocznej i jednocześnie ją nawilża. Pokrywa powierzchowne struktury oka. Zapewnia on wilgotne środowisko komórkom nabłonka, usuwa czynniki szkodliwe, zaopatruje rogówkę w podstawowe substancje odżywcze, tlen, a także leukocyty oraz czynniki wzrostu [34]. W skład filmu łzowego wchodzi białka, tj.: lizozym, laktoferyna, lipokalina łzowa, wydzielnicze IgA oraz cystatyna S. Lizozym wykazuje aktywność przeciwbakteryjną poprzez lizę ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich, laktoferyna natomiast interferuje z metabolizmem wewnątrzkomórkowym bakterii. Dodatkowo zarówno lizozym jak i laktoferyna wykazują działanie przeciwwirusowe i przeciwgrzybicze. PH filmu łzowego wynosi ok. 7,2, osmolarność 302 mOsm/l, a objętość 7  $\mu$ l [34].

Film łzowy składa się z trzech warstw:

- 1 warstwa lipidowa - najbardziej powierzchowna, grubości ok. 0,1  $\mu$ m, wytwarzana przez gruczoły Meiboma. Jej funkcją jest opóźnianie parowania łez, poprawa stabilności oraz utrzymywanie menisku łzowego. Jej niedobór może prowadzić do niestabilności filmu łzowego oraz zaburzeń ze strony nabłonka spojówki i rogówki;
- 2 warstwa wodna - o grubości ok. 7  $\mu$ m, wytwarzana jest przez gruczoły łzowe właściwe oraz dodatkowe gruczoły łzowe Krausego i Wolfringa. Bierze udział w transporcie wszystkich rozpuszczalnych w wodzie czynników odżywczych. Zawiera ona liczne białka ( laktoferynę, lizozym, defenzyny oraz wydzielnicze IgA i składniki dopełniacza), które wykazują działanie przeciwbakteryjne. Jej niedobór jest najczęstszą przyczyną suchego oka;
- 3 mucynowa warstwa podstawna – o grubości 20-50 nm, jest warstwą bezpośrednio pokrywającą rogówkę. Wytwarzana jest przez komórki kubkowe spojówki oraz nabłonek spojówki i rogówki. Warstwa śluzowa zawiera mucyny. Jej funkcją jest wychwytywanie czynników wzrostu, leukocytów i cytokin. Chroni ona powierzchnię oka przed patogenami i wysychaniem. Niedobór warstwy śluzowej prowadzi do rogowacenia spojówki [34,35].

Mucyny występujące na powierzchni oka, związane z błonami komórkowymi to MUC1, MUC4 i MUC 16. Zakotwiczą one film łzowy w nabłonku rogówki i stanowią barierę fizyczną zapobiegającą wnikaniu patogenów [36,39,40,41]. W warstwie

śluzowej filmu łzowego występują również mucyny wolne - MUC2, MUC5AC i MUC 19 [42]. Wiążą one patogeny w filmie łzowym i dzięki temu umożliwiają ich eliminację przez wypłukanie. Produkcja i wydzielanie mucyn przez komórki kubkowe spojówki oraz komórki nabłonka rogówki zachodzi w sposób ciągły. Dodatkowo w przypadku zapalenia ich produkcja może być indukowana przez cytokiny takie jak: IL1-beta, IL-6, TNF-alfa oraz za pomocą stymulacji receptorów TLR (Toll like receptors) [36,40].

W gałce ocznej funkcjonuje tak zwana EALT (Eye Associated Limfoid Tissue). Jego część stanowi CALT (Conjunctiva-Associated Limfoid Tissue) [36,43]. Limfocyty, makrofagi, granulocyty oraz komórki tuczne tworzą rozsianą tkankę limfatyczną. Umiejscawia się ona głównie w pobliżu powierzchni oka. Jedynie grudki limfatyczne znajdują się głębiej w obrębie lamina propria. W CALT obecne są wszystkie typy limfocytów - w lamina propria T helper CD4+ oraz T helper CD8+, w nabłonku spojówki limfocyty cytotoksyczne/supresorowe T CD8+, natomiast rozsiane limfocyty spojówkowe to głównie T CD3+, a składniki grudek limfatycznych to limfocyty B CD20+. Komórki plazmatyczne stanowią podstawowy element wydzielniczego układu odpornościowego wszystkich błon śluzowych w organizmie, w tym w spojówce [36].

Jeśli chodzi o immunoglobuliny, zarówno w spojówce jak i w filmie łzowym dominują polimery IgA- (p)Iga. Oprócz nich występują (p)IgM oraz IgG [36,44]. Przenabłonkowym transporterem dla IgA jest pIgR, którego pozakomórkowy komponent stanowi domena SC. Po przetransportowaniu przez nabłonek pIgA łączy się z SC i powstaje wydzielnicze sIgA, które to odkłada się w spojówce i filmie łzowym. Ich funkcją jest unieszkodliwianie wnikających antygenów, a ich produkcja zwiększa się pod wpływem obecności zarówno *Pseudomonas* lub *Acanthamoeba* jak i patogenów wnikających w głąb tkanki, w tym wirusów replikujących wewnątrzkomórkowo. IgA wiążą antygen, co ułatwia jego opsonizację i fagocytowanie [36,45]. W przypadku patogenów wewnątrzkomórkowych - związany antygen wraz z pIgA zostaje usunięty z wnętrza tkanki na jej powierzchnię podczas transportu przez błonę. Takie kompleksy antygen-przeciwciało, mają zdolność indukcji kaskady zapalnej poprzez indukcję m.in. cytokin zapalnych [36,46]

W tkance limfatycznej spojówki występują dodatkowo jeszcze inne komórki pochodzenia leukocytarnego: makrofagi, granulocyty i neutrofile. W przypadku zakażeń pasożytniczych, zdolność migracji do spojówki wykazują również eozynofile, które produkują hemokiny i cytokiny w celu aktywacji innych leukocytów, w tym limfocytów T. Komórki tuczne natomiast wydzielają wiele wazoaktywnych mediatorów takich jak:

histamina, heparyna oraz cytokiny ( IL-4, IL-5, IL-6 oraz TNF-alfa), które odgrywają rolę w większości reakcji zapalnych.

## **1.7 Obraz kliniczny chorób narządu wzroku, które mogą być wywołane obecnością roztoczy *Demodex spp.***

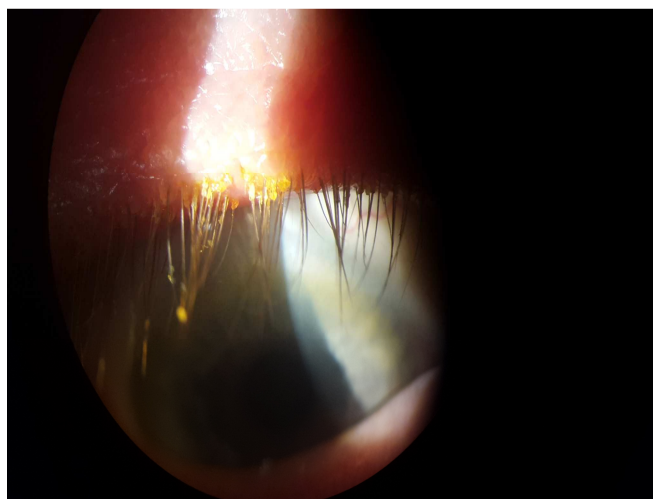
### **1.7.1 Przewlekłe zapalenie brzegów powiek**

Jest to często występujące schorzenie, powodujące dyskomfort oraz zadrażnienie oczu. Jest chorobą trudną do leczenia, mogącą trwać wiele miesięcy. Zazwyczaj występuje obustronnie i symetrycznie. Objawia się pieczeniem, uczuciem piasku pod powiekami, niewielkim światłowstrętem, łuskami u nasady rzęs, przekrwieniem brzegów powiek z charakterystycznymi okresami zaostrzeń i remisji. Nasilenie objawów występuje zazwyczaj w godzinach porannych, a mimo ich podobieństwa oraz częstego współistnienia, można je podzielić na: przewlekłe przednie zapalenie brzegów powiek oraz przewlekłe tylne zapalenie brzegów powiek [35].

**1. Przewlekłe przednie zapalenie brzegów powiek** – schorzenie to dotyczy skóry powiek u podstawy rzęs. W badaniu można zaobserwować:

- twarde łuski zlokalizowane u podstawy rzęs, określane jako mankiety keratynowo-tłuszczowe (tzw. łupież cylindryczny) (Ryc.8),
- teleangiektazje na brzegach powiek,
- przekrwiony oraz połyskujący, tłusty brzeg powieki,
- zbliźnowacenia oraz ubytki brzegu powieki,
- nieprawidłowy wzrost rzęs, ich wypadanie lub siwienie,
- często towarzyszące przekrwienie lub łagodne brodawkowate zapalenie spojówek ,
- objawy wtórne takie jak: nawracające jęczmienie, brzeżne zapalenie rogówki, pryszczykowe zapalenie spojówki i rogówki,
- niestabilność przedrogówkowego filmu łzowego oraz objawy zespołu suchego oka.

Uważa się, że zapalenie przedniego brzegu powiek może mieć etiologię gronkowcową lub łojotokową. Autorzy, tacy jak Kim i wsp., Wolf i wsp., Kerighah i wsp. uważają że dużą rolę w etiopatogenezie tego schorzenia odgrywa obecność w mieszkach rzęs nużeńca ludzkiego (*Demodex folliculorum*) [31,47]. Prowadzi ona do mechanicznego zatkania ujść gruczołów Zeissa, drażnienia cebulek włosowych rzęs oraz wtórnych zakażeń bakteryjnych i grzybiczych.



Rycina 8. Mankiety keratynowo-tłuszczowe u podstawy rzęs na brzegu powieki górnej (mat. własny).

**2. Przewlekłe tylne zapalenie brzegów powiek** – schorzenie spowodowane zaburzeniami czynności gruczołów Meiboma i zmianami w uwalnianiu ich wydzieliny. Na skutek działania lipaz bakteryjnych, które odpowiedzialne są za powstawanie wolnych kwasów tłuszczowych, dochodzi do podwyższenia temperatury topnienia wydzieliny łojowej. Utrudnia to jej sekrecję z gruczołów, czego skutkiem jest spadek zawartości fosfolipidów w filmie łzowym oraz jego niestabilność (wzrost tempa parowania łez i wzrost ich osmolarności). W efekcie dochodzi do zadrażnienia powierzchni gałki ocznej.

Objawami tylnego zapalenia brzegów powiek są:

- nadmierne, nieprawidłowe wydzielanie gruczołów Meiboma, co objawia się obecnością małych, oleistych kuleczek w miejscach ich ujścia,
- zacopowanie i rozcięcie ujść gruczołów Meiboma z towarzyszącym przekrwieniem i teleangiektazjami na tylnym brzegu powiek,
- przekrwienie i teleangiektazje na tylnym brzegu powiek,
- uwalnianie się mętnej, pastowatej wydzieliny z gruczołów Meiboma,

- zmniejszenie liczby gruczołów Meiboma,
- oleisty, pianisty film łzowy, gromadzący się na brzegu powieki lub w kącie przyśrodkowym,
- brodawkowate zapalenie spojówek oraz punktowata epiteliopatia dolnej części rogówki jako powikłanie.

#### Leczenie przewlekłego zapalenia brzegów powiek

##### A. Higiena brzegów powiek:

- kilkuminutowe ciepłe okłady w celu zmiękczenia łusek u podstawy rzęs
- mechaniczne oczyszczanie powiek 1-2 razy na dobę, z usuwaniem łusek przy użyciu pałeczki zakończonej nasączonym wacikiem
- masaż brzegów powiek

##### B. Antybiotykoterapia

###### 1) ogólna

- azytromycyna w przypadku wrzodziejącego przedniego zapalenia brzegów powiek
- tetracykliny (oksytetracyklina, doksycyklina, minocyklina, erytromycyna) w przypadku przewlekłego tylnego zapalenia brzegów powiek, szczególnie u pacjentów z nawrotowym pryszczakiem oraz brzeżnym zapaleniem rogówki;

###### 2) miejscowa

- antybiotyki
- steroidy
- preparaty sztucznych łez

Autorzy tacy jak Bhandari i wsp. uważają że jednym z czynników rozwoju tylnego zapalenia brzegów powiek może być nużeniec krótki (*Demodex brevis*), którego obecność prowadzi do mechanicznego zaczopowania ujść gruczołów Meiboma oraz zmiany jakości i ilości ich wydzieliny.

### 1.7.2 Nieprawidłowy wzrost rzęs

Jest to nabyte schorzenie, w którym rzęsy wyrastają z prawidłowej anatomicznie przedniej części brzegu powieki, a następnie ulegają zakrzywieniu do wewnątrz, w kierunku rogówki. Nieprawidłowy wzrost rzęs może być idiopatyczny lub wtórny do przewlekłych schorzeń zapalnych. Przewlekły stan zapalny powiek i spojówki może również prowadzić do wyrastania dodatkowych rzęs z tarczki [35].

W następstwie nieprawidłowego wzrostu rzęs może dochodzić do urazów nabłonka rogówki oraz powstawania punktowatych erozji nabłonkowych, co w konsekwencji może prowadzić do rozwoju owrzodzenia rogówki oraz łuszczki.

Leczenie nieprawidłowego wzrostu rzęs polega na ich usunięciu poprzez:

- epilację mechaniczną - metoda ta nie daje trwałego efektu, ponieważ rzęsy odrastają w ciągu 2-3 tyg.,
- elektrolizę – jest to metoda skuteczna w przypadku leczenia pojedynczych nieprawidłowo rosnących rzęs,
- krioterapię - powszechnie stosowana metoda leczenia nieprawidłowo rosnących rzęs polegająca na przymrażaniu mieszków rzęskowych w temperaturze – 20 stopni. Jest to metoda skuteczna w usuwaniu bardzo głęboko położonych rzęs. Może ona powodować skutki uboczne takie jak ścieczenie brzegu powiek, utratę sąsiednich prawidłowych rzęs oraz powstanie uporczywego meszku mogącego działać drażniąco na rogówkę lub powodującego martwicę oraz uszkodzenie gruczołów Meiboma.
- ablacja laserem argonowym - metoda skuteczna w usuwaniu kilku nieprawidłowo rosnących rzęs w różnych miejscach. Do wyleczenia zazwyczaj dochodzi po 1 lub 2 sesjach.
- techniki chirurgiczne - polegające na nacięciu tarczki oraz rotacji brzegu powiek.

W następstwie obecności „cylindrycznych” mankietów przy podstawie rzęs, a także przewlekłej okluzji mieszków włosowych rzęs przez nużeńca, może dochodzić nie tylko do nieprawidłowego kierunku wzrostu rzęs (trichiasis) ale również do ich wypadania i przerzedzenia (madarosis).

### **1.7.3 Madaroza (madarosis)**

Jest schorzeniem często przebiegającym ze zmniejszeniem liczby rzęs. Wśród przyczyn madarozy można wymienić przewlekłe schorzenia przedniego brzegu powiek, guzy powiek, oparzenia, radioterapię oraz krioterapię stosowane w leczeniu guzów powiek. Przyczyną może być również choroba ogólna, jak np. łysienie uogólnione, łuszczyca, obrzęk śluzowaty, liszaj rumieniowy układowy, kiła, trąd oraz przyczyny jatrogenne. Zakażenie nużeńcem również może przyczynić się do łatwiejszego wypadania rzęs i ich utraty. Pasożyt poprzez wzbudzenie swoją obecnością reakcji zapalnej w mieszku włosowym prowadzi do powstania obrzęku. To z kolei znacznie ułatwia depilację rzęs. Obecność nużeńca w mieszkach włosowych rzęs powoduje również osłabienie ich struktury i sprawia, że stają się one kruche i łatwo wypadają.

### **1.7.4 Zespół suchego oka**

Jest to zaburzenie filmu łzowego będące wynikiem obniżonego wytwarzania łez, bądź nadmiernego ich parowania. W wyniku utraty wody dochodzi do niestabilności filmu łzowego, co prowadzi do postępującego uszkodzenia powierzchniowych struktur oka.

Wśród przyczyn zespołu suchego oka wyróżniamy:

- niedobór wodnej składowej łez – może być wynikiem zaburzenia wydzielania gruczołu łzowego,
- niedobór mucynowej składowej łez – najczęściej wynikający z ogólnoustrojowego niedoboru witaminy A oraz z zaburzeń czynności komórek kubkowych,
- niedobór lipidowej składowej łez - objawia się najczęściej skróceniem czasu przerwania filmu łzowego, zaburzeniem czynności gruczołów Meiboma oraz prawidłowym wydzielaniem składowej wodnej.

Wśród mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój stanu zapalnego w przebiegu zespołu suchego oka można wymienić:

- zwiększoną osmolarność filmu łzowego- prowadzi to do zwiększenia produkcji IL-1, IL-8, TNF-alfa, MMPs
- upośledzenie funkcji gruczołu łzowego , co obniża wydzielanie czynników przeciwzapalnych
- wzrost stężenia metaloproteinaz w filmie łzowym, co prowadzi do lizy komórek podstawnych nabłonka rogówki i warunkuje ciągłość nabłonka

## rogówki

Główne objawy subiektywne suchego oka to uczucie obecności ciała obcego, pieczenie, swędzenie, uczucie suchości, światłowstręt i zamglenie widzenia.

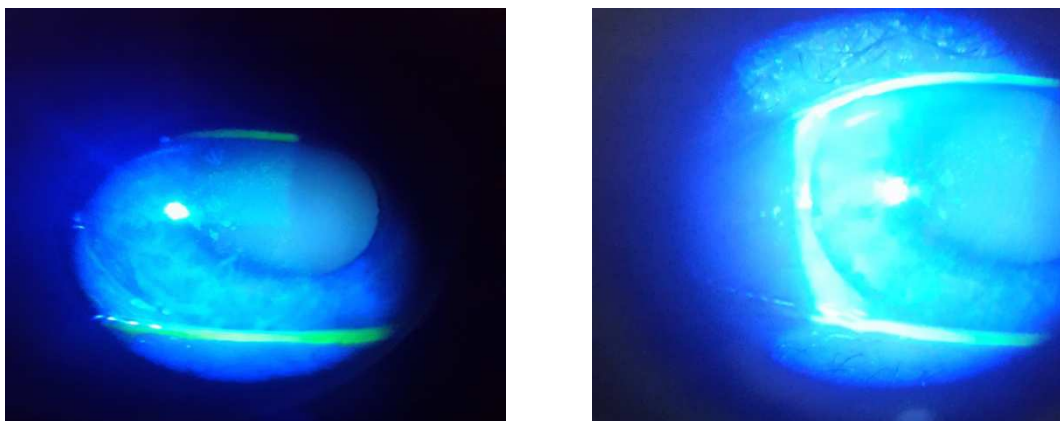
Do objawów przedmiotowych należą rozszerzenie naczyń spojówki gałkowej, fałdy spojówkowe, zmniejszony menisk łzowy (Ryc.11), nieregularna powierzchnia rogówki, ubytki nabłonka rogówki (Ryc.11) oraz zwiększona ilość materiałów resztkowych w filmie łzowym. W ciężkiej postaci suchego oka może dojść do rozwoju owrzodzenia nabłonka rogówki i istoty właściwej, bielma oraz patologicznego unaczynienia rogówki. Zmiany te w efekcie prowadzą do obniżenia ostrości wzroku [34,35].

Leczenie zespołu suchego oka zależy w dużej mierze od ciężkości schorzenia.

Zaleca się:

- stosowanie preparatów sztucznych łez,
- ciepłe okłady i masaż powiek,
- zmodyfikowanie otoczenia pacjenta celem redukcji parowania filmu łzowego,
- okluzję punktów łzowych,
- boczne zeszywanie powiek w ciężkich przypadkach,
- miejscowe stosowanie cyklosporyny A,
- surowicę autologiczną w kroplach.

U pacjentów zakażonych nużeńcem może dojść do zablokowania ujść gruczołów Meiboma, co uniemożliwia uwolnienie wydzieliny przez nie produkowanej. Prowadzi to do zmniejszenia ilości warstwy lipidowej filmu łzowego i przerwania jego stabilności. W efekcie dochodzi do rozwoju objawów suchego oka wybarwiających się po podaniu 1% roztworu fluoresceiny do worka spojówkowego oraz użyciu niebieskiego filtra. Widoczny jest również niski menisk łzowy < 1 mm (Ryc.9).



Rycina 9. Zespół suchego oka- obraz ubytków nabłonka rogówki (mat.własny)

### 1.7.5 Jęczmień

Jest to ostry gronkowcowy ropień usytuowany na powiece górnej lub dolnej, który ze względu na lokalizację może być zewnętrzny lub wewnętrzny.

- a. zewnętrzny – obejmuje mieszek rzęsy, związany z gruczołem Zeissa. Objawia się bolesnym obrzękiem brzegu powieki uwypuklającym się do przodu z zachowaniem rzęs na szczycie (Ryc.12). Może występować w formie mnogiej.
- b. wewnętrzny - zlokalizowany jest w obrębie gruczołu Meboma i powstaje w wyniku wtórnego nadkażenia bakteryjnego gradówki.

Głównymi objawami choroby są zaczerwienienie towarzyszące obecności guzka zapalnego oraz obrzęk powiek, który początkowo może być ogólny, z czasem ogranicza się do mniejszego obszaru. Pacjenci odczuwają bolesność, łzawienie, swędzenie [35].

Leczenie:

- antybiotyki w kroplach
- kompresy rozgrzewające
- usuwanie rzęs z zakażonych mieszków

### 1.7.6 Gradówka

Jest to miejscowe przewlekłe i jałowe zapalenie tłuszczowo-ziarniakowe w obrębie gruczołów Meiboma lub Zeissa. Rozwój schorzenia spowodowany jest zatkaniem ujść jednego lub kilku gruczołów. Ma postać niebolesnego guzka, który powoli się rozwija, a skóra tej okolicy może być lekko zaczerwieniona. Zmiana ustępuje w ciągu tygodni lub miesięcy, choć często pozostaje na stałe o ile nie podejmie się odpowiedniego leczenia. Drenaż zmiany następuje na zewnątrz lub do wewnątrz worka spojówkowego przez tarczkę, bądź poprzez fagocytozę lipidów wyciśniętych pod wpływem ciśnienia do otaczających tkanek.

Leczenie:

- ciepłe okłady,
- uwolnienie wydzieliny gruczołu Meiboma objętego zapaleniem poprzez jego uciśnięcie,
- nacięcie i drenaż lub wyłyżeczkowanie,
- iniekcje sterydów.

Zarówno jęczmień jak i gradówka mogą być spowodowane mechanicznym zatkaniem ujścia gruczołu przez osobniki dorosłe lub larwy nużeńca. Brak możliwości uwolnienia wydzieliny prowadzi do jej nieprawidłowego gromadzenia i nadkażenia bakteryjnego, co w efekcie wywołuje reakcję zapalną.

Wszystkie wyżej wymienione schorzenia mogą mieć silny związek z zakażeniem nużeńcem. Istnieje wiele badań, w których naukowcy tacy jak Koksai i wsp., Wolf R. i wsp., Kherighah i wsp. dowodzą patogenności roztoczy i analizują mechanizm rozwoju danej jednostki chorobowej [31,47]. Są jednak autorzy, których badania przeczą związkowi infestacji nużeńcem z chorobami dotyczącymi narząd wzroku. Należą do nich Kemal i wsp., którzy uważają nużeńca za florę saprofityczną, a w swoich badaniach wykazali porównywalną częstość występowania pasożyta u osób zdrowych i osób z zapaleniem brzegów powiek [17].

Ponieważ do tej pory brak jest szerszych badań poświęconych temu zagadnieniu, zwłaszcza wśród populacji polskiej, dlatego w niniejszej dysertacji postanowiono w sposób obiektywny zgłębić to zagadnienie.

## **2. Cele pracy**

Próba jednoznacznego określenia patogenności nużeńca dla narządu wzroku poprzez:

1. Ocenę częstości występowania nużeńca w wybranych chorobach narządu wzroku.
2. Ocenę częstości występowania objawów okulistycznych związanych z obecnością nużeńca.
3. Ocenę flory bakteryjnej worka spojówkowego pacjentów i jej korelacji z danymi na temat flory bakteryjnej nużeńca.
4. Ocenę zależności pomiędzy obecnością nużeńca i powodowanymi przez niego objawami a poziomem stężenia we łzach interleukiny 12 oraz interleukiny 17A, jako wykładników miejscowej reakcji zapalnej lub alergicznej.

### 3. Pacjenci

Analizie poddano 217 oczu u 109 dorosłych ( powyżej 18 lat) pacjentów ( jeden pacjent był pacjentem jednoocznym), zgłaszających się do Poradni Ogólnej lub Oddziału Okulistycznego Katedry Okulistyki i Kliniki Okulistycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Grupę tą stanowiły 62 kobiety oraz 47 mężczyzn w wieku od 24 do 89 lat.

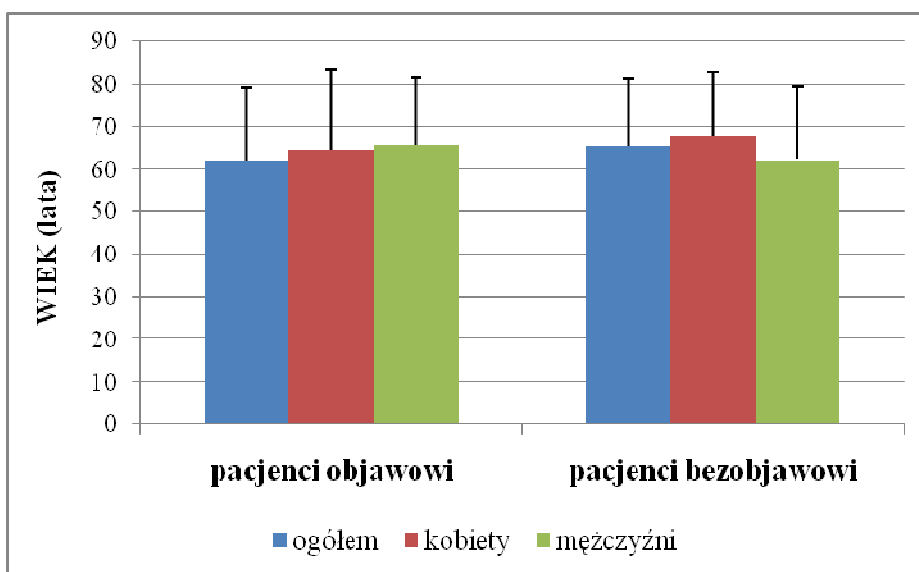
Kryteriami wyłączającymi z badania były:

- stosowanie miejscowych lub ogólnych antybiotyków lub chemioterapeutyków w okresie krótszym niż dwa tygodnie przed badaniem,
- wcześniejsza lub obecna terapia z powodu demodekozy.

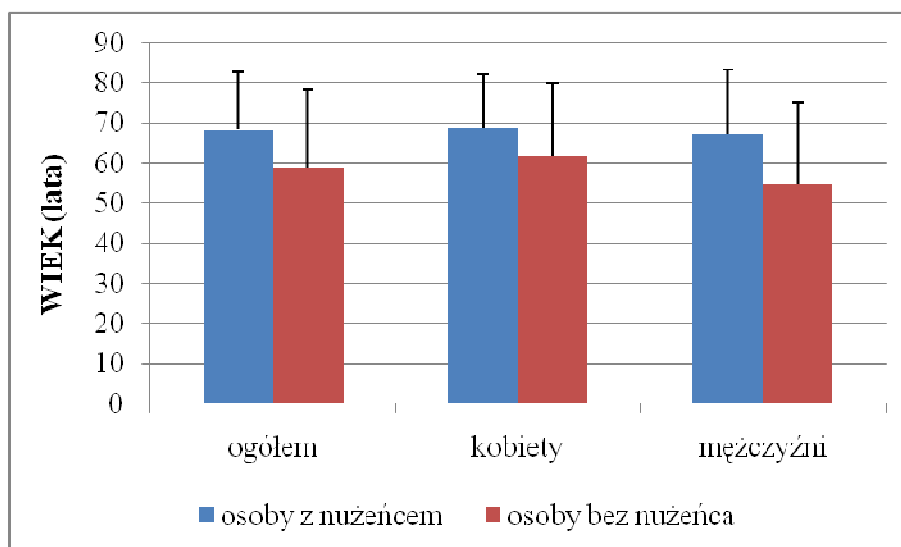
Pacjentów podzielono na dwa sposoby opisane w rozdziale pt. „Metody”:

- a) W zależności od występowania dolegliwości zgłaszanych w momencie włączenia do badania na:
- „ pacjentów objawowych”- grupę tą stanowiło 64 pacjentów, w tym 37 kobiet ( 58% ogółu) w wieku od 25 do 84 lat (średnia 65,81 lat) i 27 mężczyzn ( 42% ogółu) w wieku od 28 do 89 lat (średnia 64,52 lat). Średnia wieku wynosiła 62,25 +/- 17,05 lat. Liczba zbadanych oczu wynosiła 127 (Ryc.10).
  - „ pacjentów bezobjawowych”- grupę tę stanowiło 45 pacjentów w tym 25 kobiet ( 56% ogółu) w wieku od 24 do 85 lat (średnia wieku 67,7) i 20 mężczyzn w wieku od 25 do 84 lat (średnia wieku 62,3 lat). Średnia wieku wynosiła 65,31+/- 16,12 lat. Liczba zbadanych oczu wynosiła 90 (Ryc.10)
- b) W zależności od występowania nużeńca na:
- „pacjentów z nużeńcem” – grupę tą stanowiło 74 pacjentów , w tym 41 kobiet w wieku od 28 do 85 lat ( średnia 68,98) i 33 mężczyzn w wieku od 29 do 89 lat (średnia 67,24).
  - „pacjentów bez nużeńca”- grupę tą stanowiło 35 pacjentów w tym 21 kobiet w wieku od 24 do 84 ( średnia wieku 61,70) i 14 mężczyzn w wieku od 25 do 82 lat ( średnia wieku 54,93) (Ryc.11).

Diagnostyka nużycy była jednym z etapów prowadzonych badań.



Rycina 10. Struktura wiekowa pacjentów objawowych i bezobjawowych z podziałem na płeć.



Rycina 11. Struktura wiekowa pacjentów z grupy z nużeniem oraz grupy bez nużenia z podziałem na płeć

## 4. Metody

Podstawą rozpoczęcia pracy badawczej była zgoda Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu nr 434/13 z dnia 9 maja 2013.

Badanie podzielono na dwie części.

W części I określono poniżej wymienione parametry u pacjentów objawowych i bezobjawowych bezpośrednio zgłaszających się do badań. W tym celu wszystkich badanych pacjentów podzielono na „objawowych” oraz „bezobjawowych”.

W części II przeanalizowano związek otrzymanych danych oraz wyników badań bezpośrednio z samą inwazją nużeńca. W tym celu wszystkich badanych pacjentów podzielono na „pacjentów z nużeńcem „i „ pacjentów bez nużeńca”.

### 4.1 Badanie podmiotowe

W ramach badania podmiotowego ze wszystkimi badanymi pacjentami przeprowadzono szczegółowy wywiad uwzględniający przede wszystkim obecne dolegliwości okulistyczne, czas ich pojawienia się, okres występowania i ich nasilenie. W celu oceny nasilenia objawów podmiotowych zespołu suchego oka zastosowano kwestionariusz opracowany na podstawie kwestionariusza OSDI (*ang. Ocular Surface Disease Index*). Pytania w kwestionariuszu zostały podzielone na trzy grupy. Pacjenci odpowiadali na temat częstotliwości pojawiania się dolegliwości okulistycznych. Każdej z odpowiedzi przypisano odpowiednią ilość punktów. Punkty oraz ilość odpowiedzi zostały podliczone. Wskaźnik OSDI został określony na podstawie odczytu z wykresu przedstawionego na Rycinie 13 lub obliczony wg. wzoru: suma punktów  $\times 25$  / liczba odpowiedzi. Na potrzeby danego badania zapisywano jedynie wynik liczbowy, bez uwzględniania stopnia zaawansowania zespołu suchego oka. Zastosowany kwestionariusz przedstawiono na Ryc.12.

W badaniu podmiotowym uwzględniano również wywiad dotyczący chorób ogólnych i stosowanych leków. Pacjenci spełniający kryteria włączenia do badań kwalifikowani byli do grupy po wyrażeniu pisemnej zgody.

## KWESTIONARIUSZ OBJAWÓW SUCHEGO OKA

Proszę o uzupełnienie poniższej tabelki. Z jaką częstotliwością w **ciągu ostatniego tygodnia** występowały u Pani/Pana objawy wymienione w poniższej tabeli :

nie występowały w ogóle → proszę zaznaczyć **0**

występowały przez mniejszą część tygodnia -> proszę zaznaczyć **1**

występowały przez połowę czasu → proszę zaznaczyć **2**

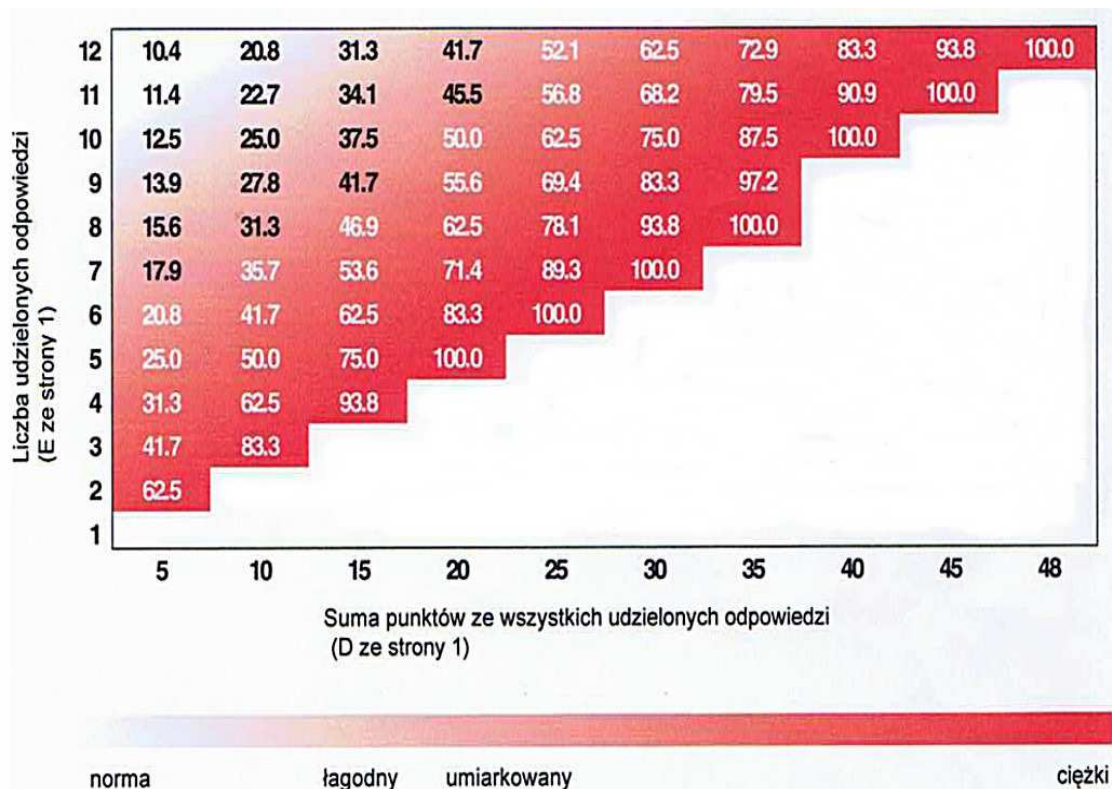
występowały przez większą część tygodnia → proszę zaznaczyć **3**

występowały przez cały tydzień → proszę zaznaczyć **4**

Objawy	0	1	2	3	4
1) światłowstręt					
2) uczucie c.obcego					
3) pieczenie/ból oczu					
4) zamglenie widzenia					
5) spadek ostrości wzroku					
6) swędzenie oczu					
7) zaczerwienienie powiek rano					
8) problem z otwarciem oczu rano					
Problem z wykonywaniem czynności	0	1	2	3	4
9) czytanie					
10) prowadzenie samochodu o zmroku					
11) praca przy komputerze					
12) oglądanie TV					
Uczucie dyskomfortu przy	0	1	2	3	4
13) wietrznej pogodzie					
14) klimatyzacji					
15) ogrzewanych pomieszczeniach					

**OSDI = suma odpowiedzi na wszystkie pytania x100 / całkowita ilość pytań x 4**

Rycina 12. Wzór kwestionariusza oceniającego nasilenie objawów zespołu suchego oka, o którego wypełnienie proszeni byli badani pacjenci.



Rycina 13. Wykres służący do obliczania wskaźnika OSDI (ang. Ocular Surface Disease Index). Oś pionowa określa liczbę pytań na które udzielono odpowiedzi, natomiast oś pozioma – uzyskaną liczbę punktów

## 4.2 Badanie przedmiotowe

Wszyscy pacjenci zostali poddani pełnemu badaniu okulistycznemu, które obejmowało badanie ostrości wzroku do dali i bliży (przy użyciu tablic Snellena), badanie odcinka przedniego i dna oka, badanie ciśnienia wewnątrzgałkowego (metodą aplanacyjną), test przerywania ciągłości filmu łzowego (TBUT). U wszystkich chorych wykonywano również test Schirmera celem oceny wydzielania łez.

### 4.2.1 Badanie odcinka przedniego oka

Odcinek przedni oka badano przy użyciu biomikroskopu z lampą szczelinową.

W trakcie badania dokonywano oceny i odnotowywano nieprawidłowości w okolicy powiek i ich brzegów, rzęs, spojówki, rogówki, komory przedniej, tęczówki, soczewki zarówno mających związek z podawanymi przez pacjenta dolegliwościami oraz rozpoznaniem podstawowym jak i nie mających związku. Szczegółowej analizie statystycznej poddano zmiany mogące mieć związek z zarażeniem nużeńcem. Oceniano

obecność objawów takich jak: teleangiektazje na brzegach powiek, zaczerwienienie powiek, łuski u podstawy rzęs, prawidłowość wzrostu rzęs, zmiany na powiekach (guzy, gradówki, jęczmienie). Oceniano również obecność choroby gruczołów Meiboma (MGD – Meibomian Gland Disease), obecność fałdów spojówkowych równoległych do brzegu powieki (LIPCOF) oraz ubytków nabłonka rogówki wg skali Oxfordzkiej.

Intensywność LIPCOF oceniano na podstawie następującej skali:

Stopień 0 – brak fałdów spojówkowych równoległych do brzegu powieki

Stopień 1 – pojedynczy fałd, mniejszy niż menisk łzowy – łagodny zespół suchego oka

Stopień 2 – pojedynczy wyraźny fałd, większy niż menisk łzowy – umiarkowany zespół suchego oka

Stopień 3 – duże, liczne fałdy spojówkowe, nie dochodzące do brzegu powieki – zaawansowany zespół suchego oka

Stopień 4 – liczne fałdy spojówkowe, dochodzące do brzegu zewnętrznego powieki – zaawansowany zespół suchego oka

Stopień uszkodzenia rogówki oceniano na podstawie skali Oxfordzkiej:

0 – brak ubytków nabłonka rogówki

I – minimalne ubytki nabłonka rogówki

II – łagodne ubytki nabłonka rogówki

III – umiarkowane ubytki nabłonka rogówki

IV – znaczne ubytki nabłonka rogówki

V – bardzo silne ubytki nabłonka rogówki.

#### 4.2.2 Badanie dna oka

Badanie dna oka odbywało się przy użyciu biomikroskopu z lampą szczelinową, przy zastosowaniu oftalmoskopii pośredniej, z użyciem szkła Volka 78D. Badanie odbywało się po uprzednim zakropieniu do worka spojówkowego kropli 1% Tropicamidu.

Wszelkie nieprawidłowości odnotowywane były w protokole w formie opisowej lub w formie schematu rysunkowego, jednak w wynikach oraz analizie statystycznej brano pod uwagę wyłącznie odchylenia mogące mieć związek bezpośredni lub pośredni z zakażeniem nużeńcem.

#### 4.2.3 Ocena jakościowa filmu łzowego

Do oceny prawidłowości i stabilności przedrogówkowego filmu łzowego zastosowano czas przerwania filmu łzowego (TBUT). Jest to czas mierzony od mrugnięcia do momentu przerwania filmu łzowego. Wykonywano go przy użyciu biomikroskopu z lampą szczelinową, z zastosowaniem filtra kobaltowego. Badanie odbywało się po uprzednim wybarwieniu powierzchni oka fluoresceiną przy użyciu sterylnych pasków fluoresceinowych FluoGp (Prolens) i polegało na ocenie ciągłości filmu łzowego – po otwarciu oczu przez pacjenta mierzono czas do momentu pojawienia się czarnych plam na zielonożółtym tle (Ryc.14).

Interpretacja wyników:

>10 sek - prawidłowy

5-10 sek.- obniżony

< 5 sek.- znacznie obniżony



Rycina 14. Test przerwania ciągłości filmu łzowego TBUT- materiał własny

#### **4.2.4 Ocena ilościowa filmu łzowego**

Oceny wydzielania wodnej składowej łez dokonano za pomocą testu Schirmera I. Mierzonym parametrem była ilość komponenty wodnej filmu łzowego wydzielanej całkowicie - wydzielanie podstawowe+ odruchowe. Test wykonywano bez znieczulenia. Do badania użyto pasków Tear Touch Schirmer Strips. Pacjenta proszono o patrzenie na wprost. Następnie po zagięciu paska w zaznaczonym miejscu zakładano go w 1/3 zewnętrznej brzoju powieki. Po 5 minutach pasek usuwano.

Interpretacja wyników:

>15 mm - wynik prawidłowy

10-15 mm - początkowy deficyt łez

5-10 mm - nasilony deficyt łez

<5 mm - zaawansowany ZSO

Do analizy w przeprowadzonym badaniu autorka użyła jedynie informacji :

>15 mm - wynik prawidłowy

<15 mm - wynik nieprawidłowy

### **4.3 Badania dodatkowe**

#### **4.3.1 Diagnostyka nużeńca**

Wszystkim pacjentom pobierano pęsetą 4 rzęsy z powieki górnej oraz 4 rzęsy z powieki dolnej obu oczu (z różnych części brzoju powieki) oraz po 4 włoski z brwi prawej i lewej. Pobierano również naskórek z powiek i okolicy oczu przy użyciu taśmy celofanowej, po wcześniejszym zeszkrobaniu powierzchniowej warstwy naskórka.

Pobrany materiał umieszczano na szkiełku podstawowym, dodawano kilka kropli 20% roztworu KOH, a następnie, po nakryciu szkiełkiem nakrywkowym, materiał oglądano pod mikroskopem świetlnym (Delta Optical) w powiększeniu 100x oraz 40x celem znalezienia pasożyta i określenia stopnia natężenia inwazji.

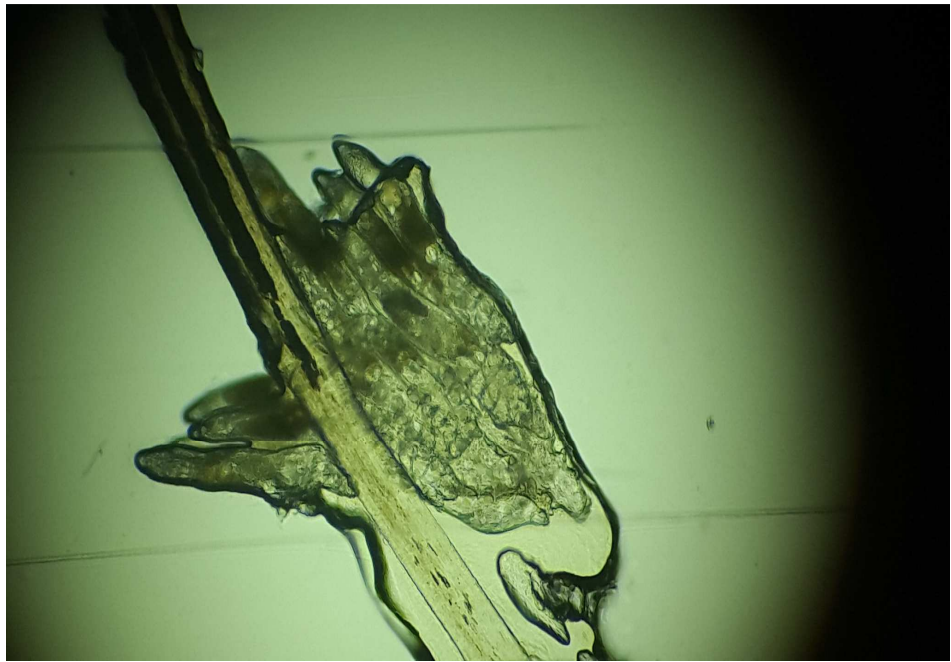
Za wynik dodatni traktowano obecność nużeńca ludzkiego (*Demodex folliculorum*) lub nużeńca krótkiego (*Demodex brevis*).

W ocenie natężenia zarażenia dokonano następującego podziału:

1. Inwazja o słabym nasileniu – obecność 1-2 osobników w mieszkum włosowym lub w jego pobliżu i/lub obecność 1 osobnika na 1 cm<sup>2</sup> powierzchni skóry twarzy
2. Inwazja o średnim nasileniu – obecność 3-5 osobników w mieszkum włosowym lub w jego pobliżu i/lub obecność 2 osobników na 1 cm<sup>2</sup> powierzchni skóry twarzy
3. Inwazja o ciężkim nasileniu – obecność 5 i więcej osobników w mieszkum włosowym lub w jego pobliżu i/lub obecność >2 osobników na 1 cm<sup>2</sup> powierzchni skóry twarzy (Ryc.15, Ryc.16).



Rycina 15. Obraz mikroskopowy inwazji nuceńca ludzkiego w mieszkum włosowym rzęsy u pacjenta objawowego – mikroskop świetlny (materiał własny).



Rycina 16. Obecność wielu osobników wewnątrz pochewki keratynowo-tłuszczowej w pobliżu mieszka włosowego brwi pacjenta objawowego – mikroskop świetlny (mat. własny).



Rycina 17. Obraz mikroskopowy osobnika dorosłego nuzęńca ludzkiego (*Demodex folliculorum*) wykryty na skórze powieki górnej – mikroskop świetlny (materiał własny).



Rycina 18. Obraz mikroskopowy osobnika dorosłego nużeńca krótkiego (*Demodex brevis*)- mikroskop świetlny (materiał własny).



Rycina.19: Obraz mikroskopowy osobników dorosłych nużeńca krótkiego (*Demodex brevis*) uwolnionych z pochewki keratynowo-tłuszczowej rzęsy pacjenta objawowego- mikroskop świetlny (materiał własny).

### 4.3.2 Oznaczenie stężenia IL-12p70 oraz IL-17A we łzach

W celu określenia zależności pomiędzy obecnością nużeńca a nasileniem odczynu zapalnego w obrębie odcinka przedniego oka przeprowadzono analizę stężenia wybranych cytokin zapalnych IL-12 oraz IL-17A badając ich poziom w filmie łzowym.

Pacjentom z obu grup pobrano łzy do dalszego badania. Materiał uzyskiwano przy możliwie jak najmniejszym zadrażnieniu oka, z dolnego menisku łzowego za pomocą mikrokapilar w ilości 100 mikrolitrów. Łzy umieszczano w probówkach i niezwłocznie zamrażano do temperatury  $-80^{\circ}$  C. Były one przechowywane w tej temperaturze do momentu wykonania oznaczenia stężenia cytokin.

Zebrany materiał przekazano do Zakładu Immunologii Katedry Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, gdzie dokonano oznaczenia stężenia interleukin w sposób opisany poniżej.

Po rozmrożeniu materiału do badania, stężenie IL-12p70 oraz IL-17A w badanych łzach oceniono przy użyciu komercyjnie dostępnych zestawów BD™ cytometric bead array (CBA) Enhanced Sensitivity Flex Set (BD Biosciences).

Wykorzystane testy umożliwiły ocenę stężenia badanych cytokin na bardzo niskim poziomie, poniżej 0,3 pg/ml. Ocenę przeprowadzono zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. System BD™ CBA Enhanced Sensitivity Flex Set składa się z zestawu zawierającego odpowiednie bufory, Human Enhanced Sensitivity Master Buffer Kit oraz zestawów Human Soluble Protein Enhanced Sensitivity Flex Sets, których połączenie umożliwia jednoczesną detekcję wielu rozpuszczalnych białek w badanym materiale przy zastosowaniu odpowiednich przeciwciał. Zestawy Human Soluble Protein Enhanced Sensitivity Flex Sets zawierają polimerowe kulki opłaszczane określonym przeciwciałem (Capture Beads), które poprzez powinowactwo do badanej cytokiny może wiązać się z nią wychwytyując ją z roztworu. Elementem detekcyjnym tego systemu są specyficzne dla badanego białka przeciwciała połączone z barwnikiem fluorescencyjnym (fikoerytryną; PE), wykazującym różne intensywności fluorescencji dla różnych badanych cytokin (Detection reagents - Part A oraz Enhanced Sensitivity Detection Reagent - Part B). Dzięki tej właściwości można selektywnie wykrywać badane cytokiny w zawiesinie przy pomocy cytometru przepływowego. Dzięki różnicom w intensywności fluorescencji emitowanej przez fluorochromy skoniugowane z polimerowymi kulkami można je przypisać do ściśle określonej pozycji na macierzowym wykresie kanałów fluorescencji FL3 i FL4, dzięki czemu połączenie różnych zestawów Human Soluble Protein Enhanced Sensitivity Flex Sets umożliwia

stworzenie multipleksu. Takie rozwiązanie umożliwia równoczesny pomiar stężenia wielu cytokin w niewielkiej objętości badanego materiału (50µl).

Po ustawieniu parametrów pomiarowych cytometru przepływowego zgodnie z odpowiednią procedurą (Instrument Setup) przeprowadzono analizę badanych lez. Do probówek cytometrycznych dodawano po 50µl badanych próbek oraz standardów określonych pod względem stężeń i przygotowanych w szeregach rozcieńczeń. Równocześnie przy użyciu dostarczonego buforu (ang. Capture Bead Diluent) przygotowano rozcieńczenia polimerowych kulek (ang. Capture Beads) opłaszczonych przeciwciałami i dodano je do wszystkich probówek w objętości 20µl. Tak przygotowane mieszaniny inkubowano w czasie 2 godzin w temperaturze pokojowej chroniąc przed dostępem światła. W kolejnym etapie do wszystkich probówek dodawano po 20µl przeciwciał detekcyjnych (Detection reagents - Part A) skierowanych przeciwko badanym cytokinom. Po dwugodzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej bez dostępu światła próbki płukano dostarczonym przez producenta buforem płuczającym i wirowano je przez 5 min przy prędkości 1500 obr./min. W kolejnym etapie do probówek dodano reagent detekcyjny o zwiększonej czułości (Enhanced Sensitivity Detection Reagent - Part B), a następnie inkubowano mieszaniny w czasie 1 godziny bez dostępu światła. Po tym czasie powtórzono procedurę płukania buforem płuczającym. Ostatecznie uzyskane kompleksy kulek, badanych cytokin i wyznakowanych fluorochromem przeciwciał detekcyjnych zawieszono w 300µl buforu płuczającego. Po wykonaniu akwizycji przy użyciu cytometru przepływowego FACSCanto za pomocą oprogramowania FACSDiva, uzyskane dane analizowano przy użyciu programu komputerowego FCAP Array™ Software (Becton Dickinson).

### 4.3.3 Badanie flory bakteryjnej worka spojówkowego

W celu przeprowadzenia oceny flory bakteryjnej worka spojówkowego pacjentów i jej korelacji z danymi na temat flory bakteryjnej nrużenia – u chorych wykonywano wymaz z worka spojówkowego. Badanie flory bakteryjnej w worku spojówkowym wykonano u 63 pacjentów (123 oczu), w tym u 33 chorych objawowych (64 oczy) oraz u 30 osób bezobjawowych (59 oczu).

Materiał pobierano ze spojówki powieki dolnej za pomocą ezy. Bezpośrednio po jego pobraniu wykonywano posiew redukcyjny na wybrane podłoża mikrobiologiczne stałe:

- TSA – agar tryptozowo-sojowy – jest to podłoże nieselektywne, namnażające dla bakterii tlenowych o niskich wymaganiach odżywczych i wzrostowych.
  - HAEM – agar czekoladowy – jest to podłoże selektywne wybiórczo różnicujące, ułatwia fenotypową ocenę wyrosłych kolonii. Podłoże przeznaczone jest do wzrostu drobnoustrojów o wysokich wymaganiach odżywczych i wzrostowych (w przypadku wymazu z worka spojówkowego - celem wykrycia gatunków należących do rodzaju *Haemophilus spp.*).
- płynne:
- TSB – bulion tryptozowo-sojowy - pozwalający na namnożenie wszystkich drobnoustrojów, których ilość w pierwotnie pobranej próbie była zbyt mała aby wyrosnąć bezpośrednio na stałym podłożu.

Pobrany materiał przekazywano do laboratorium mikrobiologicznego Szpitala Klinicznego UM Przemienienia Pańskiego w Poznaniu, gdzie dokonywano inkubacji. Czas prowadzenia hodowli, celem uzyskania wzrostu kolonii do oceny makroskopowej dla większości gatunków bakteryjnych wynosi od 18 do 24 godzin. Przeprowadzane inkubacje w toku niniejszej pracy badawczej wydłużono do 48 godzin, aby umożliwić wzrost wolniej rosnącym gatunkom drobnoustrojów. Inkubacja płytek z podłożem stałym (TSA oraz HAEM) trwała zatem 48 godzin i odbywała się w temperaturze 37°C, celem potwierdzenia lub wykluczenia obecności drobnoustrojów. Płytkę z podłożem HAEM umieszczana była w atmosferze 5-10 % CO<sub>2</sub> (zapewnianej przez eksykator lub generator wytwarzający gaz), w celu identyfikacji potencjalnych drobnoustrojów mikroaerofilnych.

Celem wykluczenia wzrostu grzybów, pobrany materiał poddano inkubacji na

wyżej wymienionych podłożach stałych, trwającej 72 godziny.

Inkubacja podłoża płynnego TSB, w przypadku, gdy nie zostało odnotowane jego zmętnienie trwała do pięciu dób i odbywała się w temperaturze 37°C. Jeżeli zmętnienie zostało odnotowane, było ono równoznaczne z namnożeniem mikroorganizmów w próbie badanej. Wówczas materiał przesiewany był na wcześniej wymienione podłoża wybiórczo-różnicujące, celem porównania wyników z bezpośredniego posiewu materiału klinicznego oraz po namnożeniu i umożliwieniu wzrostu mikroorganizmów wymagających, mogących występować na powierzchni oka.

Wynik jaki wówczas otrzymano wydawany był z dopiskiem „po namnożeniu”, bez możliwości dokonania oceny półilościowej w przypadku materiału namnożonego w podłożu płynnym. Jeżeli wzrost odnotowany był na posianych bezpośrednio przez pobierającego materiał płytkach z podłożem stałym, wówczas możliwa była ocena półilościowa, a wynik opisywany był jako „wzrost pojedynczych kolonii”/ „średnio obfity”/ „obfity”/ „bardzo obfity”.

## 5. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano w programie STATISTICA v.12.0 (StatSoft, Inc. 2014. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)). Wszystkie wyniki uznano za istotne przy  $p < 0,05$ .

Za pomocą liczebności oraz wartości procentowej przedstawiono parametry wyrażone w skali nominalnej takie jak: rozpoznanie podstawowe, zgłaszane objawy okulistyczne, odchylenia w badaniu powieki i spojówki, wyniki testów i badań dodatkowych (test Schirmera oraz nieprawidłowy wynik testu TBUT) oraz ocena wyników wymazów z worka spojówkowego. Do porównania częstości występowania poszczególnych rozpoznań podstawowych ze względu na płeć, a także częstości zgłaszania poszczególnych objawów okulistycznych i częstości występowania odchyłeń w badaniu powiek i spojówki w zależności od grupy oraz częstości występowania odchyłeń w badaniu powiek i spojówki w zależności od występowania nużeńca, użyto testu różnic między dwoma wskaźnikami struktury.

W przeprowadzonych badaniach użyto również testu Chi-kwadrat w celu sprawdzenia zależności między nasileniem zakażenia nużeńcem w mieszkach włosowych rzęs, brwi oraz skóry powiek i okolic oczu a grupą.

Testu Fishera użyto w celu sprawdzenia zależności między częstością występowania nużeńca a grupą oraz płcią, częstością występowania poszczególnych rozpoznań podstawowych, częstością występowania objawów suchego oka. Test ten wykorzystano również do sprawdzenia zależności między obecnością IL-17 a częstością poszczególnych rozpoznań podstawowych, a także zależność pomiędzy występowaniem nużeńca a obecnością bakterii w worku spojówkowym.

Wartości parametrów wyrażonych w skali ilościowej, takich jak: wiek, fałdy LIPCOF, rogówka – skala oksfordzka, TBUT, poziom IL-17 oraz IL-12, OSDI przedstawiono za pomocą liczebności, wartości średniej, wartości minimalnej i maksymalnej oraz odchylenia standardowego. Do porównania wyżej wymienionych parametrów między pacjentami objawowymi i bezobjawowymi, a także do porównania ze względu na występowanie nużeńca lub jego brak wykorzystano nieparametryczny test Manna – Whitney' a dla zmiennych niepowiązanych.

W celu sprawdzenia zależności między poziomem IL-17 i IL-12 a OSDI użyto nieparametrycznego testu korelacji rang Spearmana.

## **6. Wyniki**

### **6.1 Część I - Pacjenci objawowi oraz bezobjawowi.**

#### **6.1.1 Analiza wyników badania podmiotowego**

##### **a) objawy okulistyczne zgłaszane przez pacjentów**

Wśród pacjentów objawowych najczęściej zgłaszaną dolegliwością okulistyczną w chwili badania było uczucie dyskomfortu w oczach, które występowało u 73% pacjentów (n=47). W dalszej kolejności zgłaszali oni swędzenie oczu - 64% (n=41) oraz uczucie piasku pod powiekami - 63% pacjentów (n=40). Pieczenie oczu zgłaszane było przez 58% chorych (n=37), obecność porannej wydzieliny przez 50% (n=32), łzawienie oczu zgłaszało 48% pacjentów (n=31), pogorszenie widzenia - 39% (n=25), natomiast światłowstręt obecny był u 36% pacjentów (n=23) objawowych.

Pacjenci bezobjawowi w chwili przeprowadzania badania nie zgłaszali objawów mających związek z chorobami powierzchni oka.

##### **b) wyniki uzyskane w kwestionariuszu OSDI**

Odpowiedzi na pytania z kwestionariusza opracowanego na podstawie kwestionariusza OSDI udzieliło 52 pacjentów objawowych oraz 42 pacjentów bezobjawowych.

Współczynnik OSDI, będący wyznacznikiem nasilenia dolegliwości zespołu suchego oka, był zdecydowanie wyższy wśród pacjentów objawowych niż bezobjawowych (36,47 +/- 22,09 vs. 16,05 +/- 18,28 ; p<0,0001) (Tab.II). Oznaczało to większe nasilenie objawów suchego oka zgłaszane przez pacjentów objawowych. Nie wykazano jednak związku pomiędzy współczynnikiem OSDI a zarażeniem nużeńcem w poszczególnych grupach.

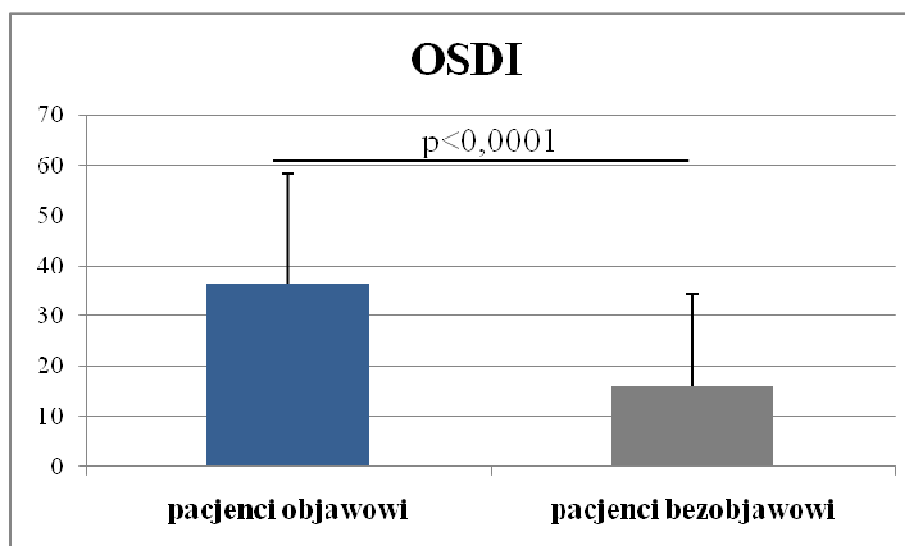
W grupie pacjentów objawowych, u których występowało zakażenie nużeńcem, średnia wartość współczynnika OSDI wyniosła 36,32 +/- 22,16, natomiast u osób bez

infestacji 37,62 +/- 23,59 (p= 0,7909).

W grupie pacjentów bezobjawowych, średnia wartość współczynnika OSDI u osób zarażonych nużeńcem wyniosła 10,20 +/- 9,72, natomiast u osób bez zarażenia 21,89 +/- 22,78 ( p= 0,1196) (Tab.III, Ryc.20).

Tabela II. Wartość współczynnika OSDI u pacjentów bezobjawowych oraz pacjentów objawowych.

OSDI	N	średnia	mediana	Min.	Max.	SD	p testu
Pacjenci bezobjawowi	42	16,05	9,94	0,00	81,81	18,28	<b>&lt;0,0001</b>
Pacjenci objawowi	52	36,47	33,33	0,00	92,31	22,09	



Rycina 20. Średnia wartość współczynnika OSDI wśród pacjentów objawowych oraz pacjentów bezobjawowych.

Tabela III. Ocena związku pomiędzy współczynnikiem OSDI a zarażeniem nużeńcem u pacjentów objawowych i bezobjawowych.

	Występowanie nużeńca	N	średnia	mediana	min.	max.	SD	p testu
Pacjenci bezobjawowi	nie	21	21,89	14,58	0,00	81,81	22,78	0,1196
	tak	21	10,20	7,69	0,00	28,84	9,72	
Pacjenci objawowi	nie	6	37,62	43,34	5,77	66,67	23,59	0,7909
	tak	46	36,32	32,74	0,00	92,31	22,16	

## **6.1.2 Analiza wyników badania przedmiotowego**

Wprawdzie u wszystkich pacjentów przeprowadzono rutynowe badanie ostrości wzroku, jednak parametr ten nie był brany pod uwagę w ostatecznej analizie statystycznej z uwagi na obecność zaćmy, wynikającej z zaawansowanego wieku części pacjentów z obu grup. Jej obecność uniemożliwiła obiektywne stwierdzenie ewentualnych zaburzeń ostrości wzroku, mogących mieć związek z chorobami powierzchni oka.

### **Odchylenia w badaniu odcinka przedniego**

#### **a) Powieki**

W grupie pacjentów objawowych, w badaniu odcinka przedniego obserwowano następujące odchylenia: teleangiektazje na brzegach powiek w 69% oczu (n=88), przekrwienie brzegów powiek w 65% oczu (n=83), mankiety keratynowe (łupież cylindryczny) u podstawy rzęs w 84% oczu (n=107), nieprawidłowości we wzroście rzęs w 12% (n=15), zaczopowanie ujść gruczołów Meiboma w 69% (n=87), gradówki w 6% (n=7), guzy skóry powiek (inne niż rak podstawnokomórkowy- tj. brodawczaki, cysty, kępki żółte) w 13% (n=16), rak podstawnokomórkowy (stwierdzony na podstawie badania histopatologicznego po wycięciu zmiany) w 6% oczu (n=7). Zapalenie brzegów powiek rozpoznano w 92% oczu (n=118).

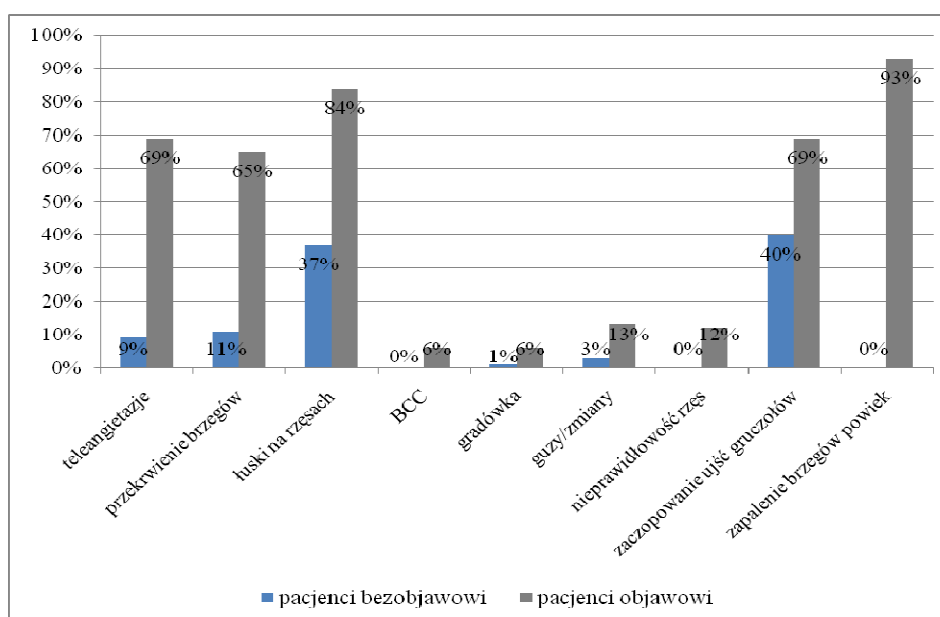
W grupie pacjentów bezobjawowych w badaniu odcinka przedniego obserwowano następujące zmiany: teleangiektazje w 9% oczu (n=8), przekrwienie brzegów powiek w 11% oczu (n=10), mankiety keratynowe (łupież cylindryczny) u podstawy rzęs w 37% oczu (n=33), zaczopowanie ujść gruczołów Meiboma w 11% oczu, gradówki w 1% oczu oraz guzy inne niż rak podstawnokomórkowy w 40% oczu (n=36). Nie stwierdzono nieprawidłowości we wzroście rzęs oraz obecności raka podstawnokomórkowego wśród pacjentów bezobjawowych. U żadnego pacjenta nie rozpoznano zapalenia brzegów powiek.

W analizie porównawczej wykazano istotną statystycznie różnicę w częstości występowania teleangiektazji, przekrwienia brzegów powiek, mankietów keratynowych (łupieżu cylindrycznego) oraz zaczopowania ujść gruczołów Meiboma pomiędzy pacjentami objawowymi a pacjentami bezobjawowymi ( $p < 0,0001$ ). Istnieje także różnica między pacjentami w częstości występowania zmian takich jak: rak podstawnokomórkowy ( $p = 0,0313$ ), guzy inne niż rak podstawnokomórkowy ( $p = 0,0106$ ), nieprawidłowości wzrostu rzęs ( $p = 0,0007$ ) oraz występowaniu zapalenia

brzegów powiek. Zmiany częściej występowały u pacjentów objawowych (Tab.IV, Ryc.21).

Tabela IV. Odchylenia w badaniu powiek u pacjentów objawowych i bezobjawowych (n-liczba badanych oczu)

powieki	Pacjenci bezobjawowi (n=90)		Pacjenci objawowi (n=127)		p testu różnic
	n	%	n	%	
teleangiatazje	8	9	88	69	<0,0001
przekrwienie brzegów powiek	10	11	83	65	<0,0001
mankiety keratynowe na rzęsach	33	37	107	84	<0,0001
BCC	0	0	7	6	0,0180
gradówka	1	1	7	6	0,0617
guzy/zmiany inne niż BCC	3	3	16	13	0,0106
nieprawidłowości wzrostu rzęs	0	0	15	12	0,0007
zaczopowanie ujść gruczołów	36	40	87	69	<0,0001
zapalenie brzegów powiek	0	0	118	93	<0,0001



Rycina 21. Graficzne przedstawienie częstości występowania odchyłek w badaniu powiek u pacjentów objawowych i bezobjawowych.

## b) Spojówka

W grupie pacjentów objawowych zbadano spojówkę gałkową u 64 osób, w 127 oczach. W badaniu spojówki przekrwienie występowało w 58% oczu (N=74), natomiast nieprawidłowy menisk łzowy (<1 mm) występował w 64% oczu (n=82).

W grupie pacjentów bezobjawowych ( 45 pacjentów, 90 oczu) przekrwienie spojówki występowało w 16% (n=14), natomiast menisk łzowy <1 mm występował w 24% (n=22).

Wykazano istotną statystycznie różnicę zarówno w występowaniu zadrażnienia spojówki, jak i w wielkości menisku łzowego pomiędzy pacjentami objawowymi i bezobjawowymi (  $p < 0,0001$ ). Zadrażnienie spojówki i zmniejszenie menisku łzowego (< 1mm) częściej występowało u osób zgłaszających objawy ( Tab.V).

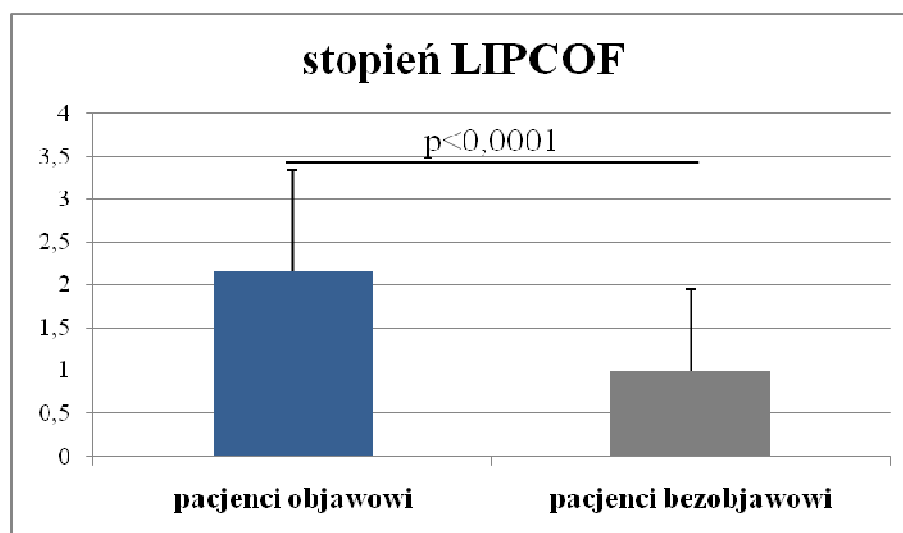
Tabela V. Ocena spojówki u pacjentów objawowych i bezobjawowych.

spojówka	Pacjenci bezobjawowi(n=90)		Pacjenci objawowi(n=127)		p testu różnic
	n	%	n	%	
zadrażnienie/przekrwienie	14	16	74	58	<0,0001
menisk łzowy <1mm	22	24	82	64	<0,0001

Test Manna-Whitney'a wykazał statystycznie istotną różnicę między ilością fałdów spojówkowych w skali LIPCOF u pacjentów objawowych i pacjentów bezobjawowych ( $p < 0,0001$ ). Osoby zgłaszające objawy prezentowały wyższy stopień w skali LIPCOF, co świadczyło o większym nasileniu zespołu suchego oka (ZSO) w tej grupie (2,14 +/- 1,18 vs. 0,98 +/- 0,96) (Tab.VI, Ryc.22).

Tabela VI. Ocena fałdów spojówkowych w skali LIPCOF u pacjentów objawowych i bezobjawowych, ( n- liczba oczu).

fałdy LIPCOF	n	średnia	mediana	min.	max.	SD	p testu
Pacjenci objawowi	127	2,14	3,00	0,00	3,00	1,17	<0,0001
Pacjenci bezobjawowi	90	0,98	1,00	0,00	3,00	0,96	



Rycina 22. Wykres przedstawiający średnią wartość wyników w skali LIPCOF u pacjentów objawowych oraz bezobjawowych.

### c) Rogówka

Do oceny rogówki użyto wyżej wspomnianej skali oksfordzkiej. Test Manna-Whitney'a wykazał statystycznie istotną różnicę między uszkodzeniem powierzchni rogówki w grupie pacjentów objawowych i bezobjawowych ( $p < 0,0001$ ). Wyższy stopień, który świadczy o większym uszkodzeniu powierzchni oka, odnotowano w grupie pacjentów objawowych ( $0,52 \pm 0,97$  vs.  $0,06 \pm 0,23$ ) ( Tab.VII).

Tabela VII. Stopień uszkodzenia rogówki w skali oksfordzkiej u pacjentów z grupy objawowej i bezobjawowej

rogówka-skala oksfordzka	Liczba badanych oczu	średnia	mediana	min.	max.	SD	p testu
Pacjenci objawowi	127	0,52	0,00	0	3	0,97	$<0,0001$
Pacjenci bezobjawowi	90	0,06	0,00	0	1	0,23	

### d) Ocena jakościowa i ilościowa filmu łzowego

#### - test Schirmera

Podczas analizy ilości oczu z nieprawidłowym wynikiem testu Schirmer'a (zwilżenie paska  $< 15$  mm), istotnie statystycznie większą ich liczbę stwierdzono w grupie pacjentów objawowych w porównaniu do grupy pacjentów bezobjawowych

(46% vs. 6% ;  $p < 0,0001$ ) (Tab.VIII, Ryc.23).

#### - test TBUT

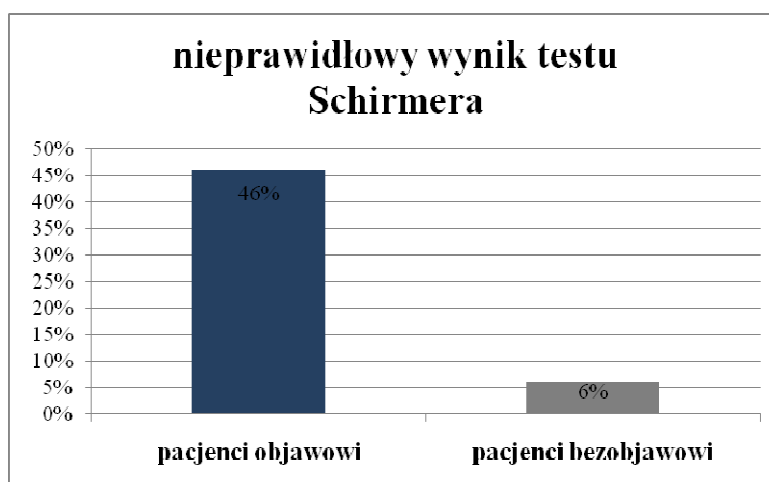
W badaniu przerywania filmu łzowego wynik nieprawidłowy testu (<10 sek.) otrzymano w 83% oczu ( $n=106$ ) pacjentów objawowych i w 61% oczu ( $n=55$ ) pacjentów bezobjawowych, co dało istotną statystycznie różnicę ( $p=0,0003$ ) (Tab. IX).

Również wartości testu przerywania filmu łzowego osiągnięte w oczach pacjentów objawowych wykazywały istotną statystycznie różnicę w porównaniu do pacjentów bezobjawowych. W grupie zgłaszających objawy średnia wartość testu wynosiła 6,38 +/- 2,56 sek., natomiast w grupie bez objawów wynosiła ona 7,92 +/- 2,74 sek. ( $p < 0,0001$ ) (Tab.IX, Ryc.24).

Zarówno wyniki ankiet i otrzymany w nich współczynnik OSDI, jak i wyniki obu testów (test Schirmer'a oraz TBUT) wykazały, iż w grupie pacjentów objawowych zespół suchego oka pojawiał się częściej i był bardziej nasilony niż w grupie pacjentów bezobjawowych.

Tabela VIII. Wyniki testów dodatkowych u pacjentów objawowych i bezobjawowych.

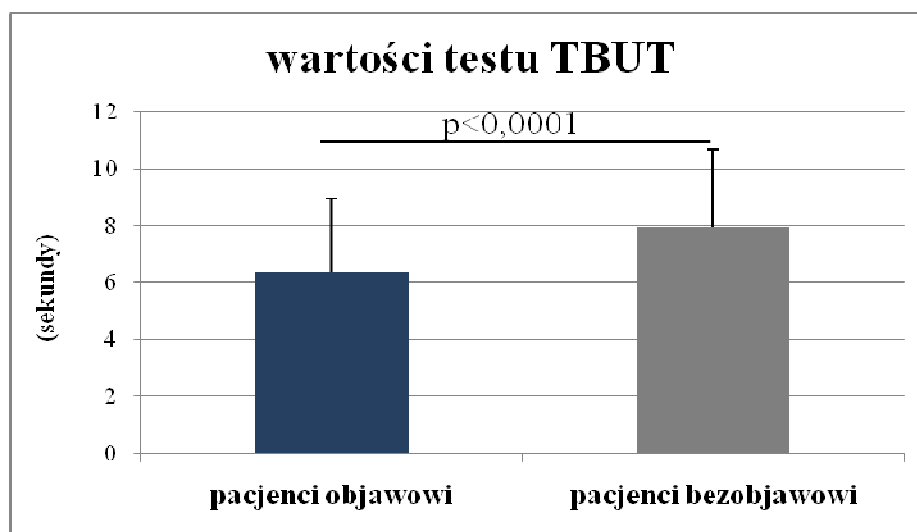
	Pacjenci objawowi ( $n=127$ )		Pacjenci bezobjawowi ( $n=90$ )		p testu różnic
	N	%	N	%	
Nieprawidłowy wynik testu Schirmera	58	46	5	6	<0,0001
Nieprawidłowy wynik TBUT	106	83	55	61	0,0003



Rycina 23. Częstość występowania nieprawidłowości w teście Schirmera u pacjentów bezobjawowych i objawowych.

Tabela IX. Wartości testu TBUT otrzymane w oczach pacjentów bezobjawowych i objawowych.

TBUT	Liczba badanych oczu	średnia	mediana	min.	max.	SD	p testu
Pacjenci objawowi	127	6,38	6,00	2,00	11,00	2,56	<b>&lt;0,0001</b>
Pacjenci bezobjawowi	90	7,92	8,00	3,00	11,00	2,74	



Rycina 24. Wykres średnich wartości testu przerwania ciągłości filmu łzowego otrzymanych u pacjentów objawowych i bezobjawowych.

### 6.1.3 Wyniki badań dodatkowych

#### a) Wyniki badania na obecność nużenia

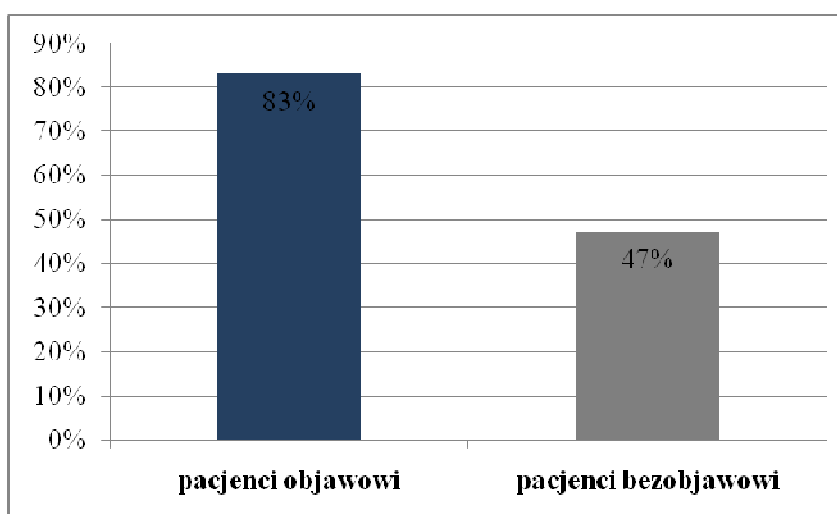
W grupie pacjentów objawowych obecność nużenia wykryto u 83% badanych (n=53), średnia wieku wynosiła 66,57 +/- 15,98, podczas gdy w grupie pacjentów bezobjawowych występował on u 47% (n=21) badanych, a średnia wieku wynosiła 72,33 +/- 8,61 (Tab.X, Ryc.25). Istnieje zatem zależność pomiędzy występowaniem nużenia a obecnością dolegliwości związanych z aparatem ochronnym oka lub powierzchnią gałki ocznej – w grupie pacjentów objawowych nużenie występowało istotnie statystycznie częściej niż w grupie pacjentów bezobjawowych (p= 0,0001) (Tab. XI).

Tabela X. Struktura wiekowa pacjentów bezobjawowych i pacjentów objawowych w zależności od występowania nużeńca.

WIEK	Występowanie nużeńca	n	średnia	mediana	SD	p testu
Pacjenci bezobjawowi	nie	24	59,17	65,00	18,66	0,0071
	tak	21	72,33	72,00	8,61	
Pacjenci objawowi	nie	11	58,30	63,50	21,54	0,2676
	tak	53	66,57	67,00	15,98	

Tabela XI. Ocena częstości występowania nużeńca u pacjentów objawowych i bezobjawowych.

	Pacjenci objawowi (n=64)		Pacjenci bezobjawowi (n=45)		p testu różnic
	n	%	n	%	
występowanie nużeńca	53	83	21	47	0,0001



Rycina 25. Częstość występowania nużeńca u pacjentów objawowych i bezobjawowych.

Podobna zależność wystąpiła w analizie badanych oczu. W grupie pacjentów objawowych nużeńca wykryto w 68% oczu (n= 86), podczas gdy w grupie pacjentów bezobjawowych występował on w 30% oczu (n=27). Potwierdzono, że nużeniec występował statystycznie istotnie częściej w grupie pacjentów objawowych niż bezobjawowych ( $p < 0,0001$ ) (Tab.XII).

Tabela XII. Analiza częstości występowania nużeńca w oczach pacjentów objawowych i bezobjawowych.( n- liczba badanych oczu)

	Pacjenci objawowi (n=127)		Pacjenci bezobjawowi (n=90)		p testu różnic
	n	%	n	%	
występowanie nużeńca	86	68	27	30	<0,0001

W badaniu przeanalizowano również częstość oraz nasilenie zarażenia nużeńcem w konkretnych lokalizacjach - w mieszkach włosowych rzęs, brwi oraz jego obecność na skórze okolicy oczu.

U pacjentów objawowych, spośród 127 badanych oczu, w 28% (n=35) nasilenie występowania nużeńca w mieszkach włosowych rzęs było łagodne, w 19% oczu (n=24) umiarkowane, natomiast w 13% (n=17) nasilenie inwazji nużeńcem było znaczne (Tab.XIII).

U pacjentów bezobjawowych, w badaniu rzęs pobranych z 90 oczu, zarażenie nużeńcem miało charakter łagodny w 16% (n=14) oczu, umiarkowany w 10% (n= 9) oraz znaczny w 2% (n=2) ( Tab. XIII, Wykres 10). Pacjenci tej grupy w chwili włączenia do badania nie zgłaszali żadnych dolegliwości związanych z odcinkiem przednim oka, pomimo stwierdzenia u nich nawet nasilonej inwazji pasożyta.

Test Chi-kwadrat wykazał, iż istnieje zależność pomiędzy natężeniem występowania nużeńca w mieszkach włosowych rzęs, a dolegliwościami zgłaszanymi przez pacjentów (p<0,0001). Statystycznie istotnie wyższe natężenie inwazji wykazano u pacjentów objawowych.

Tabela XIII. Zależność pomiędzy nasileniem zarażenia nużeńcem w obrębie rzęs a obecnością dolegliwości ze strony odcinka przedniego oka.

stopień nasilenia zarażenia w rzęsach	Pacjenci objawowi (n=127)		Pacjenci bezobjawowi (n=90)	
	n	%	n	%
0	52	41	65	72
1	35	28	14	16
2	24	19	9	10
3	17	13	2	2

W badaniu na obecność nużeńca w brwiach, w grupie pacjentów objawowych, spośród 127 badanych oczu w 9% (n=11) nasilenie występowania nużeńcem było

łagodne, w 9% oczu (n=12) umiarkowane, natomiast w 6% (n=7) nasilenie inwazji nużeńcem było wysokie.

W grupie pacjentów bezobjawowych badano zarażenie w mieszkach włosowych brwi w 90 oczach. Infestacja nużeńcem miała charakter łagodny w 4% (n=4) oczu, umiarkowany w 1% (n= 1), natomiast nie stwierdzono zarażenia nużeńcem o ciężkim stopniu nasilenia w żadnym z badanych oczu ( Tab.XIV, Ryc.26).

Test Chi-kwadrat wykazał, iż istnieje zależność pomiędzy natężeniem występowania nużeńca w obrębie brwi a obecnością dolegliwości ze strony aparatu ochronnego oka lub powierzchni gałki ocznej (p= 0,0012). Statystycznie istotnie wyższe natężenie wykazano w grupie pacjentów objawowych.

W analizie pod kątem obecności nużeńca na skórze powiek i okolicy oka, w grupie pacjentów objawowych, na 127 badanych oczu nasilenie infestacji nużeńcem w stopniu łagodnym stwierdzono w 20% (n= 26), w stopniu umiarkowanym występowało w 5% (n=6), natomiast zarażenie o znacznym nasileniu zdiagnozowano w 2% oczu ( n=3).

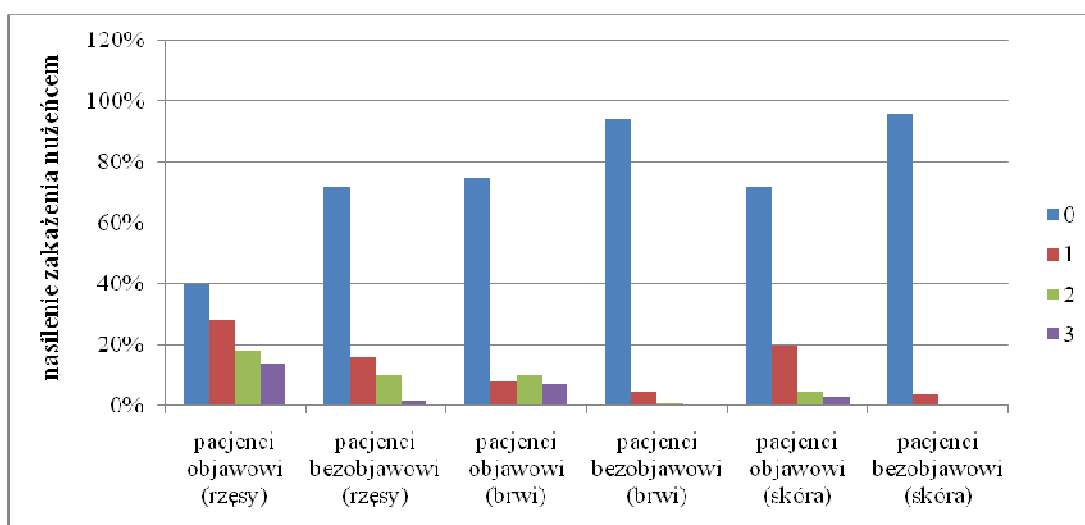
Tabela XIV. Zależność pomiędzy nasileniem zarażenia nużeńcem w obrębie brwi a obecnością objawów ze strony odcinka przedniego oka (n-liczba oczu).

stopień nasilenia zarażenia w brwiach	Pacjenci objawowi (n=127)		Pacjenci bezobjawowi (n=90)	
	N	%	N	%
0	98	77	85	95
1	11	9	4	4
2	12	9	1	1
3	7	6	0	0

W grupie pacjentów bezobjawowych stopień lekki infestacji nużeńcem występował w 4% oczu. W żadnym z badanych oczu na skórze powiek nie występowało zarażenie w stopniu umiarkowanym oraz znacznym.(Tab.XV, Ryc.26)

Tabela XV. Zależność pomiędzy nasileniem zarażenia nużeńcem na skórze powiek i okolicy oka a obecnością objawów ze strony odcinka przedniego u pacjentów.

stopień nasilenia zarażenia na skórze	Pacjenci objawowi (n=127)		Pacjenci bezobjawowi (n=90)	
	n	%	n	%
0	93	73	86	96
1	26	20	4	4
2	6	5	0	0
3	3	2	0	0



Rycina 26. Rozkład stopnia nasilenia zarażenia nużeńcem u pacjentów bezobjawowych i objawowych w różnych lokalizacjach związanych z narządem wzroku.

#### b) Wyniki badań immunologicznych

##### - analiza stężeń IL-17A oraz IL-12 we łzach

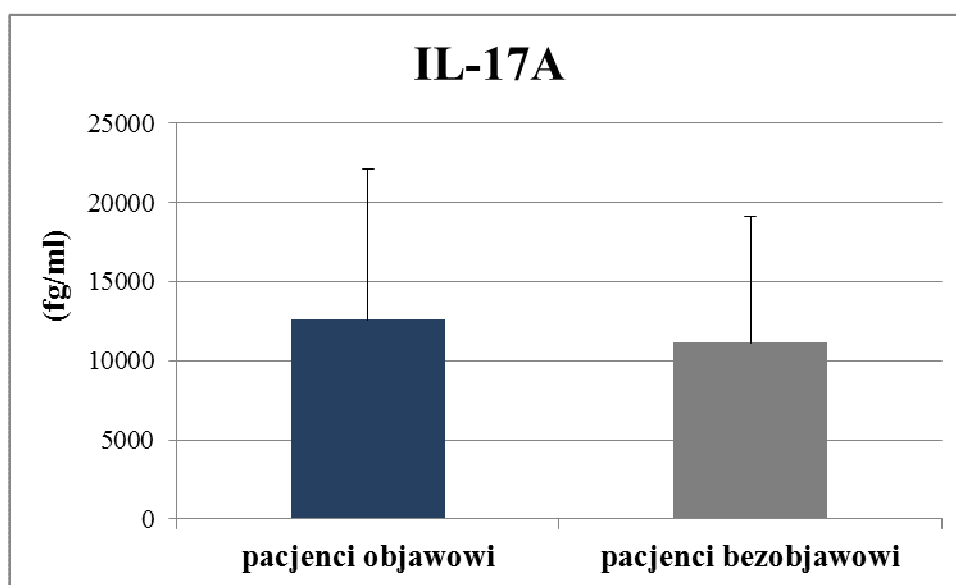
Ze względu na ograniczenia związane z ilością łez w worku spojówkowym badanych pacjentów (zespół suchego oka, wiek pacjentów, brak współpracy pacjentów podczas pobierania łez), materiał do zbadania poziomu cytokin zapalnych pobrano od 56 osób ( w tym od 32 pacjentów objawowych i od 24 pacjentów bezobjawowych). Podczas analizy pobranych próbek w 2 przypadkach stwierdzono niewystarczającą ilość materiału do wykonania testu natomiast w próbkach od 39 pacjentów nie uzyskano odczytu (w tym w 22 przypadkach z grupy pacjentów objawowych i 17 z grupy pacjentów bezobjawowych). Ostatecznie analizie poddano materiał pochodzący od 15 pacjentów, w tym 9 pacjentów objawowych i 6 pacjentów bezobjawowych.

U pacjentów objawowych średnie stężenie IL-17A wyniosło 12569,09 fg/ml, natomiast u osób bez objawów – 11138,71 fg/ml ( $p=0,7756$ ) (Tab.XVI, Ryc.27).

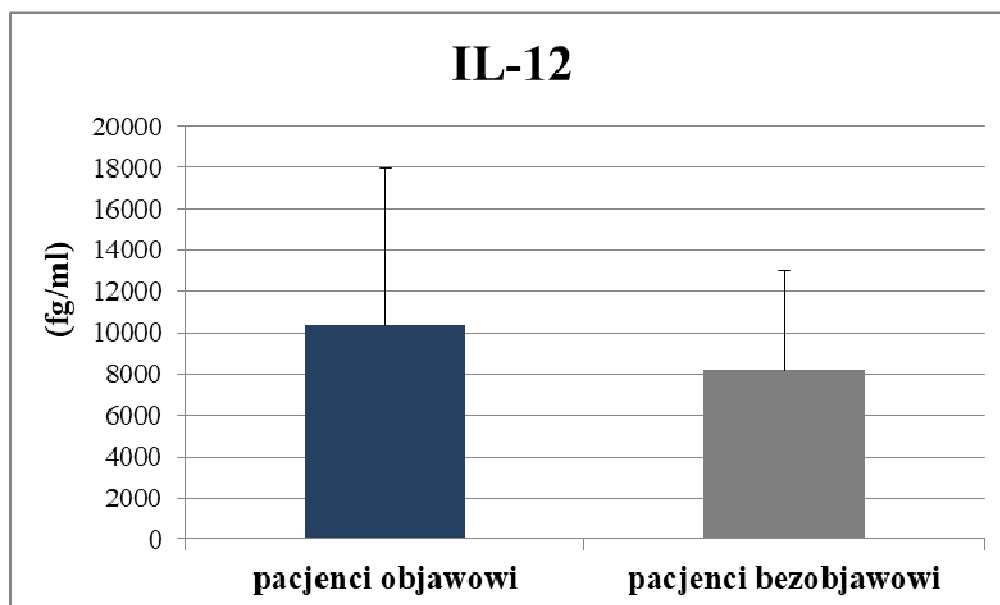
Średnie stężenie IL-12 w grupie pacjentów objawowych wyniosło 10326,30 fg/ml, natomiast w grupie pacjentów bezobjawowych – 8190,79 fg/ml ( $p=0,4559$ ) (Tab.XVI, Ryc.28). Pomimo wyższego średniego stężenia interleukin u pacjentów objawowych, nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w średnim stężeniu cytokin zapalnych pomiędzy grupami.

Tabela XVI. Stężenia IL-17A oraz IL-12 u pacjentów objawowych oraz bezobjawowych.

	pacjenci	n	średnia	mediana	min.	max.	SD	p testu
IL-17	bezobjawowi	6	11138,71	7220,21	3656,64	23241,02	8016,26	0,7756
	objawowi	9	12569,09	10116,67	2281,71	258333,26	9546,89	
IL-12	bezobjawowi	6	8190,79	7593,04	2596,43	16833,01	4818,62	0,4559
	objawowi	9	10326,30	9772,51	347,04	20397,74	7645,42	



Rycina 27. Rozkład średnich stężeń IL-17A we łzach u pacjentów objawowych oraz bezobjawowych.



Rycina 28. Rozkład średnich stężeń IL-12 we łzach u pacjentów objawowych i bezobjawowych.

c) Wyniki badań mikrobiologicznych

Wymazy z worka spojówkowego pobrano od 33 pacjentów objawowych i od 30 pacjentów bezobjawowych. W grupie pacjentów objawowych zbadano 64 oczu (dwóch pacjentów wyraziło zgodę na pobranie wymazu tylko z jednego oka), natomiast w grupie pacjentów bezobjawowych 59 oczu.

Wśród pacjentów objawowych w worku spojówkowym wykazano obecność następujących bakterii (Tab.XVII, XVIII):

- *Staphylococcus* spp. – występował u 88% badanych pacjentów (n=29)
- *Streptococcus viridians* – występował u 24% badanych pacjentów (n=8)
- *Kocuria varians* – u żadnego z badanych pacjentów (n=0)
- *Staphylococcus aureus* – u 12% badanych pacjentów (n=4)
- *Enterococcus faecalis* – u żadnego z badanych pacjentów (n=0)
- *Corynephorm* – u 3% badanych pacjentów (n=1)
- *Micrococcus* spp.- u 15% badanych pacjentów

Wśród pacjentów bezobjawowych odnotowano obecność następujących bakterii (Tab.XVII,XVIII):

- *Staphylococcus* spp. – u 83% badanych pacjentów (n=25)
- *Stahylococcus viridians* – u 10% badanych pacjentów(n=3)
- *Staphylococcus aureus* – u 10% badanych pacjentów (n=3)
- *Kocuria varians* – u 3% badanych pacjentów( n=1)
- *Enterococcus faecalis* – u 3% badanych pacjentów (n= 1)
- *Corynephorm* – u 3% badanych pacjentów (n=1)
- *Micrococcus* spp.- u żadnego z badanych pacjentów

Tabela XVII. Ocena wyników wymazów z worka spojówkowego pacjentów objawowych i bezobjawowych.

	Pacjenci objawowi (n=33)		Pacjenci bezobjawowi (n=30)		p testu różnic
	n	%	n	%	
<i>Staphylococcus</i> spp.	29	88	25	83	0,5722
<i>Streptococcus viridians</i>	8	24	3	10	0,1426
<i>Kokuria</i>	0	0	1	3	0,3163
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	12	3	10	0,8003
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	1	3	0,3163
<i>Corynephorm</i>	1	3	1	3	1,0000
<i>Micrococcus</i> spp.	5	15	0	0	0,0271

Tabela XVIII. Ocena wyników wymazów z worka spojówkowego z uwzględnieniem liczby oczu pacjentów (n- liczba badanych oczu).

	Pacjenci objawowi (n=64)		Pacjenci bezobjawowi (n=59)		p testu różnic
	n	%	n	%	
<i>Staphylococcus spp.</i>	51	80	44	75	0,5064
<i>Streptococcus viridians</i>	8	13	4	7	0,2704
<i>Kokuria</i>	0	0	1	2	0,2556
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	6	4	7	0,8219
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	2	3	0,1628
<i>Coryneform</i>	1	2	1	2	1,0000
<i>Micrococcus spp.</i>	6	9	0	0	0,0183

## 6.2 Część II- pacjenci z nużeńcem oraz pacjenci bez nużeńca

### 6.2.1 Analiza wyników badania podmiotowego

Wśród wszystkich 109 badanych pacjentów, nużeńca zdiagnozowano u 74 osób. Pasożyt nie wystąpił u 35 badanych.

W analizie wyników badania podmiotowego wykazano zależność pomiędzy zarażeniem nużeńcem a wiekiem pacjentów. Istotnie statystycznie częściej pasożyt występował u osób starszych ( $p= 0,0132$ ) (Tab.XIX).

Tabela XIX. Zależność pomiędzy zarażeniem nużeńcem a wiekiem pacjentów.

Wiek	liczba pacjentów	średnia	min.	max.	SD	p testu M-W
Pacjenci nużeńcem z	74	68,20	28	89	14,46	0,0132
Pacjenci nużeńca bez	35	58,91	24	84	19,22	

### Częstość występowania dolegliwości okulistycznych

W grupie pacjentów z nużeńcem najczęściej zgłaszanym objawem okulistycznym było uczucie dyskomfortu w oczach, które występowało u 51% badanych (n=38). W dalszej kolejności pacjenci z grupy z nużeńcem zgłaszali swędzenie oczu– 49% (n=36). Uczucie piasku pod powiekami oraz pieczenie oczu zgłaszane były przez 43%

pacjentów (n=32). U 39% (n=29) pojawiła się poranna wydzielina w oczach, natomiast 36% pacjentów (n=27) zgłaszało łzawienie oczu. Pogorszenie widzenia zgłaszało 27% pacjentów (n=20), natomiast światłowstręt wystąpił u 26 % badanych (n=19).

W grupie pacjentów bez nużenia 26% (n=9) zgłaszało dyskomfort w oczach. Uczucie piasku pod powiekami występowało u 23% (n=8) badanych. Pieczenie i swędzenie oczu a także pogorszenie widzenia zgłaszało 14% (n=5) pacjentów. U 11 % (n=4) występowało łzawienie oraz światłowstręt, natomiast obecność porannej wydzieliny wystąpiła jedynie u 9% (n=3).

U osób z obecnością nużenia, istotnie statystycznie częściej występowały objawy okulistyczne takie jak: dyskomfort, pieczenie, swędzenie, łzawienie, uczucie piasku w oczach oraz obecność porannej wydzieliny w worku spojówkowym. Nie odnotowano istotnej różnicy w częstości występowania światłowstrętu oraz pogorszenia widzenia pomiędzy pacjentami (Tab. XX).

Tabela XX. Częstość występowania poszczególnych objawów okulistycznych u pacjentów z nużeniem i bez nużenia.

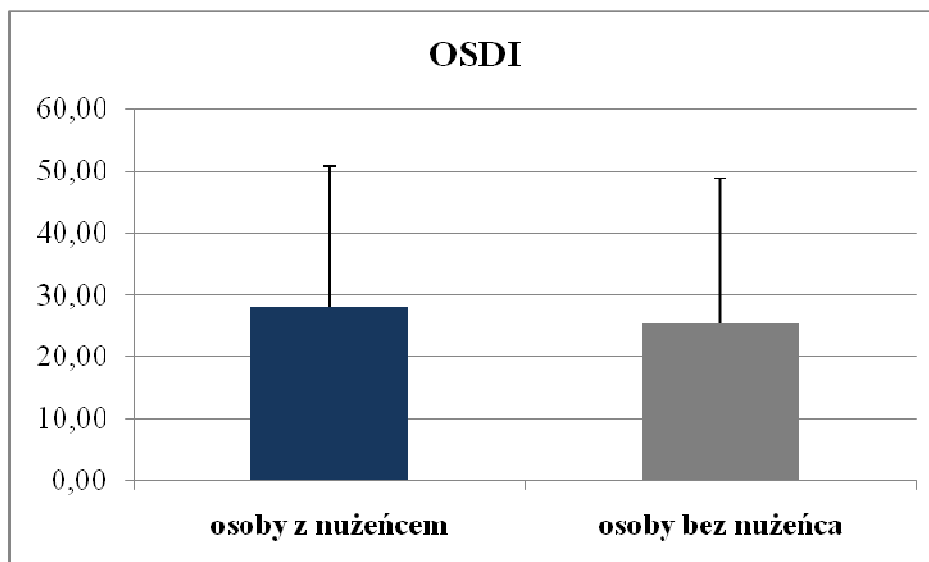
objawy okulistyczne	Osoby bez nużenia (n=35)		Osoby z nużeniem (n=74)		p testu różnic
	n	%	n	%	
dyskomfort	9	26	38	51	0,0013
pieczenie	5	14	32	43	0,0028
swędzenie	5	14	36	49	0,0004
łzawienie	4	11	27	36	0,0066
światłowstręt	4	11	19	26	0,0735
uczucie piasku w oczach	8	23	32	43	0,0430
pogorszenie widzenia	5	14	20	27	0,1311
poranna wydzielina	3	9	29	39	0,0013

Odpowiedzi na pytania z kwestionariusza opracowanego na podstawie kwestionariusza OSDI udzieliło 27 pacjentów z grupy bez nużenia oraz 67 pacjentów z grupy z nużeniem.

Współczynnik OSDI, będący wyznacznikiem nasilenia dolegliwości zespołu suchego oka był nieznacznie wyższy w grupie osób z nużeniem niż w grupie osób bez nużenia (28,14 +/- 22,64 vs. 25,39 +/- 23,47 ; p=0,5386) (Tab. XXI, Ryc.29).

Tabela XXI. Wartość współczynnika OSDI w grupie bez nużeńca oraz grupie z nużeńcem.

	Występowanie nużeńca	N	średnia	mediana	min	max	SD	p testu M-W
OSDI	nie	27	25,39	22,73	0,00	81,81	23,47	0,5386
	tak	67	28,14	23,08	0,00	92,31	22,64	



Rycina 29. Wykres wartości współczynnika OSDI w grupie bez nużeńca oraz w grupie z nużeńcem.

## 6.2.2 Analiza wyników badania przedmiotowego

### Odchylenia w badaniu odcinka przedniego

#### a) Powieki

W grupie pacjentów z nużeńcem obserwowano następujące odchylenia w badaniu powiek: teleangiektazje na brzegach powiek występowały u 55% pacjentów (n=41), przekrwienie brzegów powiek u 53% badanych (n=39), mankiety keratynowe (łupież cylindryczny) u podstawy rzęs u 80% (n=59), nieprawidłowości we wzroście rzęs u 12% pacjentów (n=9), zaczopowanie ujść gruczołów Meiboma u 70% badanych (n=52), gradówki u 4% (n=3), guzy skóry powiek (inne niż rak podstawnokomórkowy) u 15% (n=11), rak podstawnokomórkowy u 8% pacjentów (n=6), zapalenie brzegów powiek u 68% (n=50).

W grupie pacjentów bez obecności nużeńca, w badaniu powiek wykazano obecność teleangiektazji u 20% badanych (n=7). Przekrwienie brzegów powiek występowało u 23% pacjentów (n=8), mankiety keratynowe na rzęsach obecne były u 37% (n=13), nieprawidłowości we wzroście rzęs u 3% (n=1). Występowanie raka

podstawnokomórkowego stwierdzono u 3% pacjentów (n=1), natomiast guzy inne niż rak podstawnokomórkowy wystąpiły u 11% (n=4). Gradówkę zdiagnozowano u 6% badanych (n=2), zaczopowanie ujść gruczołów Meiboma u 46% (n=16), natomiast zapalenie brzegów powiek u 26% (n=9).

W przeprowadzonych badaniach wykazano istnienie zależności pomiędzy zakażeniem nużeńcem a występowaniem odchyłań w badaniu odcinka przedniego oka. W grupie pacjentów ze zdiagnozowanym nużeńcem, w porównaniu z grupą osób u których nie stwierdzono obecności pasożyta, statystycznie istotnie częściej występowały teleangiektazje na brzegach powiek (p=0,0006), ich przekrwienie (p=0,0032), mankiety keratynowe u podstawy rzęs (p<0,0001), zaczopowane ujścia gruczołów Meiboma (p=0,0158) oraz zapalenie brzegów powiek (p<0,0001). Nie stwierdzono natomiast zależności pomiędzy zakażeniem nużeńcem a występowaniem raka podstawnokomórkowego skóry (BCC) (p=0,4009), gradówek (p=0,6431), guzów skóry powiek innych niż rak podstawnokomórkowy (p=0,5709) oraz nieprawidłowego wzrastania rzęs (p=0,1274) (Tab. XXII).

Podobne zależności wystąpiły w analizie badanych oczu ( Tab.XXIII).

Tabela XXII. Zależność pomiędzy zakażeniem nużeńcem a odchyleniami w badaniu przedmiotowym ( n= liczba badanych pacjentów).

Odchylenia w badaniu powiek	Osoby bez nużeńca (n=35)		Osoby z nużeńcem (n=74)		p testu różnic
	n	%	n	%	
teleangiektazje	7	20	41	55	0,0006
przekrwienie brzegów	8	23	39	53	0,0032
mankiety keratynowe na rzęsach	13	37	59	80	<0,0001
BCC	1	3	6	8	0,4009
gradówka	2	6	3	4	0,6431
guzy/zmiany	4	11	11	15	0,5709
nieprawidłowość rzęs	1	3	9	12	0,1274
zaczopowanie ujść gruczołów Meiboma	16	46	52	70	0,0158
zapalenie brzegów powiek	9	26	50	68	<0,0001

Tabela XXIII. Zależność pomiędzy zarażeniem nużeńcem a odchyleniami w badaniu przedmiotowym (n- liczba badanych oczu).

Odchylenia w badaniu powiek	Osoby bez nużeńca (n=70)		Osoby z nużeńcem (n=147)		p testu różnic
	n	%	n	%	
teleangiektazje	14	20	82	56	<0,0001
przekrwienie brzegów	16	23	77	52	0,0001
łuski na rzęsach	25	36	117	80	<0,0001
BCC	1	1	6	4	0,2281
gradówka	2	3	6	4	0,7142
guzy/zmiany	6	9	13	9	1
nieprawidłowość rzęs	2	3	13	9	0,1067
zaczopowanie ujść gruczołów Meiboma	26	37	97	66	0,0001
zapalenie brzegów powiek	18	26	100	68	<0,0001

#### b) Spojówka

W grupie pacjentów z nużeńcem zbadano spojówkę gałkową u 74 osób, w 147 oczach. Jeden pacjent był pacjentem jednoocznym. W badaniu spojówki przekrwienie występowało w 48% oczu (n=71), natomiast nieprawidłowy menisk łzowy (<1 mm) występował w 58% oczu (n=86).

W grupie pacjentów bez nużeńca (35 pacjentów, 70 oczu) przekrwienie spojówki występowało w 24% badanych oczu (n=17), natomiast menisk łzowy <1 mm występował w 26% oczu (n=18).

Wykazano istotną statystycznie różnicę zarówno w występowaniu zadrażnienia spojówki (p=0,007), jak i w wielkości menisku łzowego pomiędzy grupami (p<0,0001). Zadrażnienie spojówki i zmniejszenie menisku łzowego częściej występowało u pacjentów z rozpoznaniem nużeńcem (Tab.XXIV, Tab.XXV).

Tabela XXIV. Zależność pomiędzy zarażeniem nużeńcem a odchyleniami w badaniu spojówki ( n- liczba badanych oczu)

	Grupa bez nużeńca (n=70)		Grupa z nużeńcem (n=147)		p testu różnic
	n	%	n	%	
zadrażnienie	17	24	71	48	0,0007
menisk łzowy<1	18	26	86	58	<0,0001

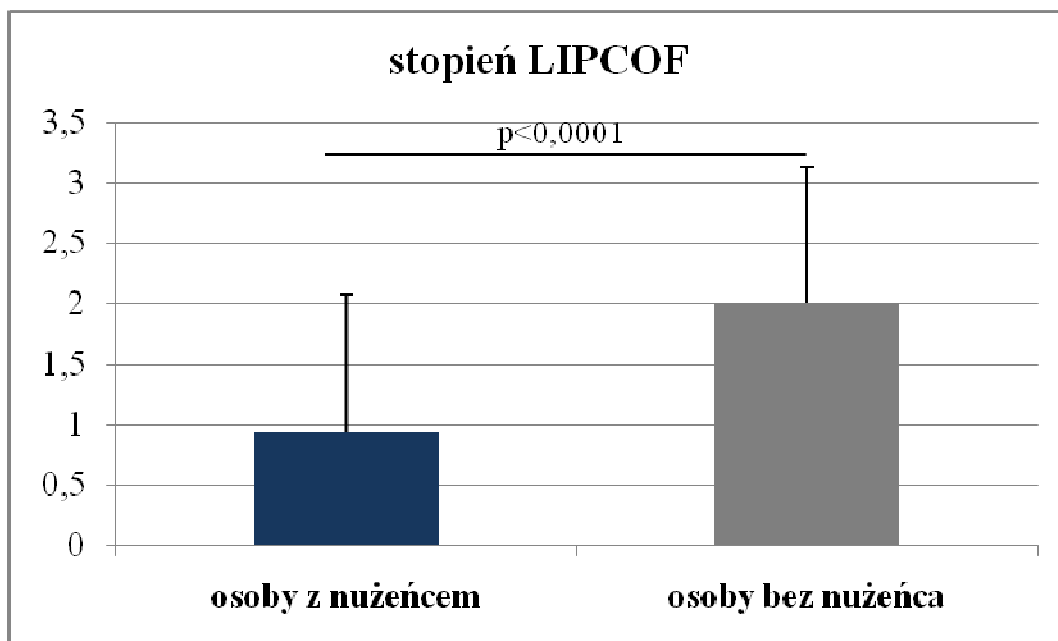
Tabela XXV. Ocena menisku łzowego u pacjentów ze zdiagnozowanym nużeniem i osób bez pasożyta ( n- liczba pacjentów)

spojówka	Osoby z nużeniem (n=74)		Osoby bez nużenia (n=35)		p testu różnic
	n	%	n	%	
menisk łzowy >1	32	43	27	77	0,0009
menisk łzowy <1	44	59	10	29	0,0034

Test Manna-Whitney'a wykazał statystycznie istotną różnicę między ilością fałdów spojówkowych w skali LIPCOF grupy pacjentów z nużeniem i grupy bez nużenia ( $p < 0,0001$ ). Grupa pacjentów z nużeniem prezentowała wyższy stopień LIPCOF, co świadczyło o większym nasileniu zespołu suchego oka (ZSO) w tej grupie (2,00 +/- 1,13 vs. 0,94 +/- 1,13) ( Tab.XXVI, Ryc.30).

Tabela XXVI. Ocena fałdów spojówkowych w skali LIPCOF u pacjentów z grupy z nużeniem i bez nużenia ( n- liczba badanych oczu).

	Grupa	n (liczba oczu)	średnia	mediana	min	max	SD	p testu M-W
fałdy LIPCOF	Bez nużenia	70	0,94	0,00	0,00	3,00	1,13	<0,0001
	Z nużeniem	147	2,00	2,00	0,00	3,00	1,13	



Rycina 30. Ocena fałdów spojówkowych w skali LIPCOF w oczach pacjentów z grupy z nużeniem i bez nużenia.

### c) Rogówka

W ocenie rogówki za pomocą skali oksfordzkiej nie wykazano statystycznie istotnej różnicy między stopniem uszkodzenia powierzchni oka w grupie pacjentów z nużeniem i bez obecności pasożyta ( $p=0,7856$ ) (Tab.XXVII). Rozkład poszczególnych stopni uszkodzenia rogówki w skali oksfordzkiej w obu grupach przedstawiono w Tabeli XXVIII.

Tabela XXVII. Ocena średniej wartości stopnia uszkodzenia powierzchni rogówki w skali oksfordzkiej u pacjentów ze zdiagnozowanym nużeniem i bez nużenia, ( n-liczba badanych oczu).

	Grupa	n	średnia	mediana	min	max	SD	p testu M-W
skala oksfordzka	Bez nużenia	70	0,33	0,00	0,00	3,00	0,83	0,7856
	Z nużeniem	147	0,33	0,00	0,00	3,00	0,78	

Tabela XXVIII. Ocena stopnia uszkodzenia powierzchni rogówki w skali oksfordzkiej u pacjentów ze zdiagnozowanym nuzęncem i bez obecności pasożyta (n- liczba badanych oczu).

skala oksfordzka	Osoby bez nuzęńca (n=70)		Osoby z nuzęncem (n=147)		p testu różnic
	n	%	n	%	
1	59	84	121	82	0,7161
2	3	4	10	7	0,3856
3	4	6	10	7	0,7827
4	4	6	6	4	0,5129

#### d) Ocena jakościowa i ilościowa filmu łzowego

##### - test Schirmera

Test Schirmera przeprowadzono w 147 oczach pacjentów z nuzęncem oraz w 70 oczach pacjentów bez nuzęńca. Jeden pacjent z grupy z nuzęncem był pacjentem jednoocznym.

W analizie wyników testu Schirmera w oczach pacjentów z nuzęncem i bez nuzęńca wykazano zależność pomiędzy występowaniem pasożyta a nieprawidłowym wynikiem testu (zwilżenie paska <15 mm) ( $p=0,0064$ ). Spośród 147 oczu pacjentów u których wykryto obecność nuzęńca, w 35% ( $n=51$ ) otrzymano nieprawidłowy wynik testu Schirmera. Natomiast spośród 70 oczu pacjentów bez zarażenia nuzęncem, wynik testu Schirmera był nieprawidłowy w 17% oczu ( $n=12$ ) (Tab XXX).

Zależności nie otrzymano podczas analizy liczby pacjentów z nieprawidłowym wynikiem testu (min. w jednym oku). Spośród 74 pacjentów z potwierdzoną obecnością nuzęńca, nieprawidłowy wynik testu Schirmera wystąpił u 35% ( $n=26$ ), natomiast u osób bez zarażenia pasożytem test Schirmera był nieprawidłowy u 20% ( $n=7$ ), co dało różnicę nieistotną statystycznie ( $p=0,1112$ ) (Tab.XXIX)

##### - test TBUT

Test przerywania filmu łzowego przeprowadzono w 147 oczach pacjentów z nuzęncem oraz w 70 oczach pacjentów bez nuzęńca.

W badaniu przerywania filmu łzowego wynik nieprawidłowy (<10 sek.) otrzymano w 81% oczu ( $n=119$ ) pacjentów z grupy z nuzęncem i w 60% oczu ( $n=42$ ) pacjentów z grupy bez nuzęńca, co dało istotną statystycznie różnicę ( $p=0,0162$ ) (Tab. XXX). Również analiza ilości pacjentów z nieprawidłowym wynikiem testu TBUT

przynajmniej w jednym oku wykazała różnicę istotną statystycznie (88% pacjentów z nużeńcem vs.69% osób bez nużeńca,  $p=0,0162$ ) (Tab. XXIX).

Analiza średniej wartości testu przerwania filmu łzowego w grupie pacjentów zarażonych nużeńcem oraz bez zarażenia wykazała statystycznie istotną różnicę. Średnia wartość testu TBUT w grupie z nużeńcem wyniosła  $6,67 \pm 2,55$ , natomiast w grupie bez nużeńca –  $7,74 \pm 2,99$  ( $p=0,0111$ ), (Tab.XXXI, Ryc.31).

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić zależność pomiędzy występowaniem nużeńca a nieprawidłowym wynikiem testu

Tabela XXIX. Ocena związku pomiędzy nieprawidłowym wynikiem testów Schirmera oraz przerwania ciągłości filmu łzowego a obecnością nużeńca ( n- liczba pacjentów).

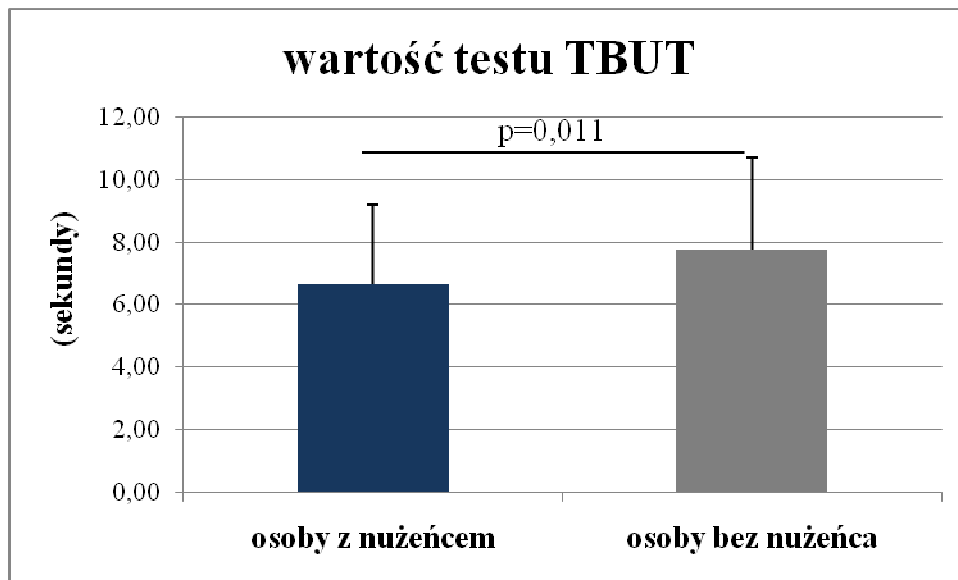
	Osoby bez nużeńca (n=35)		Osoby z nużeńcem (n=74)		p testu różnic
	n	%	n	%	
test Schirmera <15 mm	7	20	26	35	0,1112
TBUT <10 sek.	24	69	65	88	<b>0,0162</b>

Tabela XXX. Ocena związku pomiędzy nieprawidłowym wynikiem testów Schirmera oraz przerwania ciągłości filmu łzowego a obecnością nużeńca ( n- liczba badanych oczu).

	Osoby bez nużeńca (n=70)		Osoby z nużeńcem (n=147)		p testu różnic
	n	%	n	%	
test Schirmera	12	17	51	35	<b>0,0064</b>
TBUT	42	60	119	81	<b>0,0009</b>

Tabela XXXI. Analiza średniej wartości testu przerwania filmu łzowego w grupie pacjentów zarażonych nużeńcem oraz bez zarażenia (n- liczba badanych oczu).

		n	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odch.std	p testu M_W
TBUT	bez nużeńca	70	7,74	8,00	2,00	11,00	2,99	<b>0,0111</b>
	z nużeńcem	147	6,67	6,00	3,00	11,00	2,55	



Rycina 31. Wykres średniej wartości testu przerywania filmu łzowego w grupie pacjentów zarażonych nużeńcem oraz bez zarażenia.

### 6.2.3 Wyniki badań dodatkowych

#### a) Wyniki badań immunologicznych

##### - analiza stężeń IL-17A oraz IL-12 we łzach

Ze względu na ograniczenia opisane w „Części I” w rozdziale „6.1.3 b”, poziom cytokin zapalnych we łzach zanalizowano u 15 osób, z czego grupa pacjentów z nużeńcem liczyła 11 osób, natomiast grupa bez nużenia 4 osoby.

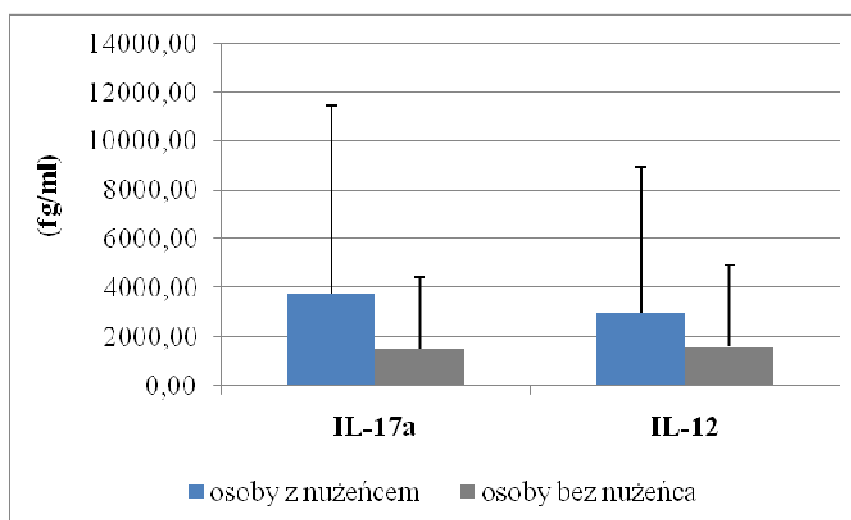
U pacjentów z grupy z nużeńcem średnie stężenie IL-17A wyniosło 14646,07 fg/ml, natomiast u osób z grupy bez nużenia – 4711,82 fg/ml, co dało istotną statystycznie różnicę ( $p=0,0396$ ), (Tab.XXXII).

Średnie stężenie IL-12 w grupie osób z nużeńcem wyniosło 11235,85 fg/ml, natomiast w grupie bez nużenia – 4621,76 fg/ml ( $p=0,1377$ ).

W przypadku obu badanych cytokin ich średnie stężenie było wyższe u pacjentów zarażonych nużeńcem, przy czym w przypadku IL-17A różnica ta była istotna statystycznie. (Tab.XXXII, Ryc.32).

Tabela XXXII. Analiza poziomu cytokin zapalnych (IL-17A oraz IL-12) we łzach pacjentów z nużeniem i bez nużenia. ( n- liczba pacjentów).

	Obecność nużenia	n	średnia	mediana	min	max	SD	p testu M-W
IL-17	nie	4	4711,82	3760,92	2281,71	9043,73	2972,15	0,0396
	tak	11	14646,07	10574,03	3360,35	25833,26	8612,91	
IL-12	nie	4	4621,76	3427,74	927,40	10704,15	4276,97	0,1377
	tak	11	11235,85	9223,85	347,04	20397,74	6457,04	



Rycina 32. Wykres przedstawiający poziom cytokin zapalnych ( IL17A oraz IL-12) we łzach pacjentów z nużeniem i bez nużenia.

### b) wyniki badań mikrobiologicznych

Wymazy z worka spojówkowego pobrano od 46 pacjentów z grupy z nużeniem i od 17 pacjentów z grupy bez nużenia. W grupie z nużeniem zbadano 90 oczu, natomiast w grupie bez nużenia 33 oczy.

Wśród pacjentów z grupy z nużeniem, w worku spojówkowym wykazano obecność następujących bakterii (Tab.XXXIII):

- *Staphyococcus spp.* – występowały u 89% badanych pacjentów (n=41)
- *Streprococcus viridians* – występowały u 20% badanych pacjentów (n=9)
- *Kocuria varians* – występowały u 2% badanych pacjentów (n=1)
- *Staphylococcus aureus* – u 15% badanych pacjentów(n=7)

- *Enterococcus faecalis* – u żadnego z badanych pacjentów (n=0)
- *Coryneform* – u 2% badanych pacjentów (n=1)
- *Micrococcus spp*- u 9% badanych pacjentów (n=4)

Za wynik dodatni uznano obecność bakterii w wymazie przynajmniej z jednego oka.

Wśród pacjentów z grupy bez nużeńca, w worku spojówkowym odnotowano obecność następujących bakterii (Tab.XXXIV):

- *Staphylococcus spp.* – u 76% badanych pacjentów (n=13)
- *Stahylococcus viridians* – u 12% badanych pacjentów (n=2)
- *Staphylococcus aureus* – u żadnego pacjenta (n=0)
- *Kocuria varians* – u żadnego pacjenta ( n=0)
- *Enterococcus faecalis* – u 6% badanych pacjentów (n= 1)
- *Coryneform* – u 6% badanych pacjentów (n=1)
- *Micrococcus spp*- u 6% badanych pacjentów (n=1)

Za wynik dodatni uznano obecność bakterii w wymazie przynajmniej z jednego oka.

Tabela XXXIII. Częstość występowania bakterii w worku spojówkowym pacjentów z grupy z nużeńcem i bez nużeńca (n-liczba pacjentów).

	Osoby bez nużeńca (n=17)		Osoby z nużeńcem (n=46)		p testu różnic
	N	%	N	%	
<i>Staphylococcus spp</i>	13	76	41	89	0,1934
<i>Streptococcus viridians</i>	2	12	9	20	0,4616
<i>Kokuria varians</i>	0	0	1	2	0,5569
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	7	15	0,0906
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	6	0	0	0,0939
<i>Coryneform</i>	1	6	1	2	0,4146
<i>Micrococcus spp</i>	1	6	4	9	0,6999

Tabela XXXIV. Częstość występowania bakterii w worku spojówkowym pacjentów z grupy z nużeniem i bez nużenia (n-liczba badanych oczu).

	Osoby bez nużenia (n=33)		Osoby z nużeniem (n=90)		p testu różnic
	N	%	N	%	
<i>Staphylococcu spp</i>	11	67	73	81	0,1002
<i>Streptococcus viridians</i>	2	6	10	11	0,4051
<i>Kokuria varians</i>	0	0	1	1	0,5642
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	8	9	0,0754
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	6	0	0	0,0185
<i>Corynephorn</i>	1	3	1	1	0,423
<i>Micrococcus spp</i>	1	3	5	6	0,5062

#### 6.2.4 Analizy dodatkowe

##### a) Analiza zależności pomiędzy zakażeniem nużeniem a płcią

##### - u pacjentów objawowych i bezobjawowych

W badaniu pacjentów objawowych i bezobjawowych nie wykazano zależności między zarażeniem nużeniem a płcią. W grupie pacjentów objawowych nużenie występowało u 78% (n=29) badanych kobiet i u 89% (n=24) badanych mężczyzn (p=0,2512) (Tab.XXXV).

W grupie pacjentów bezobjawowych nużenie był obecny u 48% (n=12) kobiet i u 45% (n=9) mężczyzn (p= 0,8411) (Tab. XXXVI).

Tabela XXXV. Występowanie nużenia w zależności od płci u pacjentów objawowych .

	kobiety (n=37)		mężczyźni (n=27)		p testu różnic
	n	%	n	%	
występowanie nużenia	29	78	24	89	0,2512

Tabela XXXVI. Występowanie nużenia w zależności od płci pacjentów bezobjawowych.

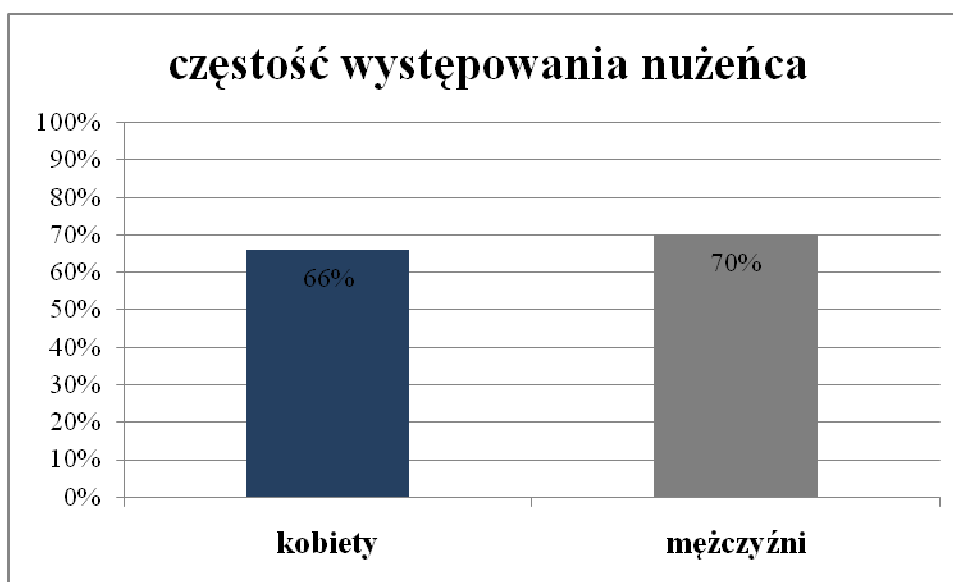
	kobiety (n=25)		mężczyźni (n=20)		p testu różnic
	N	%	N	%	
występowanie nużenia	12	48	9	45	0,8411

### - u wszystkich badanych

W badaniu wszystkich pacjentów nie wykazano zależności pomiędzy zarażeniem pasożytem a płcią. ( $p=0,3930$ ). Spośród wszystkich badanych kobiet, u 66% występował nużeniec ( $n=41$ ), natomiast wśród badanych mężczyzn pasożyta wykryto u 70% ( $n=33$ ) (Tab. XXXVII, Ryc.33).

Tabela XXXVII. Występowanie nużeńca w zależności od płci u wszystkich badanych.

	kobiety (n=62)		mężczyźni (n=47)		p testu różnic
	n	%	n	%	
występowanie nużeńca	41	66	33	70	0,3930



Rycina 33. Rozkład częstości występowania nużeńca w zależności od płci wśród wszystkich badanych pacjentów.

### b) Analiza zależności pomiędzy zakażeniem nużencem a wiekiem

#### - pacjenci objawowi i bezobjawowi

W analizie grupy pacjentów objawowych nie wykazano zależności pomiędzy zarażeniem pasożytem a wiekiem pacjentów ( $p=0,2676$ ), natomiast wykazano taką zależność w grupie pacjentów bezobjawowych ( $0,0071$ ) (Tab.XXXVIII).

Tabela XXXVIII. Analiza zależności pomiędzy zarażeniem nużeńcem a wiekiem pacjentów objawowych i bezobjawowych.

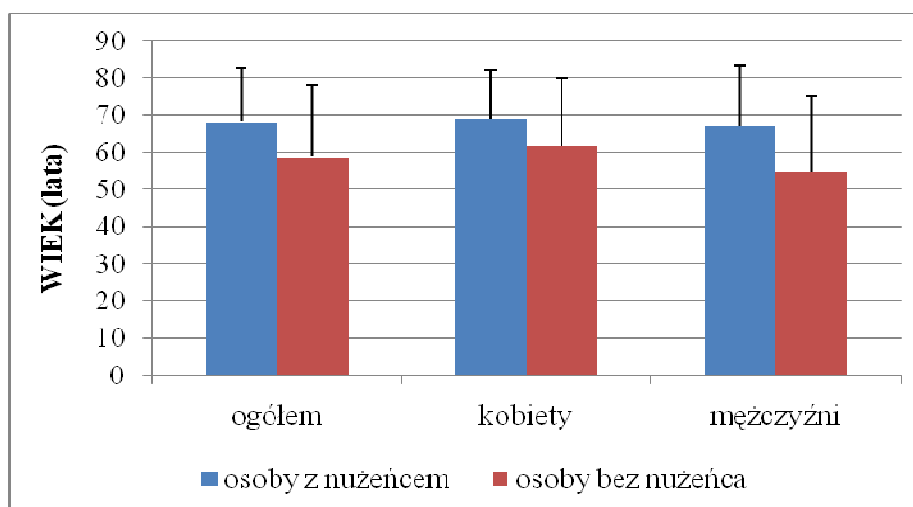
WIEK	Występowanie nużeńca	N	średnia	mediana	min.	max.	SD	p testu
Pacjenci bezobjawowi	nie	24	59,17	65,00	24,00	82,00	18,66	0,0071
	tak	21	72,33	72,00	51,00	85,00	8,61	
Pacjenci objawowi	nie	10	58,30	63,50	25,00	84,00	21,54	0,2676
	tak	53	66,57	67,00	28,00	89,00	15,98	

**- grupa z nużeńcem i bez nużeńca**

W analizie grupy z nużeńcem oraz grupy bez nużeńca wykazano zależność pomiędzy zarażeniem pasożytem a wiekiem pacjentów. Istotnie statystycznie częściej pasożyt występował u osób starszych ( $p= 0,0132$ ) (Tab.XXXIX, Ryc.34).

Tabela XXXIX. Zależność pomiędzy zarażeniem nużeńcem a wiekiem pacjentów

Wiek	liczba pacjentów	średnia	min.	max.	SD	p
Pacjenci z nużeńcem	74	68,20	28	89	14,46	0,0132
Pacjenci bez nużeńca	35	58,91	24	84	19,22	



Rycina 34. Struktura wiekowa obu grup z podziałem na mężczyzn i kobiety.

**c) korelacji pomiędzy poziomem IL-17A oraz IL-12 a wielkością współczynnika OSDI**

Zarówno dla IL-17A jak i IL-12 nie stwierdzono korelacji pomiędzy ich stężeniem a wielkością współczynnika OSDI. W przypadku IL-17A współczynnik korelacji dla wszystkich badanych pacjentów wynosił  $r = 0,011$  (przy  $p=0,9702$ ).

Dla IL-12 współczynnik korelacji u wszystkich pacjentów wyniósł  $0,077$  (przy  $p=0,7934$ ).

Można zatem wnioskować, że zwiększony poziom cytokin zapalnych we łzach nie nasila dyskomfortu odczuwanego przez pacjentów, związanego z suchością gałki ocznej.

## 7. Dyskusja

Nużeniec ludzki (*Demodex folliculorum*) i nużeniec krótki (*Demodex brevis*) są kosmopolitycznymi roztoczymi, będącymi jednocześnie najczęściej występującymi ektopasożytami u ludzi. Miejsce ich bytowania wiąże się ze źródłem pokarmu jaki spożywają a więc z gruczołami łojowymi oraz mieszkami włosowymi. Spożywają one komórki naskórka oraz składniki łoju, występują zatem głównie na skórze twarzy (okolice nosa, policzków, czoła i brody). Taka lokalizacja pasożytów jest ściśle związana ze skórą powiek, a także ich brzegiem a więc rzęsami oraz gruczołami łojowymi (Meiboma). Nużeńce mogą również zajmować skórę klatki piersiowej, okolic genitalnych, a także przewód słuchowy zewnętrzny.

Tak rozległy obszar występowania nużeńca sprawia, że jest on obiektem zainteresowania naukowców z różnych dziedzin. Od lat toczą się dyskusje odnośnie patogenności pasożyta wśród dermatologów, okulistów oraz laryngologów.

Naukowcy zajmujący się dermatologią - Akilov i Mumcugovlu (2004) uważali, że obecność nużeńca na skórze twarzy w większości przypadków nie prowadzi do rozwoju objawów chorobowych [28]. Lacey i wsp. byli zdania, iż nużeniec występujący na skórze człowieka może być składnikiem jej mikroflory i może żyć w symbiozie z organizmem ludzkim. Dopuszczali możliwość, że obecność nużeńca na skórze może przynosić korzyści gospodarzowi, gdyż mikroorganizm ten żywi się bakteriami lub innymi mikroorganizmami. Autorzy powyższej publikacji zaznaczali jednak, że taka sytuacja ma miejsce przy prawidłowo działającym wrodzonym systemie immunologicznym gospodarza, który kontroluje ilość roztoczy poprzez hamujący wpływ na ich proliferację, bez wywoływania nasilonej odpowiedzi zapalnej [7]. Według danych literaturowych, występujące na skórze korzystne dla nużeńca warunki zwiększają jego potencjał proliferacyjny, co z kolei powoduje, że z komensala może przekształcić się w pasożyta wywołującego szkodę dla żywiciela [48,49].

Podejrzewa się, że w przypadku skóry twarzy warunkami, które mogą ułatwiać namnażanie roztoczy są zwiększone pH powierzchni skóry, zmniejszony poziom jej nawodnienia [3], dysfunkcja bariery naskórkowej [50] oraz nieprawidłowy skład kwasów tłuszczowych powierzchniowej warstwy lipidowej skóry. W przypadku, gdy liczba roztoczy występujących w mieszku włosowym przekroczy graniczny poziom, może dojść do jego rozdęcia i przerwania ciągłości jego ściany. Wówczas dochodzi do

uwolnienia zawartości mieszka do otaczających tkanek [3]. Ze strony gospodarza może dochodzić do uwolnienia cytokin/chemokin i zapoczątkowania humoralnej odpowiedzi zapalnej oraz rozwoju klinicznie widocznych zmian, a także do rozwoju reakcji ziarniniakowej typu „ciała obcego” [3]. Pacjentami, u których występują czynniki predysponujące do namnażania roztoczy są chorzy cierpiący na postać grudkowo-krostkową trądzika różowatego.

Niektórzy autorzy dopatrują się w nużeńcu pierwotnej przyczyny chorób i dolegliwości. Istnieją doniesienia, że nużeniec może być pierwotną przyczyną schorzeń skóry takich jak: okołoustne zapalenie skóry [51], wykwity przypominające zarażenie świerzbem, nieprawidłowa pigmentacja skóry, wykwity na skórze głowy [14], a nawet rak podstawnokomórkowy skóry [52].

W 1930 roku Ayres opisał chorobę „pityriasis folliculorum”, którą wiązał z obecnością nużeńca na skórze człowieka. Z kolei w 1961 roku wyróżnił odrębną jednostkę chorobową zwaną „nużycą”- „rosacea- like demodicosis”, w której opisywał, iż nasilony rozwój nużeńca prowadzi do rozwoju objawów jak rumień, łuszczenie przymieszkowe oraz suchość skóry [53]. Pytyriasis folliculorum zostało w późniejszym czasie sklasyfikowane jako najłagodniejsza i najczęstsza postać nużycy. Występuje ona najczęściej u osób starszych, co sugeruje istotną rolę osłabienia układu odpornościowego w patogenezie choroby [54,55]. Potwierdzeniem oportunistycznego charakteru Pytyriasis folliculorum były badania, w których stwierdzono, iż na skórze twarzy u osób z aktualnie osłabionym systemem immunologicznym bytuje większa ilość roztoczy niż na skórze twarzy osób z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym. Zwiększoną proliferację *Demodex* odnotowano u chorych długotrwale stosujących steroidoterapię miejscową lub preparaty immunomodulujące [56], pacjentów zakażonych wirusem HIV lub chorujących na AIDS [57,58,59], pacjentów w trakcie immunosupresji (np. dzieci chorujące na białaczkę w trakcie chemioterapii) [60,61,62], a także pacjentów przewlekle dializowanych [63,64,65].

Zależności pomiędzy nasileniem infestacji nużeńcem a stosowaniem miejscowych leków steroidowych dopatrzono się także u pacjentów laryngologicznych. Cevik i wsp. wykazali, że u pacjentów cierpiących z powodu swędzenia ucha, stosujących miejscową steroidoterapię, występuje większe nagromadzenie roztoczy w przewodzie słuchowym niż u tych, którzy wykazują podobne dolegliwości i nie stosują żadnych leków. Nie stwierdzono natomiast istotnej różnicy w ilości nużeńca w przewodzie słuchowym u pacjentów ze świądem ucha, którzy nie stosowali żadnych leków i u zdrowych osób z

grupy kontrolnej [66].

Z kolei w badaniach przeprowadzonych przez Ding i wsp. odnotowano, że zadrapania spowodowane świądem przewodu słuchowego zewnętrznego wiążą się z częstszym występowaniem nużeńca w obrębie skóry i mieszków włosowych przewodów słuchowych zewnętrznych badanych osób [67].

Ayres i wsp. uważali, iż obecność nużeńca w obrębie mieszków włosowych ma większe znaczenie niż obecność pasożyta na powierzchni skóry [53]. Aylesworth i wsp. podczas badania wycinków skórnych zawierających mieszki włosowe o cechach zapalenia, wykazali większą częstość występowania *Demodex folliculorum* w mieszkach objętych stanem zapalnym (42%) niż w mieszkach bez stanu zapalnego (10%) [68].

Zarówno mieszki włosowe, jak i gruczoły łojowe są częścią aparatu ochronnego oka i są obecne na brzegach powiek. Łatwe rozprzestrzenianie się roztoczy na skórze, zwłaszcza okolicy czoła i nosa, wiąże się również z ich obecnością na skórze powiek oraz w mieszkach włosowych rzęs i gruczołach łojowych w obrębie powiek. Mniejszy dostęp do powiek podczas codziennej higieny, spowodowany ich lokalizacją w otoczeniu wystających struktur tj. nos, policzki i czoło, sprzyja gromadzeniu się nużeńca w okolicy aparatu ochronnego gałek ocznych. To sprawia, że zainteresowanie nużeńcem i możliwymi konsekwencjami zakażenia nieustannie wzrasta także wśród okulistów, jednakże patogenność tego pasożyta pozostaje kwestią dyskusyjną.

Najbardziej popularną jednostką chorobową, której przyczyny dopatruje się w zarażeniu nużeńcem, jest zapalenie brzegów powiek. Kemal i wsp. postanowili w roku 2005 porównać na dużej grupie badanych (170 chorych i 330 pacjentów z grupy kontrolnej) częstość występowania *Demodex folliculorum* u pacjentów z zapaleniem brzegów powiek i zdrowych. W wynikach swoich badań nie uzyskali statystycznie istotnej różnicy pomiędzy częstością występowania nużeńca ludzkiego w obu grupach (28,8% w grupie z zapaleniem brzegów powiek i 26,7% u zdrowych badanych). Pomimo że częstość występowania nużeńca wzrastała wraz z wiekiem badanych, nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w zarażeniu *Demodex folliculorum* pomiędzy poszczególnymi grupami wiekowymi. Nie opisano również zależności występowania nużeńca od płci pacjentów (stosunek częstości występowania u mężczyzn i kobiet wynosił odpowiednio 28,9 % : 24,1 %). To pozwoliło Kemalowi i wsp. na stwierdzenie, że zakażenie *Demodex folliculorum* nie jest główną przyczyną rozwoju zapalenia brzegów powiek [17].

W materiale prezentowanym w niniejszej rozprawie otrzymano nieco odmienne wyniki. Wśród pacjentów objawowych, wśród których występowały osoby z chorobami aparatu ochronnego oka lub powierzchni oka, obecność nużeńca wykryto u 83% badanych (w 68% oczu). U pacjentów bezobjawowych demodex obecny był u 47% badanych (w 30% oczu). Wykazano zatem istotną statystycznie różnicę pomiędzy występowaniem nużeńca w obu grupach, co sugeruje związek zarażenia pasożytem z objawami oraz chorobami odcinka przedniego oka.

W rozprawie wykazano również zależność pomiędzy zarażeniem demodex a wiekiem pacjentów. Średnia wieku pacjentów u których zdiagnozowano nużeńca wynosiła 68,20, natomiast średnia wieku osób bez zarażenia wynosiła 58,91. Demodex występował zatem istotnie statystycznie częściej u osób starszych ( $p=0,0132$ ). Podobnie jak w badaniach Kemala i wsp. nie wykazano też zależności pomiędzy występowaniem nużeńca a płcią pacjentów. Spośród badanych kobiet 66% zarażonych było nużeńcem, natomiast wśród mężczyzn nużeńca rozpoznano u 70%.

Dodatkowo w niniejszej pracy zanalizowano natężenie zarażenia nużeńcem oraz jego lokalizację. Badanie przeprowadzone zostało na rzęsach, brwiach i skórze powiek. Spośród wszystkich przebadanych pacjentów, znaczny stopień zakażenia w mieszkach włosowych rzęs występował w oczach, z których 90% stanowiły oczy pacjentów objawowych. W mieszkach włosowych brwi zarażenie o znacznym nasileniu wystąpiło tylko u pacjentów objawowych. W badaniu skóry powiek, zarówno znaczny, jak i umiarkowany stopień zarażenia wystąpił tylko u osób z chorobami odcinka przedniego. W badaniu wykazano zatem istnienie zależności pomiędzy nasileniem infestacji nużeńcem, zarówno w rzęsach, brwiach jak i w skórze pacjentów a objawami ze strony aparatu ochronnego lub powierzchni oka. Wyższy stopień występował istotnie statystycznie częściej w grupie pacjentów objawowych u których występowały choroby odcinka przedniego. Dowodzi to, iż ilość roztoczy obecnych w mieszkach włosowych oraz na skórze ma duże znaczenie dla patogenności nużeńca, co może tłumaczyć fakt, że jednym z mechanizmów oddziaływania nużeńca na organizm żywiciela jest bezpośrednie, mechaniczne uszkodzenie struktur gospodarza. Nużeniec ludzki gromadzi się u nasady rzęs, bytując na ich powierzchni i w mieszkach włosowych. Tam spożywa komórki nabłonka mieszka, powodując rozdęcie torebki włosowej. W efekcie może to prowadzić do nieprawidłowego wzrostu rzęs lub ich wypadania.

Na temat madarozy, a więc wypadania rzęs oraz nieprawidłowego ich wzrostu u pacjentów zarażonych nużeńcem toczy się ożywiona dyskusja. Norn i wsp. w swych

badaniach nie zaobserwowali, aby u osób zarażonych nużeńcem utrata rzęs była częstsza niż u osób bez infestacji pasożytem [16]. Inne źródła podają, że nużeniec może się przyczynić zarówno do wypadania rzęs, jak i ich nieprawidłowego wzrostu, poprzez rozdęcie mieszków włosowych. To z kolei może powodować stałe drażnienie rogówki i w efekcie doprowadzić do ubytków jej nabłonka oraz erozji, których następstwem są blizny [14].

W badaniach własnych nieprawidłowości dotyczące rzęs (zarówno madarozę, jak i nieprawidłowy ich wzrost) zaobserwowano u 12% pacjentów zarażonych nużeńcem, natomiast u osób bez infestacji występowały one tylko u 3% pacjentów. Podobnie jak Norn i wsp., nie zaobserwowano, by u osób zarażonych demodexem nieprawidłowości dotyczące rzęs były istotnie częstsze.

Vollmer w swoich badaniach wykazał, że aż 83% mieszków włosowych, w których odnotowano obecność nużeńca, objętych było zapaleniem [69]. Jednakże do tej pory nie wyjaśniono, czy stan zapalny jest wywołany obecnością roztoczy, czy raczej mikroorganizmy te preferują mieszki w których stan zapalny jest już obecny.

Nużeniec krótki zasiedla głównie gruczoły łojowe, a więc gruczoły Meiboma. Swoją obecnością blokuje ujście gruczołów, powodując ich dysfunkcję a w efekcie powstawanie filmu łzowego o nieprawidłowym składzie. Poza tym, penetrując głęboko w obręb gruczołu łojowego, nużeniec może wywołać reakcję ziarniniakową. Jest to odpowiedź na jego chitynowy szkielet, który może być rozpoznany jako ciało obce przez organizm żywiciela. Często w pobliżu nużeńca krótkiego, zasiedlającego gruczoł Meiboma, obserwuje się komórki nabłonkowe, histiocyty, fibroblasty, limfocyty oraz komórki plazmatyczne, co może tłumaczyć rolę pasożyta w rozwoju nawracających i trudnych do leczenia gradówek [14]. W badaniach własnych, pomimo, że wśród pacjentów z rozpoznaną gradówką, aż u 83% zdiagnozowano nużeńca, to w analizie wszystkich osób zarażonych pasożytem, gradówki rozpoznane były jedynie u 4%. Zatem potwierdzenie tej hipotezy wymaga badań przeprowadzonych wśród większej liczby osób.

Odmienne od Kemmala wyniki uzyskano w zakresie oceny częstości występowania nużeńca u pacjentów z zapaleniem brzegów powiek i zdrowych. U pacjentów ze zdiagnozowanym zapaleniem brzegów powiek, zarażenie nużeńcem rozpoznano u 85% (wystąpił on u 50 na 59 chorych), natomiast spośród wszystkich pacjentów z rozpoznaniem zarażeniem nużeńcem, zapalenie brzegów powiek wystąpiło w 68%. Istnieje zatem związek pomiędzy zapaleniem brzegów powiek a obecnością nużeńca.

Otrzymane w niniejszej pracy wyniki potwierdzają hipotezy przedstawione przez autorów takich jak Uytterbroeck, Demmer, Sumer, Alejo, czy De Venecia i Siong. Ich zdaniem nużeniec jest główną przyczyną kilku schorzeń aparatu ochronnego oka, a nawet samej gałki ocznej [70,71,72,73,74]. Uytterbroeck i wsp. w swoich badaniach udowodnili związek pomiędzy zarażeniem nużeńcem a łojotokowym zapaleniem brzegów powiek [70]. Demmler i wsp. wykazali udział *Demodex folliculorum* w rozwoju przewlekłego zapalenia brzegów powiek [71]. W przeprowadzonych przez Sumer'a i wsp. badaniach, u 62,9% pacjentów cierpiących z powodu przewlekłego zapalenia brzegów powiek występowało zarażenie nużeńcem [72]. Alejo i wsp. zdiagnozowali obecność roztoczy u 88% pacjentów z blepharitis [73]. Natomiast De Venecia i Siong wykazali, że nużeniec występuje u 95% pacjentów cierpiących na przednie zapalenie brzegów powiek i aż u 97 % chorych cierpiących z powodu przedniego i tylnego zapalenia [74]. Statystycznie istotna zależność zarażenia pasożytem i zapalenia brzegów powiek została potwierdzona w meta-analizie przeprowadzonej przez Zhao i wsp. na podstawie danych pochodzących z 11 artykułów [75].

Erbagci i wsp. zauważyli istnienie zależności pomiędzy zarażeniem nużeńcem a rozwojem raka podstawnokomórkowego skóry powiek [52]. W niniejszej rozprawie raka podstawnokomórkowego rozpoznano jedynie u 7 pacjentów, z czego jednocześnie zarażenie nużeńcem stwierdzono u 6, a więc u 86% z nich. Jest to jednak zbyt mała liczba przypadków, by móc sformułować jednoznaczne wnioski. Wśród wszystkich badanych pacjentów zarażonych nużeńcem, rak podstawnokomórkowy rozpoznany został u 8%.

W badaniach własnych zanalizowano również zależność pomiędzy występowaniem nużeńca a guzami innymi niż rak podstawnokomórkowy (takimi jak torbiele, brodawczaki, kępki żółte). Wśród pacjentów z guzami powiek innymi niż rak podstawnokomórkowy, nużeńca rozpoznano u 85%. Spośród wszystkich pacjentów zarażonych nużeńcem, guzy wystąpiły u 15%.

Dodatkowo Ezra i wsp. w swojej pracy zasugerowali istotną rolę *Demodex brevis* w patogenezie zespołu wiotkich powiek (Floppy Eyelid Syndrome) [76]. W niniejszej pracy nie stwierdzono zespołu wiotkich powiek u żadnego pacjenta.

Istnieją również doniesienia na temat schorzeń gałki ocznej, zwłaszcza spojówki i rogówki, spowodowanych obecnością nużeńca w mieszkach włosowych rzęs oraz gruczołach łojowych. Kherigah i wsp. opisali w swojej pracy przypadki pacjentów z

reakcją zapalną spojówki i rogówki i jej odmiennym obrazem klinicznym, które wiązały z obecnością nużeńca na brzegach powiek. Wśród zmian jakie odnotowali były zapalenia spojówki gałkowej i powiekowej, powierzchowna neowaskularyzacja rogówki, brzeżne nacieczenie rogówki, zmiana przypominająca pryszczyk, powierzchowne przymglenia rogówki oraz guzkowe blizny rogówki [47]. Udowodniono również udział nużeńca w alergicznym zapaleniu brzegów powiek i spojówki u pacjentów z trądzikiem różowatym.

Jednym z objawów towarzyszących zapaleniu brzegów powiek oraz dysfunkcji gruczołów Meiboma jest suchość oka. W badaniu przeprowadzonym przez Lee i wsp. wykazano, że istnieje zależność pomiędzy obecnością demodex a wynikiem w skali dotyczącej objawów suchości oka - OSDI (Ocular Surface Disease Index), powodując w niej zwyczajnie w punktacji [77]. To z kolei dowodzi o nasilonych objawach suchego oka. W niniejszej pracy, w przeciwieństwie do wyżej wymienionych danych literaturowych, nie wykazano istotnej statystycznie zależności pomiędzy zarażeniem nużeńcem a współczynnikiem OSDI. Średnia wartość współczynnika u wszystkich osób zarażonych pasożytem wynosiła 28,14, natomiast u osób bez infestacji 25,39. Nie zaobserwowano zależności również w grupach pacjentów objawowych i bezobjawowych. W grupie pacjentów objawowych, u osób zarażonych nużeńcem średnia wartość współczynnika OSDI wynosiła 36,32, natomiast u osób bez infestacji nawet 37,62. W grupie pacjentów bezobjawowych średnia wartość współczynnika OSDI u osób z jednoczesnym zarażeniem pasożytem była bardzo niska- wynosiła 10,20, natomiast u osób bez infestacji 21,89.

Interesującym wydaje się być fakt, iż pomimo istnienia zależności pomiędzy obecnością nużeńca a występowaniem zespołu suchego oka (potwierzonego testem Schirmera), nie udowodniono związku obecności roztoczy z niedoborem wodnej składowej filmu łzowego [77,78], choć uważa się, że pasożyt lepiej funkcjonuje w wilgotnym środowisku [2].

Wyniki otrzymane w niniejszej pracy potwierdzają istnienie zależności pomiędzy zarażeniem nużeńcem a występowaniem zespołu suchego oka. Spośród oczu u których wykryto obecność nużeńca, w 35% otrzymano nieprawidłowy wynik testu Schirmera, natomiast spośród oczu pacjentów bez infestacji, wynik nieprawidłowy otrzymano jedynie u 17%.

W przedstawionej dysertacji zaburzenia w składzie i wydzielaniu filmu łzowego, oprócz wykonania testu Schirmera, dodatkowo zbadano za pomocą testu przerwania

ciągłości filmu łzowego (TBUT - tear break-up time). Uzyskano istotną statystycznie różnicę w wyniku TBUT pomiędzy pacjentami objawowymi i bezobjawowymi. Średnia wyniku otrzymanego u pacjentów zgłaszających dolegliwości ze strony odcinka przedniego wynosiła 6,38, natomiast średnia u pacjentów bezobjawowych wynosiła 7,92. Analiza wyników testu wykazała również istotną statystycznie zależność pomiędzy zarażeniem nużeńcem a wynikiem uzyskanym w teście. Średnia wartość wyników TBUT u pacjentów z nużeńcem wyniosła 6,67, natomiast u osób bez obecności pasożyta – 7,74. Zarówno u osób zarażonych jak i osób bez infestacji średnia wartość wyniku testu była nieprawidłowa i wynosiła poniżej 10 sek.

W niniejszej pracy zanalizowano również występowanie objawów zespołu suchego oka takich jak fałdy spojówki, wysokość menisku łzowego, przekrwienie spojówki oraz ubytki nabłonka rogówki, w zależności od infestacji nużeńcem. Ilość fałdów spojówki oceniano z pomocą skali LIPCOF. Wykazano, że u osób zarażonych nużeńcem objawy suchego oka w postaci fałdów spojówki były bardziej nasilone niż u osób bez zarażenia. Średni stopień nasilenia u pacjentów z rozpoznaniem nużycy wynosił 2,00, podczas gdy u badanych, u których nie stwierdzono pasożyta wynosił on 0,94.

Wysokość menisku łzowego również istotnie statystycznie różniła się pomiędzy pacjentami z nużycą i bez. U osób z infestacją menisk łzowy był mniejszy niż 1 mm istotnie statystycznie częściej niż u osób, u których nie stwierdzono obecności roztoczy. Objaw ten stwierdzono w 59 % oczu pacjentów z nużeńcem oraz w 29 % oczu osób niezarażonych.

Odnotowano również istotną statystycznie różnicę pomiędzy zadrażnieniem i przekrwieniem spojówek w oczach pacjentów z nużycą i osób bez infestacji. W oczach pacjentów z nużeńcem zadrażnienie występowało w 48%, natomiast w oczach osób bez demodekozy występowało w 24% przypadków.

W ocenie rogówki, mimo, że pomiędzy grupą pacjentów objawowych i bezobjawowych istniała różnica istotna statystycznie ( $p < 0,0001$ ), nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy uszkodzeniem powierzchni oka u pacjentów, u których rozpoznano obecność pasożyta a osobami bez zarażenia. Średnia stopnia uszkodzenia rogówki w skali oksfordzkiej zarówno w grupie pacjentów z nużeńcem jak i bez wynosiła 0,33.

Mikroabrazje spowodowane ruchami odnoży roztoczy mogą prowadzić do hiperplazji nabłonka i odczynowej hiperkeratynizacji wokół nasady rzęs. W ten sposób powstaje tzw. łupież cylindryczny [14,79,80]. Udowodniono, że w obrazie klinicznym

zarażenia brzegów powiek nużeńcem dominują mankiety keratynowe wokół podstawy rzęs, charakteryzujące się cylindrycznym kształtem [33, 81,82,83]. Mają one postać delikatnych, woskowych, niekiedy suchych osadów, najlepiej widocznych w lampie szczelinowej, zlokalizowanych u podstawy rzęs i przylegających do brzegu powiek. Głównymi składnikami mankietów są tłuszcz i keratyna, stanowiące doskonałą pożywkę dla roztoczy. Gao i wsp. wykazali, że przeciętna ilość roztoczy przypadających na pacjenta z widocznymi mankietami keratynowymi wynosiła 12,9 (średnia liczba przypadająca na rzęsę wynosiła 1,6), podczas gdy u pacjentów u których nie stwierdzono występowania mankietów, ilość roztoczy wynosiła 0,35 (średnia liczba przypadająca na rzęsę wynosiła 0,05) [79]. W niniejszej pracy obecność mankietów keratynowych zaobserwowano u 80% badanych u których występował nużeniec, podczas gdy u osób bez stwierdzonej nużycy występowały one jedynie u 37%. Wykazano zatem, iż obecność mankietów keratynowych jest związana z obecnością zakażenia demodex.

Według danych literaturowych, innym objawem zajęcia przez roztocze brzegów powiek jest ich przekrwienie i teleangiektazje na powierzchni, a także przekrwienie spojówki oraz dysfunkcja gruczołów Meiboma, objawiająca się zaburzeniami w składzie i wydzielaniu filmu łzowego [14].

W przedstawionej pracy teleangiektazje zaobserwowano istotnie statystycznie częściej, bo u 55% pacjentów ze zdiagnozowanym nużeńcem, natomiast u osób bez obecności pasożyta teleangiektazje wystąpiły u 20%. Również przekrwienie brzegów powiek częściej występowało u osób z demodekozą niż u osób bez obecności nużeńca (53% vs. 23%). Dysfunkcja gruczołów Meiboma stwierdzona była istotnie statystycznie częściej (bo u 70% osób z rozpoznaniem demodekozy) niż u badanych bez zarażenia, gdzie wystąpiła u 46%. Także występowanie łusek na rzęsach (łupieżu cylindrycznego) było częstszym objawem u pacjentów z zarażeniem nużeńcem niż bez (80% vs, 37). Istotne statystycznie zależności wykazane w badaniu potwierdziły zatem hipotezy przedstawiane wcześniej w piśmiennictwie.

Według danych literaturowych, dolegliwości które mogą odczuwać pacjenci z objawami nużycy to przede wszystkim pieczenie, swędzenie, uczucie ciała obcego oraz zaburzenia ostrości widzenia. W niniejszej pracy objawy takie jak dyskomfort w oczach, pieczenie, swędzenie, łzawienie, światłowstręt, poranna wydzielina oraz uczucie piasku w oczach występowały u pacjentów objawowych w trakcie przeprowadzanego badania. U pacjentów nie zgłaszających objawów subiektywnych w

momencie badania, dolegliwości te zdarzały się jedynie w przeszłości i występowały sporadycznie. W niniejszej dysertacji potwierdzono dane literaturowe - objawy takie jak: pieczenie, swędzenie, uczucie ciała obcego, dyskomfort w oczach, łzawienie oraz obecność porannej wydzieliny istotnie częściej występowały u pacjentów u których zdiagnozowano nużeńca. Nie odnotowano istotnej różnicy w pogorszeniu widzenia oraz w obecności światłowstrętu pomiędzy pacjentami z obecnością pasożyta i bez.

Interesującym zagadnieniem jest patogeniza schorzeń dotyczących narządu wzroku, które mogą być wywołane infestacją nużeńcem. Istotna wydaje się być teoria mówiąca o tym, że demodex może być wektorem przenoszącym bakterie. W literaturze można znaleźć informacje, iż nużeniec może biernie przenosić na swojej powierzchni bakterie z grupy *Streptococcus* i *Staphylococcus*.

W niniejszej rozprawie sprawdzono skład mikroflory zasiedlającej worek spojówkowy u badanych pacjentów i zanalizowano jej ewentualny związek z infestacją nużeńcem. U pacjentów, zarówno z grupy badanej jak i kontrolnej wykryto następujące bakterie: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.(koagulazo-ujemne)*, *Streptococcus viridians*, *Kocuria varians*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus* oraz *Corynebform*.

*Streptococcus viridians* jest to Gram + paciorkowiec, wchodzący w skład fizjologicznej flory górnych dróg oddechowych. Może wywołać zakażenie u osób z niedoborem odporności. W badaniach własnych paciorkowca zdiagnozowano u 24% pacjentów objawowych oraz u 10% pacjentów bezobjawowych. W analizie wszystkich pacjentów *Streptococcus viridians* zdiagnozowano u 20% zakażonych nużeńcem oraz u 12% osób bez infestacji demodex. Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności pomiędzy występowaniem bakterii a obecnością nużeńca.

Rodzaj *Staphylococcus* (gronkowców) obejmuje 48 gatunków, które ze względu na zdolność do wytwarzania koagulazy zostały podzielone na koagulazo- dodatnie oraz koagulazo-ujemne. Spośród siedmiu gatunków gronkowców koagulazo-dodatnich, najlepiej poznanym i scharakteryzowanym jest *Staphylococcus aureus*- gronkowiec żłocisty. Gatunek ten może wywoływać zarówno zakażenia miejscowe, jak również rozprzestrzeniać się w organizmie.

W badaniach własnych wykazano, że bakterie *Staphylococcus aureus* wystąpiły u 12% pacjentów objawowych. U pacjentów bezobjawowych obecność bakterii *Staphylococcus aureus* została zdiagnozowana u 10% . Natomiast w analizie obecności bakterii u wszystkich pacjentów przy podziale na zarażonych nużeńcem oraz tych bez infestacji, wykazano, iż *Staphylococcus aureus* wystąpił u 15% pacjentów, u których

jednocześnie zdiagnozowano demodex, natomiast nie występował w ogóle u osób bez infestacji. Fakt, iż bakterie występowały jedynie u pacjentów zarażonych nużeńcem może potwierdzać doniesienia literaturowe na temat związku występowania pasożyta i bakterii *Staphylococcus aureus*. Analiza statystyczna nie wykazała jednak istotnej zależności pomiędzy zarażeniem nużeńcem a obecnością bakterii w worku spojówkowym.

*Staphylococcus spp. koagulazo-ujemne* to drobnoustroje, które pomimo, że przez długie lata uznawane były za niepatogenne, mogą wywoływać poważne zachorowania u ludzi i zwierząt. Gatunki takie jak *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* biorą udział w zakażeniach szpitalnych. Mogą brać udział w rozwoju zespołu wstrząsu toksycznego, zapaleniu wsierdza oraz powikłaniach ran pooperacyjnych. Wykryto w nich szereg czynników wirulencji takich jak: hemolizyny alfa, beta, gamma, leukocydyny, toksyny złuszczone A i B oraz geny warunkujące antybiotykooporność.

W badaniach własnych wykazano obecność bakterii *Staphylococcus koagulazo-ujemnych* u 88% pacjentów objawowych. U pacjentów bezobjawowych gronkowiec koagulazoujemny występował w 83%. Analiza wszystkich pacjentów z podziałem na zarażonych nużeńcem i osoby bez zarażenia wykazała, iż bakterie *Staphylococcus koagulazo-ujemne* występowały u 89% pacjentów z zarażeniem nużeńcem oraz u 76% osób bez infestacji pasożyta. Nie wykazano zależności pomiędzy zarażeniem demodex a obecnością bakterii *Staphylococcus koagulazo-ujemnych* w worku spojówkowym.

Bakteria *Kocuria varians* należy do rodzaju *Micrococcus* i wchodzi w skład naturalnej flory bakteryjnej skóry i błon śluzowych. Mikrokokki nie posiadają otoczek i nie wytwarzają toksyn, dlatego są postrzegane jako drobnoustroje potencjalnie niechorobotwórcze. Jednak u osób z obniżoną odpornością mogą wywołać zakażenie.

W badaniach własnych nie stwierdzono obecności bakterii *Kocuria varians* u pacjentów objawowych, natomiast w grupie pacjentów bezobjawowych *Kocuria varians* wystąpiły u 3% osób. Wśród wszystkich badanych pacjentów z obu grup, mikrokokki wykryto u 2% osób z obecnością nużeńca oraz u żadnej z badanych osób bez obecności nużeńca. Nie stwierdzono zależności pomiędzy występowaniem nużeńca a obecnością bakterii *Kocuria varians* w worku spojówkowym.

Bakterie *Enterococcus faecalis* (Paciorkowce kałowe) są gram dodatnimi, względnie beztlenowymi ziarniakami z rodziny *Enterococcaceae*. Wchodzą one w skład mikroflory jelitowej, ale występują również w jamie ustnej, drogach płciowych oraz na skórze. Pomimo ich niewielkiej zjadliwości przy zachwianiu równowagi

między gospodarzem a komensalem, może dojść do kolonizacji innych obszarów organizmu a nawet do rozwoju infekcji.

W badaniach własnych nie wykazano obecności enterokoków u pacjentów objawowych. U pacjentów bezobjawowych występowały one w 3%. Spośród wszystkich badanych pacjentów u żadnej z osób zarażonych nużeńcem nie stwierdzono obecności bakterii w worku spojówkowym, natomiast w grupie pacjentów bez obecności pasożyta, *Enterococcus faecalis* wykryto u 6%. Nie stwierdzono zatem istotnej stytycznie zależności pomiędzy występowaniem nużeńca a zarażeniem bakteriami *Enterococcus faecalis*.

Nużeniec może przenosić drobnoustroje również wewnątrz własnego organizmu. W 1988 r. Wolf i wsp w swoich badaniach wykazali obecność zarodników grzybowych wewnątrz odwłoka nużeńca. W badaniach własnych u żadnej z badanych osób z pobranych wymazów z worka spojówkowego nie wyhodowano grzybów.

Lacey i wsp. w 2007 r. wyizolowali z wnętrza nużeńca ludzkiego bakterię *Bacillus oleronius* [84]. Jest ona przetrwalnikową laseczką Gram-ujemną wyodrębnioną z rodzaju *Bacillus*, należącego do rodziny *Bacillaceae* [85]. Lacey i wsp. Sugerują, że nużeniec i bakterie *Bacillus oleronius* mogą żyć w symbiozie [84]. Na podstawie badań przeprowadzonych na termitach, można podejrzewać, że bakterie żyjąc w układzie pokarmowym roztoczy, mogą brać udział w trawieniu spożytych przez nie pokarmów.

Uważa się, że mechanizm przenoszenia drobnoustrojów może polegać na tym, iż nużeniec podczas pobierania pokarmu z powierzchni skóry – z komórek naskórka oraz wydzieliny gruczołów łojowych, może jednocześnie spożywać znajdujące się na jej powierzchni mikroorganizmy. W ten sposób staje się wektorem transportującym bakterie wewnątrz własnego przewodu pokarmowego do mieszków włosowych żywiciela. Może się również przyczynić do przenoszenia mikroorganizmów pomiędzy ludźmi [ 5, 8,86]. Ze względu na brak odbytu u nużeńców oraz zdolność bakterii *Bacillus* do rozwoju w sprzyjających warunkach również poza organizmem ludzkim, pozostają one w przewodzie pokarmowym roztoczy przez cały okres ich życia. Rozpad nużeńca po upływie jego czasu przeżycia może doprowadzić do uwolnienia drobnoustrojów do tkanki żywiciela i w następstwie spowodować lokalną odpowiedź immunologiczną. Tłumaczy to znaczne nasilenie reakcji zapalnej w tkankach otaczających mieszki włosowe u pacjentów, u których stwierdza się zwiększoną liczbę roztoczy demodex.

Bakteria *Bacillus oleronius* została opisana w 1995 r. jako składnik mikroflory jelita

termitów *Reticulitermes santonensis*. Zbadano że *Bacillus oleronius* produkują dwa specyficzne antygenowo białka – 62 kDa oraz 83 kDa, które mogą pobudzać odpowiedź immunologiczną. Istnieją badania, które wskazują na to, że immunogenne białka bakterii *Bacillus oleronius* mogą brać udział w patogenezie zmian u chorych na odmianę grudkowo-krostkową i oczną trądziku różowatego. Związek zmian skórnych w odmianie grudkowo-krostkowej trądzika różowatego z białkami *Bacillus oleronius* wykazali w 2007 roku Lacey i wsp. W swojej pracy dowiedli, że u 73% pacjentów cierpiących na tę odmianę rosacea przy ekspozycji na białka *Bacillus oleronius*, dochodzi do pobudzenia komórek jednojądrzastych pobranej od nich krwi obwodowej, podczas gdy w grupie kontrolnej do pobudzenia dochodzi jedynie u 23% badanych[84]. Sugeruje to wcześniejszy kontakt komórek jednojądrzastych z białkami u chorych.

Li i wsp. wykazali natomiast podobną zależność u pacjentów z trądzikiem różowatym i zapaleniem brzegów powiek związanym z zakażeniem *Demodex*. W swoich badaniach wykazali pozytywną korelację obecności białek *Bacillus oleronius* w surowicy ze stanem zapalnym powiek [2].

O'Reilly i wsp. dowiedli w swoich badaniach, iż ekspozycja neutrofilii na charakteryzujące się immunogennością białka bakterii *Bacillus oleronius* prowadzi do nasilonej migracji granulocytów w kierunku tych białek[87,88]. Neutrofile reagują wówczas degranulacją, czego dowodzi znaczne nasilenie uwalniania białek MMP-9 oraz kelicydyny, a także zwiększona produkcja prozapalnych cytokin IL-8 oraz TNF-alfa. Wydzielanie cytokin może nasilić napływ neutrofilii do miejsca stanu zapalnego. Dowodzi to o immunogennej roli białek produkowanych przez *Bacillus oleronius* mogących powodować rozwój zapalenia i potwierdza przypuszczenie, że roztocza *Demodex folliculorum* mogą mieć istotne znaczenie w patogenezie wykwitów skórnych poprzez wprowadzenie bakterii do mieszka włosowego [4,8,84]. Jako nosiciele immunogennych bakterii *Bacillus oleronius*, nużeńce stają się pośrednio immunogenne.

Immunogenność pasożytów sprawdzono także w narządzie wzroku. W roku 2011 Kim i wsp. przeprowadzili badania łez pobranych od trzech grup pacjentów - z zapaleniem brzegów powiek i wykrytą nużycą narządu wzroku, u chorych z zapaleniem brzegów powiek u których nie stwierdzono obecności nużeńca oraz w zdrowej grupie kontrolnej bez dolegliwości okulistycznych. Łzy badano pod kątem obecności cytokin zapalnych – IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-7, IL-12, IL-13, IL-17, czynnika stymulującego wzrost granulocytów (G-CSF) oraz białka MIP-1B. Wyniki jakie uzyskano, pozwoliły

stwierdzić, iż podwyższony poziom IL-17 może korelować z infekcją nużeńcem. Odnotowano istotną różnicę w jej poziomie pomiędzy grupami pacjentów chorujących na zapalenie brzegów powiek, różniących się obecnością nużeńca - był on istotnie wyższy u osób zakażonych pasożytem. Po leczeniu, którego celem była eradykacja roztoczy, poziom IL-17 we łzach uległ normalizacji. W badaniu wykazano również różnicę w poziomie IL-7 oraz IL-12 pomiędzy poszczególnymi grupami, a więc pacjentami z zapaleniem brzegów powiek i towarzyszącą obecnością roztoczy, pacjentami z zapaleniem brzegów powiek bez obecności nużeńca oraz osobami zdrowymi. W grupie pacjentów z zapaleniem brzegów powiek bez zarażenia pasożytem odnotowano istotnie podwyższony poziom IL-7, IL-12 oraz MIP-1B w porównaniu do osób zdrowych [31].

Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, iż nużeniec może prowadzić do indukcji sekrecji IL-17. To z kolei mogłoby tłumaczyć obecność objawów u pacjentów z nużycą powiek tj.: teleangiektazje, zaczerwienienia, świąd, uczucia dyskomfortu oraz pogorszenia funkcji narządu wzroku. Są to objawy reakcji zapalnej lub alergicznej, która może być indukowana właśnie przez IL-17 i skutkować przekrwieniem spojówek i poszerzeniem naczyń krwionośnych brzegów powiek.

IL-17 została odkryta w 1993 roku przez Rouviera i wsp. [89]. Jest to cytokina prozapalna, produkowana głównie przez limfocyty pomocnicze Th17, które stanowią subpopulację limfocytów CD4+ [90,91]. Te niedawno odkryte komórki Th17 odgrywają istotną rolę w obronie organizmu. Aktywują receptor TLR w obecności określonych patogenów tj. bakterie, wirusy, pasożyty i indukują komórkowy proces zapalny oraz odpowiedź autoimmunologiczną.

Innym źródłem IL-17 są również neutrofile, komórki NKT oraz makrofagi [92,93]. Jest ona cytokiną, która prowadzi między innymi do wydzielania naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonna -A (VEGF-A). Silnie indukuje również produkcję angiogennych chemokin przez różnego typu komórki w tym keratynocyty, fibroblasty, komórki nabłonkowe, a także komórki nowotworowe. W narządzie wzroku IL-17 może brać udział w tworzeniu nowych naczyń (neowaskularyzacji) spojówki, jej przekrwieniu i powstawaniu telangiektazji na brzegach powiek. Są to objawy charakterystyczne dla przewlekłego zapalenia brzegów powiek.

IL-17 bierze udział w zwalczaniu infekcji grzybiczych i bakteryjnych [94]. Jej zwiększony poziom odnotowano również w wielu chorobach autoimmunologicznych, alergicznych, a także w reakcjach nadwrażliwości typu późnego. Podwyższony poziom

IL-17 występuje u pacjentów z reumatycznym zapaleniem stawów, astmą, łuszczycą, alergicznym zapaleniem zatok, alergicznym zapaleniem spojówek, alergicznym kontaktowym zapaleniem skóry oraz w alergiach pokarmowych [31,95,96,97,98].

IL-12 jest produkowana w odpowiedzi na patogeny przez komórki prezentujące antygen. Indukuje ona produkcję interferonu gamma, jednocześnie aktywując go i pobudzając podział limfocytów Th-1. Zarówno IF-gama jak i IL-12 wstrzymują podział limfocytów Th-2 i produkcję przez nie cytokin (IL-4, IL-5 i IL-13).

Do tej pory w literaturze (według wiedzy autora) pojawiła się jedna praca dotycząca zależności poziomu cytokin zapalnych od zakażenia nużeńcem. Badania wykonane zostały na populacji koreańskiej, przez Kima i wsp.[31].

W niniejszej pracy postanowiono zbadać na populacji polskich pacjentów, czy istnieje zależność pomiędzy zarażeniem nużeńcem a zwiększonym poziomem IL-12 oraz IL-17A. Zbadano poziom wyżej wymienionych cytokin we łzach pacjentów, u których wystąpiły dolegliwości ze strony odcinka przedniego oraz osób bezobjawowych. Jednocześnie sprawdzono, czy we łzach badanych pacjentów u których występuje zakażenie nużeńcem poziom interleukin jest istotnie podwyższony. Dodatkowo zbadano zależność pomiędzy skalą OSDI a poziomem cytokin zapalnych we łzach pacjentów.

Zarówno w grupie pacjentów objawowych, jak i bezobjawowych średnie stężenie IL-17A oraz IL-12 było podwyższone. W przypadku IL-17A u pacjentów objawowych wynosiło ono 12569,09 +/- 9546,89 fg/ml, natomiast u pacjentów bezobjawowych – 11138,71 +/- 8016,26 fg/ml. Pomimo że średnie stężenie IL-17A było wyższe w grupie pacjentów objawowych, a więc zgłaszających dolegliwości związane z chorobami odcinka przedniego oka, niż w grupie bez objawów, różnica ta okazała się nieistotna statystycznie.

Średnie stężenie IL-12 u pacjentów objawowych wynosiło 10326,30 +/- 7645,42 fg/ml, natomiast wśród pacjentów bezobjawowych 8190,79 +/- 4818,62 fg/ml. W tym przypadku również nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie IL-12 pomiędzy grupami.

Istotną statystycznie różnicę otrzymano jednak w przypadku analizy średniego poziomu IL-17A u pacjentów z obecnością nużeńca i pacjentów bez zakażenia pasożytem. U pacjentów z grupy z nużeńcem średnie stężenie IL-17A wynosiło 14646,07 +/-8612,91 fg/ml, natomiast w grupie bez obecności pasożyta-4711,82 +/-

2972,15 fg/ml ( $p=0,0396$ ).

Analiza średniego poziomu IL-12 nie wykazała istotnej statystycznie różnicy, pomimo, że poziom cytokiny zapalnej był wyższy u pacjentów z nużeńcem niż u pacjentów bez zarażenia pasożytem. Średnie stężenie IL-12 wynosiło 11235,85 +/- 6457,04 fg/ml w grupie osób z nużeńcem oraz 4621,76 +/- 4276,97 fg/ml u pacjentów bez nużeńca.

Pomimo, że w niniejszej rozprawie stężenia oznaczonych cytokin były znacznie niższe niż w badaniach prowadzonych przez Kima i wsp. (wyrażono je w jednostkach fg/ml, podczas gdy w badaniu Kima i wsp. poziomy interleukin wyrażone były w pg/ml), wyniki jakie otrzymano częściowo potwierdziły dane literaturowe. Podobnie jak w badaniach przeprowadzonych wśród populacji japońskiej, również wśród polskich pacjentów zaobserwowano wyższy średni poziom IL-17 w przypadku zarażenia nużeńcem. Może to sugerować, iż obecność pasożyta indukuje sekrecję IL-17, która z kolei może stymulować proces zapalny lub powstanie reakcji alergicznej.

Dodatkowo w niniejszej pracy oceniono korelację pomiędzy współczynnikiem OSDI a stężeniem cytokin prozapalnych. Nie wykazano jednak korelacji pomiędzy poziomem IL-17A oraz IL-12 a współczynnikiem OSDI.

Podsumowując omówienie wyników niniejszej pracy należy podkreślić pewne bardzo ważne kwestie dotyczące nużycy. Mimo, że zarażenie nużeńcem nie należy do zarażeń zagrażających życiu, jego powszechność oraz wywołane przez niego objawy i zmiany oraz trudność w leczeniu i skłonność do nawrotów, mogą istotnie wpływać na jakość życia pacjentów.

Do tej pory przeprowadzono wiele badań na temat patogenności nużeńca, jednak nie uzyskano jednoznacznej odpowiedzi na temat jego roli w patogenezie chorób odcinka przedniego oka.

Celem niniejszej pracy była obiektywna ocena roli nużeńca w rozwoju chorób odcinka przedniego oka takich jak zapalenie brzegów powiek, zespół suchego oka, nieprawidłowości dotyczące wzrostu rzęs, gradówki, raka podstawnokomórkowego skóry powiek oraz guzów skóry powiek innych niż BCC. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że nużeniec odgrywa istotną rolę w rozwoju zapalenia brzegów powiek oraz zespołu suchego oka. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań nie potwierdzono udziału nużeńca w rozwoju nieprawidłowości dotyczących wzrostu rzęs, gradówek, raka podstawno komórkowego oraz guzów i zmian skóry

powiek innych niż rak podstawnokomórkowy (takich jak brodawczaki, cysty, kępki żółte).

Na uwagę zasługuje również rola jaką odgrywa nasilenie infestacji nużeńcem. Zauważono, że nasilenie zarażenia może mieć znaczenie w patogenności roztoczy. Informacja ta ma znaczenie podczas diagnostyki nużeńca, którą warto poszerzyć o ocenę nasilenia zarażenia pasożytem. Dodatkowo, ze względu na możliwość przemieszczania się roztoczy, przy ocenie demodekozy ocznej warto ocenić obecność nużeńca zarówno w obrębie rzęs jak i brwi oraz skóry okolicy oczu.

W niniejszej pracy potwierdzono związek roztoczy *Demodex* z powstawaniem objawów okulistycznych, takich jak teleangiektazje i przekrwienie brzegów powiek, mankiety keratynowe (łupież cylindryczny) u nasady rzęs oraz zaczerwienienie ujść gruczołów Meiboma.

Celem pracy była również próba wyjaśnienia mechanizmu rozwoju objawów zapalenia w obrębie aparatu ochronnego oka oraz odcinka przedniego oka w powiązaniu z zarażeniem nużeńcem. Sprawdzone czy doniesienia na temat związku zarażenia nużeńcem z poziomem cytokin zapalnych we łzach potwierdzą się w populacji polskich pacjentów.

Przypuszczalny wpływ obecności nużeńca na stężenia IL-12 oraz IL-17A we łzach opisali w 2011 roku Kim i wsp., po wykonaniu badań w populacji koreańskich pacjentów. Badania których wyniki przedstawiono w niniejszej pracy przeprowadzone wśród pacjentów populacji polskiej potwierdziły istnienie zależności pomiędzy obecnością nużeńca a podwyższonym stężeniem IL-17A we łzach. Średni poziom IL-12 był również wyższy u pacjentów zarażonych nużeńcem w stosunku do osób bez infestacji, jednak różnica ta nie była istotna statystycznie.

W niniejszej pracy sprawdzono także czy istnieje zależność pomiędzy objawami suchego oka wg skali OSDI a stężeniami cytokin we łzach. Nie odnotowano jednak istotnej zależności.

Dodatkowo w pracy dokonano oceny flory bakteryjnej worka spojówkowego badanych pacjentów. Zbadano również zależność pomiędzy obecnością bakterii w worku spojówkowym a obecnością nużeńca. Wśród bakterii jakie zdiagnozowano u badanych pacjentów występowały *Staphylococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridians*, *Kocuria varians*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacter*, *Micrococcus*. Jednak nie odnotowano zależności pomiędzy występowaniem nużeńca a wyżej wymienionych bakterii.

Jak zaznacza Liu i wsp., znaczenie medyczne obecności nużeńca pozostaje tematem dyskusji ze względu na częsty bezobjawowy przebieg zarażenia u części pacjentów [14]. Fakt iż u części pacjentów nużeniec może nie dawać dolegliwości, u innych natomiast wywoływać wiele uciążliwych objawów, może wiązać się z nasileniem infekcji pasożyta jednak niezbędne są kolejne, pogłębione badania w tej materii.

## 8. Wnioski

1. Na podstawie przeprowadzonej analizy częstości występowania nużeńca w wybranych chorobach odcinka przedniego oka można potwierdzić statystycznie częstszy jego udział w rozwoju wybranych jednostek chorobowych, takich jak zapalenie brzegów powiek oraz zespół suchego oka.
2. Obecność objawów okulistycznych, takich jak teleangiektazje i przekrwienie brzegów powiek, łupież cylindryczny u nasady rzęs oraz zaczopowanie ujść gruczołów Meiboma statystycznie częściej występuje u chorych zarażonych *Demodex folliculorum* oraz *Demodex brevis*. Istnieje zależność pomiędzy nasileniem infestacji nużeńcem, zarówno w rzęsach, brwiach jak i w skórze pacjentów a częstością występowania wyżej wymienionych objawów ze strony aparatu ochronnego lub powierzchni oka.
3. Podczas oceny flory bakteryjnej worka spojówkowego, nie odnotowano zależności pomiędzy występowaniem nużeńca a obecnością wyhodowanych bakterii.
4. W badaniu stwierdzono wyższą średnią wartość stężenia badanych cytokin zapalnych IL-12 oraz 17A u pacjentów zarażonych nużeńcem oraz zgłaszających objawy związane z chorobami aparatu ochronnego oka. Odnotowano istotnie statystycznie wyższy średni poziom IL-17A we łzach pacjentów z nużeńcem w porównaniu do pacjentów bez obecności pasożyta. Może to sugerować iż obecność pasożyta indukuje sekrecję IL-17A, która z kolei może stymulować proces zapalny lub powstanie reakcji alergicznej.

## 9. Streszczenie

Nużeniec ludzki (*Demodex folliculorum*) i nużeniec krótki (*Demodex brevis*) należą do najczęściej występujących ektopasożytów u ludzi. Miejsce ich bytowania obejmuje rozległy obszar na ciele człowieka - skórę twarzy wraz ze skórą i brzegiem powiek, skórę klatki piersiowej, okolic genitalnych oraz przewodów słuchowych zewnętrznych. Taka lokalizacja wzbudza zainteresowanie nużeńcem specjalistów z różnych dziedzin. Od lat toczą oni dyskusje na temat patogenności roztoczy. Część naukowców dopatruje się w nużeńcu przyczyny chorób skóry, chorób związanych z aparatem ochronnym oka oraz jego powierzchnią a także świądu ucha zewnętrznego. Są jednak tacy, którzy uważają nużeńca za komensala, będącego składnikiem mikroflory i żyjącego w symbiozie z organizmem ludzkim.

Temat patogenności nużeńca jest istotny ze względu na jego powszechność występowania i znaczenie kliniczne.

Celem pracy była ocena częstości występowania nużeńca w wybranych chorobach odcinka przedniego oka, objawów mogących mieć związek z obecnością pasożyta, a także ocena jego udziału w pojawieniu się dolegliwości zgłaszanych przez pacjentów. Ponadto dokonano oceny flory bakteryjnej worka spojówkowego badanych osób, a wyniki odniesiono do danych z piśmiennictwa mówiących o mikroorganizmach mogących mieć związek z obecnością nużeńca. Zbadano również poziom stężenia interleukiny-12 oraz 17A we łzach pacjentów celem określenia potencjalnego związku pasożyta ze wzrostem stężenia cytokin prozapalnych.

Zbadano 109 pacjentów, których podzielono na grupy w zależności od występowania objawów na pacjentów objawowych i bezobjawowych, a także w zależności od występowania nużeńca na grupę z nużeńcem i bez.

Grupę pacjentów objawowych stanowiły 64 osoby, w tym 37 kobiet w wieku od 25 do 84 lat (średnia 65,81) i 27 mężczyzn w wieku od 28 do 89 (średnia 64,52). Byli to pacjenci którzy w chwili przeprowadzania badania zgłaszali dolegliwości związane z chorobami powiek lub powierzchni oka. Grupę pacjentów bezobjawowych stanowiło 45 osób, w tym 25 kobiet w wieku od 24 do 85 lat (średnia 67,72) oraz 20 mężczyzn w

wieku od 25 do 84 lat (średnia 62,30), którzy podczas przeprowadzania badania nie podawali dolegliwości związanych z chorobami powiek oraz powierzchni oka. Wszyscy badani byli pacjentami Poradni Ogólnej lub Oddziału Okulistycznego Katedry i Kliniki Okulistyki UM w Poznaniu.

Spośród wszystkich badanych pacjentów, grupę z nużeńcem stanowiły 74 osoby, w tym 41 kobiet w wieku od 28 do 85 lat (średnia 68,98) i 33 mężczyzn w wieku od 29 do 89 lat (średnia 67,24). Obecności nużeńca nie stwierdzono u 35 pacjentów w tym 21 kobiet w wieku od 24 do 84 (średnia wieku 61,70) i 14 mężczyzn w wieku od 25 do 82 lat (średnia wieku 54,93).

U wszystkich pacjentów przeprowadzono pełne badanie okulistyczne oraz badanie w kierunku obecności nużeńca w mieszkach włosowych rzęs, brwi i na powierzchni skóry powiek. Materiał do badań stanowiły zeszkrobiny naskórka oraz rzęsy i brwi pobrane z różnych lokalizacji. Dodatkowo u części pacjentów zbadano łyżki pod kątem poziomu wybranych cytokin zapalnych (IL-12 oraz IL-17A) oraz pobrano wymaz z worka spojówkowego celem oceny flory bakteryjnej. Wszelkie nieprawidłowości dotyczące narządu wzroku odnotowano w protokole badania.

Nie wykazano zależności pomiędzy płcią pacjentów a występowaniem nużeńca. Stwierdzono natomiast zależność między wiekiem pacjentów a występowaniem pasożyta - częstość jego występowania wzrastała wraz z wiekiem pacjentów.

Na podstawie oceny częstości występowania nużeńca w poszczególnych chorobach aparatu ochronnego oraz powierzchni oka, stwierdzono możliwość udziału pasożyta w rozwoju jednostek chorobowych takich jak: zapalenie brzegów powiek oraz zespół suchego oka.

W rozprawie wykazano, że obecność roztoczy *Deomodex folliculorum* oraz *Demodex brevis* wiąże się z powstawaniem objawów okulistycznych takich jak teleangiektazje brzegów powiek, przekrwienie brzegów powiek, obecność łupieżu cylindrycznego u nasady rzęs, zaczopowanie ujść gruczołów Meiboma, zadrażnienie spojówki, obniżenie menisku łzowego <1 mm, większą liczbą fałdów spojówki w skali LIPCOF oraz wyższym stopniem uszkodzenia powierzchni oka w skali Oxfordzkiej. Wykazano, że liczba roztoczy w mieszkach włosowych rzęs i brwi oraz na skórze powiek ma wpływ na ich patogenność – liczba osobników była znamienne wyższa u pacjentów z chorobami aparatu ochronnego oka lub powierzchni gałki ocznej.

W rozprawie oceniono zależność pomiędzy zarażeniem nużeńcem a poziomem stężenia cytokin zapalnych we łzach pacjentów. Do tej pory w Polsce nie ukazały się prace

oceniające związek pomiędzy zarażeniem pasożytem a stężeniem IL-12 oraz IL-17A we łzach. Pomędzy pacjentami objawowymi a osobami bez objawów nie wykazano istotnych różnic w zakresie stężeń interleukiny 12 oraz 17A we łzach. Wykazano natomiast istotną różnicę w zakresie stężenia IL-17A we łzach pomiędzy pacjentami u których występował nużeniec a osobami bez obecności pasożyta. Potwierdzono zatem dane z piśmiennictwa na temat roli interleukiny 17A jako lokalnego czynnika zaangażowanego w proces powstawania dolegliwości oraz zmian w odcinku przednim oka związanych z obecnością nużeńca. W wyniku inkubacji wymazów z worka spojówkowego pobranych od 33 pacjentów z grupy badanej oraz 30 pacjentów z grupy kontrolnej wyhodowano bakterie takie jak: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, *Staphylococcus viridians*, *Kocuria varians*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus spp.*, *Corynebacterium*. Wśród opisywanych w literaturze bakterii mogących mieć związek z pasożytem, jedynie bakterie *Staphylococcus aureus* zostały wyhodowane w wymazach pobranych od badanych osób. Nie zaobserwowano jednak istotnie statystycznie częstszej ich obecności u pacjentów zarażonych nużeńcem. Z przeprowadzonych badań wynika, że nużeniec nie ma wpływu na florę bakteryjną worka spojówkowego.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że pomimo iż zarażenie nużeńcem nie należy do zagrażających życiu, jego powszechność oraz wywołane przez niego objawy i zmiany, a dodatkowo trudność w leczeniu oraz skłonność do nawrotów, mogą wpływać na jakość życia pacjentów. W praktyce okulistycznej nie należy zapominać o możliwości zarażenia pacjentów pasożytem i częściej diagnozować oraz zwalczać nużeńca, traktując go jako przyczynę schorzeń powierzchni oka w szczególności w sytuacjach kiedy leczenie objawowe nie przynosi pożądanych efektów.

## 10. Summary

*Demodex folliculorum* and *Demodex brevis* are the most commonly occurring human ectoparasites. They affect wide area of the human body – facial skin (together with the skin and margins of the eyelids), skin of the chest, genital area and external auditory canal. Such diverse localization arouses interest in *Demodex* of specialists from many different fields of medicine. They have debated for decades about the pathogenicity of *Demodex* mite. Some scientists think that *Demodex* can be the agent of skin diseases, diseases of eye protection apparatus and those of the eye surface, as well as, itching of the external auditory canal. However there are those scientists who treat *Demodex* as a commensal organism, which is a part of microflora, living in symbiosis with humans. Pathogenicity of *Demodex* is significant because of its prevalence and its clinical importance.

The aim of this study was to determine *Demodex* frequency of occurrence in selected diseases of anterior segment of the eye, symptoms which may be connected to the presence of the parasite, as well as, its role in occurrence of symptoms reported by patients. Additionally the bacterial flora of patients' conjunctival sac was assessed and the results were referred to the data from the literature talking about microorganisms which may be related to the presence of the *Demodex*. Cytokine levels were also analyzed (interleukine-12 and interleukine-17A) in lacrimal fluid of patients to determine the potential role of *Demodex* in the increase proinflammatory cytokine level.

A total of 109 patients were included in the study. They were divided into groups (patients with symptoms and patients without symptoms) according to the presence of signs of lid margin and surface of the eye diseases at the time of including to the study. They were also divided into groups according to the occurrence of *Demodex* (into a group with *Demodex* and group without *Demodex* presence).

The group of patients with signs consisted of 64 people, in this 37 females between the ages of 25 and 84 years old (mean age 65,81) and 27 males between the ages of 28 and 89 years old (mean age 64,52). These patients reported signs of lid margin and surface of the eye diseases at the time of including to the study. The group

of patients without signs consisted of 45 people – 25 females between the ages of 24 and 85 years old (mean age 67,72) and 20 males between the age of 25 and 84 years old (mean age 62,30), without any signs of lid margin and surface of the eye diseases. All studied individuals were patients of the general outpatient clinic or the Ophthalmological ward of the Ophthalmology Department and Clinic of Poznan University of Medical Sciences in Poznan, Poland. Out of all the individuals, the group with Demodex consisted of 74 patients, 41 females between the ages of 28 and 85 years old (mean age 68,98) and 33 males between the ages of 29 and 89 years old (mean age 67,24). Demodex was not diagnosed in 35 patients (21 females between the ages of 24 and 84 years old (mean age 61,70) and 14 males between the ages of 25 and 82 years old (mean age 54,93).

All patients underwent standard eye examination. Additionally lashes, eyebrows and the eyelid's skin surface were checked for the presence of Demodex. The study material consisted of scrapings taken from the skin surface, as well as eyelashes and eyebrows sampled from different localizations. Furthermore tear samples from some patients were collected and analyzed for the levels of chosen proinflammatory cytokines (IL-12 and IL-17A). Swab from the patients' conjunctival sac was taken to analyze its bacterial flora. All abnormalities were noted in the research study protocol.

There were no dependencies between patients' sex and presence of the Demodex. Dependence was found however, between patients' age and the presence of the Demodex - the incidence increased with patients' age.

Based on the incidence rate of the Demodex in particular diseases of the surface of the eye, it is possible that Demodex participates in progression of diseases such as: blepharitis and dry eye syndrome.

Dissertation demonstrates that presence of the *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis* is associated with ocular symptoms like teleangiectasia on margins of the eyelids, hyperaemia of margins of the eyelids, cylindrical dandruff, Meibomian gland dysfunction, irritation of the conjunctiva, teardrop meniscus <1mm, greater number of folds of the conjunctiva in LIPCOF scale, as well as, higher degree of damage of the eye surface in Oxford scale. It has been shown that number of mites that live in hair follicles of the eyelashes and eyebrows and on the skin of eyelids affects their pathogenicity - its number was significantly higher in patients who suffered from diseases of eye protection apparatus or those of the eye surface.

The dissertation evaluated the dependency between Demodex infection and level

of the proinflammatory cytokines in patients' tears. Up till now in Poland no articles which assessed the association between and the level of proinflammatory cytokines (IL-12 and IL-17) in tears have been published. There were no significant differences between patients with symptoms and patients without any symptoms in terms of concentrations of IL-12 and IL-17A in tears. However there was significant difference found in the IL-17 level between patients with Demodex infection and without the presence of the parasite. Data from literature were confirmed about the role of IL-17A as local factors involved in the process of symptom occurrence and changes in eyelids and eye surface connected with the presence of Demodex. As a result of incubation of swabs from the conjunctival sacs collected from 33 symptomatic patients from the studied group and 30 asymptomatic patients from the control group, the following bacteria were cultured: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, *Staphylococcus viridians*, *Kocuria varians*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus spp*, *Coryneborm*. Compared to data from the literature only *Staphylococcus aureus* were cultured in swabs taken from the patients. However, frequency of its occurrence was not statistically significant in patients with Demodex. The study shows that Demodex has no influence on bacterial flora of the conjunctival sac.

In conclusion it should be noted that although the Demodex infection is not life threatening, its prevalence and cumbersome symptoms caused by its presence, can affect the quality of patients' life. Additionally Demodex is difficult to treat and it has a tendency to relapse. In ophthalmology practice we should not forget about the possibility of Demodex infection and more frequently diagnose and treat the presence of the parasite. We should treat the presence of Demodex as the cause of eye surface diseases, especially in situations when symptomatic treatment does not bring desired effects

## 11. Piśmiennictwo:

1. Desch C.E.: Human Hair follicle mites and forensic acarology. *Exp Appl Acarol.* 2009, 49, 143–146
2. Li J, O'Reilly N, Sheha H, et al. Correlation between ocular Demodex infestation and serum immunoreactivity to Bacillus proteins in patients with facial rosacea. *Ophthalmology*, 2010;117:870-877.
3. Lacey N., Ní Raghallaigh S., Powell F.C.: Demodex mites - commensals, parasites or mutualistic organisms? *Dermatology*. 2011; 222: 128-30.
4. 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.
5. Desch C., Nutting W.B.: Demodex folliculorum (Simon) and Demodex brevis Akbulatova of man: redescription and reevaluation. *J Parasitol* 1972; 58: 169–177.
6. Desch C., Nutting W.B.: Morphology and functional anatomy of *Demodex folliculorum* (Simon) of man. *Acarologia* 1977; 19: 422–462.
7. Lacey N., Kavanagh K., Tseng S.C.: Under the lash: *Demodex* mites in human diseases. *Biochem (Lond)* 2009; 31: 2-6.
8. Jarmuda S.: Ocena udziału roztoczy Demodex folliculorum i laseczek Bacillus oleronius w patogenezie trądziku różowatego. Rozprawa doktorska, 2013
9. Garbacewicz A, Udziela M, Grytner-Ziecina B, Szaflik JP, Szaflik J : „Demodex infections in general Polish population, in patients suffering from blepharitis, and among people who work with microscopes”. *Klinika Oczna* , 2010, 112(10-12):307-10.
10. Lee D.Y., Yamasaki K., Rudsil J., Zoubouis 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.
11. Zhao Y.E., Guo N., Xun M., Xu J.R., Wang M., Wang D.L.: Sociodemographic characteristics and risk factor analysis of Demodex infestation (Acari: Demodicidae). *J Zhejiang Univ Sci B.* 2011, 12, 998–1007.
12. Kuźna-Grygiel W., Kosik-Bogacka D., Czepita D., Sambor I.: Symptomatic and

- asymptomatic infections of *Demodex* spp. In eye lashes of patients of different age groups. *Wiad. Parazytol* 2004;50: 55-61.
13. Bohdanowicz D, Raszeja-Kotelba B.: *Demodex* w etiopatogenezie niektórych chorób skóry. *Post Dermatol Alergoz* 2001;18: 51-53.
  14. Liu J, Sheha H, Tseng SC.G.: „Pathogenic role of *Demodex* mites in blepharitis” *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2010, 10:505-510.
  15. Elston D.M. : *Demodex* mites facts and controversies. *Clin Dermatol* 2010; 28: 502-504.
  16. Norn M.S. : *Demodex folliculorum*. Incidence and possible pathogenic role in the human eyelid. *Acta Ophthalmol.* 1970,108, 7–85.
  17. Kemal M, Sumer Z, Toker MI, Erdogan H, Topalkara A, Akbulut M.: „The Prevalence of *Demodex folliculorum* in blepharitis patients and the normal population”, *Ophtalmic Epidemiol.* 2005 Aug;12(4): 287-90
  18. Ruffli T., Mumcuoglu Y.: The hair follicle mites *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis*: biology and medical importance. A review. *Dermatologica.* 1981, 162, 1–11
  19. Marcinowska Z., Kosik-Bogacka D., Łanocha-Arendarczyk N., Czepita D., Łanocha A.: *Demodex folliculorum* i *demodex brevis*. *Pomeranian Journal of Life Sciences I* 2015 61, 1, 108-114
  20. 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.
  21. Karıncaoglu Y., Seyhan M.E., Bayram N., Aycan O., Taskapan H.: Incidence of *Demodex folliculorum* in patients with end stage chronic renal failure. *Ren Fail.* 2005,27, 495–499.
  22. Akilov O.E., Mumcuoglu K.Y.: Association between human demodicosis and HLA class I. *Clin Exp Dermatol.* 2003,28, 70–73
  23. Mumcuoglu K.Y., Akilov O.E.: The role of HLA and Cw2 in the pathogenesis of human demodicosis. *Dermatology.* 2005,210, 109–114.
  24. Jing X., Shuling G., Ying L.: Environmental scanning electron microscopy observation of the ultrastructure of *Demodex*. *Microsc Res Tech* 2005; 68:284-289.
  25. Hom M. M., Masrota K. M., Schachter S. E. Schachter : *Demodex: Clinical Cases*

- and Diagnostic Protocol, Optometry and Vision Science ,Vol. 90, No. 7, 2013.
26. Czepita D, Kuźna-Grygiel W, Czepita M, Grobelny A: „Demodex folliculorum i Demodex brevis jako przyczyna przewlekłego zapalenia brzegów powiek”, Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie , 2007,53,1, 63-67.
  27. Gortel K.: Update in canine demodicosis. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2006; 36: 229-241.
  28. Akilov O.E., Mumcuoglu K.Y.: Immune response in demodicosis. J Eur Acad Dermatol Venereol 2004; 18: 440-444.
  29. Bonnar E., Eustace P., Powell F.C.: The Demodex mite population in rosacea. J Am Acad Dermatol. 1993; 28:443- 448.
  30. Tsutsumi Y.: Deposition of IgD, alpha-1-antitrypsin and alpha-1-antichymotrypsin of Demodex folliculorum and Demodex brevis infesting the pilosebaceous unit. Pathol Int, 2004; 54: 32-34.
  31. 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.
  32. Norn MS: The follicle mite (*Demodex folliculorum*).Eye Ear Nose Throat Mon 1972; 51:187–191.
  33. Norn M.S.: Demodex folliculorum. Br. J. Ophthalmol. 1972; 56: 140.
  34. Basic and Clinical Science Course Część 8 Choroby aparatu ochronnego oka i rogówki.Wydanie I polskie pod redakcją Jerzego Szaflika. Wydawnictwo Medyczne Urban &Partner Wrocław.
  35. Kański JJ, Bowling B.Okulistyka kliniczna.Elsevier Urban&Partner 2013.
  36. Ambroziak A.M., Szaflik J, Szaflik J.P., Ambroziak M, Witkiewicz J, Skopiński P.: Immunomodulation on the ocular surface : a review. Central European Journal of Immunology 2016:41(2)
  37. Redfern RL, Reins RY: Toll-like receptor activation modulates antimicrobial peptide expression by ocular surface cells. Exp Eye Res 2011 Mar, 92(3), 209-220. Epub 2010 Dec 31
  38. Dua H.S., Faraj L.A., Said D.G., Gray T., Lowe J. Human Corneal Anatomy Redefined: A Novel Pre-Descemet's Layer (Dua's Layer). Ophthalmology. 2013 May 25
  39. Gibson IK, Kunert KS, Argüeso P (2000): Regulation of mucin gene expression in

- the ocular surface epithelia. *Cornea* 19: 97
40. Rolando M, Zierhut M (2001): The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease. *Surv Ophthalmol* 45: 203-210
  41. Watanabe H (2002): Significance of mucin on the ocular surface. *Cornea* 21: 17-22.
  42. Dartt DA, Dana R, D'amore P, et al. (2011): Immunology, inflammation and diseases of the eye. Elsevier, Groton.
  43. Knop E, Knop N (2000): Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 41: 1270-1279.
  44. Seamone C, Jackson WB (2013): Immunology of the External Eye. In: Tasman W, Jagger EA (eds.). *Duane's Clinical Ophthalmology*. Vol. 4 Ch. 2, Lippincott-Raven, Philadelphia
  45. Knop E, Knop N, Claus P (2008): Local production of secretory IgA in the eye-associated lymphoid tissue (EALT) of the normal human ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 2322-2329
  46. Lomholt JA, Kilian M: Degradation of uniquely glycosylated secretory immunoglobulin a in tears from patients with *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008 Nov, 49(11):4939-44. Epub 2008 Aug 29.
  47. Kheirkhah A., Casas V., Li W., Raju V.K., Tseng S.C.: Corneal manifestations of ocular Demodex infestation. *Am. J. Ophthalmol.* 2007; 143(5): 743-749.
  48. Dahl M.V., Ross A.J., & Schlievert P.M.: Temperature regulates bacterial protein Production possible role in rosacea. *J Am Acad Dermatol* 2004;50: 266-272
  49. Whitfeld M., Gunasingam N., Leov L.J., Schirato K. & Preda V.: *Staphylococcus eidermidis* a possible role in the pustules of rosacea. *J Am Acad Dermatol*, 2011; 64: 49- 52.
  50. 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.
  51. Morras PG, Santos SP, Imedio IL, et al. Rosacea-like demodicidosis in an immunocompromised child. *Pediatr Dermatol* 2003;20:28–30.
  52. Erbagci Z, Erbagci I, Erkilic S. High incidence of demodicidosis in eyelid basal cell carcinomas. *Int. J Dermatol* 2003 ;42;567-571.
  53. 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.
54. 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.
55. Forton F.M.: Papulopustular rosacea, skin immunity and *Demodex*: pityriasis folliculorum as a missing link. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2012; 26: 19-28.
56. Fujiwara S, Okubo Y, Irisawa R, Tsuboi R. Rosaceiform dermatitis associated with topical tacrolimus treatment. J Am Acad Dermatol. 2010; 62:1050-1052.
57. 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.
58. Dominey A., Rosen T., Tschien J.: Papulonodular demodicidosis associated with acquired immunodeficiency syndrome. J Am Acad Dermatol 1989; 20: 197-201.
59. Holmes R.B., Martins C., Horn T.: The histopathology of folliculitis In HIV-infected patients. J Cutan Pathol. 2002, 29, 93-95.
60. 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.
61. Chen G.D.: Influence of some environmental factors in the survival of two human follicular mites. Acta Entomol Sinica. 1985, 28, 75-78.
62. Damian D., Rogers M.: Demodex infestation in a child with leukaemia: treatment with ivermectin and permethrin. Int J Dermatol. 2003, 42, 724-726
63. 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.
64. Karıncaoglu Y., Seyhan M.E., Bayram N., Aycan O., Taskapan H. : Incidence of *Demodex folliculorum* in patients with end stage chronic renal failure. Ren Fail. 2005, 27, 495-499
65. Yagdiran Düzgün O., AYTEKİN S.: Comparison of *Demodex folliculorum* density in haemodialysis patients with a control group. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2007, 21, 480-483.

66. Cevik C, Kaya OA, Akbay E, Yula E, Yengil E, Gulmez MI, Akoglu E.: Investigation of demodex species frequency in patients with a persistent itchy ear canal treated with a local steroid, *J Laryngol Otol.* 2014 Aug;128(8):698-701
67. Ding Y, Huang X. Investigation of external auditory meatus secretion Demodex folliculorum and Demodex brevis infection in college students. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2005; 19: 176-7.
68. Aylesworth R, Vance JC. Demodex folliculorum and Demodex brevis in cutaneous biopsies. *J Am Acad Dermatol.* 1982 Nov;7(5):583-9.
69. Vollmer R.T.: Demodex-associated folliculitis . *Am J Dermatopathol*, 1996;18: 589-591.
70. Uyttebroeck W, Nijs I, Maudgal PC, Missotten L. Incidence of Demodex folliculorum in normal people and in blepharitis patients. *Bull Soc Belge Ophthalmol.* 1982;201:83–87.
71. Demmler M, De Kaspar HM, Mohring C, Klauss V. Blepharitis. Demodexfolliculorum, associated pathogen spectrum and specific therapy. *Ophthalmologe.* 1997;94:191–196.
72. Sumer Z, Arıcı MK, Topalkara A, Özcelik S, Yıldırım S. [Incidence of Demodex folliculorum in chronic blepharitis patients]. *Cumhuriyet Univ Tıp Fak Dergisi* 2000;22:69Y72.
73. Alejo RL, Valenton MJ, Abendanio R. Demodex folliculorum infestation of the lids in Filipinos. *Philipp J Ophthalmol* 1972;4:110Y3.
74. De Venecia AB, Siong RL. Demodes sp. infestation in anterior blepharitis, meibomian gland dysfunction, and mixed blepharitis. *Philipp J Ophthalmol* 2011;36:15Y22.
75. Zhao YE, Wu LP, Hu L, Xu JR. Association of blepharitis with Demodex: a meta-analysis. *Ophthalmic Epidemiol* 2012;19:95Y102.
76. Ezra D.G., Beaconsfield M., Collin R.: Floppy eyelid syndrome: stretching the limits. *Surv. Ophthalmol.* 2010; 55(1): 35-46.
77. Lee SH, Chun YS, Kim JH, Kim ES, Kim JC. The relationship between demodex and ocular discomfort. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010;51:2906Y11.
78. Kojima T, Ishida R, Sato EA, Kawakita T, Ibrahim OM, Matsumoto Y, Kaido M, Dogru M, Tsubota K. In vivo evaluation of ocular demodicosis using laser

- scanning confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:565Y9.
79. Gao YY, Di Pascuale MA, Li W, Liu DT, Baradaran-Rafii A, Elizondo A, Kawakita T, Raju VK, Tseng SC.: High prevalence of Demodex in eyelashes with cylindrical dandruff. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005 Sep;46(9):3089-94
  80. Bevins CL, Liu FT. Rosacea: skin innate immunity gone awry? *Nat Med*. 2007;13:904–906.
  81. Kosik-Bogacka D.I., Lanocha N., Lanocha A., Czepita D., Grobelny A., Zdziarska B. et al.: Role of Demodex folliculorum in the pathogenesis of blepharitis. *Acta Ophthalmol*. 2012,90, e579.
  82. Kosik-Bogacka D.I., Łanocha N., Łanocha A., Czepita D., Grobelny A., Zdziarska B. et al.: Demodex folliculorum and Demodex brevis in healthy and immunocompromised patients. *Ophthalmic Epidemiol*. 2013, 20, 159–163
  83. Gao Y.Y., Di Pascuale M.A., Elizondo A., Tseng S.C.: Clinical treatment of ocular demodocosis by lid scrub with tea tree oil. *Cornea*. 2007, 26, 136–143
  84. Lacey N, Delaney S, Kavanagh K, Powell FC.: Mite-related bacterial antigens stimulate inflammatory cells in rosacea. *Br J Dermatol*. 2007 Sep;157(3):474-81. Epub 2007 Jun 26
  85. Szkaradkiewicz A.: *Mikrobiologia lekarska. Repetytorium z bakteriologii*. Wydawnictwo Naukowe UM im. K Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2011.
  86. Powell F.C.: Rosacea. *N Engl J Med* 2005; 352: 793-801.
  87. 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.
  88. 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.
  89. Rouvier E., Luciani M.F., Mattei M.G., Denizot F., Golstein P.: CTLA 8, cloned from the activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol* 1993;150: 5445-5456.
  90. 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.
  91. 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.
92. Pappu M., Ramirez Carrozi V., Ota N., Ouyang W., Hu Y.: The IL-17 family cytokines in immunity and disease. *J Clin Immunol* 2010; 30: 185-195.
  93. Chen Z., O'Shea J.J.: Regulation of IL-17 production in human lymphocytes. *Cytokine* 2008 ; 41: 71-78.
  94. Hus I., Maciąg E., Roliński J.: Znaczenie limfocytów Th-17 w odporności przeciwnowotworowej. *Post Hig Med Dosw* 2010 ; 64: 244-250.
  95. Chabaud M, Lubberts E, Joosten L, van Den Berg W, Miossec P. IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2001;3:168–177.
  96. Antonysamy MA, Fanslow WC, Fu F, Li W, Qian S, Troutt AB, Thomson AW. Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors. *J Immunol.* 1999;162:577–584.
  97. Teunissen MB, Koomen CW, de Waal Malefyt R, Wierenga EA, Bos JD. Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1998;111:645–649.
  98. Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Pagé N, Olivenstein R, Elias J, Chakir J. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108:430–438.

## 12. ZAŁĄCZNIKI

### Załącznik 1

#### Wykaz tabel

Tabela I. Nużeniec - cechy charakterystyczne gatunków występujących u człowieka.	14
Tabela II. Wartość współczynnika OSDI u pacjentów bezobjawowych oraz pacjentów objawowych. ....	49
Tabela III. Ocena związku pomiędzy współczynnikiem OSDI a zarażeniem nużeńcem u pacjentów objawowych i bezobjawowych. ....	49
Tabela IV. Odchylenia w badaniu powiek u pacjentów objawowych i bezobjawowych (n-liczba badanych oczu) .....	51
Tabela V. Ocena spojówki u pacjentów objawowych i bezobjawowych.....	52
Tabela VI. Ocena fałdów spojówkowych w skali LIPCOF u pacjentów objawowych i bezobjawowych, ( n- liczba oczu). ....	52
Tabela VII. Stopień uszkodzenia rogówki w skali oksfordzkiej u pacjentów z grupy objawowej i bezobjawowej.....	53
Tabela VIII. Wyniki testów dodatkowych u pacjentów objawowych i bezobjawowych. ....	54
Tabela IX. Wartości testu TBUT otrzymane w oczach pacjentów bezobjawowych i objawowych. ....	55
Tabela X. Struktura wiekowa pacjentów bezobjawowych i pacjentów objawowych w zależności od występowania nużenia. ....	56
Tabela XI. Ocena częstości występowania nużenia u pacjentów objawowych i bezobjawowych. ....	56
Tabela XII. Analiza częstości występowania nużenia w oczach pacjentów objawowych i bezobjawowych.( n- liczba badanych oczu).....	57
Tabela XIII. Zależność pomiędzy nasileniem zarażenia nużeńcem w obrębie rzęs a obecnością dolegliwości ze strony odcinka przedniego oka. ....	57
Tabela XIV. Zależność pomiędzy nasileniem zarażenia nużeńcem w obrębie brwi a obecnością objawów ze strony odcinka przedniego oka (n-liczba oczu). ....	58

Tabela XV. Zależność pomiędzy nasileniem zarażenia nużeńcem na skórze powiek i okolicy oka a obecnością objawów ze strony odcinka przedniego u pacjentów. ....	58
Tabela XVI. Stężenia IL-17A oraz IL-12 u pacjentów objawowych oraz bezobjawowych. ....	60
Tabela XVII. Ocena wyników wymazów z worka spojówkowego pacjentów objawowych i bezobjawowych. ....	61
Tabela XVIII. Ocena wyników wymazów z worka spojówkowego z uwzględnieniem liczby oczu pacjentów (n- liczba badanych oczu). ....	62
Tabela XIX. Zależność pomiędzy zarażeniem nużeńcem a wiekiem pacjentów. ....	62
Tabela XX. Częstość występowania poszczególnych objawów okulistycznych u pacjentów z nużeńcem i bez nużeńca. ....	63
Tabela XXI. Wartość współczynnika OSDI w grupie bez nużeńca oraz grupie z nużeńcem. ....	64
Tabela XXII. Zależność pomiędzy zarażeniem nużeńcem a odchyleniami w badaniu przedmiotowym ( n= liczba badanych pacjentów). ....	65
Tabela XXIII. Zależność pomiędzy zarażeniem nużeńcem a odchyleniami w badaniu przedmiotowym (n- liczba badanych oczu). ....	66
Tabela XXIV. Zależność pomiędzy zarażeniem nużeńcem a odchyleniami w badaniu spojówki ( n- liczba badanych oczu) ....	66
Tabela XXV. Ocena menisku łzowego u pacjentów ze zdiagnozowanym nużeńcem i osób bez pasożyta ( n- liczba pacjentów) ....	67
Tabela XXVI. Ocena fałdów spojówkowych w skali LIPCOF u pacjentów z grupy z nużeńcem i bez nużeńca ( n- liczba badanych oczu). ....	67
Tabela XXVII. Ocena średniej wartości stopnia uszkodzenia powierzchni rogówki w skali oksfordzkiej u pacjentów ze zdiagnozowanym nużeńcem i bez nużeńca, ( n-liczba badanych oczu). ....	68
Tabela XXVIII. Ocena stopnia uszkodzenia powierzchni rogówki w skali oksfordzkiej u pacjentów ze zdiagnozowanym nużeńcem i bez obecności pasożyta (n- liczba badanych oczu). ....	69
Tabela XXIX. Ocena związku pomiędzy nieprawidłowym wynikiem testów Schirmera oraz przzerwania ciągłości filmu łzowego a obecnością nużeńca ( n- liczba pacjentów). ....	70

Tabela XXX. Ocena związku pomiędzy nieprawidłowym wynikiem testów Schirmera oraz przzerwania ciągłości filmu łzowego a obecnością nużenia ( n- liczba badanych oczu).....	70
Tabela XXXI. Analiza średniej wartości testu przzerwania filmu łzowego w grupie pacjentów zarażonych nużeniem oraz bez zarażenia (n- liczba badanych oczu).....	70
Tabela XXXII. Analiza poziomu cytokin zapalnych (IL-17A oraz IL-12) we łzach pacjentów z nużeniem i bez nużenia. ( n- liczba pacjentów). ....	72
Tabela XXXIII. Częstość występowania bakterii w worku spojówkowym pacjentów z grupy z nużeniem i bez nużenia (n-liczba pacjentów). ....	73
Tabela XXXIV. Częstość występowania bakterii w worku spojówkowym pacjentów z grupy z nużeniem i bez nużenia (n-liczba badanych oczu).....	74
Tabela XXXV. Występowanie nużenia w zależności od płci u pacjentów objawowych . .....	74
Tabela XXXVI. Występowanie nużenia w zależności od płci pacjentów bezobjawowych. ....	74
Tabela XXXVII. Występowanie nużenia w zależności od płci u wszystkich badanych. .....	75
Tabela XXXVIII. Analiza zależności pomiędzy zarażeniem nużeniem a wiekiem pacjentów objawowych i bezobjawowych. ....	76
Tabela XXXIX. Zależność pomiędzy zarażeniem nużeniem a wiekiem pacjentów.....	76

## Załącznik 2

### Wykaz rycin

Rycina 1. Cykl życiowy nużeńca. (Parvaiz Anwar Rather, Iffat Hassan: Human <i>Demodex</i> Mite: The Versatile Mite of Dermatological Importance, Indian J Dermatol. 2014 Jan-Feb; 59(1): 60–66.).....	10
Rycina 2. Fazy rozwoju nużeńca: jajo, larwa, nimfa, osobnik dorosły.( English, F. <i>et al.</i> (2006) The natural history of demodectic mites on the skin of the eyelid margin. <i>Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology</i> . 2(2) 132-136 .....	10
Rycina 3. Obraz mikroskopowy jaja nużeńca ludzkiego ( <i>Demodex folliculorum</i> ), mikroskop świetlny, mat. własny. ....	11
Rycina 4. Obraz mikroskopowy nimfy nużeńca ludzkiego ( <i>Demodex folliculorum</i> )- mikroskop świetlny, mat. własny. ....	11
Rycina 5. Obraz mikroskopowy nimfy nużeńca w trakcie linienia - mikroskop świetlny ( materiał własny) .....	12
Rycina 6. Obraz mikroskopowy nużeńca ludzkiego ( <i>Demodex folliculorum</i> ) - osobniki dorosłe, nimfy oraz jajo - mikroskop świetlny ( materiał własny). ....	13
Rycina 7. Obraz mikroskopowy nużeńca ludzkiego ( <i>Demodex folliculorum</i> ) osobniki dorosłe, nimfy oraz jajo- mikroskop świetlny, (materiał własny). ....	13
Rycina 8. Mankiety keratynowo-tłuszczowe u podstawy rzęs na brzegu powieki górnej (mat. własny). ....	24
Rycina 9. Zespół suchego oka- obraz ubytków nabłonka rogówki (mat.własny) .....	29
Rycina 10. Struktura wiekowa pacjentów objawowych i bezobjawowych z podziałem na płeć.....	33
Rycina 11. Struktura wiekowa pacjentów z grupy z nużeńcem oraz grupy bez nużeńca z podziałem na płeć .....	33
Rycina 12. Wzór kwestionariusza oceniającego nasilenie objawów zespołu suchego oka, o którego wypełnienie proszeni byli badani pacjenci. ....	35
Rycina 13. Wykres służący do obliczania wskaźnika OSDI (ang. Ocular Surface Disease Index). Oś pionowa określa liczbę pytań na które udzielono odpowiedzi, natomiast oś	

pozioma – uzyskaną liczbę punktów .....	36
Rycina 14. Test przzerwania ciągłości filmu łzowego TBUT- materiał własny.....	38
Rycina 15. Obraz mikroskopowy inwazji nużeńca ludzkiego w mieszku włosowym rzęsy u pacjenta objawowego – mikroskop świetlny (materiał własny). .....	40
Rycina 16. Obecność wielu osobników wewnątrz pochewki keratynowo-tłuszczowej w pobliżu mieszka włosowego brwi pacjenta objawowego – mikroskop świetlny (mat. własny).....	41
Rycina 17. Obraz mikroskopowy osobnika dorosłego nużeńca ludzkiego ( <i>Demodex folliculorum</i> ) wykryty na skórze powieki górnej – mikroskop świetlny (materiał własny).....	41
Rycina 18. Obraz mikroskopowy osobnika dorosłego nużeńca krótkiego ( <i>Demodex brevis</i> )- mikroskop świetlny (materiał własny). .....	42
Rycina.19: Obraz mikroskopowy osobników dorosłych nużeńca krótkiego ( <i>Demodex brevis</i> ) uwolnionych z pochewki keratynowo-tłuszczowej rzęsy pacjenta objawowego- mikroskop świetlny (materiał własny).....	42
Rycina 20. Średnia wartość współczynnika OSDI wśród pacjentów objawowych oraz pacjentów bezobjawowych. ....	49
Rycina 21. Graficzne przedstawienie częstości występowania odchyień w badaniu powiek u pacjentów objawowych i bezobjawowych.....	51
Rycina 22. Wykres przedstawiający średnią wartość wyników w skali LIPCOF u pacjentów objawowych oraz bezobjawowych.....	53
Rycina 23. Częstość występowania nieprawidłowości w teście Schirmera u pacjentów bezobjawowych i objawowych.....	54
Rycina 24. Wykres średnich wartości testu przzerwania ciągłości filmu łzowego otrzymanych u pacjentów objawowych i bezobjawowych.....	55
Rycina 25. Częstość występowania nużeńca u pacjentów objawowych i bezobjawowych. ....	56
Rycina 26. Rozkład stopnia nasilenia zarażenia nużeńcem u pacjentów bezobjawowych i objawowych w różnych lokalizacjach związanych z narządem wzroku.....	59
Rycina 27. Rozkład średnich stężeń IL-17A we łzach u pacjentów objawowych oraz bezobjawowych. ....	60
Rycina 28. Rozkład średnich stężeń IL-12 we łzach u pacjentów objawowych i	

bezobjawowych. ....	60
Rycina 29. Wykres wartości współczynnika OSDI w grupie bez nużenia oraz w grupie z nużeniem. ....	64
Rycina 30. Ocena fałdów spojówkowych w skali LIPCOF w oczach pacjentów z grupy z nużeniem i bez nużenia.....	68
Rycina 31. Wykres średniej wartości testu przzerwania filmu łzowego w grupie pacjentów zarażonych nużeniem oraz bez zarażenia. ....	71
Rycina 32. Wykres przedstawiający poziom cytokin zapalnych ( IL17A oraz IL-12) we łzach pacjentów z nużeniem i bez nużenia.....	72
Rycina 33. Rozkład częstości występowania nużenia w zależności od płci wśród wszystkich badanych pacjentów. ....	75
Rycina 34. Struktura wiekowa obu grup z podziałem na mężczyzn i kobiety.....	76

### Załącznik 3.

## PROTOKÓŁ BADANIA

Imię i nazwisko:.....

Adres:.....

Nr tel.:.....

Wiek .....

Rozpoznanie podstawowe.....

Wywiad:.....

Choroby ogólne.....

Leki ogólne: .....

Wywiad okulistyczny:

Korzystanie z soczewek kontaktowych                      TAK/ NIE

Objawy okulistyczne:

uczucie dyskomfortu w oczach                                      TAK/NIE

czas.....

pieczenie    TAK/NIE

czas.....

swędzenie    TAK/NIE

czas.....

łzawienie	TAK/NIE
czas.....	
Światłowstręt	TAK/NIE
czas.....	
uczucie piasku w oczach	TAK/NIE
czas.....	
pogorszenie widzenia	TAK/NIE
czas.....	
poranna wydzielina	TAK/NIE
czas.....	
korekcja okularowa	TAK/NIE
jaka?.....	
od kiedy?.....	
Choroby okulistyczne:	
zapalenia spojówek	TAK/NIE
zaćma	TAK/NIE
jaskra	TAK/NIE
od kiedy?.....	
jaka?.....	
choroby spojówek	TAK/NIE
choroby rogówki	TAK/NIE
przewlekłe zapalenie bł. naczyniowej	TAK/NIE
urazy oka:	TAK/NIE
operacje okulistyczne	TAK/NIE

jakie?.....

ch.oczu w rodzinie:

TAK/NIE

jakie?.....

leki okulistyczne .....

Bad okulistyczne:

Vis OP

.....s.c.....cc.....sph..... cyl.....ax

Vis OL

.....s.c.....cc.....sph.....cyl ..... ax

Sn OP.....

Sn OL.....

T OP 1.....

TOL 1.....

TBUT test OP: .....

OL:.....

T.Schirmera OP:.....

OL:.....

Bad odc. przedniego ( odchylenia):

Powieki OP:

OL:

Spojówka OP:

OL:

OP(schemat):

OL( schemat):

Badanie dna OP( schemat):

Badanie dna OL (schemat):

Obecność Demodex OP: rzęsy

brwi

skóra

OL: rzęsy

brwi

skóra

#### **Załącznik 4.**

### **ŚWIADOMA ZGODA PACJENTA NA UDZIAŁ W BADNIU KLINICZNYM**

Tytuł badania:

**„Ocena udziału demodekozy w etiopatogenezie wybranych chorób narządu  
wzroku”**

Ja niżej podpisany .....  
oświadczam,

Że przeczytałem i zrozumiałem informacje dotyczące opisanego badania klinicznego oraz otrzymałem wyczerpujące, satysfakcjonujące mnie odpowiedzi na zadane pytania. Wyraża zgodę na udział w tym badaniu klinicznym i jestem świadomy faktu, że w każdej chwili mogę wycofać zgodę na udział w dalszej części badania klinicznego bez podania przyczyny.

Otrzymałem kopię niniejszego formularza opatrzoną podpisem i datą.

Wyrażam zgodę, aby dla kontroli poprawności wykonania badania klinicznego, krajowe instytucje nadzorujące badanie, miały wgląd w moje dane osobowe oraz dokumentację medyczną pod warunkiem, że są one związane z badaniem.

Zostałem poinformowany, że administratorem danych będzie zakład opieki zdrowotnej w którym prowadzone jest badanie. Podpisując ten dokument oświadczam, że swoje dane udostępniam dobrowolnie.

Potwierdzam, że zostałem poinformowany o sposobie przetwarzania danych, o prawie wglądu do nich, złożenia wniosku o ich sprostowanie, weryfikowanie ich z moją dokumentacją medyczną oraz, że dane te są zbierane jedynie w celu naukowej analizy badania.

Wyrażam zgodę na przetwarzanie danych w tym badaniu zgodnie z ustawą z dnia 29 sierpnia 1997 r. o ochronie danych osobowych (tekst jednolity z 2002 r. Nr 101, poz.

926 z późn. zm.) . Zgadza się na przekazanie moich anonimowych danych do innych krajów , zarówno w obrębie Europy , jak i poza nią , przy czym dane analizowane przez odnośne władze , reprezentantów Ministerstwa Zdrowia i inne organizacje rządowe oraz komisje bioetyczne dostępne będą jedynie w postaci anonimowej. Zostałem poinformowany , że w przypadku wycofania zgody na udział w badaniu zgromadzone do tej pory dane mogą zostać wykorzystane i przetwarzane jako część bazy danych badania.

.....

Imię i Nazwisko ( drukowanymi literami) Podpis i data złożenia podpisu

Oświadczam , że omówiłam przedstawione badanie używając zrozumiałych , możliwie prostych sformułowań oraz udzieliłam wyjaśnień dotyczących istoty i znaczenia badania.

Osoba uzyskująca zgodę na badanie:

.....

Imię i nazwisko ( drukowanymi literami) Podpis i data złożenia podpisu

## Załącznik 5.

### OŚWIADCZENIE

Poznań, dn. ....

Zgadzam się na wykorzystanie danych medycznych uzyskanych z dokumentacji medycznej w celach naukowych . Dane te wykorzystane będą anonimowo .

Wyrażam zgodę na wykonanie rozszerzonego badania okulistycznego .

Zostałem przez lekarza poinformowany na czym polega badanie, zrozumiałem tę informację oraz wyrażam świadomą zgodę na udział w badaniach .

Zostałem poinformowany , iż z badania mogę wycofać się w każdej chwili, bez żadnych konsekwencji.

.....

Czytelny podpis pacjenta