

dr hab. n. med. Bartosz Miziołek
Katedra i Klinika Dermatologii
Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach

Katowice, 14.07.2025

Recenzja pracy doktorskiej **lek. Karoliny Krawczyk-Wołoszyn** na podstawie **cyklu publikacji** pt. „*Mikroskopia sił atomowych (AFM) jako innowacyjna metoda obrazowania i diagnostyki chorób włosów.*”

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

Promotor pomocniczy: dr hab. n. med. Magdalena Żychowska, prof. UR

1. Krawczyk-Wołoszyn K, Roczkowski D, Reich A, Żychowska M. ***Applying the Atomic Force Microscopy Technique in Medical Sciences-A Narrative Review***. Biomedicines 2024; 12(9): 2012. IF=3.2, MNiSW 100 pkt
2. Krawczyk-Wołoszyn K, Roczkowski D, Adam Reich A. ***Evaluation of Surface Structure and Morphological Phenomena of Caucasian Virgin Hair with Atomic Force Microscopy***. Medicina (Kaunas) 2024; 60(2): 297. IF=2.4, MNiSW 40 pkt
3. Krawczyk-Wołoszyn K, Żychowska M, Reich A. ***Evaluation of hair surface structure and morphology of patients with lichen planopilaris (LPP) by atomic force microscopy (AFM)***. Skin Res Technol 2024; 30(9): e70030. IF=3.2, MNiSW 70 pkt

Lekarz Karolina Krawczyk-Wołoszyn jest absolwentką Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Studia na kierunku lekarskim ukończyła z wynikiem bardzo dobrym w 2018 r uzyskując wyróżnienie. Po stażu zrealizowanym w Uniwersyteckim Szpitalu Klinicznym im. Norberta Barlickiego w Łodzi rozpoczęła szkolenie specjalizacyjne w dziedzinie Dermatologii i Wenerologii w Klinice Dermatologii i Dermatologii Onkologicznej w Rzeszowie w ramach rezydentury. Z wyłączeniem pozycji wchodzących w skład cyklu publikacyjnego jest współautorką 19 publikacji, w tym kilku z *impact factor*, a w aż 16 jest pierwszą autorką. Doktorantka jest autorką 15 referatów zjazdowych, w tym zaprezentowanych również na Forum Młodych Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego. Wykazuje zaangażowanie w działalność dydaktyczną i organizacyjną m.in. poprzez organizację warsztatów z technik obrazowania skóry w trakcie Podkarpackich Dni Dermatologii.

Do recenzji przedłożono cykl trzech prac powiązanych tematycznie - „*Mikroskopia sił atomowych (AFM) jako innowacyjna metoda obrazowania i diagnostyki chorób włosów.*”. W skład cyklu wchodzi dwie prace oryginalne oraz jedna poglądowa o łącznej wartości

wskaźnika impact factor 8.8 oraz 210 pkt MNiSW. Praca badawcza lek. Karoliny Krawczyk-Wołoszyn była prowadzona pod opieką jednych z najwybitniejszych polskich dermatologów - Pana Prof. dr hab. n. med. Adama Reicha oraz Pani dr hab. n. med. Magdaleny Żychowskiej, prof. UR.

Upřednio rumień okołomieszkowy, rogowacenie mieszkowe oraz włosy typu *pili torti* zidentyfikowano jako trichoskopowe markery aktywności nacieków zapalnych w liszaju płaskim mieszkowym (*ang. lichen planopilaris, LPP*) i jego wariantach klinicznych. Patomechanizm pojawiających się włosów typu *pili torti*, czyli o stopniowo skręconej łodydze, nie został w pełni wyjaśniony ze względu na niedostateczny zakres powiększenia zapewnianego przez mikroskopię świetlną, a tym bardziej wykorzystywaną powszechnie przez dermatologów dermatoskopię. Pojawia się zatem konieczność poszukiwania technik pozwalających na obrazowanie powierzchni włosa w nanoskali, co jak wykazała Doktorantka jest możliwe poprzez zastosowanie mikroskopii sił atomowych (*ang. atomic force microscopy, AFM*). Doktorantka przeprowadziła szeroką analizę literatury na temat wcześniejszego wykorzystania AFM nie tylko w diagnostyce chorób skóry owłosionej głowy, ale również schorzeń neurodegeneracyjnych z formowaniem się złogów amyloidu, układu kostno-szkieletowego, nowotworowych, jak również w badaniach immunologicznych oraz genetycznych (m.in. w poznawaniu mechanizmów naprawczych DNA). Podsumowaniem solidnego przygotowania się do dalszej analizy powierzchni włosa stanowi praca pogładowa, wchodząca w skład cyklu publikacji.

W AFM do skanowania powierzchni włosa wykorzystywana jest sonda zamontowana na elastycznym wsporniku, a obrazowanie próbek odbywa się w powietrzu, cieczy lub w wysokiej próżni. Obrazowanie powierzchni włosa zostało przeprowadzone przez Doktorantkę na materiale biologicznym zawieszonym w powietrzu w odpowiednio zdefiniowanych warunkach. Analizie powierzchni poddano 9 lokalizacji włosa po wcześniejszym jego pocięciu skalpelem na 3 cm fragmenty, które były następnie przytwierdzane do szkiełka mikroskopowego za pomocą przezroczystej taśmy dwustronnej. Końcówka sondy była wyśrodkowana tak, aby znajdowała się nad najwyższym punktem krzywizny włosa, a skanowanie odbywało się prostopadle do osi długiej włosa. Niejasne pozostaje jedynie zagadnienie potrzeby zastosowania mechanizmów stabilizujących końcówkę sondy, ograniczających potencjalne mikro drgania oraz ruchy podłoża, często nieodczuwalne dla człowieka.

Dla każdej z 9 lokalizacji włosa wykonano 4-10 zdjęć jego powierzchni, uzyskując łącznie 836 obrazów, dalej poddanych analizie za pomocą dedykowanego oprogramowania. Tak duża liczba obrazów w zupełności rekompensuje względnie niewielką liczbę pacjentów (10 osób) oraz osób grupy kontrolnej (również 9 kobiet i 1 mężczyzna).

Należy jednak podkreślić, iż obrazowanie powierzchni włosa za pomocą AFM jest niezwykle czasochłonną procedurą.

Na ukształtowanie obrazowanej powierzchni może potencjalnie wpłynąć szereg czynników zewnętrznych oddziałujących na powierzchnię włosa, np. zaproponowane przez Doktorantkę farbowanie i inne zabiegi uszkodzające strukturę włosa, które były przeciwwskazane przez co najmniej 3 miesiące przed analizą za pomocą AFM. Warto tu jednak zaznaczyć, iż zakres innych uszkodzających zabiegów jest potencjalnie bardzo szeroki i obejmuje m.in. czesanie, suszenie włosów rozgrzanym powietrzem z suszarki lub też stosowanie prostownicy do włosów, co w przypadku dominujących liczebnie kobiet w obu grupach osób badanych jest raczej mało prawdopodobne, aby nie było wykonywane przez okres aż 3 miesięcy.

Technika AFM, jak zauważyła sama Doktorantka niestety nie pozwala na analizę powierzchni biologicznych przyżyciowo, a jedynie na materiale biopsyjnym. Szereg różnych czynników sprawia, że AFM prawdopodobnie nie znajdzie zastosowania w praktyce klinicznej, natomiast w warunkach eksperymentalnych może pozwolić na lepsze poznanie zaburzeń struktury włosa w poszczególnych schorzeniach skóry owłosionej głowy. Doktorantce AFM pozwoliła na przygotowanie szczegółowej charakterystyki czterech warstw zdrowego włosa oraz określenie wzoru wyglądu włosa podczas naturalnego procesu delaminacji, co zostało zaprezentowane w jednej z dwóch prac oryginalnych wchodzących w skład cyklu publikacyjnego.

Cechy morfologiczne zdrowego włosa zostały następnie zestawione z wynikami analizy powierzchni włosów pobranych od pacjentów z LPP, potwierdzonego wcześniej badaniem patomorfologicznym. Do analizy włączono 10 pacjentów z największym nasileniem choroby ocenianym w oparciu o badanie fizykalne, trichoskopowe oraz zgłaszane przez pacjentów objawy. Ocena taka wydaje się jednak bardzo ogólna i w przyszłych badaniach dobrze, aby była uzupełniona o mierzalne narzędzia, takie jak skale oceny klinicznej: lichen planopilaris activity index (*Chiang i wsp. J Am Acad Dermatol 2010*), frontal fibrosing alopecia severity index (*Holmes i wsp. Br J Dermatol 2016*) lub badanie trichoskopowe (występowanie rumienia, rogowacenia mieszkowego, włosów *pili torti*).

W przeprowadzonej analizie powierzchni włosów z LPP zidentyfikowane zostały obszary w obrębie których zachodzi proces patologicznej delaminacji włosa oraz szczegółowo opisano pojawiające się jedynie na powierzchni włosów LPP odpowiednie wgniecenia, pęknięcia i perforowane struktury. Doktorantka bardzo dokładnie opisała morfologię powierzchni włosa uzyskanego od chorych z LPP, którą zestawiała z analizą wyglądu włosa zdrowego. Stwierdzona została większa ilość zadrapań (*scratches*), większa intensywność występowania falistych krawędzi (*wavy edges*) oraz większa liczba łusek z ubytkami (*pitting*) w poszczególnych odcinkach włosów pacjentów z LPP.

Wyznaczone przez Doktorantkę cele badawcze obejmowały:

1. Określenie typowych cech i wyglądu powierzchni zdrowego włosa w nanoskali za pomocą AFM oraz stworzenie schematu referencyjnego włosa zdrowego.
2. Wykazanie wpływu limfocytarnego nacieku zapalnego w mieszkach włosowych i hiperkeratynizacji ujść mieszków włosowych na morfologię łodyg włosów pacjentów z LPP.
3. Ocenienie skuteczności zastosowania AFM do wykrywania różnic między włosami zdrowymi a chorymi.

Przeprowadzona analiza mikroskopowa pozwoliła na bardzo szczegółowe opisanie wyglądu włosa zdrowego w nanoskali, zatem cel pierwszy pracy został osiągnięty. Zaprezentowana została charakterystyka włosów w LPP, co przy założeniu, że włosy były pobierane od osób z największą aktywnością LPP wskazuje, że cel został pośrednio zrealizowany. Należy jednak zaznaczyć, że w przyszłych analizach warto uwzględnić ocenę aktywności nacieków zapalnych mierzoną pośrednio za pomocą w/w narzędzi klinicznych i/lub charakterystykę trichoskopową, albo też bezpośrednio w biopsjach skóry, nawet metodą półilościową. Warto byłoby zestawzić ze sobą obrazy AFM pochodzące z obszarów łysienia wykazujące odpowiednio rogowacenie mieszkowe lub tylko rumień okołomieszkowy. Poprzez porównanie poszczególnych aspektów powierzchni włosów zdrowych oraz pobranych od pacjentów z LPP wykazano, że AFM to skuteczna metoda do wykrywania różnic pomiędzy włosami zdrowymi a chorymi, co pozwoliła na realizację trzeciego celu badania.

Podsumowując, przedstawiony cykl publikacyjny jest bardzo ciekawym zbiorem prac utrzymanych w jednolitej tematyce, który wymagał dużego zaangażowania Doktorantki w bardzo szczegółową analizę powierzchni włosów za pomocą AFM. Dobór przeanalizowanej literatury, zaprezentowane w publikacjach obrazy mikroskopowe oraz metodyka ich oceny są poprawne i wskazują, że lekarz Karolina Krawczyk-Wołoszyn jest osobą umiejącą prowadzić badania naukowe oraz wyciągać odpowiednie wnioski.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 r. poz. 1668) art. 187 tejże ustawy, a zatem **wyrażam pozytywnym opinię o rozprawie doktorskiej** i przedstawiam Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych *Collegium Medicum* Uniwersytetu Rzeszowskiego wniosek o dopuszczenie lek. Karoliny Krawczyk-Wołoszyn do dalszych etapów przewodu doktorskiego.