

Gliwice, 15.09.2025r.

Recenzja rozprawy doktorskiej w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu,
w dyscyplinie nauki medyczne pt.

**„Mikroskopia sił atomowych (AFM) jako innowacyjna metoda obrazowania
i diagnostyki chorób włosów.”**

lek. Karoliny Krawczyk-Wołoszyn

Badanie włosów w przebiegu liszaja płaskiego mieszkowego (lichen plano-pilaris, LPP) i łysienia czołowego bliznowaciejącego (*frontal fibrosing alopecia*, FFA) z zastosowaniem mikroskopii sił atomowych (*atomic force microscopy*, AFM) stanowi innowacyjne podejście łączące perspektywę kliniczną z eksperymentalną analizą nanostrukturalną. Oba schorzenia charakteryzują się przewlekłym, destrukcyjnym procesem zapalnym prowadzącym do nieodwracalnej utraty mieszków włosowych. Wczesne rozpoznanie ma kluczowe znaczenie dla skuteczności terapii, jednak dostępne metody diagnostyczne włączając dermoskopię (trichoskopię) i biopsję, mają ograniczoną czułość i rozdzielczość w ocenie zmian ultrastrukturalnych łodygi włosa.

W tym kontekście zastosowanie mikroskopii sił atomowych w badaniach włosów chorych na LPP i FFA otwiera nową perspektywę diagnostyczną. AFM umożliwia wizualizację zmian morfologicznych i mechanicznych w nanoskali, pozwalając na analizę uszkodzeń, które są niewidoczne w klasycznych technikach optycznych. Dzięki temu metoda ta może stanowić pomost diagnostyczny pomiędzy oceną kliniczno- trichoskopową a analizą molekularną. Nowatorstwo tego podejścia polega na przeniesieniu zaawansowanej technologii fizycznej, stosowanej dotąd głównie w naukach materiałowych, do badań dermatologicznych nad chorobami włosów. Pozwala to nie tylko lepiej zrozumieć mechanizmy destrukcji mieszków włosowych w przebiegu LPP i FFA, ale także potencjalnie opracować bardziej precyzyjne kryteria diagnostyczne oraz narzędzia monitorowania skuteczności terapii w przyszłości w kontekście kontynuacji podjętych badań.

Do cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską lek. Karolina Krawczyk-Wołoszyn włączyła 3 publikacje monotematyczne - w tym jedną o charakterze pogładowym. Łączny sumaryczny wskaźnik oddziaływania publikacji w cyklu (ang. **Impact Factor**) wynosi **9,5** a sumaryczna punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego wynosi **210 punktów**. Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich trzech publikacjach.

Dysertacja doktorska liczy 74 strony maszynopisu i zawiera wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, kserokopie trzech publikacji wchodzących w skład cyklu, wnioski oraz wykaz piśmiennictwa (21 pozycji opublikowanych w latach 2003- 2023).

Ponadto załączono dwa streszczenia zarówno w języku polskim, jak i angielskim, oświadczenia współautorów oraz wykaz dotychczasowych publikacji Doktorantki (19) z wyłączeniem prac wchodzących w skład pracy doktorskiej, wykaz własnych doniesień zjazdowych (15), udział w projektach badawczych - głównie badaniach klinicznych (7) oraz jednym badaniu uniwersyteckim (2024).

We wstępie Doktorantka omówiła syntetycznie etiopatogenezę LPP i FFA, zasadę działania AFM zaliczanej do badania mikroskopowego z sondą skanującą, a także możliwości i ograniczenia tej metody diagnostycznej.

W kolejnym punkcie dysertacji lek. Karolina Krawczyk-Wołoszyn przedstawiła trzy cele dysertacji, do których zaliczono:

1. określenie typowych cech i wyglądu powierzchni zdrowego włosa w nanoskali za pomocą mikroskopii sił atomowych (AFM) ze stworzeniem schematu referencyjnego włosa zdrowego,
2. określenie wpływu limfocytarnego nacieku zapalnego w mieszkach włosowych i hiperkeratynizacji ujść mieszków włosowych na morfologię łodyg włosów u chorych na LPP,
3. ocenę skuteczności AFM w detekcji różnic między włosami w grupie zdrowych ochotników i chorych.

Dwie oryginalne prace badawcze włączone do cyklu publikacyjnego zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych wydawanych przez wydawnictwa MDPI oraz Wiley, należących do kwartylu Q 1. Przedstawione w nich wyniki badań spełniają kryteria prac naukowo-badawczych i uzyskały pozytywną opinię Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Rzeszowskim.

W obu publikacjach Doktorantka zachowała klasyczny układ pracy oryginalnej, obejmujący określenie celów badawczych, opis materiału i metod, prezentację wyników wraz z ich omówieniem oraz dyskusję i wnioski. Wyniki badań zostały zaprezentowane w formie tabel i własnych rycin, stanowiących unikatowy materiał naukowy.

Praca poglądowa, opublikowana w recenzowanym czasopiśmie naukowym znajdującym się w kwartylu Q2, stanowi doskonały wstęp merytoryczny do badań, przedstawiając szczegółowy opis zasad oraz możliwości diagnostycznych metody AFM.

Publikacja 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. doi: 10.3390/biomedicines12092012.

Punktacja MNiSW: 100 IF(2024)=3,9 (Q2 – biochemistry& molecular biology – 100/320; Q2 – medicine, research & experimental – 69/195)

W pracy poglądowej Doktorantka dokonała przeglądu aktualnych zastosowań mikroskopii sił atomowych (AFM) w medycynie, ze szczególnym uwzględnieniem jej potencjału w analizie struktur komórkowych i molekularnych. AFM umożliwia trójwymiarowe

obrazowanie powierzchni biologicznych oraz ocenę ich właściwości mechanicznych, elektrycznych i magnetycznych, co czyni ją narzędziem o szerokim zastosowaniu w badaniach nowotworów, chorób neurodegeneracyjnych oraz zaburzeń tkanki łącznej. W ocenie struktur włosa technika ta pozwala na szczegółową analizę właściwości fizyko-mechanicznych i ultrastrukturalnych łodygi włosa. Początkowo stosowana do oceny wpływu czynników środowiskowych i kosmetycznych, obecnie dzięki połączeniu z metodami spektroskopowymi, umożliwia również badanie składu chemicznego poszczególnych warstw włosa. W dotychczas opublikowanych badaniach klinicznych wykazano przydatność AFM w identyfikacji mikrouszkodzeń i zmian nanostrukturalnych we włosach chorych na wybrane dermatozy, co podkreśla jej znaczenie jako potencjalnego precyzyjnego narzędzia diagnostycznego w dermatologii.

Publikacja 2. Krawczyk-Wołoszyn K, Roczkowski D, Reich A. Evaluation of Surface Structure and Morphological Phenomena of Caucasian Virgin Hair with Atomic Force Microscopy. *Medicina (Kaunas)*. 2024 Feb 9;60(2):297. doi: 10.3390/medicina60020297.

Punktacja MNiSW:40 IF(2024) =2,4 (Q1 – medicine, general & internal – 78/332)

Celem pierwszej pracy oryginalnej było uzyskanie szczegółowych obrazów oraz przeprowadzenie mikroskopowej analizy morfologicznej powierzchni zdrowych włosów z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych (AFM). W ramach eksperymentu od każdej osoby (10 zdrowych ochotników populacji kaukaskiej) pobrano od trzech do pięciu włosów, które analizowano w dziewięciu punktach pomiarowych, zlokalizowanych w różnych odległościach od nasady (0,5–7 cm). W każdym punkcie wykonano od czterech do dziesięciu obrazów AFM, uzyskując łącznie 496 mikroskopowych fotografii. Dla każdego włosa dokonano pomiarów parametrów geometrycznych łusek, takich jak ich długość, szerokość oraz wysokość stopnia łuski. Analiza uzyskanych obrazów pozwoliła na opis zmian zachodzących w trakcie naturalnego procesu delaminacji włosa oraz identyfikację charakterystycznych cech morfologicznych jego powierzchni, takich jak mikrozagłębienia, owalne wklęsnięcia, elementy makrofibrylarne, globule, zarysowania i faliste brzegi. Wyniki te dostarczyły nowych danych na temat ultrastruktury prawidłowych włosów i z pewnością mogą stanowić punkt odniesienia dla przyszłych badań nad patologią skóry owłosionej głowy, procesami starzenia włosa oraz oceną skuteczności zabiegów pielęgnacyjnych i terapeutycznych.

Należy podkreślić wyczerpujący opis dotyczący ograniczeń przeprowadzonego badania obejmujący nie tylko małą liczebność grupy (w liczbie ochotników, ale nie analizowanych obrazów), czasochłonność metody diagnostycznej oraz weryfikację kryteriów włączenia do eksperymentu.

Uzyskane wnioski stanowią potwierdzenie zrealizowania pierwszego celu pracy doktorskiej zgodnie z przytoczonymi powyżej jej założeniami.

Doktorantka zgodnie z podanym w publikacji oświadczeniem była odpowiedzialna za konceptualizację, metodologię, walidację, przeprowadzenie badania, przygotowanie danych z ich formalną analizą, wizualizację, cytowanie i analizę piśmiennictwa, pierwotny i końcowy kształt publikacji wskazując na jej znaczące zaangażowanie i wiodący udział w powstaniu niniejszej publikacji.

Publikacja 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 Sep;30(9):e70030. doi: 10.1111/srt.70030.

Punktacja MNiSW:70 IF(2024)=3,2 (Q1 – dermatology – 21/96)

Druga praca oryginalna stanowiła kontynuację eksperymentu związanego z opisem morfologii łodyg włosów w AFM u chorych na LPP. W badaniu pobrano od trzech do pięciu włosów z obszarów zmienionych chorobowo skóry głowy u dziesięciu chorych na liszaj płaski mieszkowy (LPP). Metodyka dotyczyła dziewięciu punktów pomiarowych z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych (AFM). W każdej lokalizacji wykonano co najmniej cztery obrazy, które następnie poddano analizie metrycznej i morfologicznej. Oceniano parametry geometryczne łusek włosa, takie jak długość, szerokość i wysokość stopnia łuski, a także cechy strukturalne, obejmujące obecność powierzchni prążkowanych lub gładkich, widoczność warstw endokutikuli i kory, kształt krawędzi łusek, zarysowania, mikrozagłębienia, owalne wklęsnięcia, globule oraz faliste brzegi. Uzyskane wyniki z analizą struktur w obrazach porównano z włosami pochodzącymi od osób zdrowych. Doktorantka wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy obrazami włosami chorych na LPP a włosami osób zdrowych. U chorych obserwowano większą liczbę zarysowań w początkowych odcinkach włosa, większe nasilenie falistości krawędzi łusek na całej długości oraz zwiększoną liczbę łusek z mikrozagłębieniami w środkowej części włosa. Ponadto od odcinka położonego około 3,5 cm od nasady w kierunku części dystalnej włosa stwierdzono istotnie częstsze występowanie łusek o powierzchni prążkowanej. Uzyskane wyniki stanowią pierwszą próbę charakterystyki włosów w przebiegu LPP z zastosowaniem AFM mogąc stanowić punkt wyjścia do dalszych badań nad patogenezą oraz diagnostyką tego schorzenia.

Wykazane istotne statystycznie różnice pomiędzy obrazami włosami chorych na LPP a włosami osób zdrowych stanowią potwierdzenie ostatniego celu doktoratu. Doktorantka określiła tym samym istnienie cech typowych dla LPP potwierdzonych w badaniu AFM.

W odniesieniu do drugiego celu dysertacji, który koresponduje z powyższym wnioskiem, sugerowałabym opisowe rozwinięcie w metodyce pracy podstawy stwierdzenia obecności limfocytarnego nacieku zapalnego w mieszkach włosowych i hiperkeratynizacji ujść mieszków włosowych i ich potencjalnego wpływu na morfologię łodyg włosów u chorych na LPP. Powyższe założenie badawcze można by sparafrazować, podkreślając, że celem pracy była ocena morfologicznych korelatów zmian obserwowanych w przebiegu LPP z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych, (w domyśle - bez bezpośredniej analizy histopatologicznej czy dermoskopowej).

Podsumowując przeprowadzone przez lek. Karolinę Krawczyk-Wołoszyn badania dotyczące charakterystyki morfologicznej włosów u zdrowych ochotników oraz u chorych na LPP w nanoskali, dały podstawę do sformułowania wniosków dysertacji doktorskiej korespondujących z celami pracy doktorskiej. Wykazano zatem w AFM istnienie typowych cech morfologicznych włosów u zdrowych ochotników ze stworzeniem schematu referencyjnego włosa osoby zdrowej, jak również potwierdzono zauważalne różnice w AFM dotyczące morfologii włosów u chorych na LPP, a włosami u zdrowych ochotników.

Z innych uwag, które nie mają wpływu na moją ostateczną, pozytywną ocenę dysertacji doktorskiej, warto wskazać na potrzebę przytoczenia i opracowania polskich odpowiedników terminów opisujących struktury morfologiczne łodygi włosa obserwowane, a także opisane w badaniach AFM w wersji anglojęzycznej. Cytowanie anglojęzycznych nazw w tekście

polskim podkreśla wręcz konieczność stworzenia adekwatnej terminologii w języku polskim, co jednocześnie akcentuje nowatorski charakter przeprowadzonych badań. Wnioski pozostają spójne z założeniami pracy, te ostatnie jednak warto byłoby nieco przereklamować pod względem stylistycznym, aby zapewnić większą klarowność ich interpretacji.

Podsumowując, powyżej omówione publikacje przedstawione do oceny jako praca doktorska stanowią spójny cykl mogący być podstawą dysertacji doktorskiej. We wszystkich pracach oryginalnych lek. Karolina Krawczyk- Wołoszyn jest pierwszą autorką będąc odpowiedzialną za konceptualizację z identyfikacją problemu badawczego, zaprojektowanie kluczowych założeń i opracowanie metodologii badań, analizę i opracowanie danych, interpretację uzyskanych wyników, napisanie manuskryptu oraz wizualizację wyników w postaci obrazów morfologicznych struktur w AFM oraz tabel. Fakt ten potwierdza znaczący i samodzielny udział Doktorantki w realizacji badań eksperymentalnych, a także jej wysokie kompetencje w zakresie planowania i organizacji pracy badawczej. Świadczy również o umiejętności krytycznej analizy oraz interpretacji uzyskanych wyników w odniesieniu do aktualnego stanu wiedzy i danych literaturowych, co wskazuje na dojrzałość naukową i świadome prowadzenie procesu badawczego.

Stwierdzam że rozprawa doktorska lek. Karoliny Krawczyk-Wołoszyn pt. „**Mikroskopia sił atomowych (AFM) jako innowacyjna metoda obrazowania i diagnostyki chorób włosów**” pod kierunkiem promotora prof. dr hab. n. med. Adama Reicha i promotora pomocniczego dr hab. n. med. Magdaleny Żychowskiej spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora nauk medycznych tj. warunki określone w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2024 r. poz. 1571). Uprzejmie wnoszę zatem do Wysokiej Rady Collegium Medicum Uniwersytetu Rzeszowskiego wniosek o dopuszczenie lek. Karoliny Krawczyk-Wołoszyn do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie powyższej rozprawy doktorskiej, biorąc pod uwagę jej nowatorski charakter, oryginalność uzyskanych wyników badań oraz zastosowanie interesującej metody obrazowania, polegającej na adaptacji techniki badawczej wywodzącej się z inżynierii materiałowej do zastosowań w medycynie. Autorka podjęła się realizacji wymagającego, technicznie złożonego i czasochłonnego projektu badawczego, którego wyniki mają istotne znaczenie poznawcze i aplikacyjne w kontekście medycznym.

Najważniejszym jednak osiągnięciem pracy jest stworzenie podstaw terminologicznych dla nowoczesnej, nieinwazyjnej metody diagnostyki obrazowej, znajdującej potencjalne zastosowanie w badaniach nad etiopatogenezą chorób dermatologicznych. Metoda ta może mieć znaczenie nie tylko w trichoskopii, lecz również w analizie zmian skórnych o podłożu ogólnoustrojowym, umożliwiając implementację uzyskanych wyników w ocenie wpływu wybranych terapii oraz nowoczesnych technologii, w tym kosmetycznych, z możliwością ich obiektywizacji i porównywania uzyskanych wyników badań w przyszłości.

Z wyrazami głębokiego szacunku,

prof. dr hab. n.med. Grażyna Kamińska-Winciorek

Kierownik Zespołu ds. Raka i Czerniaka Skóry
Klinika Transplantacji Szpiku i Onkohematologii,
Narodowy Instytut Onkologii im.Marii Skłodowskiej-Curie,
Państwowy Instytut Badawczy Oddział w Gliwicach

