



Zakład Chemii Fizycznej Układów
Biologicznych

Kasprzaka 44/52, PL-01 224 Warsaw, Poland

Prof. dr hab. Maciej Wojtkowski

Physical Optics and Biophotonics Group

Email: mwojtkowski@ichf.edu.pl

Tel. +(48 22) 343 3283

+(48 22) 343 20 00

Fax +(48 22) 343 33 33

+(48 22) 632 52 76

E-mail: ichf@ichf.edu.pl

20 sierpnia 2023

Opinia o pracy doktorskiej pani magister inżynier Marii Baczewskiej

Opiniowana praca doktorska pani magister inżynier Marii Baczewskiej zatytułowana „Holograficzne ilościowe obrazowanie fazowe ze wspomaganiami multimodalnymi w zastosowaniach biomedycznych na poziomie komórkowym” została wykonana pod promotorską opieką pani Profesor Małgorzaty Kujawińskiej na Wydziale Mechatroniki Politechniki Warszawskiej. Na rozprawę doktorską składa się siedem spójnych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w pismach recenzowanych o tytułach dobrze rozpoznawalnych globalnie przez ekspertów w dziedzinie, oraz trzy artykuły opublikowane w zeszytach konferencyjnych Proceedings SPIE, które mają status pełnoprawnych publikacji z częściowym recenzowaniem artykułów naukowych. W większości – siedmiu prac, pani Baczewska jest pierwszym autorem, natomiast w pozostałych trzech wykazała ona swój udział procentowy i wkład merytoryczny. Wszystkie dziesięć prac będących przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej wyróżnia dobra jakość, znaczący stopień wpływu na środowisko zajmujące się tomografią holograficzną oraz znaczący stopień nowości proponowanych rozwiązań. Prace oryginalne opatrzone są „przewodnikiem” w języku polskim oraz dwujęzycznym streszczeniem. Przedstawione publikacje powstały w okresie ostatnich pięciu lat i mają łączną dwucyfrową liczbę cytowań bez autocytowań, co oznacza, że wyniki prac są dostrzegane i wykorzystywane przez innych naukowców działających w tej dziedzinie. W odrębnych tabelach przedstawiono szczegółowo wkład autorki do wieloautorskich publikacji poprzez określenie procentowego udziału w opisanych w nich pracach badawczych.

Rozprawa doktorska Pani magister inżynier Marii Baczewskiej ma charakter obliczeniowo eksperymentalny z głównym skupieniem uwagi na badaniu zmian własności optycznych komórek pod wpływem działań terapeutycznych. Poruszane zagadnienia badawcze obejmują zakres zastosowań optyki współczesnej, bioinżynierii, medycyny i biologii. W swoich działaniach pani Maria umiejętnie łączy aspekt rozszerzenia wiedzy z dziedziny optyki fizycznej z pracami poznawczymi w dziedzinie biologii oraz z rozwojem algorytmiki. Platformami pomiarowymi są tutaj cyfrowa tomografia holograficzna oraz cyfrowa mikroskopia holograficzna QPM (ang. Quantitative Phase Microscopy). Metody te dają przewagę nad klasycznymi metodami mikroskopii fazowej poprzez unikatową możliwość tworzenia ilościowych map i reprezentacji trójwymiarowego rozkładu współczynnika załamania. Sprawia to, że możliwa staje się kwantyfikacja i standaryzacja prowadzonych pomiarów. W konsekwencji techniki te otwierają perspektywy wprowadzenia trwałych biomarkerów rozumianych jako obiektywne wskaźniki biologiczne. Takie biomarkery uzyskiwane są w sposób minimalnie inwazyjny i dostarczają informacji na temat procesów fizjologicznych (patologicznych) zachodzących w organizmie poprzez korelację ze stanem komórek. Jednak uzyskanie wysokiego stopnia standaryzacji wymaga zdefiniowania i narzucenia odpowiednich protokołów pomiarowych i sposobów analizy danych pomiarowych. Temu właśnie zagadnieniu poświęcona jest praca magister inżynier Marii Baczewskiej. W przedstawionej pracy w jasny sposób postawiono hipotezę badawczą oraz zdefiniowano zakres zadań badawczych mieszczących się ramach czasowych możliwych do realizacji w trakcie projektu doktorskiego.

Praca badawcza mająca na celu wprowadzenie jednoznacznych biomarkerów zawiera wiele zróżnicowanych zadań związanych tak z samymi ograniczeniami fizycznymi i technicznymi metody

pomiarowej (w tym przypadku QPM i tomografii holograficznej) jak i z problemami interpretacyjnymi związanymi ze złożonością samej próbki czy też procedury medycznej której jest poddawana. W przypadku prac pani Baczewskiej zaproponowano głównie ekstrakcję suchej masy oraz rozkładu współczynnika załamania dla pomiarów prowadzonych w dużym polu widzenia (obejmującym wielokrotność pola widzenia oferowaną przez wykorzystany układ optyczny). Sprawdzone zmienność mierzonych parametrów dla zmiennych warunków utrwalania próbki oraz przykładów działań terapeutycznych. Ponadto wykonano obrazowanie multimodalne z wykorzystaniem metod specyficznych molekularnie takich jak mikroskopia Ramana oraz mikroskopia fluorescencyjna.

Analizę źródeł przedstawioną w publikacjach dokonano baz zarzutu. Autorka tak w przewodniku jak i w załączanych prezentacjach wskazuje aktualny stan wiedzy na bazie literatury światowej. Tematyka pracy podjęta przez panią Baczewską jest bardzo dynamicznie rozwijana przez wiele ośrodków na świecie. Obecny rozwój technologiczny – szczególnie postęp metod obliczeniowych, pozwala na wprowadzenie instrumentów holograficznych jako narzędzi konkurencyjnych do klasycznych mikroskopów, które pozwalają na ilościową ocenę próbek bazując na rzeczywistym rozkładzie współczynnika załamania i wnioskowania o stanie hodowli komórkowych co może mieć przełożenie na wprowadzanie nowych leków lub terapii.

W „przewodniku” dołączonym do zbioru publikacji autorka przedstawiła szczegółowo zadania badawcze jakimi się zajmowała. W dziedzinie reprezentowanej przez panią Baczewską jest niezmiernie istotne, aby publikacje miały zawartość wystarczającą dla osiągnięcia wysokiego poziomu nowości i znaczenia dla środowiska zajmującego się QPM oraz tomografią holograficzną. To implikuje konieczność zawarcia w publikacji opisu prac badawczych wielu osób, które są realizowane równoległe przez współpracowników. W tym przypadku recenzent nie miał problemu z identyfikacją tej części zadań, za które odpowiedzialna była autorka pracy doktorskiej. Nie ma tutaj też wątpliwości, że obejmują one zamkniętą tematycznie całość i mogą być z łatwością wyodrębnione ze wszystkich prac przedstawianych w załączonych publikacjach. Autorka przedstawiła w sposób jasny motywację podjętych badań.

Linie hodowlane komórek to populacje komórek, które zostały usunięte z organizmu (np. człowieka lub zwierzęcia) i hodowane w sztucznych warunkach laboratoryjnych. Wykorzystanie ich pozwala na badanie mechanizmów działania leków na poziomie komórkowym. Stanowią one niezastąpione narzędzie w farmakologii, które pozwala na badanie mechanizmów działania leków, odkrywanie nowych związków terapeutycznych oraz ocenę toksyczności i bezpieczeństwa substancji chemicznych. Dzięki nim możliwe jest rozwijanie skuteczniejszych i bezpieczniejszych terapeutyków, co przyczynia się do postępu w dziedzinie medycyny i opieki zdrowotnej. Linie komórkowe są używane również do badania farmakokinetyki, czyli procesów, które kontrolują absorpcję, dystrybucję, metabolizm i wydalanie leków z organizmu. Te informacje pomagają w określeniu optymalnej dawki leku i jego czasu podawania. Ponadto linie hodowlane komórek są wykorzystywane do przesiewania tysięcy substancji chemicznych w celu znalezienia nowych potencjalnych leków. To tzw. badania przesiewowe, które pozwalają zidentyfikować cząsteczki o pożądanym właściwościach terapeutycznych. W badaniach takich istotną staje się wysoka rozdzielczość czasowa i przestrzenna oraz jednoznaczna kwantyfikacja parametrów fizycznych rejestrowanych przez dany instrument. Nie bez znaczenia jest również szybkość przygotowania próbek i łatwość ustawiania samego instrumentu pomiarowego.

Pani Baczewska w swojej pracy wychodzi naprzeciw wymienionym powyżej wymaganiom proponując wykorzystanie dwóch technik obrazowych QPM oraz tomografii holograficznej, które w ostatnim czasie pojawiły się jako instrumenty dostępne komercyjnie i zyskują coraz większy obszar zastosowań praktycznych. W przewodniku pokazano schemat działań mających doprowadzić do „pozyskania wiarygodnych danych pomiarowych rozszerzających wiedzę o strukturach biologicznych na poziomie komórkowym”, czyli do weryfikacji postawionej hipotezy. W schemacie tym dla każdego problemu naukowego powstaje odpowiedni protokół pomiarowy uwzględniający wybór narzędzi obrazujących, sposób przygotowania próbki, sekwencja pomiarową oraz sposób analizy danych. Odniesienie publikacji składających się na tę pracę doktorską do schematu doboru protokołu pomiarowego jest nieco karkołomne i trudne do zrozumienia. Autorka chciała w ten sposób nadać spójność całemu cyklowi, jednak taki zabieg nie był tutaj konieczny. Zrozumiałe jest, że jednocześnie prowadzone były prace nad metodologią pomiarową, przygotowania próbek, wykonania pomiarów i analizy danych i to w zupełności wystarcza do zrjonalizowania podjętych przez autorkę działań w

kontekście odpowiedzi na zadane pytanie badawcze. Z drugiej strony w przewodniku bardzo dobrze usystematyzowano podjęte działania poprzez opisy zawarte w podrozdziałach 2.2.1 do 2.2.4, w których odniesiono się do zbioru publikacji autorki (P1, P2, P4, P6, K1, K2). W części wstępnej tego zestawienia wskazano jakie kryteria doboru należy wprowadzić, aby zoptymalizować metodę obrazową. Następnie przedstawiono praktyczne wytyczne dotyczące optymalnego przygotowania próbki dla wykorzystania metod holograficznych oraz projektowania samych protokołów pomiarowych. W kolejnej części przewodnika znajdują się bardzo istotne szczegóły techniczne i doświadczenia autorki z przygotowaniem hodowli komórkowych oraz praktyczne aspekty analizy sygnałów i obrazów. Jest to bardzo ważna część, gdyż zwykle taki poziom szczegółowości pomijany jest w publikacjach, jednak wiedza ta jest bardzo istotna do utrzymania ekspertyzy w zespole zajmującym się rozwijaniem danej tematyki. Moim zdaniem ta część przewodnika całkowicie uzasadnia jego sensowność i przydatność w dalszym procesie naukowym. W ostatniej części przewodnika opisano prace badawcze poświęcone badaniu zmienności parametrów mierzonych za pomocą QPM oraz tomografii holograficznej dla hodowli komórkowych, w odpowiedzi na trzy typy terapeutyków: laseroterapii niskoenergetycznej oraz ziół Yokukansan na komórki neuroblastomy oraz leku bortezomib na komórki szpiczaka mnogiego (Publikacje P5, P7, K3). Wynikiem pierwszej pracy badawczej było pokazanie zmiany gęstości suchej masy komórek neuroblastomy oraz powierzchni komórek zależnych od dawek napromieniowania. Dodatkowo na podstawie analizy zmian gęstości suchej masy komórek w czasie wykazano istnienie zmian związanych z procesem podziału lub śmierci komórek. W drugiej z prac połączono wyniki uzyskane za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, tomografii holograficznej i mikrospektroskopii ramanowskiej i na ich podstawie oceniano następujące parametry: proliferację komórek, liczbę kropelek lipidów w cytoplazmie, zmiany współczynnika załamania wewnątrz komórki. Autorka wykazała, że występują korelacje pomiędzy dawką leku i zdolnością namnażania komórek – wskazując na parametr łatwo dostępny dla metod holograficznych. W przypadku innych parametrów nie zaobserwowano statystycznie znaczącej swoistości. W ostatniej z prac wykonano wstępne badania z wykorzystaniem trzech metod: QPM i tomografii holograficznej do pomiarów zmian gęstości suchej masy komórki, zmian powierzchni, zmian morfologii komórek i zmiany rozkładu współczynnika załamania w całej komórce i jądrach komórkowych; oraz mikrospektroskopii ramanowskiej do uzyskania informacji o specyfice chemicznej i indukowanych lekiem zmianach w widmie spektralnym komórki. W wyniku tych prac wykazano wpływ bortezomibu na zmiany rozkładu współczynnika załamania komórek i ich jąder, oraz że zmiany składu chemicznego komórek wskazują na apoptozę komórek. Podsumowując na przedstawionych przykładach pokazano, że łącząc wyniki uzyskane za pomocą zaprezentowanej metodyki, można wyciągnąć unikalne wnioski na temat analizowanych próbek biologicznych. Innymi słowy zweryfikowano pozytywnie postawioną hipotezę.

Przyjęta przez autorkę metodyka badań nie budzi zastrzeżeń we wszystkich przedstawionych pracach. Jakość publikacji jest na dobrym poziomie, porównywalna do prac publikowanych przez grupy badawcze z najlepszych ośrodków badawczych publikujących w tej dziedzinie. Zaproponowana tematyka i sposób rozwiązania problemów celuje w samo sedno rozwoju metod QPM i tomografii holograficznej i ich farmakologicznych zastosowań do obrazowania komórek.

W przedstawionych pracach zaproponowano szereg oryginalnych rozwiązań metod analizy danych pomiarowych i algorytmów rekonstrukcyjnych, z których na szczególną uwagę zasługuje metoda kompensacji wartości bazowej współczynnika załamania przy łączeniu pomiarów czy też przy analizie wolumetrycznej rekonstrukcji komórki. Najbardziej istotne z punktu widzenia naukowego jest uzyskanie zmienności ilościowych parametrów mierzonych za pomocą QPM i Tomografii holograficznej z konkretnymi działaniami terapeutycznymi. Prace te wskazują na konkretne biomarkery, które mogą być dalej testowane w praktyce farmakologicznej (również za pomocą urządzeń komercyjnych). Zaprezentowane publikacje napisane są przejrzysto, językiem angielskim na bardzo dobrym poziomie. Prace te czyta się bez trudności. Nie mam zastrzeżeń do strony edytorskiej i zawartości merytorycznej wszystkich publikacji. Autorka wykazała umiejętności przedstawiania celu pracy i uzyskanych wyników. Przewodnik jest również napisany czytelnie i syntetycznie.

Jedną z nielicznych słabości przedstawionej rozprawy doktorskiej jest brak dyskusji dotyczącej ograniczeń stosowalności zaproponowanych metod w kontekście powtarzalności w uzyskiwaniu wartości współczynnika załamania, masy suchej i innych parametrów. Te informacje można znaleźć w publikacjach, jednak kilka zdań w przewodniku byłoby przydatne dla czytelnika.

Szczegółowe i mniej istotne komentarze dotyczące przewodnika:

Str 7 „...projektu Fundacji Nauki Polskiej” – Fundacji na rzecz Nauki Polskiej

Str 9 „Wad tych pozbawione są metody obrazowania fazowego.” – to zdanie jest zbyt ogólne, w metodach fazowych przygotowanie próbki odgrywa istotną rolę i może być równie czasochłonne jak w innych metodach mikroskopii – o czym dowiadujemy się w trakcie czytania rozprawy.

Str 10 „...w handlowych systemach QPI „– być może lepiej nazywać je dostępnymi komercyjnie systemami QPI

Str 20 „...w ramieniu” – lepiej użyć w części schematu

Str 22, 26 „ ...zszywania pól widzenia” – zszywamy pomiary wykonane z określonym polem widzenia

Podsumowując stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr inż. Marii Baczewskiej w pełni spełnia warunki stawiane pracom doktorskim przez ustawę o tytule naukowym i stopniach naukowych i stawiam wniosek o dopuszczenie jej do publicznej obrony.

Z poważaniem,