

Wrocław, 7.08.2023

Prof. n. techn. dr hab. n. fiz. inż. lek. Halina Podbielska  
Katedra Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej  
Wydział Podstawowych Problemów Techniki  
Politechnika Wroclawska  
50-370 Wrocław  
Wybrzeże Wyspiańskiego 27

## **Recenzja rozprawy doktorskiej**

*Holograficzne ilościowe obrazowanie fazowe ze wspomaganie  
multimodalnym w zastosowaniach biomedycznych na poziomie komórkowym*

**Autor rozprawy: mgr inż. Maria Baczevska**

**Promotor: prof. dr hab. inż. Małgorzata Kujawińska**

**Promotor pomocniczy: dr inż. Wojciech Krauze**

**Politechnika Warszawska**

**Dyscyplina Naukowa Inżynieria Biomedyczna**

**Dziedzina Nauk Inżynieryjno-Technicznych**

Recenzję rozprawy doktorskiej sporządzono na prośbę Przewodniczącego Rady Dyscypliny Inżynieria Biomedyczna Politechniki Warszawskiej, prof. dr. hab. inż. Tomasza Markiewicza, wyrażoną w piśmie RND.IB.524.1.2023 z 23.06.2023 roku. Data wpływu pisma na Politechnikę Wrocławską: 05.07.2023.

### **Ocena aktualności zagadnień poruszanych w recenzowanej rozprawie doktorskiej**

Współczesna medycyna dąży do zrozumienia procesów zachodzących na poziomie komórkowym. Badania biooptyczne umożliwiające obserwację i analizę komórek w sposób bezinwazyjny, mogą przyczynić się do lepszej diagnostyki, monitorowania terapii i rozwoju nowych metod leczenia. W tym kontekście badania biooptyczne na poziomie komórkowym są niezwykle ważne, pozwalają bowiem na zrozumienie mechanizmów chorób, poprzez możliwość bezpośrednich obserwacji i mikroskopowej analizy komórek. Poznanie zmian strukturalnych, morfologicznych, funkcjonalnych i biochemicznych na poziomie komórkowym

pomaga w identyfikacji czynników ryzyka, rozpoznawaniu, monitorowaniu i w konsekwencji może ułatwiać leczenie wielu schorzeń.

Badania biooptyczne dostarczają narzędzi diagnostycznych, które pozwalają na wczesne wykrywanie chorób oraz ocenę ich nasilenia i progresji choroby. Przykładowo analiza zmian współczynnika załamania komórek, morfologii czy ekspresji białek może pomóc w identyfikacji raka, w badaniach chorób serca, schorzeń neurologicznych i wielu innych. Biooptyczne badania na poziomie komórkowym pozwalają na monitorowanie skuteczności terapii i ocenę reakcji komórek na leczenie. Dzięki temu można dostosowywać terapię do indywidualnych potrzeb pacjenta, zoptymalizować dawkowanie leków i ocenić efektywność terapii.

Badania biooptyczne są też istotne w rozwoju nowych terapii i leków. Pozwalają one na testowanie nowych substancji i badanie ich wpływu na komórki i tkanki. Dzięki temu można identyfikować biomarkery, które mogą być wykorzystane do monitorowania skuteczności terapii i oceny odpowiedzi pacjenta na leczenie. Badania te pozwalają na personalizację procedur medycznych poprzez analizę unikalnych cech komórek i tkanek. Poznanie różnic między komórkami zdrowymi a zmienionymi chorobowo pozwala na bardziej precyzyjne diagnozowanie, prognozowanie i leczenie, dostosowane do indywidualnych potrzeb pacjenta.

Postęp w dziedzinie obrazowania komórek za pomocą mikroskopii, spektroskopii i innych technik biooptycznych otwiera nowe możliwości badawcze i zastosowania kliniczne, prowadząc do innowacyjnych rozwiązań w medycynie.

Recenzowana rozprawa Pani Marii Baczewskiej wpisuje się więc doskonale w te trendy i dotyczy jak najbardziej aktualnych zagadnień. Wysokorozdzielcze pomiary, segmentacja dwuwymiarowa i wolumetryczna danych fazowych pozyskanych za pomocą cyfrowego mikroskopu holograficznego DHM i wysokorozdzielczego tomografu holograficznego HT, pozwalają na wyznaczenie interesujących parametrów komórkowych, w tym suchej masy i rozkładu współczynnika załamania komórek i substruktur komórkowych.

### **Ocena struktury rozprawy i prezentowanych treści**

Recenzowana praca doktorska ma format broszury i liczy 148 stron wraz z bibliografią oraz dołączonymi kopiami publikacji współautorstwa Doktorantki. Pracę podzielono na 3 rozdziały. W pracy zamieszczono wykaz skrótów, tabel i rysunków, odpowiednie streszczenia w języku polskim i angielskim, a także dołączono współautorskie publikacje naukowe, stanowiące podstawę rozprawy. Pierwszy rozdział jest Wstępem wyjaśniającym cele pracy, opisującym aktywności naukowe Doktorantki podczas realizacji pracy doktorskiej, a także prezentującym

zastosowania biologiczne ilościowej mikroskopii fazowej. Kandydatka do stopnia doktora skupiła się na metodach cyfrowej mikroskopii holograficznej i tomografii holograficznej. Ten podrozdział jest dobrze udokumentowany i wskazuje na rozeznanie Doktorantki w tematyce prowadzonych badań. Szczególnie wysoko oceniam schematy graficzne prezentujące metodykę badań, zastosowane procedury i techniki pomiarowe. Drugi rozdział stanowi przewodnik po opublikowanych pracach współautorstwa Doktorantki. Trzeci natomiast zawiera kopie opublikowanych prac.

Pani Baczevska jest współautorką następujących publikacji (według numeracji i pisowni zastosowanej w rozprawie):

[P1] M. Baczevska, K. Eder, S. Ketelhut, B. Kemper i M. Kujawińska. „Refractive index changes of cells and cellular compartments upon paraformaldehyde fixation acquired by tomographic phase microscopy”. *Cytometry Part A* 99.4 (2021), 388–398.

[P2] P. Nienaltowski, M. Baczevska i M. Kujawińska. „Comparison of fixed and living biological cells parameters investigated with digital holographic microscope”. *Photonics Letters of Poland* 12.1 (2020), 13–15.

[P3] V. Balasubramani, A. Kuś, H.-Y. Tu, C.-J. Cheng, M. Baczevska, W. Krauze, M. Kujawińska. „Holographic tomography: techniques and biomedical applications”. *Applied Optics* 60.10 (2021), B65–B80.

[P4] P. Stępień, M. Ziemczonok, M. Kujawińska, M. Baczevska, L. Valenti, E. Casirati, A. Cherubini i W. Krauze. „Numerical refractive index correction for the stitching procedure in tomographic quantitative phase imaging”. *Biomedical Optics Express* (2022).

[P5] M. Baczevska, P. Stępień, M. Mazur, W. Krauze, N. Nowak, J. Szymański i M. Kujawińska. „Method to analyze effects of low-level laser therapy on biological cells with a digital holographic microscope”. *Applied Optics* 61.5 (2022), B297–B306.

[P6] M. Baczevska, M. Mazur i W. Krauze. „Towards true volumetric refractive index investigation in tomographic phase microscopy at cellular level”. *Optics Continuum* 2.2 (2023), 484–489.

[P7] M. Baczevska, M. Krolikowska, M. Mazur, N. Nowak, J. Szymański, W. Krauze, C.-J. Cheng i M. Kujawińska. „Influence of Yokukansan on refractive index of neuroblastoma cells”. *Biomedical Optics Express* 14.5 (2023), 1959–1973.

[K1] M. Baczevska, M. Kujawińska, E. Skrzypek i D. Śladowski. „Feasibility study of investigation of skin at cellular level by digital holographic microscopy”. *Speckle 2018: VII International Conference on Speckle Metrology*. T. 10834. SPIE. 2018, 440–446.

[K2] M. Baczevska, W. Krauze, A. Kuś, P. Stępień, K. Tokarska, K. Zukowski, E.

Malinowska, Z. Brzózka i M. Kujawińska. „On-chip holographic tomography for quantifying refractive index changes of cells' dynamics”. Quantitative Phase Imaging VIII. T. 11970. SPIE. 2022, 43–47.

[K3] M. Baczevska, M. Królikowska, W. Krauze i M. Kujawińska. „Holographic tomography supported by Raman micro-spectroscopy for identifying and quantifying changes in cells treated with Chinese herbal medicine”. Quantitative Phase Imaging IX. T. 12389. 1238907. SPIE. 2023 (cyt. na s. 19, 22, 23, 27, 29–32, 37, 38, 40, 41).

Numeracja [P] to prace opublikowane w czasopismach naukowych, niektóre z nich mają dość wysoki współczynnik wpływu. W optyce i optyce biomedycznej (Biomedical Optics Express) czy nawet w naukach medycznych (Cytometry) są plasowane w pierwszym kwartylu. Numeracja [K] odnosi się do prac konferencyjnych. W sumie podstawę rozprawy stanowi 10 opublikowanych doniesień naukowych.

Według oświadczenia Doktorantki, ocenia Ona swój udział w powstanie tychże prac następująco:

[P1]	80%
[P2]	40%
[P3]	20%
[P4]	8%
[P5]	60%
[P6]	50%
[P7]	60%

Natomiast w pracach konferencyjnych udział Autorki, jest następujący:

[K1]	85%
[K2]	70%
[K3]	70%

Jak więc widać, w 7 pracach (na dziesięć) udział Doktorantki wynosi minimum 50% i często sięga 80%. Jest to udział znaczny, zważywszy na to, że wszystkie prace są wieloautorские (od 3 do 9 współautorów). W 7 pracach Pani Baczevska jest też pierwszą autorką. Nie dołączono do rozprawy oświadczeń współautorów, jednakże Promotor potwierdza taki udział Doktorantki.

Analiza struktury pracy i zawartych w rozprawie opisów, pozwala stwierdzić, że Doktorantka orientuje się w tematyce rozprawy, dobrze opanowała pisanie tekstów naukowych, a wiele osiągniętych wyników już opublikowała.

## **Ocena osiągnięć stanowiących podstawę ubiegania się o stopień doktora**

Głównym celem rozprawy, jaki wyznaczyła sobie Doktorantka jest zastosowanie metod obrazowania fazowego do badań na poziomie komórkowym i subkomórkowym, co pozwala na nieinwazyjne śledzenie zmian w komórkach i długotrwałe pomiary przyżyciowe, bez konieczności pracochłonnego przygotowania próbek. Ilościowe obrazowanie fazowe ze wspomaganie multimodalnym w zastosowaniach biomedycznych na poziomie komórkowym umożliwia dokładną, trójwymiarową i wielowymiarową analizę komórek. Pozwala na lepsze zrozumienie procesów biologicznych, co może prowadzić do lepszego diagnozowania chorób, odkrywania nowych terapii i prowadzenia badań w dziedzinie biomedycyny.

W pracach naukowych współautorstwa Pani Baczewskiej prezentowane są różnorodne techniki, metody oraz ich zastosowania w analizie komórek i tkanek na poziomie mikroskopowym. Aby wykazać wieloaspektowość badań Doktorantki, poniżej odniosę się do wybranych publikacji, w których miała wiodącą rolę.

Przykładowo w pracy [P1] opisano zastosowanie fazowej mikroskopii tomograficznej, do badania zmian współczynnika załamania komórek i składników komórkowych po utrwaleniu paraformaldehydem. Metoda pozwoliła na ilościową ocenę zmian współczynnika załamania w utrwalonych próbkach (zaobserwowano spadek wartości współczynnika). Pozwoliło to na ocenę wpływu procesu utrwalania na struktury komórkowe, przyczyniając się do lepszego zrozumienia przygotowania próbek do badań metodami tomografii fazowej.

Natomiast w publikacji [P5] analizowano za pomocą mikroskopu holograficznego wpływ niskoenergetycznej terapii laserowej na komórki. Wykazano różnice suchej masy w zależności od parametrów dozymetrycznych promieniowania, przy czym zaproponowano zaawansowane metody statystyczne do oceny zmiany gęstości suchej masy w czasie. Rekomenduję rozważenie pogłębionych badań i przedstawienie ich na forum czasopisma o globalnym zasięgu skierowanego do świata biomedycyny

Publikacja [P6] omawia postępy w wolumetrycznej analizie współczynnika załamania przy użyciu fazowej mikroskopii tomograficznej na poziomie komórkowym. Skupiono się na osiągnięciu dokładnych i kompleksowych wyników pomiarów współczynnika załamania struktur komórkowych. Wykazano, że w celu uzyskania wysokiej jakości informacji wolumetrycznej konieczne jest zastosowanie zaawansowanych iteracyjnych algorytmów rekonstrukcji tomograficznej, a szybkie algorytmy rekonstrukcji prowadzą do otrzymania zaniżonych i metrologicznie nieakceptowalnych wartości współczynnika załamania.

Badania wpływu terapii ziołowej Yokukansan na współczynnik załamania komórek neuroblastoma są przedmiotem pracy [P7]. Zastosowano tu podejście multimodalne, wykorzystując trzy systemy do badań w skali mikroskopowej: mikroskopię fluorescencyjną, tomografię holograficzną i mikrospetroskopię Ramana. Badanie przyczynia się do zrozumienia wpływu ziołowych środków terapeutycznych na zachowanie komórek. Tu również można rekomendować po rozszerzeniu badań publikację w czasopiśmie medycznym.

Przeprowadzone badania wykazały, że Doktorantka bardzo dobrze opanowała warsztat badawczy, procedury laboratoryjne i wykazała się umiejętnością analizy danych pomiarowych. Znaczenie osiągniętych wyników jest nietuzinkowe.

1. Zastosowanie mikroskopii holograficznej do badania komórek umożliwia obserwację i pomiar parametrów komórek, takich jak morfologia, zmiany współczynnika załamania czy dynamika komórek.
2. Badanie zmian współczynnika załamania światła w komórkach, zarówno na poziomie komórek żywych, jak i utrwalonych, ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia struktury, funkcji i reakcji komórek na różne czynniki.
3. Zastosowanie tomografii holograficznej w badaniach biologicznych dostarcza informacji o morfologii komórek, ich właściwościach refrakcyjnych i zmianach tych parametrów w czasie.
4. Opracowanie metod korekcji numerycznej danych i analiza wyników pozyskanych różnymi technikami mikroskopowymi ulepsza precyzję pomiarów i ma istotne znaczenie dla uzyskiwania dokładnych i wiarygodnych wyników.
5. Zaprezentowane w publikacjach zastosowania biomedyczne pozwalają na lepsze zrozumienie mechanizmów niskoenergetycznej terapii laserowej, ocenę skutków oddziaływania leków na komórki, identyfikację zmian w komórkach pod wpływem leków ziołowych i badanie komórek nowotworowych.

Reasumując, można stwierdzić, że przedstawione w publikacjach wyniki badań Doktorantki przyczyniają się do rozwinięcia wiedzy na temat komórek i tkanek na poziomie mikroskopowym. Mają istotne znaczenie dla zrozumienia procesów biologicznych, analizy podłoża chorób i rozwijania nowych metod diagnostycznych i terapeutycznych.

### **Wnioski końcowe**

Rozprawa została sumiennie przygotowana, a otrzymane wyniki są ważne z punktu widzenia przyszłych badań podstawowych, a także klinicznych. Doktorantka rozwiązała

rozważany w pracy problem naukowy, stosując przy tym poprawny warsztat badawczy i metody analizy. Praca jest wieloaspektowa i świetnie ilustruje bogactwo metod inżynierii biomedycznej (metody obrazowe, analiza biochemiczna, zaawansowane algorytmy przetwarzania obrazów, analiza statystyczna etc.). Praca napisana jest poprawnie pod względem językowym, usterki są nieliczne (np. przeżyciowo zamiast przyżyciowo). Doktorantka wykazała się dużą dojrzałością naukową, rozważając w rozprawie także kierunki przyszłych badań.

Uważam, że recenzowana rozprawa zadowalająco spełnia wymagania wspomniane w regulujących te kwestie dokumentach (*Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, Dz.U. Nr 65 z dnia 16 kwietnia 2003 r., poz. 595 z późn. zm.*).

Mając zatem na uwadze osiągnięte wyniki oraz obowiązujące przepisy o stopniach i tytułach naukowych, wnoszę o dopuszczenie Pani Marii Baczewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, ze względu na jakość prezentowanych wyników, bogaty dorobek publikacyjny w zakresie tematyki rozprawy, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.



Prof. n. techn. dr hab. n. fiz. inż. lek. Halina Podbielska