

Konspekt pracy doktorskiej

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

Wersja polska:

Głównym celem rozprawy jest opracowanie metodyki pomiarowej i ścieżek przetwarzania danych wykorzystujących bezznacznikowe, mikroskopowe techniki ilościowego obrazowania fazowego wspomagane wybranymi metodami pozyskiwania informacji biochemicznej na poziomie komórkowym.

W pierwszym etapie prac skupiono się na opracowaniu protokołów przygotowania i pomiarów hodowli komórkowych i utrwalonych preparatów biologicznych z wykorzystaniem cyfrowego mikroskopu holograficznego (DHM, z ang. *digital holographic microscopy*) i wysokorozdzielczego tomografu holograficznego (HT, z ang. *holographic tomography*). W szczególności zaproponowano i zaimplementowano metodykę wysokorozdzielczych pomiarów w dużym polu widzenia, segmentacji dwuwymiarowej i wolumetrycznej danych fazowych oraz analizy statystycznej suchej masy (DM, z ang. *dry mass*) i rozkładu współczynnika załamania (RI, z ang. *refractive index*) w komórkach i substrukturach komórkowych. Zbadano również wpływ procesu utrwalania komórek na pomiary DM i RI, co jest ważne z punktu widzenia porównania wyników między-laboratoryjnych i tworzenia bibliotek cyfrowych danych fazowych struktur biologicznych. W drugim etapie prac, ze względu m.in. na brak możliwości identyfikacji specyficzności chemicznej materiału biologicznego w metodach holograficznych, zaproponowano uzupełnienie danych pomiarowych poprzez wykorzystanie technik wspomagających: mikroskopii fluorescencyjnej (FM, z ang. *fluorescence microscopy*), mikrospektroskopii Ramana (RmS, z ang. *Raman micro-spectroscopy*) oraz mikroskopii optycznej (BFM, z ang. *bright field microscopy*). Funkcjonalność opracowanych metodyk i protokołów pomiarowych przedstawiono na konkretnych przykładach zastosowań biomedycznych. Przeprowadzono badania wpływu niskoenergetycznej biostymulacji laserowej na komórki neuroblastomy oraz keratynocyty (DHM). Multimodalne pomiary zastosowano do badań wpływu ziół medycyny chińskiej na komórki neuroblastomy (HT, RmS, FM) oraz do zbadania wpływu leku bortezomib na zmiany RI i składu chemicznego komórek białaczki (DHM, HT, RmS, BFM).

Podstawą pracy doktorskiej jest cykl 10 publikacji recenzowanych, w tym 6 z listy JCR. Przedstawiony przewodnik podsumowuje badania zrealizowane w trakcie przygotowania rozprawy. Prace te dobrze wpisują się w ogólnoswiatowy trend coraz szerszego wykorzystania metod holograficznych w takich obszarach jak farmakologia lub zdalna diagnostyka bazująca na cyfrowych bibliotekach biologicznych danych na poziomie komórkowym.

Słowa kluczowe: multimodalne pomiary mikroobektów biologicznych, ilościowe obrazowanie fazowe na poziomie komórkowym, cyfrowa mikroskopia holograficzna, tomografia holograficzna, mikroskopia fluorescencyjna, mikrospektroskopia Ramana.

English version:

Holography based quantitative phase imaging with multimodal support for biomedical application at cellular level

The main objective of the dissertation is to develop measurement methodologies and data processing pathways using label-free, microscopic quantitative phase imaging techniques supported by selected methods that allow the acquisition of biochemical information at the cellular level.

The first stage of the work focused on developing protocols for the preparation and measurement of cell cultures and fixed biological samples using a digital holographic microscope (DHM) and a high-resolution holographic tomograph (HT). In particular, methodologies were proposed and implemented for high-resolution measurements in a large field of view, two-dimensional and volumetric segmentation of phase data, and statistical analysis of dry mass (DM) and refractive index (RI) distribution in cells and cell substructures. The effect of the cell fixation process on DM and RI measurements was also investigated, which is important for the comparison of inter-laboratory results and the creation of digital libraries of phase data of biological structures.

In the second stage of the work, due to the i.e., lack of possibilities to identify the chemical specificity of biological material in holographic methods, it was proposed to supplement the measurement data by using supporting techniques: fluorescence microscopy (FM), Raman microspectroscopy (RmS) and bright field microscopy (BFM). The functionality of the developed methodologies and measurement protocols was demonstrated using specific examples of biomedical applications. First, a comprehensive study of the effects of Low Level Laser Therapy biostimulation on neuroblastoma cells and keratinocytes (DHM). Multimodal measurements were used also to study of the effects of Chinese medicine herbs (Yokukansan) on neuroblastoma cells (HT, RmS, FM) and to study of the effect of the drug bortezomib on changes in the RI and chemistry of leukemia cells (DHM, HT, RmS, BFM). \par

The dissertation is based on a series of ten peer-reviewed publications, including six JCR-listed articles. The presented guide summarizes the research carried out during the preparation of the dissertation. The work follows well the worldwide trend of increasing use of holographic methods in such areas as pharmacology or remote diagnostics based on digital libraries of biological data at the cellular level.

Keywords: multimodal measurements of biological micro-objects, quantitative phase imaging at the cellular level, digital holographic microscopy, holographic tomography, fluorescence microscopy, Raman microspectroscopy.