

WPŁYNĘŁO

2023-09-13

dn.....

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Michała Ziemiczonoka
pt.: „Metrologia w optycznej tomografii dyfrakcyjnej z wykorzystaniem
mikrostruktur naśladujących rzeczywiste obiekty biologiczne”.**

Przedmiotem recenzji jest rozprawa doktorska mgr inż. Michała Ziemiczonoka p.t. „Metrologia w optycznej tomografii dyfrakcyjnej z wykorzystaniem mikrostruktur naśladujących rzeczywiste obiekty biologiczne”. Funkcję promotorki doktoratu pełniła prof. dr hab. inż. Małgorzata Kujawińska, natomiast dr inż. Arkadiusz Kuś był promotorem pomocniczym.

Recenzja została opracowana na prośbę prof. dr hab. inż. Tomasza Stareckiego, Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Automatyka, Elektronika, Elektrotechnika i Technologie Kosmiczne Politechniki Warszawskiej.

1. Wstęp i tematyka pracy

Optyczne metody obrazowania struktur biologicznych należą do zaawansowanych układów metrologicznych, mających na celu dokonanie analizy w kontekście prawidłowego ich funkcjonowania i budowy morfologicznej. Obecnie polegają one przede wszystkim na analizie zmian natężenia źródła światła, co wobec skomplikowanego obiektu badań jakim są tkanki, prowadzi często do oceny subiektywnej. Znaczący postęp w tej dziedzinie zaczął się w momencie pojawienia się Leserów, czułych i rozdzielczych układów detekcji, stosowania technik dyfrakcji promieniowania i numerycznego modelowania oddziaływania z materiałą, prowadzących do analizy wartości zmian współczynnika załamania (n) światła. W konsekwencji rozwijana technika kontrastu fazowego umożliwiła uzyskiwanie obrazów o rozdzielczości submikronowej, niosąc przy tym informację ilościową o próbce. Zmienność parametrów metrologicznych obejmujących właściwości absorpcyjne badanego układu biologicznego, wymaganą rozdzielczość, czułość czy obszar analityczny sprawia, że technika ilościowego obrazowania fazowego (QPI, ang. quantitative phase imaging) wymaga standaryzacji, co do działań w zakresie obrazowania konkretnych elementów strukturalnych tkanki. Ten aspekt rozwijany jest w pracy doktorskiej mgr inż. Michała Ziemiczonoka, który zaproponował opracowanie fantomów mikrostruktur biologicznych pozwalających na dokonywanie oceny metrologicznej układów QPI.

2. Cel rozprawy doktorskiej

Celem rozprawy doktorskiej było opracowanie mikrostruktur naśladujących rzeczywiste obiekty biologiczne, o optymalnych parametrach geometrycznych i optycznych z punktu widzenia oceny metrologicznej systemów ilościowego obrazowania fazowego, w szczególności optycznej tomografii dyfrakcyjnej. Doktorant zaproponował logiczną kolejność zagadnień do osiągnięcia, obejmującą (str. 10, rozdz. 1.2):

„1. Wytworzenie mikrostruktur o parametrach geometrycznych i optycznych odpowiadających obiektom biologicznym i spełniających wymagania QPI.

2. Weryfikację istotnych parametrów charakteryzujących mikrostruktury metodami referencyjnymi.
3. Opracowanie metodyki metrologicznej oceny rekonstrukcji tomograficznej na podstawie pomiaru fantomu komórki biologicznej.
4. Demonstrację metodyki na podstawie pomiarów fantomu komórkami trzema układami ODT o różnych implementacjach sprzętowych i algorytmicznych.
5. Demonstrację użyteczności opracowanych struktur kalibracyjnych i możliwe rozszerzenia ich funkcjonalności.”

Praca ma zatem charakter analityczno-eksperymentalny, a Doktorant na podstawie obecnych wymagań w zakresie cech struktur biologicznych zaproponował własną architekturę ich fantomów, umożliwiającą opracowanie metodyki metrologicznej oceny jakości rekonstrukcji tomograficznej. Ponadto dokonał weryfikacji przeprowadzonych pomiarów dla różnych układów pomiarowych i algorytmów analitycznych. Przeprowadził dyskusję nad koniecznością prowadzenia prac nad strukturami testowymi dla optycznej tomografii dyfrakcyjnej (ODT, ang. optical diffraction tomography). W związku z faktem, że pomiar QPI 3D dokonywany jest w układzie interferometru Macha-Zehndera, proces rekonstrukcji obrazu wymaga rejestracji wielu perspektyw oraz algorytmu ich interpretacji do trójwymiarowego rozkładu wartości współczynnika załamania światła. Nadto, jak wiadomo materiał biologiczny jest skomplikowany przestrzennie pod względem geometrycznym ($\sim 1\mu\text{m}$) i optycznym ($n \sim 0,01$) i zaproponowanie procedury pomiarowej nawet dla grupy podobnych komórek jest, jak wykazał Autor w rozdz. 1.3.3., mało prawdopodobne. Na tej podstawie uważam, że cel pracy został sformułowany prawidłowo, bowiem odpowiada na obecne wyzwania metrologiczne i aplikacyjne w zakresie metody ODT, znajdującej się w obrębie dyscypliny naukowej Doktoranta.

3. Układ pracy oraz udział własny doktoranta w osiągnięciach zaprezentowanych w dysertacji oraz ich zgodność z opublikowanymi pracami naukowymi

Praca doktorska, została przygotowana w postaci zwięzłego opracowania (liczącego 195 stron), obejmującego 41-stronicowy opis oraz kopię publikacji stanowiących przedmiot rozprawy. Opis składa się ze wstępu (rozdz.1) zawierającego: działalność naukową Doktoranta, cel pracy i wstęp teoretyczny oraz przewodnik po publikacjach (rozdz. 2) obejmującego: tabelę z cyklem publikacji (wraz z bibliometrią), opis zagadnień zrealizowanych w ramach metrologii ODT, wkład Autora, podsumowanie i przyszłe plany badawcze. Dodatkowo zamieszczono: glosariusz, spis tabel i rysunków oraz bibliografię.

Publikacje stanowiące przedmiot rozprawy doktorskiej obejmują cykl 9-ciu prac posiadających współczynnik wpływu IF (w zakresie 3,43-5,13; Σ IF=39), 5-ciu artykułów konferencyjnych oraz 1 patent. Prace mają liczbę cytowań 120 (Google Scholar) i 59 (Web of Science) oraz liczbę punktów MNiSW równą 1360. Doktorant wskazał w tabelach 2.1 i 2.2 (str. 15 i 27) swój udział procentowy wynoszący w 6-ciu pracach 70-90%, a w pozostałych 9-ciu, 5-30% oraz przedstawił opis zadań zrealizowanych w trakcie ich przygotowania. Nadmienię, że prof. dr hab. inż. Małgorzata Kujawińska, drogą korespondencji e-mailowej, potwierdziła zgodność oświadczeń Doktoranta z posiadaną dokumentacją.

Doktorant do najważniejszych prac zalicza te, które traktują o opracowaniu fantomu i metodyki oceny metrologicznej:

- [A1] Ziemczonok, M., Kuś, A., Wasylczyk, P., Kujawińska, M., 3D-printed biological cell phantom for testing 3D quantitative phase imaging systems, *Scientific Reports*, 2019, 9(1), 18872, (udział Doktoranta – 70%),
- [A2] Ziemczonok, M., Kuś, A., Kujawińska, M., Optical diffraction tomography meets metrology — Measurement accuracy on cellular and subcellular level, 2022, 195, (udział Doktoranta – 75%),
- [P1] Ziemczonok, M., Kuś, A., Kujawińska, M., Wzorzec rozkładu współczynnika załamania, patent, PL 237 684 B1, (udział Doktoranta – 70%),
- [K1] Ziemczonok, M., Kujawińska, M., Multiscale and multipurpose phantoms for 2D/3D quantitative phase imaging, *Quantitative Phase Imaging IX 2023*, (udział Doktoranta – 90%),
- [A3] Krauze, W., Kuś, A., Ziemczonok, M., et al. 3D scattering microphantom sample to assess quantitative accuracy in tomographic phase microscopy techniques, *Scientific Reports*, 2022, 12(1), 19586 (udział Doktoranta – 25%).

Z kolei inne tj. [A4-A9 i K2-K5] traktują o praktycznych zastosowaniach powyżej wskazanego osiągnięcia pracy doktorskiej.

W publikacjach, najważniejszych z punktu widzenia osiągnięć (tabela 2.1, str. 15), Doktorant jest pierwszym autorem i/lub autorem korespondencyjnym, a w przypisach artykułów i tabeli 2.2 (str. 27) znajdują się informacje na temat jego wiodącej roli w zakresie projektowania i wytworzenia fantomu komórki biologicznej, budowy układu ODT do pomiaru z obrotem próbki, przeprowadzenia pomiarów i symulacji, syntezy i analizy danych oraz przygotowania manuskryptu publikacji. Zakres badawczy przedstawiony w publikacjach jest zgodny z osiągnięciami wskazanymi w rozdziale 2 opracowania. Na tej podstawie można stwierdzić, że układ doktoratu jest poprawny i pozwala na jednoznaczną ocenę dorobku Doktoranta.

4. Ocena pracy

4.1 Oryginalność i zdolności doktoranta do formułowania zadań i prowadzenia dyskusji naukowej.

Tematyka pracy dotyczy trójwymiarowego ilościowego obrazowania fazowego struktur biologicznych, czyli poszukiwanego narzędzia do analizy stanu funkcjonowania tkanek. Obecnie realizowane układy ODT realizowane są najczęściej dwuwymiarowo i dedykowane dla ściśle określonych struktur biologicznych. Wynika to jak Autor zauważa z kilku istotnych zagadnień badawczych: i) konieczności opracowania rekonstrukcji tomograficznej 3D, ii) weryfikacji metrologicznej dokonanego pomiaru iii) przedstawienia wzorca tożsamego z cechami badanej struktury biologicznej i iv) jego weryfikacji praktycznej. We wszystkich tych obszarach prowadzone są prace dotyczące charakteryzacji różnych struktur biologicznych, ale jak dotąd brak jest podejścia holistycznego do tego zagadnienia. Wynika to z prostego faktu trudności w jednoczesnym zrozumieniu właściwości i funkcjonowania komórek biologicznych oraz metrologii systemów optycznej tomografii dyfrakcyjnej. Tego zadania podjął się Doktorant, mając szczęście realizując swoją pasję naukową w Instytucie Mikromechaniki i Fotoniki Politechniki Warszawskiej pod kierunkiem Prof. Małgorzaty Kujawińskiej. Pozwoliło mu to na jednoznaczne określenie zagadnień badawczych dotyczących układu pomiarowego

ODT, a w szczególności rejestracji obrazów w osi z i ich interpretacji wymagającej syntezy dwuwymiarowych amplitud zespolonych prowadzących do ilościowego określenia zmian wartości parametru n . Drugi aspekt badawczy czyli propozycja opracowania fantomu o cechach tożsamyh ze strukturami biologicznymi wymagała poznania ich nie tylko od strony geometrycznej, ale również dynamiki i gradientu zmian cech komórkowych wymagających wysokiego kontrastu pomiaru współczynnika załamania światła. Doktorant jasno formułuje te dwa zagadnienia, będąc jednocześnie świadomy różnic kompozycyjnych pomiędzy strukturami biologicznymi, a zastosowanym polimerem i układem do dwufotonowej polimeryzacji. Dlatego też weryfikuje metrologicznie zaproponowaną strukturę fantomu stosując różne parametry układu ODT względem wymaganych cech (geometrycznych i jakościowych np. parametr suchej masy, rys. 2.8, str. 25) oraz analizując zastosowane algorytmy prowadzące do symulacji rekonstrukcji obrazu (rys. 2.6, str. 23). Ostatnim ważnym elementem jest ocena zastosowania zaproponowanej metodologii wytworzenia fantomu, przeprowadzonej dla różnych układów w szeroko zakrojonej współpracy zagranicznej.

Na podstawie powyższego oraz biorąc pod uwagę parametry bibliometryczne cyklu (pkt. 3 recenzji) nie mam wątpliwości, że tematyka rozprawy jest oryginalna i dobrze rozpoznawalna na arenie międzynarodowej. Nadto, Doktorant formułuje i dyskutuje każdy etap swoich osiągnięć i kierunków badań w oparciu o aktualną literaturę i współpracę zagraniczną.

4.2 Znaczenie i osiągnięcia pracy doktorskiej.

Przeprowadzone badania dotyczyły metody 3D QPI istotnej w biomedycynie ze względu na nieinwazyjny sposób ilościowego obrazowania struktur komórkowych. Zagadnieniem badawczym stosowania tej metody w biomedycynie jest konieczność specyficznego podejścia do metodologii pracy tj. od metrologii układu przez opracowanie struktury testowej do weryfikacji praktycznej. Brak standardów i kryteriów oceny to fundamentalne zagadnienia techniki 3D QPI w medycynie, których próby podjął się Doktorant. Do najważniejszych osiągnięć pracy zaliczam:

1. Opracowanie fantomu komórki biologicznej zaprezentowane w publikacji [A1, A2] i patencie krajowym [P1]. Znamiennym jest, że układ fantomu musiał nie tylko odzwierciedlać poszczególne struktury biologiczne ($\sim 100\text{nm}$ - $40\mu\text{m}$, $\sim 0,01\text{mm}^3$), ale także odpowiadać typowym warunkom pomiarowym stosowanym w układach ODT (rys.1, [A1]). Doktorant zdecydował się również na określenie wpływu rozpraszania światła w otoczeniu komórki proponując umieszczenie jej w układzie zbudowanym z losowo umieszczonych pręcików tworzącej porowatą strukturę. W ten sposób mógł analizować wpływ kontrastu Δn otoczenia na widmo hologramu (Rys. 1., [A3]) komórki, stosując ciecze immersyjne. Pozwoliło to również na ocenę wpływu rozpraszania na odwzorowanie hologramu wykonane dla długości fali 633nm i 835nm (rys. 2, [A3]).

2. Opracowanie metodyki projektowania i wytwarzania fantomu o zadanych parametrach geometrycznych i refrakcyjnych przy wykorzystaniu polimeryzacji dwufotonowej (TPP, Nanoscribe) pozwalającej na uzyskanie kontrastu Δn do wartości 0,03. Projekt ten uzyskał ochronę krajową ochroną patentową [P1], a obecnie jest w trakcie procesu rozszerzenia na EPO, USA i Japonię. Należy tu zwrócić uwagę na dwa aspekty, a mianowicie opanowanie procedury druku o zmiennej wartości współczynnika n ($\sim 1,51$ - $1,53$, rys.2, [A2]) poprzez różny stopień polimeryzacji oraz określenie spełnienia wymagań optycznych struktury wobec techniki 3D

ODT [K1]. W pracy tej dokonana została weryfikacja parametrów fantomu poprzez wytworzenie struktur pomocniczych o różnych parametrach geometrycznych i wartości n (rys.1 [K1], rys.3, [A1]), co również udowodniło potrzebę druku znaczników (rys. 2, [K1]).

3. Opracowanie metodyki pomiaru fantomu metodą 3D ODT, obejmujące konstrukcję układu do obrotu obiektu (3D) oraz dokonanie pomiaru oraz metrologicznej oceny rekonstrukcji obrazu. To lwią część pracy doktorskiej w której dla przygotowanych fantomów opracowano algorytmy przetwarzania i symulacje numeryczne dla zmiennych parametrów pomiarowych, zestawiając je z danymi eksperymentalnymi (rys.4, [A1], rys. 3-6, [A2]). Analiza została wykonana biorąc pod uwagę kluczowe parametry komórki biologicznej i rozdzielczość pomiaru m.in. wielkość, objętość, całkowitą suchą masę, wsp. zał. n elementów komórki, gradient n (tabela 1 i 2, [A2]). Niewątpliwą zaletą takiego podejścia było wyznaczenie dokładności tych parametrów dla wybranych układów pomiarowych ODT wykazując zgodność i możliwe błędy przedstawione na rys. 7 i 9 w pracy [A2] oraz wpływ dyspersji i temperatury.

4. Przeprowadzenie badań w różnych międzynarodowych zespołach badawczych w aspekcie wykorzystania opracowanej metodologii obejmującej koncepcję fantomu i metrologię 3D ODT w wielu aspektach takich jak: zastosowanie przestrajalnego źródła światła NIR [A6], walidacja układu ODT na bazie interferometru wspólnej drogi [A7], opracowania algorytmu rekonstrukcji obrazu dla sygnału z podwyższonym poziomem szumu [A8], określenie działania algorytmu w obszarach granicznych pola widzenia [A9] czy wpływu wielokrotnego rozpraszania [K5].

Jednoznacznie należy stwierdzić, że osiągnięcia pracy mają duże znaczenie naukowe i użyteczne, a Doktorant zweryfikował ich jakość na poziomie współpracy międzynarodowej. Napisał rozdział w artykule [A4] przeglądowym z wiodącymi w tym obszarze grupami badawczymi, proponując zestawienie metryk oceny rekonstrukcji metrologicznej [A5] oraz wskazał na konieczność porównywania wyników rekonstrukcji 3D, wykonanych na innych układach ODT [K2, K3].

Stwierdzam, że cel pracy został osiągnięty.

5. Uwagi wynikające z lektury rozprawy

Rozprawa doktorska mgr inż. Michała Ziemczonoka została zaplanowana i zrealizowana w sposób wzorcowy. Tematyka pracy odnosi się do aktualnego tematu badawczego i aplikacyjnego jakim jest obrazowanie 3D struktur biologicznych. Doktorant zrealizował pracę w oparciu o cykl artykułów powstałych w ramach projektów badawczych i szerokiej współpracy krajowej i zagranicznej, w tym też staże. W ten sposób jest przygotowany do prowadzenia badań naukowych.

Przedstawiona tematyka badawcza szeroka, ale zweryfikowana recenzyjnie w publikacjach, co pozwoliło rozwiązać wiele zagadnień dyskusyjnych pojawiających się w rodz. 2 „Przewodnik po publikacjach”. Stąd też na etapie recenzji nie podnoszę zagadnień do dyskusji.

6. Dorobek i doświadczenie naukowe

W opracowaniu Doktorant zawarł również informacje na temat swojej aktywności naukowej obejmującej ogólnie: 12 artykułów posiadających współczynnik wpływu IF, 8 artykułów konferencyjnych, jeden patent, 6 międzynarodowych konferencji. Prace realizował w ramach

8 projektów (np. BiOpTo, REVEAL, H2020) i sześciu wyjazdów zagranicznych, np. VUB w Belgii (sumarycznie 40 dni). Współpracował z wieloma grupami badawczymi czego częściowym efektem są przedstawione publikacje, reszta obejmuje jasno sprecyzowane plany na przyszłość.

Konkluzja

Osiągnięcia zaprezentowane w pracy doktorskiej mgr inż. Michała Ziemczonoka pozwalają mi jednoznacznie stwierdzić, że spełnia ona warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce – Dz.U.2020 poz. 85 z późn. zm.) i wnioskuję o jej dopuszczenie do publicznej obrony. Mając na uwadze osiągnięcia pracy, udokumentowane publikacjami i współpracą zagraniczną, oceniam ją jako wybitnie dobra i wnioskuję o wyróżnienie.

Kraków, 05.09.2023 r.

Dominik Dorosz