

Autoreferat

Igor Buzalewicz

Katedra Inżynierii Biomedycznej
Wydział Podstawowych Problemów Techniki
Politechnika Wrońska

30 maja 2023 r.

Spis treści

1	Dyplomy i stopnie naukowe	3
2	Przebieg zatrudnienia.....	4
3	Osiągnięcie naukowe	6
3.1	Tytuł osiągnięcia	7
3.2	Wprowadzenie	7
3.3	Wieloparametryczne fenotypowanie bakterii [H1–H5, H8].....	11
3.3.1	Holograficzne fenotypowanie kolonii i multiplikacja ich wzorców [H1,H2]	11
3.3.2	Dyfraktometryczne fenotypowanie kolonii bakterii [H4]	16
3.3.3	Multiplikacja wzorców i hybrydowe fenotypowanie bakterii [H3, H5, H8]	20
3.4	Wieloparametryczne fenotypowanie organelli, komórek i tkanek [H6, H7].....	30
3.4.1	Wieloparametryczne fenotypowanie tkanek [H6].....	31
3.4.2	Wieloparametryczne fenotypowanie komórek i struktur komórkowych [H7]	33
3.5	Wieloparametryczne fenotypowanie zmian zachodzących w komórkach [H9]	37
3.6	Podsumowanie.....	41
4	Aktywność naukowa realizowana w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej	44
5	Osiągnięcia dydaktyczne, organizacyjne, popularyzujące naukę.....	51
5.1	Aktywność w przygotowaniu nowych zajęć i materiałów dydaktycznych na kierunku Inżynieria Biomedyczna.....	51
5.1.1	Studia inżynierskie (I-stopnia).....	51
5.1.2	Studia magisterskie (II stopnia)	53
5.2	Praca na rzecz zaplecza laboratoryjnego i technicznego	53
5.3	Prowadzone zajęcia dydaktyczne.....	54
5.4	Opieka naukowa nad doktorantami/doktorantkami	57
5.5	Opieka naukowa nad studentami studiów inżynierskich i magisterskich na kierunku Inżynieria Biomedyczna -wypromowane prace na stopień.....	57
5.5.1	Studia inżynierskie (I stopnia)	57
5.5.2	Studia magisterskie (II stopnia)	59
5.6	Wspólne publikacje naukowe ze studentami/studentkami	60
5.7	Działalność organizacyjna	61
5.8	Popularyzacja nauki	63
6	Inne informacje dotyczące kariery zawodowej.....	64
6.1	Międzynarodowe i krajowe nagrody oraz stypendia za działalność naukową	64
6.2	Ukończone szkolenia.....	65
7	Literatura.....	66

1 Dyplomy i stopnie naukowe

Doktor Dyplom uzyskania stopnia naukowego doktora nauk technicznych z wyróżnieniem w dyscyplinie Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna nadany uchwałą Rady Naukowej Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęczza Polskiej Akademii Nauk w Warszawie w dniu 15 stycznia 2013 r.

Tytuł rozprawy doktorskiej: *Optyczne metody identyfikacji i charakteryzacji bakterii*.
Promotor: prof. n. tech. dr hab. n. fiz. inż. lek. Halina Podbielska.

Magister Dyplom ukończenia studiów II-stopnia na kierunku Fizyka Techniczna w specjalności Optometria na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej z wynikiem celującym. Uzyskanie tytułu magistra z wyróżnieniem w dniu 15 września 2009 r.

Tytuł pracy dyplomowej: *Skażenia biologiczne przyrządów oftalmicznych*.
Promotor: prof. n. tech. dr hab. n. fiz. inż. lek. Halina Podbielska.

Magister inżynier Dyplom ukończenia 5-letnich studiów jednolitych na kierunku Fizyka Techniczna w specjalności Inżynieria biomedyczna (specjalizacja: Optyka biomedyczna) na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej z wynikiem bardzo dobrym. Uzyskanie tytułu magistra inżyniera w dniu 12 lipca 2007 r.

Tytuł pracy dyplomowej: *Hologramy objętościowe jako elementy optyczne układów odwzorowujących*.

Promotor: prof. dr. hab. Eugeniusz Jagoszewski.

2 Przebieg zatrudnienia

✓ Politechnika Wrocławska

10.2014–obecnie *Adiunkt naukowo-dydaktyczny*, Katedra Inżynierii Biomedycznej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wrocławska.

10.2012–09.2014 *Asystent naukowo-dydaktyczny*, Katedra Inżynierii Biomedycznej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wrocławska.

01.2009–01.2010, 03.2010–06.2010, 10.2019–01.2011, 02.2011–06.2011 09.2011–09.2011 / (łącznie 24 miesiące) *Starszy referent inżynieryjno-techniczny*, Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej¹, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wrocławska w ramach projektu UE 7PR pt. *Electrically Modified Biomaterials' surfaces: From Atoms to Applications* (Nr NMP4-SL-2008-212533).

✓ Ośrodek Badawczo-Rozwojowy², Wojewódzki Szpital Specjalistyczny we Wrocławiu

11.2020–03.2022 / (17-miesiące) *Pracownik naukowy*, Stanowisko: Wykonawca-Badacz. **Zatrudnienie w Ośrodku Badawczo-Rozwojowym** (umowa o pracę nr SZp/FW/2020 z dn. 01.11.2020 r.) w projekcie badawczo-rozwojowym w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014–2020 Działanie 4.1 – Poddziałanie 4.1.1. Wspólne przedsięwzięcie z Województwem Dolnośląskim „Dolnośląska strefa technologii biomedycznych”, Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, Nr POIR.04.01.01-00-0016/19.

✓ Bioavlee S.A.

04.2019–08.2019 / (5 miesięcy) **zatrudnienie w firmie Bioavlee S.A. w ramach umowy zlecenia** dot. koordynacji merytorycznej zespołu B+R podczas prowadzonych testów technicznych i funkcjonalnych opracowanego prototypu urządzenia do identyfikacji bakterii (Avlee650TM), wsparcie zespołu badawczego w rozwoju urządzenia Avlee650TM oraz licznika kolonii bakterii Quantica 500/500+ (w szczególności torów optycznych).

04.2018–10.2018 / (7 miesięcy) **zatrudnienie w firmie Bioavlee S.A. w ramach umowy zlecenia** dot. koordynacji merytorycznej zespołu B+R podczas prowadzonych testów technicznych i funkcjonalnych opracowanego prototypu urządzenia do identyfikacji bakterii (Avlee650TM), wsparcie zespołu badawczego w rozwoju urządzenia Avlee650TM oraz licznika kolonii bakterii Quantica 500/500+ (w szczególności torów optycznych).

¹ obecnie Katedra Inżynierii Biomedycznej

² jest klasyfikowany przez Ministerstwo Edukacji i Nauki jako jednostka naukowa i obecnie posiada kategorię B+.

03.2017–03.2018 / (12-miesiący) *Ekspert ds. Inżynierii Biomedycznej i członek zespołu B+R. Zatrudnienie w firmie Bioavlee S.A. w projekcie badawczo-rozwojowym w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014–2020 Działanie 1.1 Projekty B+R przedsiębiorstw, Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, Tytuł: Opracowanie innowacyjnego urządzenia diagnostycznego do identyfikacji oraz oznaczania lekowrażliwości bakterii bazującego na zjawisku dyfrakcji laserowej, holografii oraz analizie cech morfologicznych kolonii bakteryjnych, Nr POIR.01.01.01-00-0536/16-00.*

01–08. 2016 / (8 miesięcy) **zatrudnienie w firmie Bioavlee S.A. w ramach umowy o dzieło** dot. m.in. optymalizacji toru optycznego, przygotowania założeń technicznych do systemu kalibracji toru optycznego, oceny termodynamicznej skuteczności funkcjonowania inkubatora pionowego.

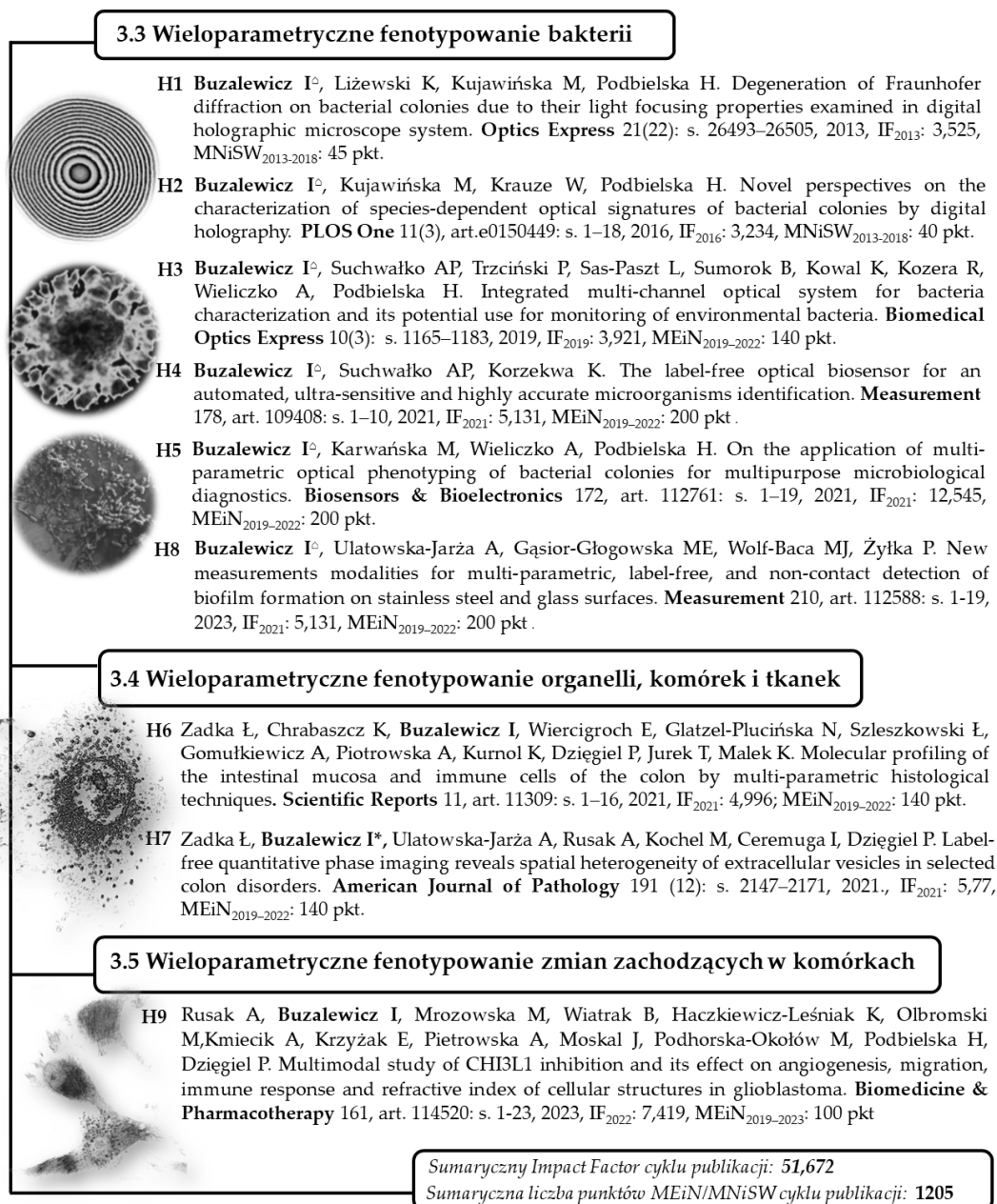
✓ **Synaptise S.A.**

07.2014–12.2015 / (18-miesiący) *Ekspert ds. optyki i członek zespołu B+R. Zatrudnienie w firmie Synaptise S.A w ramach umowy o pracę z dn. 01.04.2014 r. w projekcie badawczo-rozwojowym w ramach Programu Operacyjnego Inteligentna Gospodarka 2007–2013 Działanie 1.4 Wsparcie projektów celowych, Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, Tytuł: Innowacyjny system identyfikacji bakterii bazujący na zjawisku dyfrakcji laserowej, Nr POIG.01.04.00-02-182/13.*

3 Osiągnięcie naukowe

Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

Sekcja ta przedstawia cykl dziewięciu powiązanych tematycznie publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, zgodnie z art. 219 ust. 1 pkt. 2b ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2018 r. poz. 1668 ze zm.). Niniejszy autoreferat zawiera merytoryczne ujęcie mojego osiągnięcia naukowego, jak i w sposób precyzyjny określa mój wkład w powstanie cyklu dziewięciu prac naukowych obejmujących trzy obszary badawcze zgodnie ze schematem zilustrowanym na Rys. 1.



Rys. 1. Schematyczne przedstawienie cyklu dziewięciu prac stanowiących moje osiągnięcie naukowe.

W ramach cyklu składającego się z dziewięciu oryginalnych publikacji zaproponowałem nowe kierunki **badania nad wieloparametrycznym fenotypowaniem** różnych **obiektów biologicznych**:

- ✓ struktur przestrzennych formowanych przez bakterie (komórek, biofilmów, kolonii bakterii),
- ✓ tkanek, komórek eukariotycznych i organelli komórkowych,

oraz zachodzących w nich zmian (wpływ inhibitora białka CHI3L1(YKL-40) na organelle komórek glejaka) z **wykorzystaniem bezkontaktowych, nieniszczących, hybrydowych technik pomiarowych**, co doprowadziło do opracowania nowych rozwiązań technologicznych do celów diagnostycznych.

3.1 Tytuł osiągnięcia

Badania nad wieloparametrycznym fenotypowaniem obiektów biologicznych i zachodzących w nich zmian do celów diagnostycznych

3.2 Wprowadzenie

Wszystkie osobnicze cechy obiektów biologicznych uwarunkowane są przez informację genetyczną zawartą w komórkach. Ogólnie, *zespół cech genów determinujący właściwości dziedziczne (pojedynczych komórek, tkanek, organizmów) określany jest mianem genotypu* [1]. To właśnie genotyp w decydujący sposób wpływa na proces rozwoju organizmów oraz różnicuje ich cechy. Jednak, nawet w obrębie tego samego genotypu, możemy mieć do czynienia z dużym zróżnicowaniem cech dziedzicznych, w czym zasadniczą rolę odgrywają warunki środowiskowe. Z tego też powodu, w celu lepszego różnicowania obiektów biologicznych, wprowadzono pojęcie fenotypu, czyli zespołu cech organizmu charakteryzujących jego morfologię, właściwości fizjologiczne (np. metabolizm, rozmnażanie, cykl życiowy), właściwości biologiczne lub fizyko-chemiczne oraz wpływ środowiska. Oznacza to, że *fenotyp jest nierozdzielnie związany z genotypem oraz jego wzajemną interakcją ze środowiskiem zewnętrznym*. Definiuje to koncepcja plastyczności fenotypowej [2], czyli zdolności danego genotypu do wytworzenia więcej niż jednego fenotypu pod wpływem środowiska zewnętrznego. Tym samym, zarówno środowisko zewnętrzne może wpływać na rozwój danego organizmu i zespół jego cech dziedzicznych, jak również sam organizm jest w stanie dokonać zmian rozwojowych oraz modyfikować zespół swoich cech w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiskowe, co leży u podstaw ewolucji.

Oznacza to, iż kompleksowa charakteryzacja obiektów i procesów biologicznych, wymaga zastosowania wielopoziomowego fenotypowania różnego rodzaju cech mikro-/makroskopowych np.: morfologicznych [3]–[5], chemicznych [6]–[8], metabolicznych [9], [10], fizycznych [11]–[13] dzięki zastosowaniu różnych technik pomiarowych m.in.: optycznych, molekularnych, chemicznych, elektronicznych, mechanicznych lub ich integracji. Dlatego też wciąż istnieje konieczność opracowywania nowych technik umożliwiających bardziej złożone, dokładne

i skuteczne fenotypowanie obiektów oraz zachodzących w nich zmian w celu pozyskania ich wieloparametrycznych wzorców, które można wykorzystać w celach w diagnostycznych.

Przedstawione powyżej przesłanki i powody, zdecydowały o tym, iż zagadnienie fenotypowania od samego początku należy do moich głównych zainteresowań naukowych, szczególnie w zakresie opracowywania i zastosowania nowych technik fenotypowania optycznego.

W trakcie studiów doktoranckich rozpocząłem badania nad wykorzystaniem zjawiska dyfrakcji światła do charakteryzacji kolonii bakterii hodowanych na podłożach stałych. Zaproponowałem wykorzystanie układu optycznego, będącego przykładem korelatora optycznego, do klasyfikacji gatunku bakterii ([A11] w sekcji 2.2 w Wykazie osiągnięć). Na układ optyczny, jak również opracowaną metodę identyfikacji bakterii, został przyznany patent ([T9] w sekcji 2.3 w Wykazie osiągnięć) przez Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej (UPRP)³. Zaproponowałem również nową, automatyczną metodę określania liczby kolonii bakterii CFU (z ang. *Colony Forming Units*) na podstawie zarejestrowanych obrazów kolonii na szalce Petriego z wykorzystaniem przekształceń dyfrakcyjnych (tj. transformacji Fouriera i Mellina) ([A15] w sekcji 2.2 w Wykazie osiągnięć). Metoda została praktycznie zastosowana do oceny aktywności przeciwbakteryjnej nanomateriałów na bazie srebra. Również na tę metodę przyznany został patent krajowy ([T8] w sekcji 2.3 w Wykazie osiągnięć) przez UPRP⁴.

W dalszej pracy badawczej, po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, wyznaczyłem nowe kierunki badań dotyczących rozwoju technik wieloparametrycznego fenotypowania obiektów biologicznych (komórek bakterii, biofilmów bakterii, kolonii bakterii, komórek eukariotycznych i ich organelli) oraz zachodzących w nich zmian (fizjologicznych lub indukowanych). W ramach swoich prac badawczych, szczególną uwagę poświęciłem na rozwój i zastosowanie optycznych metod fenotypowania ze względu na bezkontaktowy i nieniszczący charakter pomiaru z wykorzystaniem światła. Ponadto wzajemna interakcja światła z różnego rodzaju obiektami prowadzi do jego transformacji tj. amplitudowo-fazowej modulacji bezpośrednio zdeterminowanej przez właściwości tego obiektu [14]. Modulacja ta umożliwia zakodowanie w wiązce świetlnej informacji na temat tego obiektu. W zależności od właściwości obiektu z jakim światło ma kontakt (np. jego morfologii, homogeniczności / heterogeniczności strukturalnej, dwójłomności, gęstości, składu chemicznego, współczynnika absorpcji / transmisji, współczynnika załamania światła, współczynnika rozpraszania), dochodzi do wieloparametrycznego

³ *Buzalewicz I, Podbielska H. Sposób badania kolonii bakterii hodowanych na podłożach stałych i układ optyczny do badania kolonii bakterii hodowanych na podłożach stałych, patent nr PL 218010 B1, opublikowany w dn. 30.09.2012 (zgłoszenie nr P.395007 opublikowane w dn. 25.05.2011).*

⁴ *Buzalewicz I, Podbielska H. Sposób pomiaru liczebności słabo przezroczystych lub nieprzezroczystych optycznie obiektów w optycznym układzie odwzorowującym, patent nr PL 219105 B1, opublikowany w dn. 31.03.201 (zgłoszenie nr P.395120 opublikowane w dn. 03.06.2011).*

zapisu informacji polegającego na zmianie np. długości fali, amplitudy / natężenia, stopnia polaryzacji lub kierunku rozchodzenia się wiązki świetlnej wskutek zjawisk i efektów optycznych takich jak absorpcja, transmisja, rozpraszanie elastyczne / nieelastyczne, luminescencja, interferencja, dyfrakcja i wiele innych. Oznacza to, iż w wyniku modulacji różnych parametrów / wielkości fizycznych charakteryzujących wiązkę świetlną, propagującą dalej w przestrzeni światło staje się nośnikiem informacji o obiekcie, a tym samym możliwe jest odtworzenie tej informacji poprzez zastosowanie odpowiednich technik optycznych. Koncepcja ta jest fundamentem tzw. zagadnienia / problemu odwrotnego [15], [16], polegającego na możliwości odtworzenia informacji o obiekcie dzięki wiedzy na temat modulacji światła jaką ten obiekt wywołał. Jednakże w odniesieniu do prowadzonych przeze mnie prac badawczych, należy to zagadnienie/problem redefiniować i uogólnić. Problem odwrotny opiera się na odpowiadającym mu problemie perspektywicznym, którego rozwiązanie reprezentuje zwykły ciąg zdarzeń przyczynowo–skutkowych. W przypadku zagadnień optycznych sprowadza się on do wzajemnego oddziaływania światła z obiektem, które prowadzi do różnych zjawisk optycznych. Przyczyną (źródłem) lub determinantą tych zjawisk jest sam obiekt, a dokładniej jego właściwości, z kolei skutkiem jest modulacja światła. Zatem w kontekście prowadzonych przeze mnie badań, *problem odwrotny polegał na wykorzystaniu różnego rodzaju wieloparametrycznych wzorców optycznych wywołanych transformacją światła na obiekcie do scharakteryzowania jego właściwości, czyli fenotypowania.*

W związku z powyższym, w cyklu moich dziewięciu prac stanowiącym osiągnięcie naukowe (**Rys. 1**) przedstawiłem odpowiedzi na następujące pytania naukowe:

- *Czy cyfrowa mikroskopia holograficzna pozwala na analizę morfometryczną kolonii bakterii? (sekcja 3.3.1.1; odpowiedź w publikacji [H1])*
- *Czy cyfrowa mikroskopia holograficzna umożliwi wyjaśnienie zachodzącej na koloniach modulacji fazowej światła i czy wpływa ona na widma dyfrakcyjne kolonii? (sekcja 3.3.1.1; odpowiedź w publikacji [H1])*
- *Czy cyfrowa mikroskopia holograficzna umożliwi multiplikację wzorców fenotypowych kolonii bakterii? (sekcja 3.3.1.2; odpowiedź w publikacji [H2])*
- *Czy nierównomierne warunki oświetlenia kolonii oraz ogniskowanie wiązki oświetlającej przez kolonie wpływają na zmianę cech klasyfikacyjnych monochromatycznych widm dyfrakcyjnych oraz proces klasyfikacji / skuteczność identyfikacji bakterii? (sekcja 3.3.2; odpowiedź w publikacji [H4])*
- *Czy monochromatyczne dwuwymiarowe rozkłady współczynnika transmisji kolonii bakterii mogą stanowić ich wzorce fenotypowe? (sekcja 3.3.3.1; odpowiedź w publikacji [H3])*
- *Czy zmiana sposobu ekstrakcji i selekcji cech klasyfikacyjnych widm dyfrakcyjnych użytych w modelach klasyfikacyjnych pozwala na skuteczną identyfikację bakterii na poziomie szczepów tego samego gatunku bakterii? (sekcja 3.3.3.1; odpowiedź w publikacji [H3])*

- Czy możliwa jest identyfikacja (na poziomie szczepu) bakterii glebowych pochodzących z próbek środowiskowych na podstawie wzorców fenotypowych w postaci monochromatycznych widm dyfrakcyjnych ich kolonii? (sekcja 3.3.3.1; odpowiedź w publikacji [H3])
- Czy wykorzystanie obrazowania multispektralnego i wyznaczanie multispektralnych rozkładów przestrzennych współczynnika transmisji kolonii pozwoli na wyodrębnienie ich nowych wzorców fenotypowych? (sekcja 3.3.3.2; odpowiedź w publikacji [H5])
- Czy multiplikacja (z wielokrotnienie) wzorców kolonii (multispektralnych widm dyfrakcyjnych i rozkładów współczynnika transmisji) poprawi /skuteczności identyfikacji bakterii? (sekcja 3.3.3.2; odpowiedź w publikacji [H5])
- Czy zastosowanie techniki skanującej sondy Kelvina, mikrospektroskopii w podczerwieni i cyfrowej tomografii holograficznej pozwoli na wyodrębnienie wzorców fenotypowych biofilmu bakteryjnego, jego detekcję (bezpośrednio na badanej powierzchni) oraz ocenę dynamiki jego rozwoju? (sekcja 3.3.3.3; odpowiedź w publikacji [H8])
- Czy mikrospektroskopia w podczerwieni i cyfrowa tomografia holograficzna umożliwi wyodrębnienie wzorców fenotypowych pozwalających na bezznacznikową, bezkontaktową ocenę żywotności komórek bakterii? (sekcja 3.3.3.3; odpowiedź w publikacji [H8])
- Czy technika cyfrowej tomografii holograficznej i zrekonstruowane trójwymiarowe (3D) rozkłady współczynnika załamania (RI) światła pozwolą na porównawczą analizę strukturalną preparatów tkankowych pobranych od żywego pacjenta i pobranych pośmiertnie? (sekcja 3.4.1; odpowiedź w publikacji [H6])
- Czy zarejestrowane dzięki technice cyfrowej tomografii holograficznej 3D rozkłady RI pozwolą na charakterystykę zmian zachodzących w strukturach tkankowych indukowanych przez procesy pośmiertne? (sekcja 3.4.1; odpowiedź w publikacji [H6])
- Czy zarejestrowane dzięki technice cyfrowej tomografii holograficznej 3D rozkłady RI pozwolą na wieloparametryczną charakterystykę pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz na wyodrębnienie ich różnych wzorców fenotypowych w zależności od sposobu ich izolacji, stopnia złośliwości oraz aktywności proliferacyjnej zmian nowotworowych? (sekcja 3.4.2; odpowiedź w publikacji [H7])
- Czy uzyskane wzorce w postaci 3D rozkładów RI pozwolą na wieloparametryczne fenotypowanie komórek prawidłowych i nowotworowych? (sekcja 3.4.2; odpowiedź w publikacji [H7])
- Czy cyfrowa tomografia holograficzna i 3D rozkłady RI pozwolą na wieloparametryczną charakterystykę zmian zachodzących na poziomie komórkowym wywołanych przez inhibitor białka w komórkach glejaka wielopostaciowego? (sekcja 3.5; odpowiedź w publikacji [H9])

W dalszych sekcjach przedstawiłem swój szczegółowy wkład w publikacje wchodzące w skład cyklu (syntetyczny opis wkładu został przedstawiony w sekcji 1.1 w Wykazie osiągnięć), zaproponowane rozwiązania oraz wyniki prowadzonych przeze mnie prac badawczych nad wieloparametrycznym fenotypowaniem różnych

obiektów biologicznych oraz zmian w nich zachodzących. Na końcu każdej podsekcji znajduje się syntetyczne podsumowanie najważniejszych wyników i osiągnięć.

3.3 Wieloparametryczne fenotypowanie bakterii [H1–H5, H8]

W tym podrozdziale opisane zostaną zaproponowane przez mnie nowe metody fenotypowania bakterii w celu ich identyfikacji, charakteryzacji lub też detekcji. Opracowane przez mnie rozwiązania skoncentrowane były na wyodrębnieniu nowych wzorców fenotypowych bakterii, jak również ich multiplikacji poprzez wykorzystanie różnych technik obrazowo-pomiarowych. W odróżnieniu do powszechnie stosowanych technik różnicowania / detekcji bakterii m.in.: biochemicznych (np. barwienia [17], testów metabolicznych [18]), molekularnych (np. PCR⁵ [19], ELISA⁶ [20], aptamery [21]), spektroskopii mas typu MALDI-TOF⁷ [22], znakowania fluorescencyjnego [23], opracowane przez mnie metody są bezkontaktowe, nieniszczące oraz są bezznacznikowe, czyli nie wymagają konieczności stosowania dodatkowych barwników lub znaczników immunologicznych, immunoenzymatycznych lub fluorescencyjnych.

3.3.1 Holograficzne fenotypowanie kolonii i multiplikacja ich wzorców [H1,H2]

Holografia jest unikatową techniką, która pozwala teoretycznie na uzyskanie „idealnej” trójwymiarowej (3D) kopii obrazu obiektu. W wyniku interferencji wiązki przedmiotowej i odniesienia, rejestrowany jest hologram zawierający kompletną informację o rozkładzie zespolonego pola optycznego. Następnie jest on rekonstruowany za pomocą wiązki świetlnej (wiązki odniesienia lub jej sprzężonej wersji) w celu uzyskania kopii obrazu przedmiotu. Dzieje się tak, ponieważ holografia pozwala na rejestrację i rekonstrukcję kompletnego, zespolonego pola optycznego transformowanego na obiekcie dostarczając w ten sposób pełnej 3D informacji o nim, co umożliwia charakterystykę (w czasie i przestrzeni) zmian, jakim ten obiekt podlega. Postęp w optoelektronice i pojawienie się detektorów macierzowych doprowadził do digitalizacji holografii [24] oraz rozwoju holografii cyfrowej [25], [26]. W tym przypadku proces rekonstrukcji realizowany jest numerycznie. Dzięki zastosowaniu numerycznego przeogniskowania [27], możliwa jest rekonstrukcja z submikronową rozdzielczością, z pojedynczego hologramu cyfrowego, zarówno zespolonego pola optycznego transformowanego na przedmiocie, jak również kopii obrazów przedmiotu w różnych płaszczyznach. Rekonstrukcja pola optycznego w przestrzeni zajmowanej przez obiekt pozwala na uzyskanie jego rozkładów amplitudowych, jak i fazowych. Pierwszy z nich odpowiada klasycznemu amplitudowemu (natężeniowemu) obrazowi przedmiotu uzyskanemu dzięki np. optycznej mikroskopii transmisyjnej. Z kolei drugi rozkład odpowiada ilościowemu obrazowi fazowemu, który nie ma swojego odpowiednika w klasycznych metodach

⁵ PCR (z ang. *Polymerase Chain Reaction*)

⁶ ELISA (z ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

⁷ MALDI-TOF (z ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization - Time Of Flight*)

mikroskopii fazowej, umożliwiających rejestrację jedynie jakościowych obrazów fazowych. W procesie fenotypowania badanego obiektu możliwe jest zatem wykorzystanie zarówno kopii 3D jego obrazu, jak również dodatkowych wzorców: amplitudowych i fazowych rozkładów pola optycznego transformowanego na obiekcie, rekonstruowanych w dowolnej płaszczyźnie.

Powyższe przesłanki skłoniły mnie do podjęcia prac badawczych nad możliwością wykorzystania techniki cyfrowej mikroskopii holograficznej DHM (z ang. *Digital Holographic Microscopy*) do charakteryzowania kolonii bakterii, które nie były dotąd badane tą techniką. W tym celu zainicjowałem współpracę z zespołem *prof. dr hab. inż. Małgorzaty Kujawińskiej* z Zakładu Inżynierii Fotonicznej Instytutu Mikromechaniki i Fotoniki na Wydziale Mechatroniki Politechniki Warszawskiej, gdzie w ramach stażów naukowych prowadziłem badania.

3.3.1.1 Holograficzna charakterystyka morfometryczna kolonii i ich właściwości ogniskujących światło [H1]

W pierwszej kolejności zaplanowałem przeprowadzenie eksperymentu opisanego w [H1], który miał na celu zbadanie hipotezy o możliwości przeprowadzenia za pomocą DHM analizy morfometrycznej kolonii bakterii oraz wpływu jej topografii na modulację fazową wiązki oświetlającej, która jest współodpowiedzialna za specyficzny rozkład przestrzenny generowanych przez kolonię widm dyfrakcyjnych. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, była to pierwszych próba wykorzystania dwuwiązkowej techniki DHM do fenotypowania kolonii bakterii.

Badania przeprowadziłem na koloniach bakterii *Escherichia coli* (PCM⁸ 0119), które przygotowałem w laboratorium mikrobiologicznym Wydziału Inżynierii Środowiska Politechniki Warszawskiej. Czasowo-rozdzielcze pomiary kolonii zrealizowałem w Zakładzie Inżynierii Fotonicznej Politechniki Warszawskiej na układzie DHM opierającym się na konfiguracji interferometru Macha-Zehndera, który był dotąd stosowany jedynie do charakteryzacji mikroobektów metrologicznych [28], [29]. Następnie w celu określenia topografii kolonii, z zarejestrowanych hologramów cyfrowych zrekonstruowane zostały ciągłe rozkłady fazy pola optycznego w obrębie kolonii przy zastosowaniu algorytmu czasowego przesunięcia fazy TPS (z ang. *Temporal Phase Shifting*) [30]. Zakładając, że średni współczynnik załamania światła RI (z ang. *Refractive Index*) dla kolonii wynosi 1,35 [31], uzyskany rozkład fazy został przekształcony w mapę topograficzną kolonii dzięki zastosowaniu przybliżenia lokalnego promienia LRA (z ang. *Local Ray Approximation*) [29]. Następnie, przeprowadzono numeryczną rekonstrukcję 3D rozkładu przestrzennego zespolonego pola optycznego (reprezentującego wiązkę, która uległa transformacji na badanym obiekcie) dzięki zastosowaniu algorytmu opartego na przybliżeniu dyfrakcyjnym Rayleigha-Sommerfelda [14]. W celu weryfikacji wyników profilometrycznych wykonanych za pomocą techniki DHM, przeprowadziłem

⁸ Polska Kolekcja Mikroorganizmów PCM (z ang. *Polish Collection of Microorganisms*)

dodatkowe pomiary profilu i chropowatości powierzchni kolonii za pomocą skaningowego mikroskopu konfokalnego (LEXT 3D Measuring Laser Microscope, Olympus).

Uzyskane przeze mnie wyniki potwierdziły, że DHM umożliwia czasowo-rozdzielczą charakteryzację morfometryczną kolonii poprzez określenie ich średnicy, promienia krzywizny, grubości centralnej, które zależą od stadium jej rozwoju. Pomiary wykonane przeze mnie za pomocą skanującego mikroskopu konfokalnego sugerowały, że kolonie *E. coli* mają wypukły kształt, który może być przybliżony powierzchnią sferyczną. Jednakże ilościowe wyniki uzyskane techniką DHM dowiodły, że powierzchnie te wykazują bardziej asferyczne właściwości.

Ponadto, zrekonstruowany rozkład zespolonego pola optycznego, który był następnie numerycznie propagowany do kolejnych płaszczyzn prostopadłych do osi optycznej, wykazał, że w przestrzeni za kolonią dochodzi do ogniskowania wiązki świetlnej. Na podstawie 3D analizy tych rozkładów oraz zastosowanych algorytmów numerycznych możliwe było określenie odległości ogniskowej kolonii, co po raz pierwszy zrealizowano eksperymentalnie. Z uwagi na fakt, że różne gatunki bakterii formują kolonie o różnych profilach oraz strukturze wewnętrznej, zdecydowano się na przeprowadzenie dodatkowych symulacji numerycznych, które wykazały, że zmiana profilu i RI kolonii bakterii wpływa na zmianę ich odległości ogniskowej. Oznacza to, iż odległość ogniskowa może również być traktowana jako dodatkowa cecha różnicująca kolonie bakterii. Wyniki czasowo-rozdzielczych pomiarów kolonii wykazały, że w ciągu 150 minut ognisko przesuwają się o 39 μm . Świadczy to o tym, iż kolonie wykazują zależne czasowo właściwości ogniskujące światło. Topografia powierzchni kolonii oraz jej średni RI powodują modulację fazową wiązki oświetlającej, która jest analogiczna jak w przypadku soczewek optycznych. Oznacza to, iż kolonie można traktować za asferyczne, biologiczne soczewki skupiające, które w odróżnieniu do soczewek optycznych są jedynie częściowo transparentne. Ponadto, przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że kolonie *E. coli* wykazują chropowatość powierzchni, która będzie prowadzić do częściowego rozpraszania wiązki i zwiększenia jej rozmiarów poprzecznych. W związku z powyższym, kolonie bakterii można traktować jako złożenie asferycznej soczewki, filtra amplitudowego oraz dyfuzora optycznego, co nie było dotąd rozpatrywane [31], [32].

Najważniejszym wynikiem tego eksperymentu (opisanym w [H1]), a zarazem nową informacją dotyczącą fenotypowania kolonii, jest potwierdzenie tezy dotyczącej możliwości zastosowania DHM do analizy morfometrycznej kolonii i ich właściwości ogniskujących, które można wykorzystać do różnicowania kolonii, a tym samym do celów diagnostycznych. Udowodniono, iż DHM umożliwia rekonstrukcję 3D rozkładów zespolonego pola optycznego stanowiących dodatkowe optyczne wzorce fenotypowe kolonii. Istotnym wynikiem było eksperymentalnie potwierdzenie po raz pierwszy ogniskowania światła przez kolonie. Tym samym, wpływa to na wymagania dotyczące odpowiednich warunków pomiarowych we wszelkiego rodzaju biosensorach optycznych opierających się na rejestracji rozkładu przestrzennego

natężenia światła ugiętego (jak w metodzie wcześniej zaproponowanej przez mnie [A9, A11, A14] w sekcji 2.2 w Wykazie osiągnięć) lub rozproszonego (z ang. *forward scattering patterns*) [33]–[36], które były dotąd rejestrowane w stałej, arbitralnie ustalonej odległości od kolonii. Jednak, w przypadku kolonii różnych gatunków / szczepów bakterii, o różnej topografii powierzchni, zależne czasowo właściwości ogniskujące światło będą powodować zmianę rozkładu tych wzorców wraz ze zwiększającą się odległością od kolonii. Oznacza to, iż w zależności od tej odległości, rejestrowane wzorce optyczne mogą wykazywać różny potencjał predykcyjny. Uzyskane wyniki oraz opracowana metoda może przyczynić się do optymalizacji opracowanych już technik diagnostyki mikrobiologicznej, lub rozwoju nowych rozwiązań.

3.3.1.2 Holograficzna multiplikacja wzorców fenotypowych kolonii bakterii [H2]

W pracy [H1] wykazałem, że możliwa jest rejestracja hologramów cyfrowych, które zawierają pełną 3D informację amplitudowo-fazową nie tylko dotyczącą samej kolonii, ale także rozkładów amplitudy i fazy zespolonego pola optycznego transformowanego (ugiętego, rozproszonego) na nich. Tym samym, holograficzny zapis informacji może prowadzić do zwielokrotnienia / multiplikacji liczby potencjalnych wzorców kolonii zrekonstruowanych z pojedynczego hologramu cyfrowego, co z kolei może przyczynić się do zwiększenia skuteczności ich identyfikacji. W celu weryfikacji tej hipotezy, zaproponowałem kolejny eksperyment z wykorzystaniem techniki DHM, którego wyniki zostały opisane w [H2].

Badania przeprowadziłem na koloniach dwóch gatunków bakterii: Gram-ujemnych *Escherichia coli* (PCM 0119) oraz Gram-dodatnich *Staphylococcus intermedius* (PCM 2405), które przygotowałem w laboratorium mikrobiologicznym Wydziału Inżynierii Środowiska Politechniki Warszawskiej. Pomiar przeprowadziłem w Zakładzie Inżynierii Fotonicznej Politechniki Warszawskiej na bezzsoczewkowym, osiowym, cyfrowym, mikroskopie holograficznym z punktowym źródłem światła PSDIHM (z ang. *Point-Source Digital In-Line Holographic Microscopy*), który ma znacznie prostszą konfigurację niż układ DHM zastosowany w [H1]. W celu zwiększenia rozdzielczości zapisu holograficznego wykorzystałem laser o długości fali 405 nm. Numeryczną rekonstrukcję hologramów cyfrowych przeprowadziłem z wykorzystaniem dyfrakcyjnego przekształcenia Helmholtza-Kirchhoffa [37]. Pozwoliło mi to na uzyskanie rozkładów amplitudy i fazy pola optycznego wewnątrz przestrzeni zajmowanej przez kolonie, jak również rozkładów amplitudy i fazy pola optycznego transformowanego przez kolonie w przestrzeni pomiędzy nią a detektorem. Dodatkowo, w celu charakterystyki właściwości absorpcyjnych i transmisyjnych kolonii oraz podłoża hodowlanego przeprowadziłem pomiary spektrofotometryczne oraz mikroskopowe. W celu potwierdzenia możliwości różnicowania bakterii w oparciu uzyskane wzorce holograficzne przeprowadziłem analizę składowych głównych PCA (z ang. *Principal Component Analysis*) w środowisku MATLAB (MathWorks).

Wyniki zrealizowanych przeze mnie pomiarów potwierdziły, iż PSDIHM pozwala na rejestrację hologramów cyfrowych kolonii. Jednakże kontrast uzyskanych hologramów jest ściśle uzależniony od właściwości transmisyjnych kolonii, ich morfologii oraz sposobu przygotowania próbek mikrobiologicznych. W przypadku PSDIHM, hologram cyfrowy powstaje w wyniku interferencji wiązki ugiętej na przedmiocie oraz wiązki nieugiętej, przechodzącej (transmitowanej) bezpośrednio przez nią. Oznacza to, iż właściwości absorpcyjne kolonii oraz odległość jaką pokonuje w niej światło, mogą wpływać na natężenie wiązki odniesienia, a tym samym na kontrast hologramów. Przeprowadzone przeze mnie badania spektroskopowe wykazały, że w przypadku zastosowanej długości fali oświetlenia kolonie *E. coli* wykazują stosunkowo słabszą absorpcję, niż kolonie *S. intermedius*, co prowadzi do różnic w kontraście zarejestrowanych hologramów cyfrowych dla obu gatunków. Oprócz właściwości absorpcyjnych komórek bakterii i materiału pozakomórkowego, może to być również związane z profilem kolonii. Co więcej, również preparatyka przygotowania próbek mikrobiologicznych (np. struktura podłoża hodowlanego, rysy po głaszczce) przyczyniła się do uzyskania niejednorodnego tła hologramów, co uniemożliwiało bezpośrednią jego subtrakcję przed rekonstrukcją numeryczną hologramu. Wpływało to na jakość zrekonstruowanych wzorców kolonii obu badanych gatunków. Efekty te można zminimalizować poprzez skrócenie czasu inkubacji i pomiary na koloniach we wcześniejszych stadiach rozwoju, jak również poprzez opracowanie dedykowanej metodologii przygotowania próbek. Jednakże, nawet dla czasu inkubacji zastosowanego w tym badaniu, możliwe było zarejestrowanie hologramów o wymaganej jakości do ich rekonstrukcji.

Uzyskane przeze mnie wyniki potwierdziły możliwość rekonstrukcji obrazów amplitudowych i fazowych kolonii. Badania porównawcze wykonane za pomocą mikroskopii transmisyjnej, wykazały, że zrekonstruowane holograficznie obrazy amplitudowe kolonii wykazują unikalne cechy silnie związane ze strukturą wewnętrzną kolonii oraz 2D rozkładem jej współczynnika transmisji. Uzyskane obrazy fazowe kolonii, także wykazały odmienne cechy charakterystyczne dla każdego gatunku, co związane jest z procesem formowania się kolonii i migracji komórek. Przejawia się to odmienną geometrią przestrzenną kolonii oraz różnicami lokalnego rozkładu RI, które mają wpływ na ich właściwości fazowe kolonii.

Ponadto wyniki pokazują, iż w przypadku obu gatunków możliwa jest analiza propagacji zespolonych pól optycznych transformowanych (ugiętych/rozproszonych) przez kolonie w dowolnie wybranych płaszczyznach w przestrzeni obserwacji za nimi. Zrekonstruowane rozkłady amplitudy i fazy tych pól optycznych wykazują unikalne cechy związane z morfologicznymi i optycznymi właściwościami kolonii badanych gatunków. Wyniki analizy porównawczej rozkładów amplitudy pola optycznego oraz widm dyfrakcyjnych tych samych kolonii (zarejestrowanych w układzie dyfraktometrycznym do ich identyfikacji) potwierdziły ich podobieństwo oraz obecność identycznych cech dla danego gatunku. Tym samym również te zrekonstruowane rozkłady mogą posłużyć do różnicowania bakterii, analogicznie jak

widma dyfrakcyjne. Potencjał różnicowania kolonii w oparciu o uzyskane wzorce holograficzne tj. hologramy cyfrowe, zrekonstruowane obrazy amplitudowe / fazowe kolonii oraz rozkłady amplitudy pola optycznego ugiętego na nich został potwierdzony za pomocą PCA. Wykazano, że analizowane wzorce fenotypowe uzyskane za pomocą holografii cyfrowej wykazują unikalne cechy zależne od gatunku.

Najważniejszym wynikiem tego eksperymentu (opisanym w [H2]) było potwierdzenie po raz pierwszy możliwości wykorzystania PSDIHM, lub ogólnie DHM, do multiplikacji wzorców fenotypowych kolonii. W przypadku wcześniej opracowanej przeze mnie metody identyfikacji bakterii w oparciu o widma dyfrakcyjne ([A9, A11, A14] w sekcji 2.2 w Wykazie osiągnięć) oraz metod alternatywnych [35], [36], [38], możliwe jest zarejestrowanie jednego wzorca kolonii w czasie jednokrotnego pomiaru. W przypadku techniki PSDIHM (lub ogólnie DHM) z pojedynczego hologramu można uzyskać $3+3 \times n$ wzorców holograficznych, gdzie n to liczba płaszczyzn, w których są rekonstruowane amplitudowe / natężeniowe lub fazowe rozkłady pola optycznego transformowanego na kolonii. Jest to główna przewaga DHM nad wspomnianymi powyżej metodami identyfikacji. **Tym samym, DHM może przyczynić się do rozwoju diagnostyki mikrobiologicznej. Nowatorstwo tej metody oraz opracowanego przeze mnie układu pomiarowego zostało potwierdzone przyznaniem patentu przez Urząd Patentowy RP⁹ ([T6] w sekcji 2.3 w Wykazie osiągnięć).**

W przypadku wykorzystanej tu konfiguracji układu DHM tj. PSDIHM niemożliwa była zadowalająca rekonstrukcja profilu kolonii. Wynikało to z częściowej absorpcji przez kolonię wykorzystywanej tu wiązki odniesienia (wiązki nieugiętej, transmitowanej przez kolonię), czego udało się uniknąć w układzie opisanym w [H1], gdzie wiązka odniesienia biegła w osobnym ramieniu interferometru. W konsekwencji wiązka ta nie miała w pełni jednorodnego rozkładu amplitudy, co skutkowało nierównomiernym natężeniem tła hologramów i ograniczało możliwość rekonstrukcji profilu kolonii. Oznacza to, iż konfiguracja układu DHM z osobną wiązką odniesienia zastosowana w [H1] może być również użyta do multipleksacji wzorców kolonii z jednoczesną możliwością rekonstrukcji ich profilu. Wyniki prowadzonych przeze mnie eksperymentów potwierdzają zatem, iż **DHM umożliwia wieloparametryczne fenotypowanie kolonii bakterii i multiplikację wzorców w jednym układzie pomiarowym, bez konieczności integracji lub wykorzystania dodatkowych układów profilometrycznych np. mikroskopii konfokalnej [39] lub laserowego konfokalnego miernika przemieszczeń [34].**

3.3.2 Dyfraktometryczne fenotypowanie kolonii bakterii [H4]

Bezpośrednią konsekwencją wyników uzyskanych w ramach eksperymentu opisanego w publikacji [H1] było potwierdzenie wpływu ogniskowania światła przez kolonie na zmianę rozmiarów poprzecznych pola optycznego transformowanego

⁹ Buzalewicz I, Podbielska H. Sposób charakteryzacji i identyfikacji kolonii bakterii oraz osiowy układ holografii cyfrowej do charakteryzacji i identyfikacji kolonii bakterii. Patent Polska nr PL 232525, opublikowany w dn. 28.06.2019 (nr zgłoszenia P.410681 opublikowanego w dn. 30.12.2014)

przez nie wraz ze zwiększającą się odległością od nich. Tym samym, zaproponowana wcześniej przeze mnie metoda identyfikacji bakterii ([A11], [T8] w Wykazie osiągnięć), jak również metody alternatywne [33], [35], [36], [40], w których rejestrowane są wzorce optyczne (dyfrakcyjne / rozproszeniowe) kolonii dla pojedynczego, arbitralnie ustalonego położenia płaszczyzny detekcji, mogą być obarczone zasadniczą wadą tzn. nie muszą być one najlepszymi wzorcami fenotypowymi, wykazującymi największą liczbę najlepszych cech klasyfikacyjnych. Wpływ położenia płaszczyzny rejestracji nie był dotąd rozważany, dlatego zdecydowałem się na zainicjowanie prac nad opracowaniem nowej konfiguracji układu dyfraktometrycznego oraz optymalizacją warunków pomiaru na reprezentatywnej próbie badawczej. W związku z tym, zainicjowałem współpracę z podmiotami gospodarczymi (sekcja 3.2 w Wykazie osiągnięć), którą kontynuowałem w ramach projektów finansowanych m.in. przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju - NCBiR (sekcja 3.2.2 i 3.2.3 w Wykazie osiągnięć) realizowanych przez firmy Synaptise S.A. oraz Bioavlee S.A., gdzie **byłem zatrudniony w ramach projektów B+R**. W celu przeprowadzenia badań na reprezentatywnej liczbie mikroorganizmów zainicjowałem współpracę z *dr Kamilą Korzekwą* z Zakładu Mikrobiologii¹⁰ Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego. Opisane poniżej prace wykonywałem lub koordynowałem na różnych etapach ich realizacji, jako pracownik Politechniki Wrocławskiej (zewnętrzne zlecenie B+R dla uczelni – **poz. 1** w sekcji 2.12 w Wykazie osiągnięć) oraz jako CTO¹¹ lub członek zespołu B+R (**pracownik firmy Synaptise S.A., a potem Bioavlee S.A. – poz. 3 i 5** w sekcji 2.6 w Wykazie osiągnięć oraz sekcja 3.2.2 i 3.2.3 w Wykazie osiągnięć) m.in. w ramach projektów NCBiR (**poz. 3 i 4** w sekcji 2.6 w Wykazie osiągnięć).

W ramach prac badawczych, opisanych w [H4], zaproponowałem nową konfigurację dwukanałowego układu dyfraktometrycznego do identyfikacji bakterii, która zapewnia automatyzację rejestracji widm dyfrakcyjnych oraz uzyskanie jednolitych warunków oświetlenia kolonii. Badania przeprowadzono na 12 gatunkach (88 szczepach) mikroorganizmów, nie tylko bakterii, ale również grzybów, z których 50% badanych szczepów stanowiły próbki kliniczne.

W dotychczasowych rozwiązaniach, kolonię oświetlano wiązką generowaną bezpośrednio przez diodę laserową [41], lub stosowano soczewki oraz obiektywy ogniskujące [35], [36], oraz [A11], [T8] w Wykazie osiągnięć. Jednakże nie analizowano wpływu niedopasowania średnicy kolonii i wiązki oświetlającej oraz gaussowskiego rozkładu natężenia tej wiązki na widma dyfrakcyjne/ rozproszeniowe kolonii. Są to istotne zagadnienia, gdyż mogą one eliminować (częściowo lub całkowicie) wkład dyfrakcji światła na krawędziach kolonii w rejestrowane wzorce. Może to prowadzić do ich deformacji i bezpowrotnej utraty części informacji zawartych we wzorcach dyfrakcyjnych. Wzrost natężenia obrazów wzorców w centrum i spadek na obrzeżach,

¹⁰ Wcześniej Instytut Genetyki i Mikrobiologii

¹¹ CTO (z ang. Chief Technology Officer)

może prowadzić do eliminacji istotnych cech klasyfikacyjnych, np. związanych z kształtem kolonii. W związku z tym, zbadalem wpływ niejednorodności rozkładu natężenia wiązki oświetlającej oraz stosunku jej średnicy do średnicy kolonii na cechy klasyfikacyjne związane z rozkładem przestrzennym wzorców optycznych. W tym celu opracowałem dedykowane algorytmy numeryczne do analizy wzorców. Uzyskane przeze mnie wyniki wykazały, iż zmiany natężenia w całym przekroju wiązki równe lub mniejsze niż 10–20% maksymalnej wartości natężenia wiązki (wzdłuż osi optycznej) nie powodują statystycznie istotnych zmian cech (ANOVA, F-value < F-critical = 4,0410). Ponadto wykazałem również brak statystycznie istotnych zmian (ANOVA, F-value < F-critical = 2,334) w natężeniu widm dyfrakcyjnych związanych z niedopasowaniem średnicy wiązki oraz kolonii, gdy ich stosunek mieścił się w zakresie od 0,9 do 1,1.

W związku z tym, w nowym układzie zastosowano nowy system oświetlający kolonię bakterii. W celu wyeliminowania wpływu nierównomiernego oświetlenia kolonii, zastosowano poszerzacz w konfiguracji lunety Galileusza, który umożliwił uzyskanie wymaganych warunków oświetlenia kolonii (zmiana natężenia w zakresie 10–20%). Dodatkowo, w celu dopasowania średnicy wiązki do średnicy kolonii, próbkę umieszczono w statywie zintegrowanym ze stolikiem przesuwu XYZ. Stosując zbieżną wiązkę oświetlającą oraz osiowy przesuw próbki możliwe jest automatyczne dopasowanie średnicy wiązki i kolonii. Układ został również wyposażony w dodatkowy kanał odwzorowujący, który umożliwia rejestrację obrazu całej szalki Petriego z koloniami oraz automatyczne określenie położenia środka kolonii za pomocą dedykowanych algorytmów analizy obrazu, umożliwiając automatyzację procesu pomiaru.

Następnie przeprowadzono eksperyment mający na celu uwzględnienie właściwości ogniskujących kolonii. Zbadano wpływ położenia płaszczyzny rejestracji wzorców na wyniki klasyfikacji. Przeanalizowano wzorce kolonii 12 gatunków mikroorganizmów zarejestrowane w 11 różnych odległościach od kolonii (1,8–2,8 cm). Liczba wzorców podlegających analizie wynosiła 48 400. Uzyskane wyniki potwierdziły wcześniejsze przypuszczenia [H1], iż właściwości ogniskujące kolonii mogą wpływać na czułość, specyficzność oraz skuteczność modelu klasyfikującego opierającego się na liczbowych cechach klasyfikacyjnych tych wzorców. Najlepsze wyniki uzyskano dla odległości równej 2,3 cm, gdyż wzorce zarejestrowane w tej odległości wykazywały największe możliwości predykcyjne dla wszystkich badanych gatunków. Uzyskane wyniki zależą od konfiguracji układu oświetlającego, rodzaju wiązki oświetlającej (skolimowanej, rozbieżnej, zbieżnej) oraz użytych obiektywów. Jednakże przeprowadzenie tego rodzaju badań, we wszystkich alternatywnych konfiguracjach, jest kluczowe w celu ekstrakcji wzorców o największym potencjale predykcyjnym.

W przypadku próbek klinicznych (np. medycznych, weterynaryjnych) charakteryzujących się dużą różnorodnością patogenów, jak również obecnością naturalnej flory bakteryjnej, mogą wystąpić kolonie mikroorganizmów, które nie

zostały wcześniej uwzględnione w referencyjnej bazie wzorców. W związku z tym, zdecydowano się na modyfikację dotychczas stosowanego algorytmu klasyfikacji [H3] poprzez wprowadzenie dwustopniowego progu adaptacyjnego, który pozwala stwierdzić, czy dana kolonia jest kolonią nieznanego gatunku (w odniesieniu do zastosowanej, referencyjnej bazy wzorców optycznych). W literaturze dotyczącej tej tematyki, nie zaproponowano dotąd podobnego rozwiązania. Eksperyment ten przeprowadzono na koloniach 12 gatunków (88 szczepów) mikroorganizmów z wykorzystaniem 100 000 wzorców dla odległości rejestracji równej 2,3 cm. Klasyfikacja została przeprowadzona w oparciu o algorytm xgboost, który sam dokonuje rankingowania i selekcji cech liczbowych, bezpośrednio wyodrębnionych z wzorców. Sektorowa ekstrakcja cech z wzorców uwzględnia ich rozkład przestrzenny, co odróżnia to podejście od innych traktujących wzorce jako całość [33], [39]. Wyniki porównawcze uzyskane dzięki walidacji krzyżowej CV (z ang. *Cross-Validation*), pomiędzy pierwotnym i zmodyfikowanym algorytmem klasyfikacji, wykazały, że możliwa jest identyfikacja mikroorganizmów na podstawie widm dyfrakcyjnych ze skutecznością od 97% do 100%, w zależności od zastosowanego algorytmu. Przeprowadzona przeze mnie analiza miary siły efektu (z ang. *Cohen's h statistics*) wykazała poprawę wyników klasyfikacji dla zmodyfikowanego algorytmu klasyfikacyjnego. Do celów ślepej walidacji zaproponowanej metody kolonie mikroorganizmów, użyte do rejestracji wzorców zestawu testowego, zostały również zidentyfikowane przy użyciu aparatu VITEK 2 Compact (Biomerieux).

Najważniejszymi wynikami eksperymentów opisanych w [H4] było opracowanie nowego układu dyfraktometrycznego zapewniającego skuteczną identyfikację bakterii, który umożliwia uzyskanie optymalnych warunków pomiaru widm dyfrakcyjnych. Nowatorstwo tego rozwiązania (opracowanego układu i metody identyfikacji bakterii) zostały potwierdzone przez przyznany patent krajowy¹² ([T4] w sekcji 2.3 w Wykazie osiągnięć) oraz patenty zagraniczne w Wielkiej Brytanii¹³, Korei Południowej¹⁴ oraz Brazylii¹⁵ ([T5] w sekcji 2.3 w Wykazie osiągnięć), których jestem współautorem. Ponadto, potwierdziłem tezę, iż nierównomierne oświetlenie kolonii, położenie płaszczyzny rejestracji wzorców i właściwości ogniskujące kolonii wpływają na cechy klasyfikacyjne wzorców oraz na sam proces klasyfikacji w oparciu o nie. Pozwoliło to na zaproponowanie procedur standaryzacji warunków pomiarowych, które mogą zostać wykorzystane również

¹² Andrzejewski D, Pawełek Ł, **Buzalewicz I**, Gnojnicki R. Sposób badania mikroorganizmów hodowanych na podłożach stałych i układ pomiarowy do badania mikroorganizmów hodowanych na podłożach stałych. **Patent Polska** nr PL 225872 opublikowany w dn. 01.05.2017 (zgłoszenie nr 411946 opublikowane w dn. 10.04.2015)

¹³ Andrzejewski D, **Buzalewicz I**, Bednarek K, Markiewicz N, Pawełek Ł. Method for examination of microorganisms on solid bases and the measuring system for examination of microorganisms grown on solid bases. **Patent Wielka Brytania** nr GB 2540108 opublikowany w dn. 14.04.2021 (zgłoszenie nr GB201619142 opublikowane w dn 27.01.2016).

¹⁴ Andrzejewski D, **Buzalewicz I**, Bednarek K, Markiewicz N, Pawełek Ł. Method for examination of microorganisms on solid bases and the measuring system for examination of microorganisms grown on solid bases. **Patent Korea Południowa** nr KR 102215859 opublikowany w dn. 16.02.2021 (zgłoszenie nr KR20180004153A opublikowane w dn. 10.01.2018)

¹⁵ Andrzejewski D, **Buzalewicz I**, Bednarek K, Markiewicz N, Pawełek Ł. Method for examination of microorganisms on solid bases and the measuring system for examination of microorganisms grown on solid bases. **Patent Brazylii** nr BR 112017021862 opublikowany w dn. 01.06.2021 (zgłoszenie nr BR 112017021862 opublikowane w dn. 10.07.2018).

w innych technikach. Ponadto uzyskane wyniki dla tak reprezentatywnej grupy mikroorganizmów (12 gatunków i 88 szczepów) oraz bazy wzorców (100 000 widm dyfrakcyjnych) potwierdzają możliwość wykorzystania opracowanej przeze mnie optycznej techniki do identyfikacji mikroorganizmów w diagnostyce mikrobiologicznej.

3.3.3 Multiplikacja wzorców i hybrydowe fenotypowanie bakterii [H3, H5, H8]

U podstaw wszelkich technik identyfikacji obiektów biologicznych leży konieczność znalezienia najlepszych cech / wzorców fenotypowych, które będą wykazywać największy potencjał predykcyjny. Im większy będzie zestaw wzorców, tym większy będzie również zestaw cech różnicujących, który posłuży do budowy modeli klasyfikacyjnych charakteryzujących się większą czułością, specyficznością oraz skutecznością.

W poprzednich pracach opisanych w sekcji 3.3.1 wykazałem możliwość multiplikacji wzorców dzięki wykorzystaniu technik DHM, jednakże badane obiekty powinny charakteryzować się stosunkowo wysoką transmisją (szczególnie w technice PSDIHM). Zapewnia to rejestrację hologramów cyfrowych o odpowiednim kontraście, który umożliwi rekonstrukcję wysokiej jakości wzorców. Oznacza to, że im dłuższy będzie czas inkubacji kolonii, tym większe będą ich rozmiary przestrzenne (średnica, grubość) i światło będzie silniej pochłaniane. Takie podejście będzie ograniczać możliwość wykorzystania technik holograficznych działających w trybie transmisyjnym, gdyż będzie to prowadziło do rejestracji hologramów o mniejszym kontraście. Mogą one być zatem stosowane w diagnostyce mikrobiologicznej dla celów medycznych, gdzie konieczna jest szybka identyfikacja bakterii związana z koniecznością zastosowania odpowiedniej terapii antybiotykowej u pacjenta. W przypadku przemysłowej diagnostyki mikrobiologicznej (np. w przemyśle spożywczym, kosmetycznym), gdzie szybkość identyfikacji nie jest już tak ważna, bada się kolonie zazwyczaj w późniejszych stadiach rozwoju. Alternatywnym rozwiązaniem, pozwalającym na multiplikację wzorców optycznych „starszych” kolonii, może być wykorzystanie innych technik pomiarowych, dla których wymóg dużej transparentności kolonii nie jest tak znaczący, lub też integracja tych technik w jednym układzie. Pierwsza koncepcja prowadziła do zaproponowania przeze mnie wielomodowej detekcji formowania się biofilmów bakterii [H8]. Z kolei druga koncepcja prowadziła do podjętych przeze mnie prac badawczych opisanych w [H3, H5], które polegały na skonstruowaniu nowych układów dyfraktometrycznych z dodatkowymi kanałami pomiarowymi, czyli integrację różnych technik pomiarowych w celu multipleksacji wzorców fenotypowych kolonii.

3.3.3.1 Monochromatyczne, dyfrakcyjne i transmisyjne fenotypowe kolonii [H3]

Dotychczasowe metody optyczne do identyfikacji kolonii bakterii, opierające się na wykorzystaniu 2D wzorców optycznych tych kolonii, ograniczały się głównie do wzorców dyfrakcyjnych ([A9,A11] w sekcji 2.2 w Wykazie osiągnięć), bądź

rozproszeniowych [33], [35], [36], [38], [42]. Jednakże zdecydowano się również na wprowadzenie dodatkowych kanałów pomiarowych np. kanału zintegrowanego z laserowym konfokalnym miernikiem przemieszczeń [34] do pomiaru profilu kolonii, lub kanału do pomiaru multispektralnych wzorców rozproszeniowych kolonii [43]. Należy jednak pamiętać, że modulacja wiązki oświetlającej przez kolonię ma charakter wieloparametryczny. Oznacza to, że informacja o kolonii zawarta jest w różnych wielkościach fizycznych charakteryzujących wiązkę świetlną, co umożliwia wyodrębnienie dodatkowych wzorców kolonii.

W związku z powyższym opracowałem nową koncepcję badań i zaplanowałem eksperyment polegający na zbadaniu możliwości dwukanałowej charakteryzacji kolonii w celu wyodrębnienia nowego wzorca w postaci 2D rozkładu współczynnika transmisji (2D-T) oprócz ich wzorców dyfrakcyjnych. W tym celu skonstruowałem nowy układ dyfraktometryczny, który został przetestowany podczas charakteryzacji bakterii glebowych pozyskanych dzięki współpracy z grupą *prof. dr hab. Lidii Sas-Paszt* z Pracowni Rizosfery Zakładu Agrotechniki Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach, prowadzącą badania nad identyfikacją rizobakterii promujących wzrost roślin PGPR (z ang. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). Zagadnienie to jest istotne ze względu na istnienie silnego związku pomiędzy rozwojem systemu korzeniowego roślin i mikroorganizmami. Wzrost roślin i uzyskane plony są bezpośrednio uzależnione od obecności pożytecznych bakterii żyjących w glebie [44]. Niestety, cała wiedza o pożytecznych mikroorganizmach glebowych nie może być praktycznie wykorzystana bez potwierdzenia ich obecności w próbkach gleby. W związku z tym, zdecydowałem się na zbadanie możliwości ich identyfikacji w nowo skonstruowanym układzie dyfraktometrycznym. Co więcej zainicjowałem współpracę z *dr hab. Ryszardem Kozera* z Wydziału Informatyki Stosowanej i Matematyki Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie oraz School of Computer Science and Software Engineering (University of Western Australia) skoncentrowaną na rozwoju i optymalizacji wykorzystanych w niniejszej pracy metod klasyfikacyjnych oraz analizy obrazu. Próbkę mikrobiologiczną przygotowałem we współpracy z grupą *prof. dr hab. Aliny Wieliczko* z Katedry Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

W ramach przeprowadzonych prac badawczych zaprojektowałem i skonstruowałem nowy dwukanałowy układ do optycznego fenotypowania kolonii poprzez modyfikację układu dyfraktometrycznego, który oprócz dodatkowego modułu do rejestracji obrazów odbiciowych całej szalki Petriego z koloniami (do automatycznego wykrywania położenia kolonii) został również wyposażony w dodatkowy moduł do rejestracji powiększonych obrazów transmisyjnych pojedynczych kolonii. Przebadano 7 różnych gatunków bakterii powszechnie występujących w środowisku, a zwłaszcza w glebie. Wśród nich znalazły się rizobakterie PGPR: dwa szczepy *Rahnella aquatilis* (x31E i x21N) oraz *Bacillus subtilis* (Sp27).

Dla każdej kolonii badanego gatunku, w zaprojektowanym przeze mnie układzie, zarejestrowałem ich monochromatyczne widma dyfrakcyjne oraz obrazy transmisyjne. Dzięki opracowanemu przeze mnie w środowisku MATLAB (MathWorks) algorytmowi przetwarzania obrazu, wyznaczyłem rozkłady 2D-T kolonii z obrazów transmisyjnych, które zostały znormalizowane względem średniego natężenia światła transmitowanego przez podłoże i szalkę, na których były one hodowane. Wyeliminowało to całkowicie błędy określenia właściwości transmisyjnych kolonii związanych z różną grubością podłoża. Walidację algorytmu przeprowadziłem z wykorzystaniem obiektów wzorcowych, a odchylenie standardowe wyznaczonej wartości współczynnika transmisji zawierało się w przedziale 0,05%–9% (zgodnie z wartością katalogową producenta). Wprowadzie analiza właściwości tłumiących kolonii poprzez skanowanie punkt po punkcie lokalnych wartości ich gęstości optycznej została zaproponowana w [45], jednak uzyskana informacja charakteryzowała się małą rozdzielczością przestrzenną. Z kolei zaproponowana przez mnie metodologia wyznaczania rozkładu 2D-T kolonii, uwzględniająca cechy morfologiczne kolonii z wykorzystaniem pojedynczego obrazu mikroskopowego, nie była wcześniej analizowana ani badana w literaturze. Eliminuje ona czasochłonną procedurę skanowania „punkt po punkcie” oraz konieczność zastosowania wysokorozdzielczych systemów skanujących. Umożliwia natomiast pozyskanie wysokorozdzielczej informacji przestrzennej w wyniku pojedynczego pomiaru, dostarczając dodatkowych informacji na temat właściwości morfologicznych i optycznych. W odróżnieniu do wcześniej stosowanych przeze mnie rozwiązań ([A11] sekcji 2.2 w Wykazie osiągnięć), modyfikacji uległ również sposób ekstrakcji cech oraz budowa modeli klasyfikacyjnych. Jako cechy klasyfikacyjne widm dyfrakcyjnych wykorzystano tu morfologiczne i teksturalne cechy liczbowe oparte na momentach statystycznych. Dodatkowo zdecydowano się na wprowadzenie dwustopniowego rankingowania cech w celu wyboru zestawu o największym potencjale predykcyjnym. Pierwszy etap selekcji cech został wykonany w oparciu o błędy klasyfikacji kwadratowej analizy dyskryminacyjnej QDA (z ang. *Quadratic Discriminant Analysis*) dla modeli zbudowanych z uwzględnieniem wszystkich cech. Drugi etap selekcji polegał natomiast na wykorzystaniu ANOVA oraz dywergencji Fishera SNR (z ang. *Signal to Noise Ratio*). Skuteczność klasyfikacji za pomocą CV badano na dwóch modelach klasyfikacyjnych opartych na QDA i maszynie wektorów nośnych SVM (z ang. *Support Vector Machine*) zbudowanych w oparciu o cechy wybrane przy użyciu ANOVA lub SNR.

Uzyskane wyniki potwierdziły, że w przypadku badanych gatunków ich rozkłady 2D-T wykazują unikalne cechy. W głównej mierze wynika to z topografii kolonii zależnej od gatunku i szczepu bakterii, która związana jest z lokalnymi zmianami grubości kolonii, jak również z różną dynamiką akumulacji komórek oraz materiału pozakomórkowego w obrębie kolonii, oraz z specyficznymi właściwościami absorpcyjnymi kolonii. Wyznaczone wzorce transmisyjne charakteryzowały się znacznie lepszą rozdzielczością niż skaningowe techniki pomiaru [45]. Tym samym

wzorce te mogą zostać wykorzystane do analizy osobniczych cech kolonii bakterii. Rozkłady 2D-T kolonii różnych gatunków charakteryzowały się obszarami o różnej transmisji, których regularność, kształt i położenie były uzależnione od gatunku / szczepu bakterii, morfologii ich komórek (pałeczki, laseczki, gronkowce) lub też ich ruchliwości. Różnice w rozkładzie 2D-T były również zauważalne na poziomie szczepu tego samego gatunku *Rahnella aquatilis* (x31E i x21N), co potwierdza możliwość wykorzystania tych wzorców optycznych w różnicowaniu bakterii na poziomie szczepu. Uzyskane wzorce transmisyjne pozwoliły również na lepsze zrozumienie transformacji światła zachodzącej na koloniach, gdyż kształt stref o różnej transmisji wpływa na dyfrakcję zachodzącą na ich krawędziach, co wpływa na widma dyfrakcyjne. Opracowana technika potwierdziła możliwość identyfikacji przedstawicieli bakterii środowiskowych na poziomie gatunku ze skutecznością równą 98,51% (model SVM z rankingowaniem cech opartym na SNR). Z kolei uzyskana skuteczność identyfikacji na poziomie szczepu (w przypadku bakterii *Rahnella aquatilis*) wynosiła 98,8% (model SVM z rankingowaniem cech opartym na ANOVA).

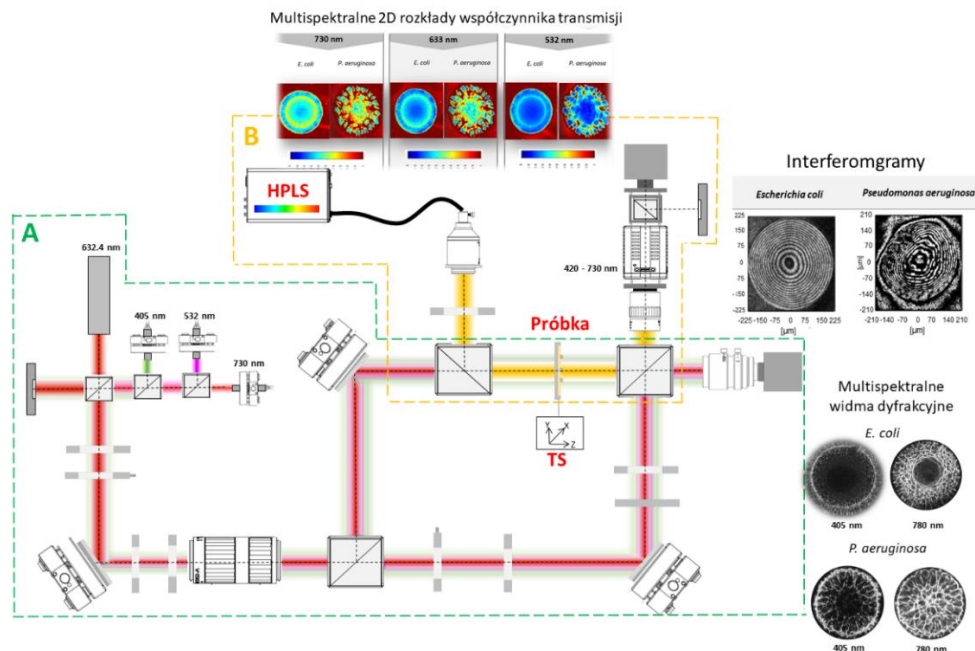
Najważniejszymi wynikami zaplanowanego przeze mnie eksperymentu w [H3] było potwierdzenie tezy, iż skonstruowany przeze mnie nowy układ pomiarowy oraz zastosowane algorytmy przetwarzania obrazu pozwalają na pozyskanie nowych wzorców fenotypowych kolonii, jak również skuteczną identyfikację bakterii na poziomie ich szczepu. Integracja układu dyfraktometrycznego z modulem obrazowania transmisyjnego pozwoliła na ekstrakcję osobniczych, monochromatycznych rozkładów 2D-T kolonii, które mogą posłużyć jako dodatkowe wzorce różnicujące kolonie bakterii. Ponadto zaproponowana metoda pozwala na wysoce skuteczną identyfikację bakterii PGPR, co może przyczynić się do lepszego zrozumienia ich bioróżnorodności, interakcji (sygnalizacji, działania promującego wzrost roślin, ograniczenia chorób roślin itp.), które zachodzą pomiędzy roślinami i bakteriami. Identyfikacja bakterii PGPR jest niezbędna do ich praktycznego zastosowania np. do wzbogacania nimi nawozów.

3.3.3.2 Multispektralne, dyfrakcyjne, transmisyjne i profilometryczne fenotypowanie kolonii [H5]

Kontynuując prace badawcze opisane w sekcji 3.3.3.1 [H3] zaproponowałem dalszą rozbudowę układu dyfraktometrycznego i konstrukcję nowego trójkanałowego układu optycznego w celu rejestracji nowych wzorców fenotypowych kolonii. Koncepcją, która zainspirowała mnie do podjęcia dalszych badań w tym zakresie, było zaproponowane przez autorów [43] alternatywne rozwiązanie wykorzystania multispektralnych wzorców rozproszeniowych kolonii do ich identyfikacji. Wzbogacili oni swój układ skaterometryczny o dodatkowe dwa kanały oświetleniowe pozwalające na rejestrację wzorców kolonii dla 3 różnych długości fali: 405 nm, 635 nm i 904 nm. Ponadto zdecydowali się oni na pomiar gęstości optycznej uśrednionej po całym obszarze kolonii w funkcji długości fali, jednak nie uwzględnili przestrzennie rozdzielczej analizy właściwości transmisyjnych kolonii. Uzyskane wyniki badań dla

4 gatunków bakterii pozwoliły im na uzyskanie skuteczności identyfikacji od 98,45% do 100% w oparciu o multispektralne widma dyfrakcyjne. Jednakże, jak w poprzednich przypadkach, autorzy ci zdecydowali się na wykorzystanie wzorców rozproszeniowych zarejestrowanych w jednej arbitralnie ustalonej odległości, bez uwzględnienia wpływu topografii kolonii oraz ich właściwości ogniskujących. W rezultacie trudno jest jednoznacznie stwierdzić, że zarejestrowane wzorce są tymi, które wykazują największą liczbę cech różnicujących.

Mając na uwadze powyższe, w niniejszej pracy [H5] zdecydowałem się na odmienne podejście. W ramach prac badawczych skonstruowałem wielokanałowy układ pomiarowy oraz opracowałem metodologię pomiarów i analizy numerycznej uzyskanych wyników. Nowy układ optyczny (patrz Rys. 2), który skonstruowałem, bazował na konfiguracji interferometru Macha-Zehndera i składał się z 3 zintegrowanych modułów: dyfraktometrycznego, profilometrycznego oraz obrazowania multispektralnego.



Rys. 2 Konfiguracja zintegrowanego wielokanałowego systemu do: interferometrycznej profilometrii kolonii oraz rejestracji ich multispektralnych widm dyfrakcyjnych (A), wraz z systemem obrazowania spektralnego (B) (dokładny opis w [H5]).

Pierwszy moduł został wyposażony w 4 źródła światła koherentnego (laser HeNe, 3 diody laserowe) umożliwiające rejestrację multispektralnych widm dyfrakcyjnych dla długości fal: 405 nm, 532 nm, 632,8 nm i 750 nm. Był to wynik przeprowadzenia pomiarów spektrofotometrycznych kolonii przy użyciu spektrofotometru (AvaSpec 3648, Avantes) z sondą odbiciową. Zdecydowałem się również na wprowadzenie interferometrycznego modułu profilometrycznego, który pozwolił na bezpośrednią kontrolę / monitoring profilu kolonii oraz rejestrację wzorców optycznych kolonii o tej samej topografii. Moduł ten opierał się na konfiguracji interferometru Macha-Zehndera, który pozwalał na rekonstrukcję profili kolonii dzięki zastosowaniu

cieklokryształicznego modulatora fazy LC-PR (0-1λ, LCC1423-A, Thorlabs) oraz czterostopniowego algorytmu przesunięcia fazy (z ang. *four-step phase-shifting algorithm*) [46]. Ostatni moduł obrazowania spektralnego pozwalał na rejestrację multispektralnych obrazów transmisyjnych kolonii oraz wyznaczenie ich multispektralnych rozkładów 2D-T zgodnie z metodologią opisaną w sekcji 3.3.3.1 [H3]. Moduł ten składał się z układu oświetlającego zawierającego szerokopasmowe źródło światła (350–800 nm, HPLS343, Thorlabs) oraz z układu obrazującego zawierającego przestrajalny cieklokryształiczny filtr spektralny (420–730 nm, Kurios VB1, Thorlabs) o kontrolowanych pasmach transmisji (szerokość połowkowa: $18 \pm 1,8$ nm) zintegrowanych z układem interferometru Macha-Zehndera.

Następnie zaplanowałem eksperyment mający na celu potwierdzenie tezy, iż multiplikacja wzorców fenotypowych kolonii uzyskanych dzięki nowemu układowi pomiarowemu umożliwi zwiększenie skuteczności identyfikacji bakterii. Badania przeprowadziłem na koloniach 5 gatunków bakterii (Gram-dodatnich, Gram-ujemnych) przygotowanych we współpracy z Katedrą Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

W pierwszej kolejności przeprowadziłem pomiary wpływu właściwości ogniskujących kolonii bakterii na rejestrację multispektralnych widm dyfrakcyjnych kolonii. Dokonałem pomiaru tych widm dla 20 kolonii każdego gatunku i każdej długości fali w różnych odległościach od kolonii (od 0,1 cm do 3,8 cm). Dzięki opracowanemu przeze mnie algorytmowi przetwarzania obrazu w środowisku MATLAB (MathWorks), opierającemu się na kryterium zastosowanym w [H1] (sekcja 3.3.1.1), wyznaczyłem odległość ogniskową kolonii. Uzyskane wyniki potwierdziły, że również w tym przypadku konieczna jest standaryzacja warunków pomiaru widm multispektralnych i dobranie odpowiedniej odległości rejestracji widm dyfrakcyjnych, co nie było dotąd w ogóle analizowane [43], [47]. W związku z tym przeprowadziłem dalsze pomiary topografii kolonii za pomocą modułu profilometrycznego. Zrekonstruowane z interferogramów profile kolonii pozwoliły na ich analizę morfometryczną. Błędy określenia średnicy i grubości kolonii mieściły się odpowiednio w zakresach: 0,25–0,73 μm oraz 0,11–0,17 μm. Pomiar profilu kolonii umożliwił wyznaczenie odległości rejestracji wzorców dyfrakcyjnych kolonii o powtarzalnej topografii w celu rejestracji porównywalnych widm dyfrakcyjnych bez zmiany zawartości ich cech klasyfikacyjnych.

W kolejnym etapie rejestrowałem 1000 multispektralnych widm dyfrakcyjnych (po 200 na gatunek) oraz 1000 obrazów multispektralnych, z których wyznaczono 1000 multispektralnych rozkładów 2D-T (200 na gatunek) dla 250 kolonii (po 50 na gatunek). Następnie za pomocą opracowanych algorytmów dokonałem ekstrakcji cech klasyfikacyjnych z zarejestrowanych multispektralnych wzorców kolonii. Za pomocą algorytmu losowego lasu decyzyjnego (z ang. *random forest algorithm*) dokonałem rankingowania cech o największym potencjale predykcyjnym, które posłużyły mi do budowy modelu klasyfikacyjnego SVM. Uzyskane wyniki

klasyfikacji potwierdzają tezę, że w przypadku każdego rodzaju wzorca optycznego (widma dyfrakcyjnego, rozkładu 2D-T) klasyfikacja w oparciu o wzorce multispektralne jest skuteczniejsza niż w przypadku wykorzystania danego rodzaju wzorców monochromatycznych. Największą skuteczność klasyfikacji od 99,4% do 100% (czyli wyższą niż w [43]) uzyskano w oparciu o oba zestawy wzorców multispektralnych (widma, rozkładów 2D-T). Uzyskane wyniki zostały zweryfikowane przez porównawcze badania przeprowadzone na próbce zawierającej kolonie różnych gatunków bakterii za pomocą opracowanej metody oraz konwencjonalnej metody mikrobiologicznej (panele biochemiczne). Uzyskane wartości wyznaczonego przeze mnie parametru Kappa (opisującego zbieżność wyników uzyskanych przez obie metody) z zakresu od 0,983 do 1, świadczą o niemal doskonałej zgodności obu metod.

Najważniejszym wynikiem przeprowadzonego eksperymentu (opisanego w [H5]) było opracowanie przeze mnie nowego, wielokanałowego układu do charakteryzacji i identyfikacji bakterii oraz potwierdzenie tezy o możliwości multiplikacji wzorców kolonii oraz ich wykorzystania do skuteczniejszej identyfikacji bakterii. Zastosowanie profilometrii interferencyjnej pozwalało na uwzględnienie topografii kolonii i optymalizację warunków pomiarowych, co umożliwiło skuteczniejszą (niż w [43]) klasyfikację w oparciu o zmultiplikowany zestaw wzorców fenotypowych kolonii. W literaturze nie było dotąd doniesień o identyfikacji bakterii w oparciu o zaproponowany zestaw optycznych wzorców fenotypowych kolonii. Tym samym opracowane przeze mnie rozwiązanie może przyczynić się rozwoju nowych, skuteczniejszych technik diagnostyki mikrobiologicznej. Świadczyć może o tym adaptacja i wykorzystanie zaproponowanych przeze mnie rozwiązań przez innych autorów [47]. Uzyskane wyniki potwierdziły również możliwość wykorzystania opracowanej metody fenotypowania kolonii bakterii do oceny efektywności działania środków / czynników bakteriobójczych, która może zostać wykorzystana w testowaniu terapii antybakteryjnych.

3.3.3.3 Multiplikacja wzorców i hybrydowe fenotypowanie biofilmów [H8]

Kolonie bakterii hodowane są głównie w warunkach laboratoryjnych. Komórki bakterii żyjące w środowisku, na różnego rodzaju powierzchniach, występują zazwyczaj w formie planktonicznej, tworząc skupiska lub formując biofilmy. Ta ostatnia struktura jest szczególnie istotna, gdyż może składać się z komórek tego samego lub różnych gatunków bakterii. Komórki te zawieszane są w zewnątrzkomórkowych substancjach polimerowych EPS (z ang. *extracellular polymer substances*) [48]. Z jednej strony taka forma pozwala im przetrwać niekorzystne warunki środowiskowe (np. brak składników odżywczych), z drugiej strony chroni je przed substancjami toksycznymi (antybiotyki, środki dezynfekujące). Dlatego też, biofilmy w przeciwieństwie do komórek planktonicznych wykazują blisko 1500 razy większą odporność na antybiotyki [49]. Obecnie stosowane, konwencjonalnie metody detekcji, biofilmów to m.in.: automatyczne zliczenia CFU (z ang. *Colony Forming Unit*) [50], wybarwienie fioletem krystalicznym [50], mikroskopia fluorescencyjna

[51], bioluminescencja ATP [52], skaningowa mikroskopia elektronowa [53]. Wymagają one wykorzystania czasochłonnych i kosztochłonnych procedur przygotowania próbek, dodatkowych odczynników chemicznych, znaczników fluorescencyjnych, nie pozwalają na detekcję biofilmów bezpośrednio na powierzchni na jakiej się one formują oraz mają niszczący charakter badania. Oznacza to, że istnieje potrzeba opracowania szybkich, skutecznych, bezkontaktowych i bezznacznikowych metod detekcji formowania się biofilmów bakteryjnych na różnego rodzaju powierzchniach znajdujących się w naszym najbliższym otoczeniu.

Z tego powodu podjąłem się prac badawczych nad opracowaniem nowych metod detekcji i charakteryzacji biofilmów. Wyniki tych prac zostały opublikowane w [H8]. Opracowałem metodologię badań nad zastosowaniem nowych, nieinwazyjnych i nieniszczących technik pomiarowych: sondy skanującej Kelvina SKP (z ang. *scanning Kelvin probe*), cyfrowej tomografii cyfrowej DHT (z ang. *digital holographic tomography*) oraz mikrospektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera μ FTIR (z ang. *micro-Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) do detekcji i oceny dynamiki formowania się biofilmu bezpośrednio na badanej powierzchni. Zaplanowany eksperyment polegał na potwierdzeniu tezy dotyczącej możliwości wykorzystania tych technik do detekcji biofilmów bezpośrednio na powierzchniach, na których się one formują. Zdecydowano się zbadać powierzchnię stali nierdzewnej oraz szkła ze względu na powszechność ich wykorzystania. Wybór metod pomiarowych był zdeterminowany przez właściwości wybranych materiałów (przewodność elektryczną, transparentność). Dlatego też do detekcji biofilmów na powierzchni stali nierdzewnej zastosowano SKP oraz μ FTIR, natomiast w przypadku powierzchni szklanej zastosowano DHT oraz μ FTIR. Badania zostały przeprowadzone na bakteriiach *E. coli* (ATCC 25922) jako modelowym mikroorganizmie wykorzystywanym w eksperymentach dotyczących kolonizacji powierzchni. Za pomocą wymienionych powyżej technik pomiarowych przebadano próbki biofilmów hodowanych przez 24, 48 i 72 godziny na obu rodzajach powierzchni. **Badania te zostały zrealizowane w ramach kierowanego przeze mnie projektu NCN OPUS 21 (poz. 1 w sekcji 2.6 w Wykazie osiągnięć).**

Zastosowana technika SKP jest zdolna do wykrywania kontaktowej różnicy potencjałów CPD (z ang. *Contact Potential Difference*), wynikającej z różnic w pracy wyjścia WF (z ang. *Work Function*) elektronu pomiędzy analizowaną przewodzącą próbką i końcówką sondy skanującej. W tym przypadku, jako wzorzec fenotypowy, wykorzystano CPD bezpośrednio związaną z właściwościami elektrycznymi biofilmu bakteryjnego. Pomiary zostały przeprowadzone za pomocą układu SKP (SKP5050, KP Technology). Uzyskane wyniki wykazały, że obecność biofilmu na powierzchni stali, już po 24 godzinach jego inkubacji, prowadzi do zmniejszenia się wartości CPD w stosunku do próbki kontrolnej (bez bakterii). Różnice wartości CPD były również obserwowalne pomiędzy powierzchniami z biofilmami inkubowanymi przez 48 godzin i 72 godziny a próbką kontrolną. Jednakże dla biofilmów inkubowanych dłużej niż 24 godziny, różnice te malały, co może być związane z tzw. fazą plateau rozwoju

bakterii *E. coli* i charakterystycznym spadkiem dynamiki tworzenia biofilmu po 24 godzinach. Tym niemniej uzyskane wyniki sugerują, że technika SKP pozwala na detekcję biofilmu bezpośrednio na powierzchniach przewodzących, gdzie zakres zmian CPD zależy od stadium rozwoju biofilmu bakteryjnego. Niestety, jak w przypadku większości technik opartych na metodzie sondy skanującej, rozdzielczość SKP zależy od rozmiarów przestrzennych sondy skanującej. Oznacza to, że zmniejszenie rozmiarów sondy może przyczynić się do skuteczniejszego fenotypowania biofilmów. Przeprowadzone badania po raz pierwszy wykazały możliwość zastosowanie tej metody pomiarowej do detekcji biofilmów bakterii.

Technika μ FTIR, łącząca zalety mikroskopii optycznej oraz spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni, pozwala na analizę składu biochemicznego badanego materiału oraz uzyskanie map przedstawiających rozkład wybranego związku chemicznego w obrębie próbki. W rozważanym eksperymencie została wykorzystana do detekcji tworzenia się biofilmu na powierzchniach stali nierdzewnej i szkła. Wyznaczone 2D mapy ATR-FTIR (z ang. *Attenuated Total Reflectance micro-Fourier transform infrared spectroscopy*) umożliwiły wyznaczanie formowanej struktury przestrzennej biofilmów na badanych powierzchniach, natomiast zarejestrowane widma w podczerwieni (IR) pozwoliły na bezpośrednią charakterystykę ich składu chemicznego. Należy jednak zaznaczyć, że w przypadku powierzchni szklanych ekstremalna absorpcja szkła w rejestrowanym zakresie podczerwieni w znaczący sposób wpływała na widma biofilmów, uniemożliwiając analizę ich składu biochemicznego. Jednakże nawet w tym przypadku możliwa była detekcja biofilmu na podstawie obecności w widmie ATR-FTIR pasma absorpcji związanego z drganiem rozciągającymi grup CH_2 i CH_3 ($3000\text{--}2900\text{ cm}^{-1}$). Uzyskane wyniki dla obu rodzajów badanych powierzchni wykazały, iż te dwa analizowane wzorce fenotypowe biofilmów bezpośrednio związane z ich składem chemicznym pozwalają na detekcję biofilmów. Ponadto wzorce IR różniły się od siebie w zależności od stadiów rozwoju biofilmu tj. czasu formowania się biofilmu (24, 48, 72 godziny). Oznacza to, iż wzorce IR pozwalają na charakterystykę dynamiki rozwoju biofilmu. Rozwój biofilmu jest uzależniony od żywotności komórek bakterii i ich zdolności do podziału. Uzyskane wyniki sugerują również, że analiza stosunku absorbancji pasma przy $\sim 1230\text{ cm}^{-1}$ (odpowiadającego głównie kwasom nukleinowym) i pasma Amidu II może być wykorzystana do oceny dynamiki produkcji kwasów nukleinowych. Oznacza to, że wzorce IR mogą zostać wykorzystane do oceny żywotności komórek w całkowicie bezznackowy, nieniszczący sposób. Im więcej będzie w biofilmie komórek zdolnych do podziału, tym większa będzie produkcja kwasów nukleinowych.

Kolejna, zaproponowana przeze mnie technika DHT pozwala na rekonstrukcję 3D rozkładu RI (współczynnika załamania z ang. *Refractive Index*) biofilmów bakterii związanego z lokalnymi zmianami gęstości badanej próbki. Technika ta pozwala również na wyznaczanie pochodnych wzorców, takich jak objętość i sucha masa biofilmów na podstawie 3D rozkładu RI. Pomiary przeprowadziłem na

holotomografii 3D Cell-Explorer (Nanolive), a rekonstrukcji rozkładów RI dokonałem za pomocą oprogramowania STEVE (Nanolive). W kolejnym etapie dane w postaci tomogramów 3D-RI przeanalizowałem ilościowo z wykorzystaniem dedykowanych algorytmów numerycznych opracowanych przeze mnie w środowisku MATLAB (MathWorks). Wzorce RI, jak również wzorce pochodne, zostały w tym przypadku wykorzystane jako wzorce fenotypowe do detekcji formowania się biofilmów na powierzchni szkła. W przypadku *E. coli* możliwe było wykrycie obecności biofilmów na powierzchni szkła, niezależnie od stopnia dojrzałości biofilmu. Na podstawie RI możliwe było również rozróżnienie w strukturze biofilmu komórek o wysokim RI (1,352–1,380), zdolnych do podziałów komórkowych, oraz komórek o niskim RI (1,334–1,348), niezdolnych do nich. Świadczy to o możliwości zastosowania tej techniki do bezznacznikowej oceny żywotności komórek bakterii. Ponadto przeprowadzona analiza wykazała, iż w zależności od stadium rozwoju biofilmu, zwiększała się objętość komórek o niskim RI, a zmniejszała się objętość komórek o wysokim RI, co świadczy o obumieraniu biofilmu na powierzchni szkła. Towarzyszył temu wzrost wartości suchej masy komórek o niskim RI. Oznacza to, iż w oparciu o uzyskane wzorce RI i ich wzorce pochodne możliwa jest charakterystyka dynamiki rozwoju biofilmu. W odniesieniu do pozostałych zastosowanych metod pomiarowych, główną zaletą techniki DHT jest jej rozdzielczość równa 190 nm, która umożliwia detekcję pojedynczych komórek bakterii znajdujących się na badanej powierzchni.

Podsumowując, najważniejszym wynikiem tego eksperymentu (opisanego w [H8]) było potwierdzenie po raz pierwszy tezy o możliwości wyodrębnienia nowych wzorców fenotypowych biofilmów bakteryjnych uwzględniających ich właściwości elektryczne, skład chemiczny, właściwości optyczne (RI), objętość i suchą masę w całkowicie bezkontaktowy i nieniszczący sposób za pomocą zaproponowanych technik pomiarowych w celu ich charakteryzacji. Zaproponowane techniki pozwalają na wieloparametryczną detekcję obecności biofilmów na badanych powierzchniach, jak również charakterystykę dynamiki formowania się biofilmów, lub też bezznacznikową, bezkontaktową ocenę żywotności komórek bakterii (μ FTIR, DHT) pod względem zdolności do podziału komórkowego i produkcji kwasów nukleinowych. Uzyskane wyniki świadczą o tym, iż integracja powyższych technik, w zależności od właściwości badanych powierzchni (przewodzące, nietransparentne: SKP, μ FTIR; nieprzewodzące, transparentne: DHT, μ FTIR; przewodzące, transparentne: SKP, μ FTIR, DHT), może się przyczynić do skuteczniejszej detekcji biofilmów bezpośrednio na badanych powierzchniach, czego nie umożliwiają wspomniane powyżej konwencjonalnie stosowane metody. Warto podkreślić, że nieniszczący charakter pomiaru pozwala na weryfikację uzyskanych wyników za pomocą konwencjonalnych metod diagnostycznych.

3.4 Wieloparametryczne fenotypowanie organelli, komórek i tkanek [H6, H7]

Dotychczas prowadzone przeze mnie badania koncentrowały się głównie na fenotypowaniu kolonii bakterii, co wymagało zastosowania układów optycznych o niewielkim powiększeniu. W przypadku badań na organellach, pojedynczych komórkach eukariotycznych i prokariotycznych lub tkankach konieczne było zastosowanie techniki obrazowania o znacznie większym powiększeniu oraz zdolności rozdzielczej. W celu nieniszczącego obrazowania organelli, tj. bez zastosowania technik barwienia i znakowania fluorescencyjnego, konieczne było zastosowanie techniki obrazowania fazowego z uwagi na czysto-fazowe właściwości tych komórek (modulacja jedynie fazy pola optycznego). Konwencjonalne techniki mikroskopowe (np. kontrastu fazowego, kontrastu interferencyjnego) nie zostały wybrane, ponieważ są to metody jedynie jakościowe, co nie pozwoliłoby na uzyskanie ilościowej informacji o badanym obiekcie. Alternatywą okazały się techniki ilościowego obrazowania fazy QPI (z ang. *Quantitative Phase Imaging*), u których podstaw leżą techniki holograficzne oraz interferometryczne [54], [55]. Przykładem może być tu opisana w podrozdziale 3.3.1 cyfrowa mikroskopia holograficzna (DHM), będąca przykładem 2D ilościowego obrazowania fazy (2D-QPI). DHM umożliwia rekonstrukcję 2D rozkładu fazy pola optycznego w danej płaszczyźnie dzięki numerycznej rekonstrukcji hologramów cyfrowych. W zasadzie, rozkłady te przedstawiają rozkład fazy zintegrowanej, gdyż zawierają informację zarówno o rozkładzie RI, jak i geometrii przestrzennej badanego obiektu. Tym samym niemożliwa jest ekstrakcja informacji np. o wartości RI bez znajomości topografii badanego obiektu i na odwrót. Niedogodność tę eliminuje cyfrowa tomografia holograficzna DHT (z ang. *Digital Holographic Tomography*), określana też mianem techniki 3D-QPI [56], optycznej tomografii dyfrakcyjnej [57], nanoskopii fazowej [58] lub po prostu holotomografii [59]. DHT łączy w sobie koncepcje DHM oraz numerycznej filtrowanej projekcji wstecznej [60], podobnej co do zasady do rekonstrukcji obrazu w tomografii komputerowej. W skrócie, DHT polega na rejestracji serii hologramów cyfrowych próbki dla różnych kątów padania wiązki oświetlającej, które po numerycznej rekonstrukcji reprezentują projekcje obiektu. Następnie wykorzystując metodę projekcji wstecznej i teorię przekroju rzutu (z ang. *Fourier slice theory*) możliwa jest rekonstrukcja rozkładu / tomogramu 3D-RI, a tym samym ilościowe 3D obrazowanie fazy (3D-QPI). Teoretyczna rozdzielczość poprzeczna i osiowa DHT wynosi odpowiednio 124 nm i 397 nm [61], [62], zatem dostarcza informacji zarówno morfologicznych, jak i biochemicznych z rozdzielczością mikrometrową [63] lub nawet nanometrową [58]. Należy tu podkreślić, że RI jest nie tylko ważnym parametrem optycznym, ale również kluczowym parametrem biofizycznym związanym z właściwościami mechanicznymi i elektrycznymi komórek, ich składem chemicznym, gęstością itp. Oznacza to, że RI dostarcza istotnych informacji charakteryzujących komórki oraz zachodzące w nich procesy fizjologiczne lub patologiczne [64].

W związku z powyższym, skoncentrowałem się na wykorzystaniu techniki DHT również do fenotypowania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, organelli komórkowych, pojedynczych komórek, tkanek oraz zachodzących w nich zmian.

3.4.1 Wieloparametryczne fenotypowanie tkanek [H6]

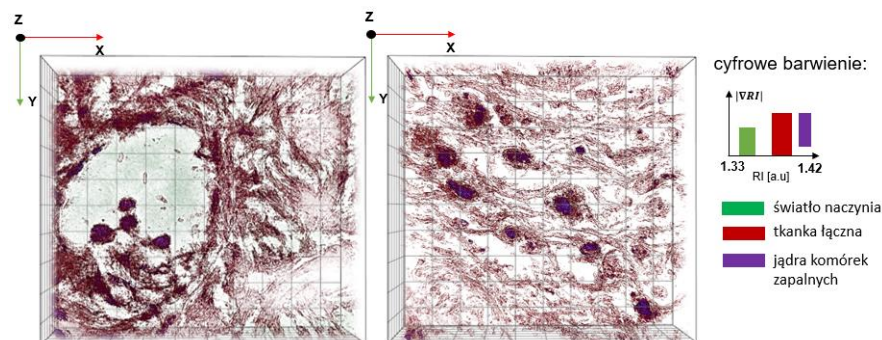
Badania histopatologiczne polegające na analizie mikrofotografii tkanek pobranych od pacjenta są powszechnie wykorzystywane w medycynie w ocenie procesu chorobowego. Wykonywane są one na próbkach pobranych od pacjentów w wyniku biopsji, jak również na próbkach pośmiertnych (*post-mortem*) pobranych w trakcie sekcji zwłok. Wykorzystanie próbek *post-mortem* wnosi dodatkowe walory poznawcze, gdyż poprzez dostęp do prawie wszystkich rodzajów tkanek ludzkich możliwa jest poszerzona analiza procesów zachodzących w narządach i tkankach, w tym w komórkach nowotworowych [65]. Należy jednak pamiętać o postępujących procesach pośmiertnych w preparatach tkankowych *post-mortem*, które mogą prowadzić do zmian fenotypu pobranych tkanek, m.in. ich morfologii lub składu chemicznego. W konsekwencji może to doprowadzić do niewłaściwej interpretacji przez histopatologa zmian chorobowych zachodzących na poziomie poszczególnych tkanek i komórek.

Przybliżone powyżej zagadnienie zmian zachodzących w strukturach biologicznych związane z procesami pośmiertnymi podkreśla konieczność dokładnej charakterystyki tych zmian. W celu analizy tego zagadnienia za pomocą wieloparametrycznych technik histologicznych [H6] przeprowadzono molekularne fenotypowanie próbek kontrolnych i *post-mortem* błony śluzowej jelita grubego i tkanki limfoidalnej GALT związanej z jelitem (z ang. *Gut-Associated Lymphoid Tissue*). Pobranie próbek od pacjentów, przygotowanie preparatów tkankowych, rejestracja wysokorozdzielczych obrazów preparatów za pomocą skanera histologicznego, jak również wykrycie obecności komórek zapalnych za pomocą technik immunohistochemicznych zostało zrealizowane przez zespół pracowników Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z Zakładu Histologii i Embriologii, Zakładu Medycyny Sądowej oraz Kliniki Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej. Natomiast parametry molekularne preparatów tkankowych od wszystkich pacjentów zostały ocenione za pomocą pomiarów spektroskopii Ramana (z ang. *Raman Spectroscopy*) i spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (z ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) w grupie dr hab. Kamilli Małek prof. UJ z Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

W ramach tych badań przeprowadziłem eksperyment weryfikujący postawioną przeze mnie tezę o możliwości wykorzystania DHT oraz 3D rozkładu RI do fenotypowania preparatów tkankowych (kontrolnych / *post-mortem*) błony śluzowej jelita grubego i tkanki limfoidalnej. Ponadto opracowałem metodologię pomiarów i analizy uzyskanych rozkładów 3D-RI, jak również zaplanowałem i wykonałem niezbędne prace badawcze związane z metodą DHT. Pomiary przeprowadziłem na holotomografii 3D Cell-Explorer (Nanolive). Dokonałem numerycznej rekonstrukcji

3D rozkładów RI za pomocą oprogramowania STEVE (Nanolive) i przeprowadziłem cyfrowe barwienie danych struktur tkankowych na podstawie wartości ich RI. Dane w postaci 3D rozkładu RI przeanalizowałem ilościowo z wykorzystaniem dedykowanych algorytmów, które opracowałem w środowisku MATLAB (MathWorks). W celu zbadania istotności statystycznej zmian uśrednionych wartości RI struktur tkankowych przeprowadziłem jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA, poziom istotności: 0,05).

Uzyskane przeze mnie wyniki wykazały, że opierając się na wartościach RI poszczególnych struktur tkankowych możliwe jest przeprowadzenie cyfrowego wybarwienia tych struktur, co pozwala na ich wizualizację oraz strukturalną analizę porównawczą w całkowicie nieniszczący sposób (bez chemicznego wybarwienia). W przypadku próbki kontrolnej (od żywego, zdrowego pacjenta) możliwe było wyróżnienie charakterystycznej struktury przestrzennej gruczołów jelita grubego z komórkami Gobleta ograniczonymi błoną śluzową i światłem naczyń w badanych miejscach. Jednak w przypadku próbek pośmiertnych struktura przestrzenna gruczołów okrężnicy była zaburzona i pojawiały się nieciągłości, co wskazuje na postępujące procesy pośmiertne oraz rozkład komórkowy. Wartość RI wewnątrz komórek Gobleta była zbliżona do RI otaczającego medium (1,3341), co wskazuje, że krypty jelitowe były pozbawione komponenty organicznej, a preparatyka przygotowania próbki przyczyniła się do wypłukania ich zawartości. Co więcej, w przypadku zdrowej kontroli komórki odpornościowe znajdowały się głównie w błonie śluzowej i tkance łącznej, natomiast w przypadku próbek pośmiertnych były one obecne w świetle naczyń lub tkance łącznej (patrz [Rys. 3](#)).



Rys. 3 Przykładowe wyniki cyfrowego barwienia tkanek *post-mortem* demonstrujące komórki z okrągłymi i owalnymi jądrami o morfologii podobnej do limfocytów, które są obecne w świetle naczyń i tkance łącznej (jądra komórkowe zaznaczone na fioletowo; zidentyfikowane jako komórki odpornościowe) (na podstawie [H6]).

Oznacza to, iż pomiędzy próbkami kontrolnymi i *post-mortem* występowały różnice strukturalne związane z postępującymi procesami pośmiertnymi, które udało się wykazać jedynie w oparciu o zmiany wartości RI związane z lokalną zmiennością gęstości struktur tkankowych. Wyniki te potwierdzają, iż technika DHT może być wykorzystana do obrazowania 3D i porównawczej analizy strukturalnej preparatów tkankowych w analogiczny sposób jak klasyczna mikroskopia optyczna, ale bez

konieczności chemicznego wybarwienia lub fluorescencyjnego znakowania struktur tkankowych.

Przechodząc do wyników przeprowadzonej przez mnie ilościowej analizy zauważono, że średnie wartości 3D-RI badanych struktur tkankowych różniły się statystycznie istotnie (ANOVA, $p < 0.05$) pomiędzy tkanką łączną, komórkami zapalnymi, oraz wnętrzem komórek Gobleta, co sugeruje zmiany gęstości oraz składu chemicznego tych struktur. Wynik ten potwierdza, że DHT może mieć zastosowanie w różnicowaniu histopatologicznym z wysoką biologiczną specyficznością. Najwyższe wartości średnie RI uzyskano dla komórek zapalnych, a mniejsze dla tkanki łącznej i wnętrza komórek Gobleta, co wskazywało na wysoką dokładność różnicowania tych struktur przez DHT. Ponadto wartości średnie RI danych struktur tkankowych miały wyższe wartości dla próbek pośmiertnych niż kontrolnych sugerując istnienie różnic w 3D rozkładzie gęstości tych struktur. Może to być związane z postępującym procesem ich dehydratacji [66] wywołanej procesami pośmiertnymi, który prowadzi do zwiększenia gęstości struktur oraz wzrostu ich RI, jak zaznaczono w publikacji [H6].

Głównym osiągnięciem przeprowadzonego eksperymentu było potwierdzenie tezy o możliwości wykorzystania DHT do porównawczego fenotypowania preparatów tkankowych w celu histopatologicznego różnicowania ich wybranych struktur tkankowych. Potwierdziłem, iż pomiędzy próbkami kontrolnymi i post-mortem występowały statystycznie istotne różnice w morfologii, jednorodności strukturalnej oraz gęstości badanych struktur tkankowych, które zostały uwidocznione dzięki uzyskanym techniką DHT wzorcom RI. Otrzymane wyniki potwierdzają, że przestrzenny rozkład RI może być istotnym wzorcem fenotypowym pozwalającym na charakteryzację strukturalną preparatów oraz zachodzących w nich procesów, w tym przypadku pośmiertnych. W literaturze naukowej dotąd nie było doniesień na temat różnicowania tkanek post-mortem i tkanek kontrolnych pacjentów za pomocą 3D rozkładów RI, zatem zrealizowane badania stanowią nowy wkład w rozwój wiedzy na temat zmian fenotypowych tkanek związanych z procesami pośmiertnymi. Wyniki przedstawione w [H6] stanowią istotny wkład w rozwój patologii cyfrowej dzięki możliwości wykorzystania zrekonstruowanych numerycznie wzorców RI uzyskanych za pomocą DHT w beznacznikowy, całkowicie nieniszczący i bezkontaktowy sposób, co może zostać wykorzystane w laboratoriach patomorfologicznych.

3.4.2 Wieloparametryczne fenotypowanie komórek i struktur komórkowych [H7]

Fenotypowanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych EVs (z ang. *Extracellular Vesicles*) zdobywa w ostatnich latach coraz większe zainteresowanie ze względu na ich potencjalne wykorzystanie w diagnostyce i terapii. W skrócie EVsy to struktury ograniczone warstwą lipidową, które w procesie egzocytozy są naturalnie uwalniane z komórki, ale w przeciwieństwie do niej nie mogą się replikować. Ich zawartość może składać się z białek, kwasów nukleinowych, lipidów, metabolitów, a nawet organelli komórki macierzystej, co może informować o różnych procesach fizjologicznych

i patologicznych zachodzących wewnątrz komórek [67]. Unikatowe właściwości EVsów, m.in. ich różna biogeneza, odmienne funkcje biologiczne, morfometria, różny skład ich zawartości itp. sprawiają, iż rozważane są one jako potencjalne biomarkery chorób lub nośniki leków np. w terapii antynowotworowej [68], [69]. Potwierdzenie możliwości fenotypowania struktur tkankowych opisane w sekcji 3.4.1 ([H6]) skłoniło mnie do dalszych badań nad możliwością scharakteryzowania również komórek eukariotycznych oraz ich struktur komórkowych za pomocą DHT. W związku z tym zdecydowałem się na przeprowadzenie eksperymentu opisanego w [H7], który polegał na weryfikacji tezy o możliwości wykorzystania wzorców RI (3D rozkładów RI) i wzorców pochodnych (np. rozkładu rozmiarów, suchej masy, gęstości suchej masy) uzyskanych dzięki DHT do wieloparametrycznego różnicowania EVsów. W literaturze naukowej nie było dotąd pory doniesień dotyczących bezpośredniego pomiaru RI EVsów, gdyż dotąd powszechnie stosowano jedynie metodę pośredniego pomiaru RI tzw. NTA (z ang. *Nanoparticles Tracking Analysis*)[70].

W celu realizacji prac badawczych opisanych w [H7] opracowałem metodologię pomiarów holotomograficznych oraz analizy uzyskanych danych RI. Dzięki zainicjowanej współpracy z Zakładem Histologii i Embriologii Katedry Morfologii i Embriologii Człowieka oraz Zakładem Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu możliwe było pozyskanie próbek, izolacja EVsów oraz ich charakterystyka za pomocą technik immunohistochemicznych, immunofluorescencyjnych oraz Western-blot. Z kolei badania na skaningowej mikroskopii elektronowej zostały zrealizowane we współpracy z Pracownią Mikroskopii Elektronowej Instytutu Nauk Geologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego.

EVsy pozyskano za pomocą różnych technik ich izolacji z osocza, tkanek, jak również z linii komórkowych pobranych od pacjentów, u których zdiagnozowano raka jelita grubego CRC (z ang. *Colorectal Cancer*) lub wrzodziejące zapalenie jelita grubego UC (z ang. *Ulcerative Colitis*). EVsy te zostały przeze mnie przebadane za pomocą holotomografu 3D Cell-Explorer (Nanolive). Numeryczną rekonstrukcję 3D rozkładów RI i cyfrowe wybarwienie EVsów przeprowadziłem za pomocą oprogramowania STEVE (Nanolive). Następnie dane RI w postaci 3D rozkładów RI przeanalizowałem ilościowo z wykorzystaniem opracowanych przeze mnie algorytmów numerycznych w środowisku MATLAB (MathWorks). Również w tym środowisku przeprowadziłem analizę statystyczną obejmującą: weryfikację występowania statystycznie istotnych różnic pomiędzy średnimi wartościami RI EVsów z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA, poziom istotności: 0,05). Oprogramowanie ImageJ w wersji 1 53i41 (NIH z ang. *National Institutes of Health*) posłużyło mi w celu charakteryzacji rozmiarów przestrzennych EVsów z cyfrowo wybarwionych 3D rozkładów RI (tomogramów 3D-RI), ich automatycznego zliczania i określenia ich średnicy.

Uzyskane przeze mnie wyniki sugerują, że we wszystkich rodzajach próbek EVsów można wyznaczyć dwie frakcje EVsów o większej lub mniejszej wartości średniej RI,

co świadczyć może o różnej gęstości i składzie chemicznym ich zawartości. Ponadto wykazano różnice w wartościach średnich RI EVsów wyizolowanych z osocza pacjentów z CRC oraz UC, również świadczące o różnej gęstości i składzie chemicznym zawartości EVsów, co zostało potwierdzone za pomocą techniki spektrometrii dyspersyjnej energii EDS (z ang. *Energy Dispersive Spectrometry*). Wynik ten sugeruje potencjalną możliwość wykorzystania DHT do różnicowania EVsów w celach diagnostycznych. Jednakże istotnym czynnikiem wpływającym na wartość RI EVsów jest sposób ich izolacji. Preparatyka izolacji EVs, m.in. wykorzystanie komercyjnych zestawów odczynników (ExoQuick i TEIK) lub ultrawierowanie, w statystycznie istotny sposób [ANOVA, (Prob>F)<0,05] wpływa na wartości średnie RI EVsów. Oznacza to, iż sam sposób przygotowania próbek może wpływać na gęstość i skład chemiczny zawartości EVsów. Również analiza otrzymanych rozkładów średnic EVsów uzyskanych na podstawie danych RI wskazuje, że procedura izolacji EVsów determinuje obecność w próbce subpopulacji EVsów o danych rozmiarach przestrzennych. Oznacza to, iż w przypadku chęci wykorzystania EVsów jako biomarkerów patogenezы w oparciu o ich 3D rozkłady RI konieczna jest standaryzacja procedur ich izolacji w celu uzyskania porównywalnych wyników.

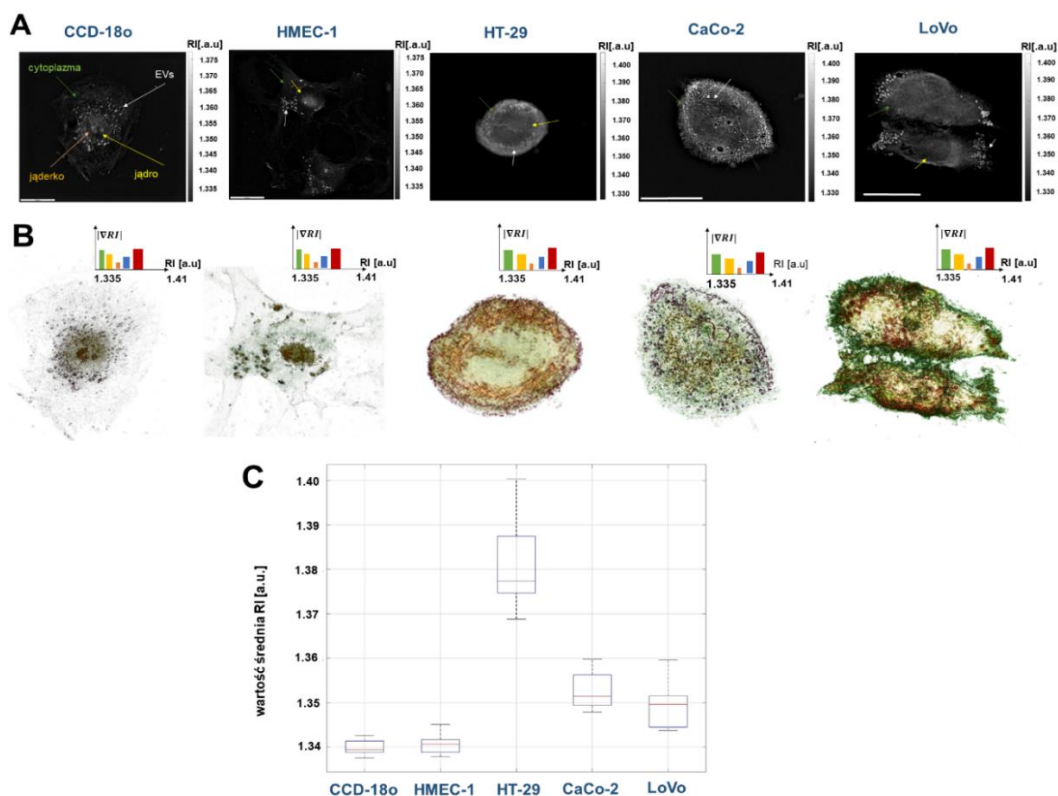
Wyniki charakteryzacji za pomocą DHT EVsów wyizolowanych bezpośrednio z próbek tkanki lityj gruczolaka jelita grubego o różnym stopniu złośliwości histologicznej wykazały, że wartości średnie RI obu frakcji EVs o wyższym i niższym RI rosną wraz ze wzrostem stopnia złośliwości w zależności od rozpoznania histopatologicznego. Ponadto rośnie również gęstość EVsów, a tym samym wartość ich suchej masy wyznaczonej na podstawie 3D rozkładów RI, chociaż wzrost ten jest bardziej zauważalny w przypadku frakcji EVsów o wyższym RI. Wyniki te potwierdzają związek pomiędzy wzrostem suchej masy EVsów i ich gęstością a wzrostem stopnia złośliwości. Może to oznaczać, że zmiana wartości 3D-RI związana jest ze zmianą składu chemicznego zawartości EVsów zależną od stopnia złośliwości, co stwarza możliwość wykorzystania wzorców RI do różnicowania stopnia złośliwości nowotworów.

Przebadanie EVsów wyizolowanych z tkanek wykazujących różną aktywność proliferacyjną pozwoliło na wykazanie związku pomiędzy wartościami średnimi RI wyizolowanych EVsów a proliferacją komórek nowotworowych. Uzyskane wyniki świadczą o tym, iż zwiększona proliferacja prowadzi do wzrostu wartości średniej RI EVsów związanego ze zmianami gęstości ich zawartości. Najbardziej znaczący wzrost RI zaobserwowano dla frakcji EVsów o wysokim RI. Z kolei zwiększona proliferacja spowodowała wzrost wartości suchej masy EVsów, co zaobserwowano dla obu frakcji EVsów o wysokim i niskim RI, choć bardziej znaczące statystycznie różnice odnotowano ponownie dla EVsów o wysokim RI. Dodatkowo wyższa proliferacja komórek nowotworowych prowadziła do wzrostu odsetka EVsów o gęstszej zawartości, czyli większej liczebności populacji EVsów o większej wartości RI, co sugeruje wpływ proliferacji na skład chemiczny zawartości EVsów i możliwość charakteryzacji proliferacji za pomocą wyznaczonych wzorców RI.

Ostatnim etapem tego eksperymentu była charakterystyka EVsów izolowanych bezpośrednio z ludzkich linii komórkowych, takich jak:

- HT-29 (gruczolakoraka, stopień złośliwości 1),
- CaCo-2 (gruczolakoraka, stopień złośliwości 2),
- LoVo (gruczolakoraka, Dukesa typu C, stopień złośliwości 4, przerzut),
- CCD-18Co (prawidłowego nabłonka jelita grubego),
- HMEC-1 (komórek śródbłonna mikronaczyń),

jak również charakterystyka 3D rozkładu RI samych komórek. W przypadku komórek nienowotworowych (CCD-18Co, HMEC-1) na podstawie uzyskanych rozkładów 3D-RI, po ich cyfrowym wybarwieniu, możliwe było rozróżnienie podstawowych struktur komórkowych (cytoplazmy, jądra, jąderka) i wewnątrzkomórkowych, kolistych struktur odpowiadających EVsom (patrz [Rys. 4](#)).



Rys. 4 (A) Przykładowe tomogramy 2D-RI komórek, (B) tomogramy 3D-RI cyfrowo wybarwione (zielony-cytoplazma, żółty-jądro, pomarańczowy-jąderko, niebieski-subpopulacja struktur pęcherzykowych o niskim RI, czerwony-subpopulacja struktur pęcherzykowych o niskim R), (C) zmiany wartości średniej RI komórek poszczególnych linii komórkowych (na podstawie [H7]).

W przypadku komórek nowotworowych (HT-29, CaCo-2, LoVo) wyodrębnienie jądra i jąderka było utrudnione ze względu na stosunkowo niewielkie rozmiary tych komórek, co prowadziło do dużego nagromadzenia organelli wewnątrzkomórkowych. W konsekwencji ograniczało to kontrast wizualizowanych komórek opierający się bezpośrednio na wartości RI. Nadal jednak możliwe było wyodrębnienie EVsów, które wykazywały znacznie wyższe wartości RI niż pozostałe

struktury komórkowe. Uzyskane wyniki wykazały, że dla kontrolnych linii komórkowych (CCD-18Co, HMEC-1) ich średnie wartości RI były do siebie zbliżone, podczas gdy dla komórek nowotworowych były wyższe (szczególnie dla HT-29). Analiza statystyczna potwierdziła obecność statystycznie istotnych różnic pomiędzy wartościami średnimi RI komórek kontrolnych (zdrowych) i komórek nowotworowych (ANOVA, $\text{Prob}>F = 1,208 \cdot 10^{-7}$). W przypadku EVsów wykazano, że istnieją statystycznie istotne różnice pomiędzy EVsami wyizolowanymi z komórek kontrolnych i z komórek nowotworowych. Większe różnice zaobserwowano dla frakcji EVsów o wyższym RI (ANOVA, $\text{Prob}>F = 1,6063 \cdot 10^{-20}$) niż frakcji EVsów o niskim RI (ANOVA, $\text{Prob}>F = 6,18034 \cdot 10^{-12}$). Również w tym przypadku rozkłady średnic EVsów wyizolowanych z poszczególnych linii komórkowych (kontrolnych / nowotworowych) wykazały różnice, szczególnie w przypadku frakcji EVsów o wyższych wartościach RI.

Najważniejszym osiągnięciem zrealizowanych prac badawczych w ramach [H7] było potwierdzenie tezy o możliwość wykorzystania techniki DHT do fenotypowania EVsów, organelli komórkowych i samych komórek w oparciu o 3D rozkłady RI w całkowicie nieniszczący i bezkontaktowy sposób. Jednakże warunkiem koniecznym pozwalającym na skuteczną i powtarzalną charakteryzację EVsów jest standaryzacja procedur ich izolacji. Zrekonstruowane po raz pierwszy dzięki DHT wzorce fenotypowe RI (3D rozkłady RI) oraz wzorce pochodne (rozkład rozmiarów, sucha masa, objętość) pozwalają na wieloparametryczną, ilościową charakteryzację i różnicowanie EVsów wyizolowanych z osocza, komórek lub tkanek w oparciu o wzorce RI, suchej masy oraz morfometryczne (rozkłady rozmiarów EVsów). Warto podkreślić, że wyznaczone wzorce mogą zostać potencjalnie wykorzystane do różnicowania stanów chorobowych, oceny stopnia złośliwości nowotworu lub też oceny aktywności proliferacyjnej komórek nowotworowych w całkowicie bezznanikowy, nieniszczący sposób. Biorąc pod uwagę fakt, iż dotąd nie analizowano w literaturze wykorzystania wzorców RI do charakteryzacji EVsów, uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w rozwój potencjalnych metod diagnostycznych opartych na fenotypowaniu EVsów stanowiąc alternatywę do konwencjonalnych technik: mikroskopii elektronowej, cytometrii przepływowej oraz analizy śledzenia nanocząstek.

3.5 Wieloparametryczne fenotypowanie zmian zachodzących w komórkach [H9]

Większość chorób jest wynikiem deregulacji procesów komórkowych, ale powiązania między defektami genetycznymi/epigenetycznymi, leżącymi u podstaw sieci interakcji molekularnych, i fenotypami chorób, są słabo poznane [71], [72]. Dlatego też zrozumienie procesów chorobowych na poziomie komórkowym może stać się kluczem do odkrycia przyczyn wielu chorób. Niestety zrozumienie fenotypów chorób i patofizjologii komórkowej pozostaje niekompletne i jest utrudnione przez ograniczone właściwości tradycyjnych technik obrazowania. Należą do nich niszczący charakter badania (np. konieczność barwienia, znakowania,

utrwalania), brak możliwości pozyskania ilościowej informacji w przypadku metod stricte jakościowych (np. mikroskopia kontrastu fazowego, jasnego pola), czy też ograniczona rozdzielczość (w przypadku konwencjonalnej mikroskopii optycznej minimalny rozmiar badanej struktury to połowa długości fali stosowanego promieniowania). Opracowywanie i testowanie nowych rozwiązań terapeutycznych (np. fizykoterapia) lub farmakoterapeutycznych również wymagają konieczności charakterystyki i wglądu w przebieg różnego rodzaju zmian komórkowych indukowanych przez czynniki zewnętrzne.

W ostatnich latach ilościowe obrazowanie fazowe z wykorzystaniem DHT odgrywa coraz większą rolę w badaniach biomedycznych oferując znaczące usprawnienia w badaniach pojedynczych komórek. Pozwala to na połączenie zalet konwencjonalnych metod obrazowania (mikroskopia fazowa, konfokalna i fluorescencyjna) z niedestrukcyjnym, bezznacznikowym 3D obrazowaniem, niższą fototoksycznością i brakiem fotowybielenia [59]. Poprzednie wyniki moich prac badawczych opisanych w sekcji 3.4.1 ([H6]) wykazały, iż DHT pozwala na fenotypowanie nie tylko struktur tkankowych, ale również zachodzących w nich zmian wywołanych procesami pośmiertnymi. Dlatego też postanowiłem sprawdzić możliwość wykorzystania techniki DHT do charakteryzacji zmian zachodzących na poziomie komórkowym. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań po raz pierwszy wykazały, że w przypadku pojedynczych komórek bakterii technika DHT pozwala na charakterystykę m.in.: procesu podziału komórek bakterii, efektywności akumulacji w nich fotouczulaczy wykorzystywanych w antybakteryjnej terapii fotodynamicznej oraz rozróżnienie komórek fotoinaktywowanych i komórek zdolnych do podziału na podstawie wzorców fenotypowych uzyskanych dzięki DHT ([A4] w sekcji 2.2 w Wykazie osiągnięć). Ponadto, badania na komórkach eukariotycznych (zdrowych, nowotworowych) z wykorzystaniem DHT również wykazały, że możliwa jest ilościowo charakterystyka zmian zachodzących w obu grupach komórek indukowanych przez stres oksydacyjny. Zrekonstruowane wzorce opierające się na 3D rozkładach RI pozwoliły na wykazanie zmian zachodzących nie tylko w morfologii komórek, ale również w gęstości i wartości RI organelli komórkowych (cytoplazmy, jąder, struktur pęcherzykowych) wywołanych hipoksją ([A1] w sekcji 2.2 w Wykazie osiągnięć). Również w tym przypadku było to pierwsze doniesienie o możliwości charakterystyki stresu oksydacyjnego za pomocą DHT.

W związku z tym zdecydowałem się na przeprowadzenie eksperymentu potwierdzającego tezę o możliwości wykorzystania informacji o 3D rozkładzie RI w charakteryzacji zmian zachodzących w komórkach glejaka wielopostaciowego indukowanych przez różne stężenia inhibitora białka CHI3L1(YKL-40) [H9].

Glejak wielopostaciowy (z ang. *glioblastoma multiforme*) jest jednym z najbardziej agresywnych nowotworów o słabej odpowiedzi na leczenie i złych rokowaniach dla pacjentów. Jedynie 8% pacjentów przeżywa okres 5 lat od zdiagnozowania glejaka [73]. Białko CHI3L1 (YKL-40) jest jednym z białek, którego wyższy poziom ekspresji obserwowany jest w komórkach glejaka i warunkuje proces nowotworzenia.

Białko to wpływa m.in. na angiogenezę, migrację komórek, przerzuty lub też przeżywalność pacjentów [74], [75]. Oznacza to, iż inhibicja jego syntezy w komórkach glejaka może prowadzić do opracowania nowych technik terapeutycznych.

Celem opisanego w [H9]. eksperymentu była weryfikacja możliwości wykorzystania techniki DHT, uzyskanych wzorców RI i wzorców pochodnych do fenotypowania zmian zachodzących w komórkach glejaka, które zostały indukowane przez inhibitor białka CHI3L1 (YKL-40). Badania te przeprowadziłem we współpracy z pracownikami Zakładu Histologii i Embriologii, Katedry Farmakologii, Katedry Podstaw Nauk Chemicznych oraz Zakładu Badań Ultrastrukturalnych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, jak również z Katedrą i Kliniką Neurochirurgii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

W ramach wyżej wymienionych prac badawczych zbadałem wpływ zmian indukowanych przez badany inhibitor w komórkach glejaka z linii UM-87 MG na wzorce RI tych komórek oraz ich organelli. Opracowałem metodologię pomiarów i analizy danych holotomograficznych, jak również przeprowadziłem pomiary komórek glejaka (kontrolnych i poddanych działaniu różnych stężeń inhibitora G721-0282) za pomocą holotomografu 3D Cell Explorer (Nanolive). Cyfrowe barwienie komórek oraz ich organelli (cytoplazmy, jąder, kropli lipidowych) przeprowadziłem z wykorzystaniem oprogramowania STEVE (Nanolive). Analizę ilościową wartości średniej RI komórek i organelli przeprowadziłem za pomocą opracowanych przeze mnie algorytmów numerycznych w środowisku MATLAB (MathWorks). Przeprowadziłem również jednoczynnikową analizę ANOVA (poziom istotności: 0,05) potwierdzającą statystyczną istotność zmian wartości średnich RI.

Uzyskane wyniki potwierdzają, iż dzięki cyfrowemu barwieniu, jedynie w oparciu o wartości RI, możliwa jest 3D wizualizacja komórek w całkowicie nieniszczący sposób, bez konieczności ich biochemicznego wybarwienia lub znakowania. Dzięki zrekonstruowanym 3D rozkładom RI możliwa była również wizualizacja cytoplazmy, jąder, jąderek, autofagosomów i kropli lipidowych. Ich obecność i cechy morfologiczne zostały potwierdzone dzięki transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Pozwoliło to na przeprowadzenie przeze mnie charakterystyki strukturalnej komórek kontrolnych glejaka tj. wykazania obecności jąder z wieloma jąderkami, autofagosomów w postaci pęcherzyków o niskiej wartości RI oraz sferoidalnych pęcherzyków o wysokim RI (najprawdopodobniej kropli lipidowych) występujących w pobliżu jąder, gdzie zlokalizowane jest retikulum endoplazmatyczne [76]. W przypadku komórek glejaka poddanych działaniu inhibitora o największym stężeniu (100 μM) możliwe było wyróżnienie w cytoplazmie włókien o większej wartości RI, którymi mogą być włókna aktywne, sygnalizujące indukowaną przez inhibitor reorganizację cytoszkieletu komórek. Ich obecność została potwierdzona dzięki reakcjom immunofluorescencyjnym.

Wyniki przeprowadzonej przeze mnie porównawczej analizy porównawczej wykazały, iż inhibitor powoduje spadek wartości średniej RI komórek, jednakże

zakres zmian zależy od użytego stężenia inhibitora, co potwierdziła ANOVA: 100 μM ($\text{Prob}>F = 4,082\text{E}^{-19}$), 50 μM ($\text{Prob}>F = 4,275\text{E}^{-12}$), 25 μM ($\text{Prob}>F = 2,204\text{E}^{-9}$), 13,5 μM ($\text{Prob}>F = 4,313\text{E}^{-9}$). Ponadto analiza zmian wartości średniej RI organelli wykazała, iż w przypadku cytoplazmy obserwuje się znaczne zmniejszenie wartości RI dla stężenia 100 μM ($\text{Prob}>F = 1,31\text{E}^{-9}$), 50 μM ($\text{Prob}>F = 2,92\text{E}^{-8}$), 25 μM ($\text{Prob}>F = 1,35\text{E}^{-2}$). Wyniki ten sugeruje zmianę gęstości cytoplazmy związaną ze zmianą stężenia białek wewnątrzkomórkowych, w tym białek cytoszkieletowych, wywołaną przez inhibitor. W przypadku jąder, zmniejszenie wartości średniej RI było statystycznie istotne jedynie dla stężenia 100 μM ($\text{Prob}>F = 6,82\text{E}^{-9}$), natomiast w przypadku jąderek nie zaobserwowano statystycznie istotnych zmian RI dla wszystkich badanych stężeń inhibitora. W przypadku kropli lipidowych (sferoidalnych struktur pęcherzykowych o największym RI) statystycznie istotne zmiany RI, przejawiające się spadkiem wartości średniej RI, zaobserwowano jedynie dla dwóch największych stężeń inhibitora: 100 μM ($\text{Prob}>F = 7,03\text{E}^{-3}$), 50 μM ($\text{Prob}>F = 2,92\text{E}^{-8}$). Zaobserwowane zmiany wartości średniej RI poszczególnych organelli znalazły również odzwierciedlenie w zmianach ich gęstości suchej masy tj. zmniejszaniu się jej wartości w zależności od użytego stężenia inhibitora oraz analizowanej struktury. Wynik ten może świadczyć o zmianie składu chemicznego (białkowego, lipidowego) organelli indukowanej przez inhibitor. Ponadto wykazano, iż inhibitor może wpływać na objętość struktur komórkowych odpowiadających kroplom lipidowym. Im większe było użyte stężenie inhibitora, tym większa była ich objętość w komórce przy spadku gęstości, co może świadczyć o zaburzeniu gospodarki lipidowej komórek.

Najważniejszym osiągnięciem tego eksperymentu (opisanego w [H9]) jest potwierdzenie tezy o możliwości wykorzystania DHT i uzyskanych wzorców do wieloparametrycznego fenotypowania zmian zachodzących wewnątrz komórek glejaka indukowanych przez zastosowany środek farmakologiczny (inhibitor białka CHI3L1). Po raz pierwszy wykazano, że zachodzące w komórkach procesy indukowane przez inhibitor wpływały na zmianę wyznaczonych wzorców (RI, morfologii, suchej masy, objętości, gęstości) nie tylko komórki, ale również poszczególnych organelli. Uzyskane wyniki wskazują, iż DHT może zostać potencjalnie wykorzystana jako alternatywna, nieniszcząca, bezkontaktowa i bezznacznikowa metoda charakteryzacji wpływu środków farmakologicznych na procesy zachodzące w komórkach, co może przyczynić się do rozwoju technik farmakoterapeutycznych. Warto zaznaczyć, że technika DHT może mieć szczególne znaczenie w przypadku badań dotyczących nowych substancji o potencjalnie klinicznym znaczeniu, nie tylko z uwagi na szybkość pomiarów, ale przede wszystkim ze względu na możliwość oceny zmian w strukturze komórek, dla których nie ma porównywalnych, klasycznie stosowanych technik badawczych. Jednoczesna analiza zmian w poszczególnych organellach komórki pod wpływem badanego związku ma istotne znaczenie w ocenie działania nowych substancji i określeniu mechanizmów, które mogą leżeć u podstaw nowych strategii terapeutycznych, między innymi ukierunkowanych na szeroko pojęte działanie przeciwnowotworowe.

3.6 Podsumowanie

Inżynieria biomedyczna wykorzystuje zasady inżynierii optycznej, elektrycznej, chemicznej, materiałowej, informatycznej, bądź też mechanicznej, w celu lepszego zrozumienia, modyfikacji lub kontroli systemów biologicznych [77]. Należy jednak podkreślić, że jednym z głównych czynników determinujących rozwój inżynierii biomedycznej jest postęp w opracowywaniu nowych technik pomiarowych pozwalających na dokładne scharakteryzowanie właściwości (np. morfologicznych, biologicznych, fizycznych, chemicznych) danych obiektów biologicznych, zrozumienie mechanizmu ich funkcjonowania oraz zachodzących w nich zmian i procesów biologicznych, biofizycznych lub biochemicznych. Osiągnięcie tych celów możliwe jest jedynie dzięki opracowywaniu nowych technik pomiarowych umożliwiających kompleksowy, wieloparametryczny opis cech / właściwości różnego rodzaju obiektów biologicznych, czyli ich fenotypowanie.

W niniejszym autoreferacie przedstawiłem moje osiągnięcie naukowe dotyczące badań nad opracowaniem i wykorzystaniem nowych technik wieloparametrycznego fenotypowania różnego rodzaju obiektów biologicznych, jak również zachodzących w nich zmian. Schematyczne przedstawienie tego osiągnięcia przyczyniającego się do rozwoju inżynierii biomedycznej zostało przedstawione na **Rys. 5**.



Rys. 5 Schemat zaproponowanego przeze mnie rozwoju inżynierii biomedycznej poprzez wieloparametryczne fenotypowanie obiektów biologicznych i zachodzących w nich zmian.

Szczegółowe zestawienie głównych osiągnięć przyczyniających się do rozwoju dyscypliny inżynierii biomedycznej przedstawiłem również w formie tabelarycznej poniżej:

Rozwój dyscypliny Inżynieria Biomedyczna w zakresie nowych metod diagnostycznych	
<i>Osiągnięcia szczegółowe</i>	<i>Publikacje [H]/ Patenty (T)</i>
3.3 Wieloparametryczne fenotypowanie bakterii	
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Zaproponowanie nowej, bezkontaktowej, nieniszczącej metody holograficznego fenotypowania morfologii kolonii bakterii i ich właściwości ogniskujących.</i> • <i>Zaproponowanie nowej, bezkontaktowej i nieniszczącej metody holograficznej multiplikacji cyfrowych wzorców fenotypowych kolonii bakterii.</i> • <i>Zaproponowanie nowego, osiowego układu holografii cyfrowej do charakteryzacji i identyfikacji kolonii bakterii.</i> 	<p>[H1], [H2] [T6] w Wykazie osiągnięć: patent PL</p>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Zaproponowanie metod standaryzacji warunków pomiarowych w celu wyodrębnienia wzorców kolonii bakterii o największym potencjale predykcyjnym.</i> • <i>Zaproponowanie nowej, bezkontaktowej, nieniszczącej metody dyfraktometrycznego fenotypowania kolonii bakterii w celu ich różnicowania.</i> • <i>Zaproponowanie nowego, wielokanałowego układu dyfraktometrycznego do identyfikacji bakterii.</i> 	<p>[H4] [T4, T5] w Wykazie osiągnięć: patent PL, patent UK, patent Hiszpania</p>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Zaproponowanie nowego sposobu ekstrakcji i selekcji cech klasyfikacyjnych widm dyfrakcyjnych użytych w modelach klasyfikacyjnych umożliwiających skuteczną identyfikację bakterii na poziomie szczepów tego samego gatunku bakterii.</i> • <i>Zaproponowanie nowej metody identyfikacji bakterii glebowych.</i> • <i>Zaproponowanie nowego układu i metody do monochromatycznego, dyfrakcyjnego i transmisyjnego fenotypowe kolonii.</i> 	<p>[H3]</p>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Zaproponowanie nowego, wielokanałowego układu i metody wieloparametrycznego fenotypowania kolonii bakterii i ich identyfikacji dzięki profilometrii interferometrycznej, multispektralnej dyfraktometrii oraz multispektralnemu obrazowaniu .</i> 	<p>[H5]</p>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Zaproponowanie nowych, bezkontaktowych i bezznacznikowych metod fenotypowania dynamiki rozwoju biofilmów bakteryjnych bezpośrednio na powierzchniach za pomocą techniki sondy skanującej Kelvina, mikrospektroskopii w podczerwieni oraz cyfrowej tomografii holograficznej.</i> • <i>Zaproponowanie bezkontaktowych metod oceny ocenę żywotności komórek bakterii.</i> 	<p>[H8]</p>
3.4 Wieloparametryczne fenotypowanie organelli, komórek i tkanek	
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Zaproponowanie nowej, nieniszczącej, bezznacznikowej metody fenotypowania tkanek oraz zmian zachodzących w strukturach tkankowych indukowanych przez procesy pośmiertne.</i> • <i>Zaproponowanie nowej metody porównawczej analizy preparatów tkankowych pobranych od żywego pacjenta i pobranych pośmiertnie .</i> 	<p>[H6]</p>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Zaproponowanie nowej, nieniszczącej, bezkontaktowej i bezznacznikowej metody fenotypowanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.</i> • <i>Zaproponowanie nowej metody fenotypowania komórek nowotworowych i zdrowych w oparciu o rozkład przestrzenny współczynnika załamania światła,</i> 	<p>[H7]</p>

-
- Wykazanie związku pomiędzy wartościami współczynnika załamania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych a proliferacją komórek nowotworowych.
 - Wykazanie związku pomiędzy wartościami współczynnika załamania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych a różnym stopniem złośliwości histologicznej gruczolakoraków jelita grubego.
-

3.5 Wieloparametryczne metody fenotypowanie zmian zachodzących w komórkach

- Zaproponowanie nowej, nieniszczącej, bezkontaktowej i bezznacznikowej metody optycznego fenotypowania wpływu inhibitora białka CHI3L1(YKL-40) na komórki glejaka wielopostaciowego i ich organelle. [H9]
 - Zaproponowanie nowej, nieniszczącej i bezkontaktowej techniki optycznego fenotypowania wpływu środków farmakologicznych na pojedyncze komórki i ich organelle.
-

W niniejszym cyklu, o łącznym współczynniku wpływu $IF= 51,672$ oraz całkowitej liczbie punktów MEiN (zgodnie z rokiem opublikowania) równej 1205 pkt.:

- w 6 jestem pierwszym autorem [H1], [H2], [H3], [H4], [H5], [H8],
- w [H7] jestem autorem równorzędnym z pierwszym autorem,
- w [H9] jestem drugim autorem,
- w [H6] jestem trzecim autorem.

W ramach przedstawionego osiągnięcia naukowego przeprowadziłem szereg autorskich prac konstrukcyjnych, aplikacyjnych, jak również opracowałem dedykowane numeryczne algorytmy przetwarzania informacji obrazowej i analizy danych. Część opracowanych przeze mnie rozwiązań została również opatentowana w kraju lub za granicą ([T4–T6] sekcja 2.3 w Wykazie osiągnięć):

- 2 patenty przyznane przez Urząd Patentowy RP (sekcja 3.3.1.2 i 3.3.2)
- 1 patent zagraniczny (Wielka Brytania, Korea Płd., Brazylia) (sekcja 3.3.2).

Zaproponowane, opracowane i zweryfikowane przeze mnie rozwiązania dotyczące fenotypowania różnych obiektów biologicznych oraz zachodzących w nich zmian mogą przyczynić się do rozwoju nowych technik diagnostycznych. Opisane prace badawcze zrealizowałem z wieloma jednostkami naukowymi, jak również z podmiotami gospodarczymi w celu komercjalizacji uzyskanych wyników badań (sekcja 4) w ramach projektów finansowanych przez NCBiR.

Zaprezentowane osiągnięcie naukowe jest motywacją moich dalszych badań naukowych nad opracowaniem nowych wielomodowych metod fenotypowania obiektów biologicznych. Obecnie prace te realizuję w ramach kierowanego przeze mnie projektu OPUS21 pt. „Multi-parametryczne fenotypowanie bakterii i formowanych przez nie struktur przestrzennych” finansowanego przez NCN (poz. 1 w sekcji 2.6 w Wykazie osiągnięć).

4 Aktywność naukowa realizowana w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej

W celu realizacji moich planów badawczych związanych z opracowaniem nowych metod fenotypowania obiektów biologicznych i zjawisk w nich zachodzących, tuż po przygotowaniu rozprawy doktorskiej (w 2012 r.) rozpocząłem współpracę z zespołem *prof. dr hab. Małgorzaty Kujawińskiej* z **Zakładu Inżynierii Fotonicznej Instytutu Mikromechaniki i Fotoniki na Wydziale Mechatroniki Politechniki Warszawskiej**. Zespół ten specjalizuje się w optycznych, polowych metodach pomiarowych ze szczególnym uwzględnieniem analizy fazy obiektów inżynierskich i biologicznych. **W tym zespole odbyłem 4-miesięczny staż naukowy w ramach stypendium stażowego Politechniki Wrocławskiej¹⁶ (2012 r.) oraz 2 krótkoterminowe wyjazdy badawcze**, w ramach których prowadziłem badania w Zakładzie Inżynierii Fotonicznej (lipiec 2013 r. i sierpień 2015 r.). Współpraca ta przyczyniła się do powstania 2 wspólnych publikacji [**H1, H2**] w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, opisujących perspektywy wykorzystania technik holograficznych w fenotypowaniu kolonii bakterii. Ponadto współpraca ta zaowocowała również otrzymaniem nagrody zespołowej JM Rektora Politechniki Warszawskiej za osiągnięcia naukowe¹⁷. Nowatorstwo i oryginalność rozwiązań opracowanych przeze mnie w ramach tej współpracy naukowej zostały potwierdzone przyznaniem przez Urząd Patentowy RP **patentu krajowego** ([**T6**] w sekcji 2.3 Dorobku). Potwierdzenie tej współpracy znajduje się w **załączniku nr 8** do wniosku.

W prowadzonych przeze mnie badania współpracuję z zespołem *prof. dr hab. Aliny Wieliczko* z **Katedry Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu** w celu realizacji prac badawczych związanych z multiplikacją wzorców fenotypowych kolonii bakterii, z walidacją nowo opracowywanych przeze mnie konfiguracji układów optycznych oraz z rozwojem antybakteryjnej terapii fotodynamicznej. Efektem tej współpracy było powstanie 7 publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, w tym 2 w ramach jednolitego tematycznie cyklu [**H3, H5**] oraz 8 spoza cyklu ([**A2, A3, A4, A5, A11, A13, A14, A18**] w sekcji 2.2

¹⁶ Program stażowy PWr „Rozwój potencjału dydaktyczno-naukowego młodej kadry akademickiej Politechniki Wrocławskiej” w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Poddziałanie 4.1.1: Wzmocnienie i rozwój potencjału dydaktycznego uczelni finansowanego ze środków Unii Europejskiej.

¹⁷ Nagroda zespołowa stopnia II za osiągnięcia naukowe dla zespołu w składzie: *prof. dr hab. inż. Małgorzata Kujawińska*, *mgr inż. Wojciech Krauze*, *mgr inż. Arkadiusz Kuś*, *mgr inż. Michał Dudek*, *mgr inż. Paulina Pura*, *dr inż. Piotr Makowski*, **dr inż. Igor Buzalewicz** za opracowanie algorytmów i zbudowanie nowatorskich w skali międzynarodowej systemów mikroskopów i tomografów holograficznych do analizy trójwymiarowego rozkładu współczynnika załamania w mikroobiektych biologicznych i inżynierskich, tworząc metody i systemy, które mogą być uznane za „state-of-the-art” w obszarze tomografii fazowej przyznana 2 października 2017 roku.

w Wykazie osiągnięć), jak również 1 rozdziału ([R6] w Wykazie osiągnięć) oraz 2 wystąpień konferencyjnych ([K1, K2, K13, K15, K16, K17, K29, K30] w sekcji 2.4 Wykazu osiągnięć) Wspólnie przeprowadzone badania nad identyfikacją bakterii z wykorzystaniem wzorców optycznych kolonii stanowiły główny nurt badań w pracy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Suchwałko, której byłem promotorem pomocniczym. Rozprawa ta została obroniona z wyróżnieniem na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej w dn. 30 czerwca 2016 r. Obecnie wraz z grupą *prof. dr hab. Aliny Wieliczko* współpracuję w ramach kierowanego przeze mnie projektu OPUS 21 finansowanego przez NCN.

Od 2009 r. współpracuję z grupą MOSAIC (Modelling, Simulation and Innovative Characterisation) kierowaną przez *prof. Tofail Syed* z **Department of Physics (Faculty of Science and Engineering, University of Limerick, Limerick, Irlandia)**. Współpraca ta rozpoczęła się w ramach wspólnie realizowanego projektu UE 7 PR pt. *Electrically Modified Biomaterials' surfaces: From Atoms to Applications* (Nr NMP4-SL-2008-212533), w którym byłem zatrudniony jako wykonawca. W ramach tej współpracy jestem współautorem jednej publikacji naukowej ([A10] w sekcji 2.2 Wykazu osiągnięć) w recenzowanym czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym oraz jednego wystąpienia konferencyjnego ([K20] w sekcji 2.4 w Wykazie osiągnięć). Jestem również współautorem metody osadzania nanocząstek na termoplastycznych polimerach, które mogą zostać wykorzystane do produkcji tekstyliów o fotoindukowanych właściwościach antybakteryjnych, na którą został przyznany **patent europejski** w 2018 r. ([T7] w sekcji 2.3 w Wykazie osiągnięć) oraz **tożsame patenty zagraniczne: w Hiszpanii** w 2018 r. i **w USA** w 2021 r. Kontynuując tę współpracę, w ramach programu stażowego Erasmus+ (**Erasmus Bilateral Exchange between the Wrocław University of Science and Technology and the University of Limerick**) w listopadzie 2016 r. odbyłem krótkoterminowy pobyt w **Department of Physics (Faculty of Science and Engineering, University of Limerick, Limerick, Irlandia)** pod opieką *prof. Tofail Syed*. W ramach tego zagranicznego wyjazdu powstały dwa rozdziały w monografii ([R3,R4] w sekcji 2.1 Wykazu osiągnięć). Ponadto wygłosiłem cykl wykładów (8 godzin) dotyczących optycznych metod diagnostycznych oraz poszerzyłem wiedzę w zakresie charakteryzacji antybakteryjnych materiałów o właściwościach fotokatalitycznych, którą wykorzystałem w swoich dalszych badaniach związanych z antybakteryjną terapią fotodynamiczną i fotoinaktywacją bakterii ([A2]-[A4] w sekcji 2.2 w Wykazie osiągnięć). Potwierdzenie tej współpracy znajduje się w **załączniku nr 8** do wniosku.

Chcąc weryfikować możliwość wykorzystania opracowanych przeze mnie technik fenotypowania kolonii bakterii w odniesieniu do próbek środowiskowych, w 2018 roku nawiązałem współpracę z zespołem *prof. dr hab. Lidii Sas-Paszt* z **Pracowni Rizosfery Zakładu Agrotechniki Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach** oraz **dr hab. Ryszardem Kozera** z **Wydziału Informatyki Stosowanej i Matematyki Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie** oraz **School of Computer Science and Software Engineering (University of Western Australia)**. W ramach tej

współpracy wykazałem możliwość zastosowania opracowanych rozwiązań do identyfikacji bakterii glebowych, a szczególnie rizobakterii promujących wzrost roślin PGPR (z ang. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). Wspólne prace badawcze zaowocowały jedną publikacją w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym [H3].

W ramach projektu pt. *Fotoaktywna formuła nanoliposomowa jako nowa strategia w terapii fotodynamicznej niestabilnej blaszki miażdżycowej* (OPUS 5, Narodowe Centrum Nauki, Nr 2013/09/B/NZ5/02764, 2014–2017, 48 miesięcy) współpracowałem z dr Dariuszem Białym i dr Magdaleną Wawrzyńską z **Katedry i Kliniki Kardiologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu**. Dzięki nawiązanej współpracy powstała publikacja w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym ([A6, A10] w sekcji 2.2 w Wykazie osiągnięć) oraz patent krajowy ([T1] w sekcji 2.3 w Wykazie osiągnięć).

Chęć zbadania możliwości wykorzystania cyfrowej tomografii holograficznej do fenotypowania komórek eukariotycznych (prawidłowych, nowotworowych), ich organelli i struktur tkankowych oraz zachodzących w nich procesów skłoniła mnie do nawiązania współpracy z zespołem prof. dr. hab. Piotra Dziegla z **Zakładu Histologii i Embriologii Katedry Morfologii i Embriologii Człowieka Uniwersytetu Medycznego (UMWr) we Wrocławiu**, z którym prowadzę wspólne prace badawcze od 2020 roku. Współpraca ta przyczyniła się do nawiązania kolejnych m.in.: z zespołem dr hab. n. med. mgr prawa Tomasz Jurek, prof. UMW z **Zakładu Medycyny Sądowej UMWr**, z dr Ireneuszem Ceremugą z **Zakładu Biochemii Lekarskiej UMWr**, z zespołem prof. dr hab. Marzeną Podhorską-Okotów z **Zakładu Badań Ultrastrukturalnych UMWr**, czy też z zespołem dr hab. Kamilli Małek prof. UJ z **Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego** w Krakowie. Efektem tej multidyscyplinarnej współpracy, którą nadal podtrzymuję, są 4 opublikowane prace naukowe w czasopismach o zasięgu międzynarodowym [H6, H7, H9] oraz [A1] w sekcji 2.2 w Wykazie osiągnięć, jak również jednego wystąpienia konferencyjnego ([K5] w sekcji 2.4 w Wykazie osiągnięć).

Koncentrując się na fenotypowaniu pojedynczych komórek bakterii, charakteryzacji interakcji komórek z fotouczulaczami oraz opracowaniu nowych rozwiązań dla antybakteryjnej terapii fotodynamicznej, w 2021 roku nawiązałem współpracę z dr Anną Matczuk z **Zakładu Mikrobiologii Katedry Patologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczy we Wrocławiu**. Wspólnie przeprowadzone prace badawcze zaowocowały 3 publikacjami naukowymi w czasopismach o zasięgu międzynarodowym ([A2-A4] w sekcji 2.2 w Wykazie osiągnięć) oraz 2 referatami ustnymi na konferencjach naukowych ([K1, K5] w sekcji 2.4 w Wykazie osiągnięć). Obecnie wraz z dr Anną Matczuk współpracuję w ramach kierowanego przeze mnie projektu OPUS 21 finansowanego przez NCN.

W celu wykorzystania techniki cyfrowej tomografii holograficznej do charakteryzacji biomateriałów z jakich wykonane są soczewek kontaktowe oraz ich oddziaływania z środkami farmakologicznymi **prowadziłem prace badawcze będąc zatrudnionym przez okres 17 miesięcy** (od listopada 2020 r. do marca 2022 r.)

w **Ośrodku Badawczo-Rozwojowym¹⁸ Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu** w zespole kierowanym przez *prof. dr. hab. Wojciecha Witkiewicza*. Projekt ten był prowadzony we współpracy z firmą LipoTech SP. ZO.O. Swoje prace przeprowadziłem będąc zatrudnionym w **projekcie nr POIR.04.01.01-00-0016/19 finansowanym przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR) w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014–2020 Działanie 4.1 – Poddziałanie 4.1.1. Wspólne przedsięwzięcie z Województwem Dolnośląskim „Dolnośląska strefa technologii biomedycznych” (poz. 2 w sekcji 2.6 w Wykazie osiągnięć)**. W ramach tego projektu, w którym byłem zatrudniony jako badacz, prowadzone były badania przemysłowe nad technologią opracowywania i wytwarzania nowych nanonśników preparatów farmakologicznych obniżających ciśnienie wewnątrzgałkowe, opartych na opatentowanych rozwiązaniach nanotechnologicznych oraz nowych, mało inwazyjnych metodach diagnostycznych do badania filmu łzowego, zmian współczynnika załamania soczewek kontaktowych oraz rozwoju biofilmów bakteryjnych. W projekcie tym prowadziłem badania nad pomiarami refraktometrycznymi / holotomograficznymi soczewek kontaktowych oraz charakterystyką zachodzących w nich zmian pod wpływem działania testowanych eksperymentalnych środków farmakologicznych. Badałem również możliwość wykorzystania holotomografii cyfrowej do oceny dynamiki rozwoju biofilmów bakteryjnych na powierzchni soczewek potraktowanych opracowanymi preparatami. Projekt zakończył się w kwietniu 2023 r., dlatego ze względu na ochronę własności intelektualnej opracowanych rozwiązań, dotychczas powstał jeden manuskrypt dotyczący nowej metody przestrzenno-rozdzielczych pomiarów współczynnika załamania miękkich soczewek kontaktowych, który został wysłany do recenzji w czasopiśmie *Biosensors & Bioelectronics*. W najbliższym czasie planowane jest przygotowanie kolejnego manuskryptu opisującego charakterystykę rozwoju biofilmów na powierzchni soczewek kontaktowych (hydrożelowych, silikonowo hydrożelowych) traktowanych i nietraktowanych badanym środkiem farmakologicznym za pomocą holotomografii cyfrowej (sekcja 3.2.4 w Wykazie osiągnięć). Potwierdzenie tej współpracy znajduje się w **załączniku nr 8** do wniosku.

Oprócz aktywności w prowadzeniu prac badawczych na innych uczelniach, moja aktywność obejmowała również prace badawczo-rozwojowe w ramach współpracy z przedsiębiorstwami / instytucjami realizującymi projekty badawczo-rozwoje (B+R) i wdrożeniowe finansowane przez NCBiR.

W 2013 roku odbyłem 6 miesięczny staż w **firmie OPTICHIP Sp. ZO.O.** (sekcja 3.2.1 Dorobku) w ramach projektu „KLUCZOWY STAŻYSTA” realizowanego przez Poznański Akademicki Inkubator Przedsiębiorczości (PAIP) w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Priorytet VIII Regionalne kadry gospodarki, Działania

¹⁸ *Ośrodek Badawczo-Rozwojowy szpitala jest liderem w działalności badawczo-rozwojowej w zakresie nauk biomedycznych w regionie Dolnego Śląska. Jest klasyfikowany przez Ministerstwo Edukacji i Nauki i obecnie posiada kategorię B+. Ocena przeprowadzona została na podstawie informacji o efektach działalności naukowej i badawczo-rozwojowej ośrodka.*

8.2 Transfer wiedzy, Poddziałania 8.2.1 Wsparcie współpracy sfery nauki i przedsiębiorstw finansowanego ze środków UE. W ramach tej współpracy zrealizowałem prace rozwojowe dotyczące dyfraktometrycznych metod identyfikacji bakterii. W ramach tego programu stażowego PAIP ukończyłem również szkolenie z zakresu komercjalizacji wiedzy, prawa własności intelektualnej oraz transferu technologii w ramach projektu prowadzonego przez dr inż. Jarosława Osiadacza z Innova Consulting (14–16.06.2013). Zdobytą wiedzę i umiejętności dotyczące ochrony własności intelektualnej i strategii transferu technologicznego wykorzystałem w swoich dalszych pracach badawczo-rozwojowych.

W 2014 r. nawiązałem współpracę z kolejnymi podmiotami gospodarczymi w celu rozwoju opracowanych przeze mnie rozwiązań technicznych (sekcja 3.2.2 w Wykazie osiągnięć). **Przez 18 miesięcy** (od lipca 2014 r. do grudnia 2015 r.) **byłem zatrudniony w firmie Synaptise S.A. w projekcie B+R nr POIG.01.04.00-02-182/13 finansowanym przez NCBiR w ramach Programu Operacyjnego Inteligentna Gospodarka 2007–2013 Działanie 1.4 Wsparcie projektów celowych. Efektem tej współpracy było przyznanie przez Urząd Patentowy RP patentu krajowego ([T4] w sekcji 2.3 w Wykazie osiągnięć) na nowe urządzenie i metodę identyfikacji mikroorganizmów, którego jestem współautorem jako pracownik firmy. Potwierdzenie tej współpracy znajduje się w załączniku nr 8 do wniosku.**

Następnie majątkowe prawa autorskie do tego rozwiązania przejęła firma Bioavlee S.A. (sekcja 3.2.3 w Wykazie osiągnięć). Łącznie **przez okres 32 miesięcy byłem zatrudniony w firmie Biovlee S.A. na umowę zlecenie jako członek zespołu B+R i CTO (z ang. Chief Technology Officer) lub członek Rady Naukowej. W tym, przez okres 12 miesięcy (od marca 2017 r. do marca 2018 r.) byłem zatrudniony w tej firmie jako członek zespołu B+R prowadzącego prace badawczo-rozwojowych w projekcie nr POIR.01.01.01-00-0536/16-00 finansowanym przez NCBiR w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014–2020 Działanie 1.1 Projekty B+R przedsiębiorstw. Efektem tej współpracy było opracowanie i skonstruowanie prototypu urządzenia do identyfikacji bakterii Avlee650TM (opartego na patencie [T4] w sekcji 2.3 Dorobku) oraz uzyskanie 3 patentów zagraniczne w Wielkiej Brytanii, Korei Południowej oraz Brazylii ([T5], sekcja 2.3 w Wykazie osiągnięć).**

Ponadto brałem udział w opracowaniu automatycznego licznika kolonii bakterii Quantica 500/500+, w którym opracowałem różne warianty konfiguracyjne układu oświetlającego. Na rozwiązanie to przyznany został **patent krajowy ([T2] w sekcji 2.3 w Wykazie osiągnięć)**. Ponadto, brałem udział w projektowaniu przenośnego inkubatora do hodowli komórkowych (Inomate 100k) i w współpracowaniu opisującego go **zgłoszenia patentowego ([T3] w sekcji 2.3 w Wykazie osiągnięć)**. W zgłoszeniach tych występuję jako współautor z ramienia firmy. W ramach tej współpracy powstała również jedna **publikacja w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowych [H4]**. Ponadto, współpraca z firmą Bioavlee przyczyniła się do

uzyskania **nagrody I stopnia** przyznanej¹⁹ przez Wrocławską Radę Federacji Stowarzyszeń Naukowo-Technicznych NOT oraz **wyróżnienia**²⁰ przyznanego przez Radę Krajową Federacji Stowarzyszeń Naukowo-Technicznych NOT. Dzięki opracowanym we współpracy ze mną rozwiązaniom technologicznym, firma Bioavlee zajęła II miejsce w konkursie start-upów „Master of Innovation” podczas Central European BIO FORUM 2016. Potwierdzenie tej współpracy znajduje się w **załączniku nr 8** do wniosku.

Podsumowując, **we współpracy z firmami (Synaptise, Bioavlee) prowadziłem prace badawczo-rozwojowo-wdrożeniowe przez okres 50 miesięcy (sumarycznie) jako ich pracownik** w tym: **przez 30 miesięcy w ramach projektów NCBiR**, natomiast przez 20 miesięcy (umowa zlecenie/umowa o dzieło).

Poniżej znajduje się tabelaryczne zestawienie instytucji naukowych, z którymi współpracowałem, oraz efektów tej współpracy (opisanych w Wykazie osiągnięć):

<i>Instytucja naukowa</i>	Publikacje z cyklu	Publikacje spoza cyklu - sekcja 2.2 w Wykazie osiągnięć	Patenty/ Zgłoszenia - sekcja 2.3 w Wykazie osiągnięć	Rozdziały - sekcja 2.1 w Wykazie osiągnięć	Wystąpienia konferencyjne - sekcja 2.4 w Wykazie osiągnięć
Uczelnie/Jednostki naukowe zagraniczne					
<i>Department of Physics Faculty of Science and Engineering, University of Limerick, Limerick, Irlandia.</i>		[A10]	[T7]: patent UE patent USA patent Hiszpania	[R3], [R4]	[K20]
Uczelnie/Jednostki naukowe krajowe					
<i>Zakład Inżynierii Fotonicznej Instytutu Mikromechaniki i Fotoniki, Wydział Mechatroniki Politechniki Warszawskiej</i>	[H1] [H2]		[T6]: patent PL		
<i>Katedra Epizootologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.</i>	[H3] [H5]	[A2], [A3], [A4], [A5], [A11], [A13], [A14], [A18]		[R6]	[K1], [K2], [K13], [K15], [K16], [K17], [K29], [K30]
<i>Katedra Patologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.</i>	[H6]	[A2], [A3], [A4]			[K1] [K5]
<i>Pracownia Rizosfery Zakładu Agrotechniki Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach,</i>	[H3]				

¹⁹ Nagroda I stopnia za wybitne osiągnięcia w dziedzinie techniki zrealizowane w roku 2016 przyznana zespołowi: dr inż. Igor Buzalewicz, prof. dr hab. inż. lek. med Halina Podbielska oraz firmie Bioavlee S.A. za „Innowacyjną metodę identyfikacji bakterii opartą na zjawisku dyfrakcji światła na koloniach bakteryjnych” przez Wrocławską Radę Federacji Stowarzyszeń Naukowo – Technicznych NOT w 2017 roku.

²⁰ Wyróżnienie w ogólnopolskim konkursie MISTRZ TECHNIKI 2016 / 2017 organizowanym przez Radę Krajową Federacji Stowarzyszeń Naukowo-Technicznych NOT przyznane zespołowi: dr inż. Igor Buzalewicz, prof. dr hab. inż. lek. med Halina Podbielska oraz firmie Bioavlee S.A. za „Innowacyjną metodę identyfikacji bakterii opartą na zjawisku dyfrakcji światła na koloniach bakteryjnych” w 2018 roku.

Wydział Informatyki Stosowanej i Matematyki Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie	[H3]				
Katedra Morfologii i Embriologii Człowieka Uniwersytetu Medycznego	[H6] [H7] [H9]	[A1]			[K5]
Zakład Badań Ultrastrukturalnych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.	[H9]	[A1]			
Zakład Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu	[H6]				
Klinika Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu	[H6]				
Katedra Farmakologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu	[H9]				
Katedra Podstaw Nauk Chemicznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu	[H9]				
Katedry i Kliniki Kardiologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu		[A6] [A10]	[T1]: patent PL		
Katedra i Klinika Neurochirurgii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.	[H9]				
Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.	[H6]				
Pracownia Mikroskopii Elektronowej Instytutu Nauk Geologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego	[H7]				
Zakład Mikrobiologii Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego	[H4]				
Firmy / instytucje naukowe prowadzące projekty finansowane przez NCBiR					
Synaptise SP. ZO.O. Bioavlee S.A.	[H4]		[T2]: patent PL [T3]: zgłoszenie międzynarod. [T4]: patent PL, [T5]: patent UK, patent Korea, zgłoszenie UE		

5 Osiągnięcia dydaktyczne, organizacyjne, popularyzujące naukę

5.1 Aktywność w przygotowaniu nowych zajęć i materiałów dydaktycznych na kierunku Inżynieria Biomedyczna

5.1.1 Studia inżynierskie (I-stopnia)

1. Zaproponowanie, przygotowanie i prowadzenie autorskich zajęć laboratoryjnych *Metody Numeryczne w Optyce Biomedycznej* (FTP002014L, wymiar: 30 godzin):
 - ✓ Opracowanie karty przedmiotu.
 - ✓ Opracowanie zakresu tematycznego kursu.
 - ✓ Opracowanie wstępów teoretycznych dla studentów (ok. 100 stron).
 - ✓ Opracowanie 9 list z zadaniami obejmujących realizowane na zajęciach skrypty w środowisku MATLAB.
2. Zaproponowanie oraz przygotowanie zajęć projektowych *Przyrządy i Układy Optyczne* (ETP001018P, wymiar: 30 godzin):
 - ✓ Opracowanie karty przedmiotu.
 - ✓ Opracowanie 20 zadań obliczeniowych i zakresu tematycznego 8 zadań projektowych do realizacji w oprogramowaniu OSLO EDU.
3. Zaproponowanie, przygotowanie i prowadzenie autorskich ćwiczeń rachunkowych *Biomedycyna Laserowa* (MDP002004C, wymiar: 15 lub 30 godzin):
 - ✓ Opracowanie karty przedmiotu.
 - ✓ Opracowanie zakresu tematycznego kursu.
 - ✓ Samodzielne opracowanie 40 autorskich zadań rachunkowych do ćwiczeń rachunkowych.
4. Przygotowanie i prowadzenie autorskich ćwiczeń rachunkowych *Optyczna Diagnostyka Medyczna* (FTP002006C, wymiar: 15 godzin):
 - ✓ Opracowanie zakresu kursu.
 - ✓ Opracowanie 20 autorskich zadań rachunkowych do ćwiczeń rachunkowych.
5. Opracowanie 6 autorskich wykładów do kursu *Optyczna Diagnostyka Medyczna* (FTP002006W, wymiar: 30 godzin) obejmujących: podstawowe zjawiska i efekty optyczne, zdolność rozdzielczą układów optycznych, metody interferometryczne, metody holograficzne, endoskopię optyczną oraz smart optics imaging.

6. Autorstwo 4 instrukcji, współautorstwo 1 instrukcji oraz konstrukcja 5 stanowisk pomiarowych na zajęcia laboratoryjne **Optyczna Diagnostyka Medyczna** (FTP002006L, wymiar: 30 godzin):
 - ✓ *Multispektralne obrazowanie tkanek w świetle spolaryzowanym (20 stron).*
 - ✓ *Spektroskopia skóry i lampa Wooda (16 stron).*
 - ✓ *Określenie stężenia barwników w roztworach wodnych za pomocą pomiarów mocy optycznej (16 stron).*
 - ✓ *Konstrukcja cyfrowego mikroskopu optycznego oraz charakteryzacja jego właściwości odwzorowujących (19 stron).*
 - ✓ *Konstrukcja interferometru Michelsona i jego wykorzystanie w pomiarach (19 stron).*

7. Autorstwo 6 instrukcji oraz konstrukcja stanowisk pomiarowych na zajęcia laboratoryjne **Konstrukcje i Pomiary Optyczne** (FTP002084L, wymiar: 30 godzin):
 - ✓ *Konstrukcja układów dwusoczewkowych i charakteryzacja ich właściwości odwzorowujących (9 stron).*
 - ✓ *Zwierciadła optyczne (płaskie/sferyczne) - charakterystyka realizowanego przez nie odwzorowania optycznego (7 stron).*
 - ✓ *Szczeliny i siatki dyfrakcyjne (8 stron).*
 - ✓ *Konstrukcja i charakterystyka spektrofotometrów wykorzystujących siatki dyfrakcyjne i pryzmaty refrakcyjne (9 stron).*
 - ✓ *Aberracje optyczne soczewek oraz ich pomiar (11 stron).*
 - ✓ *Teoria odwzorowania mikroskopowego Abbego oraz filtracja przestrzenna (20 stron).*

8. Opracowanie 3 instrukcji do autorskich ćwiczeń laboratoryjnych oraz konstrukcja 3 stanowisk pomiarowych na zajęcia laboratoryjne na zajęcia laboratoryjne z **Podstaw Biofotoniki** (FTP002003L, wymiar: 15 godzin):
 - ✓ *Charakterystyka właściwości tłumiących światło wybranych materiałów z jakich wykonane są okulary ochronne (16 stron)*
 - ✓ *Elementy fotometrii (14 stron)*
 - ✓ *Komputerowa analiza zdjęć fluorescencyjnych komórek biologicznych (12 stron.)*

Nowe autorskie kursy zgłoszone przeze mnie do planu studiów na studiach I stopnia (zatwierdzona realizacja: od 2025 r.):

9. Zaproponowanie oraz przygotowanie autorskich zajęć laboratoryjnych **Optyka Obliczeniowa** (forma: wykład i zajęcia laboratoryjne, wymiar: 15 i 30 godzin):
 - ✓ *Opracowanie karty przedmiotu.*
 - ✓ *Opracowanie zakresu tematycznego kursu.*

10. Zaproponowanie rozszerzonych zajęć laboratoryjnych **Konstrukcje i Pomiary Optyczne 2** (FTP002084L, wymiar: 60 godzin):

- ✓ Opracowanie karty przedmiotu.
- ✓ Opracowanie zakresu tematycznego 5 dodatkowych ćwiczeń laboratoryjnych.

5.1.2 Studia magisterskie (II stopnia)

11. Przygotowanie autorskiego kursu **Metody Optyczne w Diagnostyce** obejmującego wykład, projekt oraz zajęcia laboratoryjne (ETP002939W/L/P, wymiar odpowiednio: 15/15/15 godzin):

- ✓ Opracowanie karty przedmiotu.
- ✓ Opracowanie 15 wykładów obejmujących stosowane w diagnostyce medycznej techniki optyczne.
- ✓ Opracowanie tematów projektów dla studentów, które mają na celu samodzielne rozwiązanie aktualnych problemów technicznych w różnych obszarach optyki biomedycznej.
- ✓ Opracowanie zajęć laboratoryjnych utrwalających praktyczne wykorzystanie wiedzy zdobytej na wykładzie w odniesieniu do wybranych problemów pomiarowych optyki biomedycznej.

12. Zaproponowanie oraz przygotowanie autorskiego kursu **Zaawansowane Techniki Optyki Biomedycznej** obejmującego wykład (ETP002958W, wymiar: 15 godzin):

- ✓ Opracowanie karty przedmiotu.
- ✓ Opracowanie cyklu 7 wykładów omawiających współczesne trendy rozwoju technik obrazowania optycznego, ograniczenia zdolności rozdzielczej konwencjonalnych technik mikroskopii optycznej, podstawy teoretyczne uzyskania super-rozdzielczości w obrazowaniu optycznym na przykładzie m.in.: mikroskopii bliskiego pola, nanoskopii fluorescencyjnej (STED, PALM, STOMR), nanoskopii holotomograficznej, mikroskopii oświetlenia strukturalnego, mikroskopii 4pi etc.

13. Opracowanie 3 instrukcji do autorskich ćwiczeń laboratoryjnych oraz konstrukcja stanowisk pomiarowych na zajęcia laboratoryjne **Badania Mikroskopowe Biomateriałów oraz Tkanek** (ETP002907L, wymiar: 15 godzin):

- ✓ Podstawy mikroskopii optycznej (12 stron)
- ✓ Konstrukcja transmisyjnego mikroskopu optycznego (12 stron)
- ✓ Mikroskopia kontrastu fazowego oraz ciemnego pola (10 stron)

5.2 Praca na rzecz zaplecza laboratoryjnego i technicznego

1. Udział w przygotowaniu specyfikacji technicznej i/lub realizacji zakupu niezbędnych elementów optycznych i urządzeń pomiarowych do

opracowanych przeze mnie i skonstruowanych stanowisk na poniższe zajęcia laboratoryjne:

- ✓ *Optyczna Diagnostyka Medyczna* (FTP002006L, 5 stanowisk),
- ✓ *Konstrukcja i Pomiarzy Optyczne* (FTP002084L, 6 stanowisk),
- ✓ *Podstawy Biofotoniki* (FTP002003L, 2 stanowiska),
- ✓ *Badania Mikroskopowe Biomateriałów oraz Tkanek* (ETP002907L, 3 stanowiska).

2. Nadzór merytorycznych oraz coroczne przygotowanie stanowisk pomiarowych na zajęcia laboratoryjne z *Optycznej Diagnostyki Medycznej* (FTP002006L, 5 stanowisk) i *Konstrukcji i Pomiarów Optycznych 2* (FTP002084L, 6 stanowisk).
3. Przygotowanie preparatów tkankowych na zajęcia laboratoryjne z *Optycznej Diagnostyki Medycznej* (FTP002006L).
4. W 2017-2018 r. brałem udział w pracach organizacyjnych mających na celu utworzenie nowego laboratorium naukowego *Technik Pomiarowych Optyki Biomedycznej* w Katedrze Inżynierii Biomedycznej Politechniki Wrocławskiej, którego jestem obecnie kierownikiem.

5.3 Prowadzone zajęcia dydaktyczne

Poniżej znajduje się wykaz wszystkich prowadzonych przeze mnie zajęć dydaktycznych na Politechnice Wrocławskiej na kierunku Inżynieria Biomedyczna na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki po uzyskaniu stopnia doktora:

<i>Rok akademicki 2013/2014</i>		
Lp.	Nazwa kursu (W-wykład, C-ćwiczenia, L- laboratoria, P-projekt, S-seminarium)	Liczba godzin
1	Badania mikroskopowe tkanek i biomateriałów / ETP002907L	10
2	Biomedycyna laserowa / MDP002004C	45
3	Optyczne czujniki chemiczne i biosensory 1 / ETP002007P	2
4	Technologie informacyjne / INP001112L	94
5	Optyczna diagnostyka medyczna 1 / FTP002006L	45
6	Podstawy biofotoniki / FTP002003L	90
7	Praca dyplomowa inż. / FTP002013D	10
Suma (pensum 240 godzin/rok):		288
<i>Rok akademicki 2014/2015</i>		
1	Biomedycyna laserowa / MDP002013C	60
2	Optyczna diagnostyka medyczna / FTP002095L	120
3	Optyczna diagnostyka medyczna 1 / FTP002006C	30
4	Podstawy biofotoniki / FTP002003L	30
5	Praca dyplomowa inż. / FTP002080D	10
Suma (pensum 240 godzin/rok):		250

<i>Rok akademicki 2015/2016</i>		
1	Biomedycyna laserowa / MDP002013C	58
2	Metody numeryczne w optyce biomedycznej / FTP002100L	120
3	Biopomiary w nanoskali / ETP002949W	8
4	Elektronika i elektrotechnika / ETP001006L	6
5	Optyczna diagnostyka medyczna / FTP002095L	86
6	Podstawy biofotoniki / FTP002003S	22
7	Praca dyplomowa inż. / FTP002080D	30
Suma (pensum 240 godzin/rok):		330
<i>Rok akademicki 2016/2017</i>		
1	Biomateriały / MDM010147W (Z)	3
2	Biomedycyna laserowa / MDP002004C	45
3	Lasery i ich zastosowania w medycynie / FTP006353W	2
4	Medycyna fizykalna i rehabilitacja / MDP002918P	2
5	Metody numeryczne w optyce biomedycznej / FTP002100L	90
6	Optyczna diagnostyka medyczna / FTP002095L	90
7	Praca dyplomowa mgr 1 / ETP002943D	35
8	Praca dyplomowa mgr 2 / ETP002944D	15
Suma (pensum 240 godzin/rok):		287
<i>Rok akademicki 2017/2018</i>		
1	Metody numeryczne w optyce biomedycznej / FTP002100L	90
2	Biomedycyna laserowa / MDP002004C	30
3	Optyczna diagnostyka medyczna / FTP002095L	90
4	Podstawy biofotoniki / FTP002003S	30
5	Zaawansowane techniki optyki biomedycznej / ETP002958W	15
6	Praca dyplomowa inż. / FTP002080D	21
Suma (pensum 240 godzin/rok):		276
<i>Rok akademicki 2018/2019</i>		
1	Metody numeryczne w optyce biomedycznej / FTP002100L	120
2	Konstrukcje i pomiary optyczne / FTP002099L	78
3	Optyka instrumentalna / FTP002010W	3
4	Biomedycyna laserowa / MDP002004C	30
5	Optyczna diagnostyka medyczna / FTP002095L	60
6	Techniki obrazowania medycznego / MDP002014P	2
7	Zaawansowane techniki optyki biomedycznej / ETP002958W	15
8	Praca dyplomowa inż. / FTP002080D	28
9	Praca dyplomowa inż. / FTP002080D	7
Suma (pensum 240 godzin/rok):		343
<i>Rok akademicki 2019/2020</i>		
1	Konstrukcje i pomiary optyczne / FTP002099L	60
2	Metody numeryczne w optyce biomedycznej / FTP002100L	90
3	Biomedycyna laserowa / MDP002004C	15
4	Optyczna diagnostyka medyczna / FTP002095L	90
5	Zaawansowane techniki optyki biomedycznej / ETP002958W	
6	Praca dyplomowa inż. / FTP002080D	24

Suma (pensum 240 godzin/rok):		294
<i>Rok akademicki 2020/2021</i>		
1	Konstrukcje i pomiary optyczne / FTP002084L	60
2	Metody numeryczne w optyce biomedycznej / FTP002100L	90
3	Biomedycyna laserowa / MDP002004C	15
4	Optyczna diagnostyka medyczna / FTP002095L	60
5	Zaawansowane techniki optyki biomedycznej / ETP002958W	
6	Praca dyplomowa mgr 1 / ETP002943D	18
7	Praca dyplomowa mgr 2 / ETP002944D	18
Suma (pensum 225 godzin/rok):		276
<i>Rok akademicki 2021/2022</i>		
1	Konstrukcje i pomiary optyczne / FTP002084L	60
2	Metody numeryczne w optyce biomedycznej / FTP002100L	60
3	Biopomiary w nanoskali / ETP002949W	2
4	Optyczna diagnostyka medyczna / FTP001047L	30
5	Optyczna diagnostyka medyczna / FTP001047W	20
6	Zaawansowane techniki optyki biomedycznej / ETP002958W	15
7	Praca dyplomowa mgr 1 / ETP002943D	12
8	Praca dyplomowa mgr 2 / ETP002944D	12
	Praca dyplomowa / FTP002080D	16
Suma (pensum 225 godzin/rok):		227
<i>Rok akademicki 2022/2023</i>		
1	Metody numeryczne w optyce biomedycznej / FTP002100L	60
2	Optyczna diagnostyka medyczna / FTP001047W	18
3	Zaawansowane techniki optyki biomedycznej / ETP002958W	15
4	Praca dyplomowa mgr 1 / ETP002943D	6
5	Praca dyplomowa mgr 2 / ETP002944D	6
Suma (pensum 225 godzin/rok)		105
Zniżka pensum w związku z prowadzeniem projektu NCN		

W trybie ciągłym prowadzę następujące autorskie kursy (pogrubiona czcionka w tabeli powyżej):

- ✓ **Optyczna diagnostyka medyczna** – wykład i laboratorium (I stopień studiów).
- ✓ **Zaawansowane techniki optyki biomedycznej** – wykład (II stopień studiów).
- ✓ **Metody numeryczne w optyce biomedycznej** – laboratorium (I stopień studiów).
- ✓ **Konstrukcje i pomiary optyczne** – laboratorium (I stopień studiów).
- ✓ **Biomedycyna laserowa** – ćwiczenia rachunkowe (I stopień studiów).

5.4 Opieka naukowa nad doktorantami / doktorantkami

1. Promotor pomocniczy mgr inż. Agnieszki Suchwałko, Politechnika Wrocławska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Katedra Inżynierii Biomedycznej.
Dziedzina: Nauki Techniczne
Dyscyplina: Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna
Tytuł rozprawy doktorskiej: *Zastosowanie analizy statystycznej do identyfikacji bakterii na podstawie widm dyfrakcyjnych kolonii bakterii.*
Rok uzyskania stopnia naukowego doktora n. tech. z wyróżnieniem: 30 czerwca 2016 r.
2. Promotor pomocniczy mgr inż. Aleksandry Pietrowskiej, Politechnika Wrocławska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Katedra Inżynierii Biomedycznej, od października 2021 r.
Dziedzina: Nauki inżynieryjno-techniczne
Dyscyplina: Inżynieria Biomedyczna
Proponowany tytuł rozprawy doktorskiej: *Analiza skuteczności kombinowanej przeciwdrobnoustrojowej terapii fotodynamicznej z wykorzystaniem inhibitorów pomp efflux z oceną ich wpływu na proces formowania struktur bakteryjnych*

Potwierdzenia znajdują się w **załączniku nr 9** do wniosku.

5.5 Opieka naukowa nad studentami studiów inżynierskich i magisterskich na kierunku Inżynieria – wypromowane prace na stopień

5.5.1 Studia inżynierskie (I stopnia)

1. Promotor Pani Dominiki Skrzeli, Politechnika Wrocławska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 2022 r.
Kierunek: Inżynieria Biomedyczna
Tytuł pracy inżynierskiej: *Charakteryzacja wybranych komórek eukariotycznych za pomocą ilościowego obrazowania fazy.*
2. Promotor Pani Małgorzaty Bachórz, Politechnika Wrocławska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 2022 r.
Kierunek: Inżynieria Biomedyczna
Tytuł pracy inżynierskiej: *Zbadanie i charakterystyka warunków generacji efektu plamkowego w zależności od użytego źródła światła.*
3. Promotor Pana Jakuba Wojciechowskiego, Politechnika Wrocławska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 2020 r.
Kierunek: Inżynieria Biomedyczna
Tytuł pracy inżynierskiej: *Holotomograficzne obrazowanie soczewek kontaktowych.*
4. Promotor Pana Łukasza Ozimka, Politechnika Wrocławska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 2020 r.
Kierunek: Inżynieria Biomedyczna

Tytuł pracy inżynierskiej: *Klasyfikacja multi- oraz hiper-spektralnych wzorców optycznych kolonii bakterii z wykorzystaniem sieci neuronowych.*

5. Promotor Pani Agaty Bartosik, Politechnika Wroclawska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 2019 r.

Kierunek: Inżynieria Biomedyczna

Tytuł pracy inżynierskiej: *Zbadanie możliwości wykorzystania multispektralnych, dwuwymiarowych rozkładów współczynnika transmisji kolonii bakterii w charakteryzacji ich właściwości optycznych i różnicowaniu ich gatunku.*

6. Promotor Pani Joanny Kalety, Politechnika Wroclawska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 2020 r.

Kierunek: Inżynieria Biomedyczna

Tytuł pracy inżynierskiej: *Zbadanie chromatycznych właściwości ogniskowania światła przez kolonie bakterii.*

7. Promotor Pana Grzegorza Gomułki, Politechnika Wroclawska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 2019 r.

Kierunek: Inżynieria Biomedyczna

Tytuł pracy inżynierskiej: *Zbadanie możliwości rejestracji wzorców optycznych kolonii wybranych gatunków mikroorganizmów w dwuwiązkowym interferometrycznym układzie sensorycznym.*

Wyróżnienie (II miejsce) w konkursie Oddziału Wroclawskiego Stowarzyszenia Elektryków Polskich na najlepszą pracę dyplomową w roku akademickim 2018/2019 na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wroclawski.

8. Promotor Pani Katarzyny Sowińskiej, Politechnika Wroclawska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 2018 r.

Kierunek: Inżynieria Biomedyczna

Tytuł pracy inżynierskiej: *Konstrukcja i charakterystyka układu optycznego do multispektralnej diagnostyki dermatologicznej.*

9. Promotor Pani Katarzyny Dolaty, Politechnika Wroclawska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 2018 r.

Kierunek: Inżynieria Biomedyczna

Tytuł pracy inżynierskiej: *Numeryczna analiza dyfrakcji światła na koloniach bakterii.*

10. Promotor Pana Adama Maziarza, Politechnika Wroclawska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 2017 r.

Kierunek: Inżynieria Biomedyczna

Tytuł pracy inżynierskiej: *Zbadanie wpływu długości fali światła na rozkład przestrzenny widm dyfrakcyjnych kolonii bakterii w multispektralnym dyfraktometrze optycznym.*

11. Promotor Pani Marceli Raszewskiej, Politechnika Wroclawska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 2017 r.

Kierunek: Inżynieria Biomedyczna

Tytuł pracy inżynierskiej: *Wykorzystanie wybranych algorytmów numerycznej propagacji*

wiązki laserowej dla celów biomedycyny laserowej oraz ich eksperymentalna weryfikacja.

12. Promotor Pani Pauliny Wojtczak, Politechnika Wrocławska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 2016 r.

Kierunek: Inżynieria Biomedyczna

Tytuł pracy inżynierskiej: *Zbadanie wpływu rodzaju podłoża hodowlanego na widma dyfrakcyjne Fresnela kolonii wybranych gatunków bakterii.*

13. Promotor Pani Sandry Gołębiowskiej, Politechnika Wrocławska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 2016 r.

Kierunek: Inżynieria Biomedyczna

Tytuł pracy inżynierskiej: *Zbadanie wpływu sposobu inkubacji kolonii bakterii wybranych gatunków bakterii na ich widma dyfrakcyjne Fresnela.*

14. Promotor Pana Mariusza Linarda, Politechnika Wrocławska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 2016 r.

Kierunek: Inżynieria Biomedyczna

Tytuł pracy inżynierskiej: *Konstrukcja stanowiska pomiarowego oraz nowej techniki anemometrii obrazowej.*

15. Promotor Pani Natalii Norbert, Politechnika Wrocławska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 2015 r.

Kierunek: Inżynieria Biomedyczna

Tytuł pracy inżynierskiej: *Konstrukcja stanowiska pomiarowego oraz opracowanie metodologii wyznaczenia stężenia substancji absorbujących w roztworach za pomocą pomiarów gęstości optycznej.*

16. Promotor Pani Agnieszki Bombały, Politechnika Wrocławska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 2014 r.

Kierunek: Inżynieria Biomedyczna

Tytuł pracy inżynierskiej: *Jakościowa charakteryzacja właściwości amplitudowo-fazowych kolonii bakterii.*

5.5.2 Studia magisterskie (II stopnia)

1. Promotor Pani inż. Dominiki Skrzeli, Politechnika Wrocławska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 2023 r.

Kierunek: Inżynieria Biomedyczna

Tytuł pracy magisterskiej: *Optyczna charakterystyka komórek poddanych działaniu wybranych czynników zewnętrznych.*

2. Promotor Pani inż. Karoliny Majki, Politechnika Wrocławska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 2022 r.

Kierunek: Inżynieria Biomedyczna

Tytuł pracy magisterskiej: *Przetwarzanie i analiza 3D rozkładów współczynnika załamania pojedynczych komórek bakterii.*

3. Promotor Pani inż. Martyny Mospan, Politechnika Wrocławska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 2022 r.

Kierunek: Inżynieria Biomedyczna

Tytuł pracy magisterskiej: *Charakteryzacja heterogeniczności pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz ich różnicowanie za pomocą wspomaganą komputerowo analizy trójwymiarowych rozkładów współczynnika załamania światła.*

4. Promotor Pana inż. Łukasza Ozimka, Politechnika Wroclawska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 2021 r.

Kierunek: Inżynieria Biomedyczna

Tytuł pracy magisterskiej: *Zautomatyzowanie procesu przetwarzania i analizy obrazów spektralnych kolonii bakterii z wykorzystaniem sieci neuronowych.*

5. Promotor Pana inż. Mateusza Misiewicza, Politechnika Wroclawska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 2021 r.

Kierunek: Inżynieria Biomedyczna

Tytuł pracy magisterskiej: *Wyznaczenie bio-sygnatur bakterii za pomocą wybranych technik spektroskopii w podczerwieni.*

6. Promotor Pana inż. Szymona Piaska, Politechnika Wroclawska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 2017 r.

Kierunek: Inżynieria Biomedyczna

Tytuł pracy magisterskiej: *Zbadanie wpływu decentracji kolonii bakterii względem wiązki oświetlającej na cechy ilościowe rozkładu przestrzennego ich widm dyfrakcyjnych Fresnela.*

7. Promotor Pana inż. Mateusza Linarda, Politechnika Wroclawska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 2017 r.

Kierunek: Inżynieria Biomedyczna

Tytuł pracy magisterskiej: *Zbadanie wpływu wybranych czynników bakteriobójczych na zmiany morfologiczne kolonii bakterii za pomocą metod dyfrakcyjnych i mikroskopowych.*

5.6 Wspólne publikacje naukowe ze studentami/studentkami

W swojej działalności dydaktycznej zawsze staram się motywować studentów do ich rozwoju, pogłębiania wiedzy i umiejętności w ramach prowadzonych przeze mnie zajęć na kierunku Inżynieria Biomedyczna. W tym celu angażuję również studentów w moje prace badawcze, czego efektem jest kilka publikacji naukowych w recenzowanych czasopismach naukowych oraz jeden rozdział w książce.

Współpracując z Panem inż. Mateuszem Linardem, moim dyplomantem, powstała jedna publikacja naukowa w 2017 r. oraz jeden rozdział w 2018 r.:

1. **Linard M**, Buzalewicz I, Ulatowska-Jarża A, Zmiany rozkładu przestrzennego widm dyfrakcyjnych kolonii bakterii wywołanych działaniem wybranych czynników fizykochemicznych. Inżynieria Biomedyczna - Acta Bio-Optica et Informatica Medica 23(1): 1–12, 2017.

MNiSW_{2013–2018}: 12 pkt

2. Buzalewicz I, Kowal K, **Linard M**, Suchwałko AP, Podbielska H. Advances in label-free sensing of bacteria by light diffraction phenomenon. *Advances in*

optics: reviews: book series vol. 3 (ISBN: 978-84-697-9439-5), praca zbiorowa pod redakcją Sergeya Y. Yurish, Barcelona: International Frequency Sensor Association (IFSA) Publishing, 2018; s. 169–196.

Współpracując z Panem *Mateuszem Guźniczakiem* oraz Panią *Dominiką Skrzela* (moją dyplomantką) powstała jedna publikacja naukowa w 2022 r.:

3. Buzalewicz I, Hołowacz I, Matczuk AK, **Guźniczak M**, **Skrzela D**, Karwańska M, Wieliczko A, Kowal K, Ulatowska-Jarża A. Photolon nanoporous photoactive material with antibacterial activity and label-free noncontact method for free radical detection. *International Journal of Molecular Sciences* 23(1), art. 279, s. 1–20, 2022; doi:10.3390/ijms23010279

IF₂₀₂₁: 6,208, MEiN_{2019–2022}: 140 pkt

Kontynuując współpracę z Panem *inż. Mateuszem Guźniczakiem* powstała jedna publikacja naukowa w 2023 r.:

4. Pietrowska A, Hołowacz I, Ulatowska-Jarża A, **Guźniczak M**, Matczuk AK, Wieliczko A, Wolf-Baca MJ, Buzalewicz I. The enhancement of antimicrobial photodynamic therapy of *Escherichia coli* by a functionalized combination of photosensitizers: in vitro single cell study by quantitative phase imaging. *International Journal of Molecular Sciences* 23(11), art. 6137, s. 1–17, 2022; doi:10.3390/ijms23116137

IF₂₀₂₂: 6,208, MEiN_{2019–2023}: 140 pkt

Obecnie, Pan inż. Mateusz Guźniczak planuje ubiegać się o przyjęcie do Szkoły Doktorskiej Politechniki Wrocławskiej w dziedzinie: nauki inżynieryjno-techniczne i w dyscyplinie: Inżynieria Biomedyczna.

5.7 Działalność organizacyjna

1. Członek komisji programowej kierunku Inżynieria Biomedyczna na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki odpowiedzialny za program kształcenia i plan studiów na specjalność Optyka Biomedyczna (od 01.10.2022 roku).
2. Członek komitetu organizacyjnego *European Association for Predictive Preventive and Personalized Medicine World Congress* (EPMA World Congress), 20–23.09.2021 r., Wrocław, Polska.
3. Organizacja współpracy naukowej pomiędzy *Zakładem Mikrobiologii* Katedry Patologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu a *Katedrą Inżynierii Biomedycznej* Politechniki Wrocławskiej (od 2021 r.).
4. Organizacja współpracy naukowej pomiędzy *Zakładem Histologii i Embriologii* Katedry Morfologii i Embriologii Człowieka Uniwersytetu Medycznego we

- Wrocławiu a Katedrą Inżynierii Biomedycznej Politechniki Wrocławskiej (od 2021 r.).
5. Inicjacja i koordynacja współpracy z *Zakładem Mikrobiologii* Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego a *Katedrą Inżynierii Biomedycznej* Politechniki Wrocławskiej (od 2021 r.).
 6. Udział w przygotowaniu raportu samooceny do akredytacji kierunku Inżynieria Biomedyczna na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej 2017/2018.
 7. Kierownik laboratorium Technik Pomiarowych Optyki Biomedycznej odpowiedzialny za organizację pracy i funkcjonowanie laboratorium (od 2017 r.).
 8. Członek komitetu naukowego konferencji naukowej *Students' science conference*, 21–24.10.2017, Wrocław, Polska.
 9. Członek komitetu programowego Seminarium w ramach projektu POLINNOVATION MED. *Partnerstwo naukowo-przemysłowe w innowacyjnych technologiach biomedycznych*, 29.05.2015, Wrocław, Polska.
 10. Organizacja współpracy naukowej pomiędzy *Katedrą Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych* Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu a *Katedrą Inżynierii Biomedycznej* Politechniki Wrocławskiej (od 2013 r.).
 11. Pracownik Katedry Inżynierii Biomedycznej odpowiedzialny za przygotowanie i oprawę graficzną materiałów (plakaty, ulotki etc.) promujących studia I/II stopnia na kierunku Inżynieria Biomedyczna na Politechnice Wrocławskiej (2013–2018).
 12. Inicjacja i koordynacja współpracy naukowej pomiędzy *Zakładem Inżynierii Fotonicznej* Instytutu Mikromechaniki i Fotoniki Wydziału Mechatroniki Politechniki Warszawskiej a *Katedrą Inżynierii Biomedycznej* Politechniki Wrocławskiej (od 2012 r.).
 13. Udział w organizacji kwartalnego spotkania partnerów w projekcie unijnym *7PR BioElectric Surface Meeting*, 16–18.03 2011 r., Wrocław, Polska.
 14. Udział w organizacji Konferencji Humboldt Kolleg Nutraceuticals, *Biomedical remedies and physiotherapeutic methods for prevention of civilization-related diseases*, 26–19.05.2011 r., Wrocław, Polska.
 15. Członek komitetu naukowego międzynarodowej konferencji *OPTO- Meeting for Young Researches 2011 and VI International SPIE Students' Chapters Meeting*, 11–14.05.2011 r., Toruń, Polska, 2011.

16. Członek komitetu organizacyjnego międzynarodowej konferencji *OPTO-Meeting for Young Researches 2010 and V International SPIE Students' Chapters Meeting*, 12–15.05.2010, Toruń, Polska.
17. Członek komitetu organizacyjnego międzynarodowej konferencji studenckiej: *III International SPIE and OSA Students Chapter Meeting*, 07–09.05.2008 r., Wrocław, Polska.

5.8 Popularyzacja nauki

1. Członek Komitetu Organizacyjnego dwóch konferencji studenckich *Wrocławskie Akademickie Spotkania Ambitnych BioInżynierów WASABI* (17.04.2018, 22.05.2019), które powstały z inicjatywy pracowników Katedry Inżynierii Biomedycznej Politechniki Wrocławskiej. Konferencja ta miała na celu integrację środowisk studentów I i II stopnia Inżynierii Biomedycznej. Dla studentów II stopnia konferencja ta daje szansę doskonalenia swoich umiejętności prezentacyjnych oraz wymiany pomysłów. Dla studentów I stopnia jest to świetna okazja do zapoznania się z możliwymi kierunkami rozwoju na kolejnym etapie studiów. Organizowane są także spotkania z zaproszonymi przedstawicielami przemysłu, które pokazują możliwości pracy i rozwoju po ukończeniu studiów. Zaproszone dotychczas goście to m.in. S3 Group, Pregnabit, Instytut Techniki i Aparatury Medycznej, Medicus Care Sp. ZO.O., Spectrum Sp. ZO.O., Ryszard Jarża Translations, Diagnova Technologies Sp. ZO.O., Wrocławski Park Technologiczny, Bioengineering.PL Sp. ZO.O., Międzynarodowe Centrum Inżynierii Biomedycznej, Dynacon Sp. ZO.O., Pure Biologics S.A.
2. Przygotowanie pokazów demonstracyjnych w ramach *XXI Pikniku Naukowego Polskiego Radia i Centrum Nauki Kopernik* (Warszawa, 03.06.2017 r.) oraz *XX Pikniku Naukowego Polskiego Radia i Centrum Nauki Kopernik* (Warszawa, 07.06.2016 r.) promujących inżynierię biomedyczną.
3. Aktywny udział w *Dniach Otwartych Politechniki Wrocławskiej*, marzec 2014–2018 r. Przygotowanie stanowisk demonstracyjnych oraz przeprowadzenie pokazów obejmujących wybrane zagadnienia optyki biomedycznej (dot. endoskopii optycznej, zjawiska fluorescencji, dyfrakcji na koloniach bakterii). Prezentacja laboratoriów naukowych. Przygotowanie materiałów promocyjnych (ulotki, plakaty).
4. Zorganizowanie 1-miesięcznych *praktyk studenckich* dla dwóch dyplomantek: Pani inż. Sandry Gołębiowskiej i Pani inż. Pauliny Wojtczak w firmie Synatpise S.A. (2015 r.).
5. Udział wraz z kołem naukowym Biomedica w *Tygodniu Zdrowia* mającym na celu popularyzację inżynierii biomedycznej oraz optyki, jak również prezentującym możliwości zastosowania technik inżynierii biomedycznej

- w ochronie zdrowie i diagnostyce medycznej w ramach promocji zdrowia (2013 r.).
6. Udział w zajęciach popularno-naukowych zorganizowanych dla dzieci w wieku 5–15 lat p.t. „*Odkrywamy mikroświat*”. Zajęcia były prowadzone w formie naukowej zabawy, podczas których dzieci mogły samodzielnie odkrywać otaczający nas świat za pomocą mikroskopów optycznych (Wrocław, 28.09.2013).
 7. Udział w Parku Wiedzy, największej plenerowej imprezie odbywającej się w ramach *XIV Dolnośląskiego Festiwalu Nauki*. Przeprowadzenie warsztatów „*Jarmark fizyczny*” popularyzujących nauki techniczne i fizyczne wśród młodzieży (Wrocław, 17–18.09.2011 r.).
 8. Przygotowanie oraz prowadzenie zajęć pokazowych pt. „*Teleskopy*” dla uczniów szkół gimnazjalnych i średnich w ramach *XIII Dolnośląskiego Festiwalu Nauki 2010* promujących studia optyczne na Politechnice Wrocławskiej (Wrocław, 20.09.2010 r.)
 9. Udział w *Karkonoskim Festiwalu Światła* organizowanego przez Philips Lighting oraz Politechnikę Wrocławską wraz z wygłoszeniem dwóch referatów popularno-naukowych pt. „*Światło leczy*” oraz „*O holografii słów kilka*” (Jelenia Góra, 10.01.2009).

6 Inne informacje dotyczące kariery zawodowej

6.1 Międzynarodowe i krajowe nagrody oraz stypendia za działalność naukową

1. *Laureat konkursu JM Rektora Politechniki Wrocławskiej Secundus* dla młodych naukowców Politechniki Wrocławskiej za najlepszy dorobek w dyscyplinie inżynierii biomedycznej w 2021 roku.
2. *Laureat konkursu JM Rektora Politechniki Wrocławskiej Primus* dla autorów publikacji w najlepszych czasopismach naukowych w roku 2021.
3. *Wyróżnienie* w ogólnopolskim konkursie *MISTRZ TECHNIKI 2016 / 2017* organizowanym przez Radę Krajową Federacji Stowarzyszeń Naukowo-Technicznych NOT przyznane zespołowi: dr inż. Igor Buzalewicz, prof. dr hab. inż. lek. med. Halina Podbielska za „Innowacyjną metodę identyfikacji bakterii opartą na zjawisku dyfrakcji światła na koloniach bakteryjnych” w 2018 roku.
4. *Nagroda I stopnia za wybitne osiągnięcia w dziedzinie techniki* zrealizowane w roku 2016 przyznana zespołowi: dr inż. Igor Buzalewicz, prof. dr hab. inż. lek. med. Halina Podbielska za „Innowacyjną metodę identyfikacji bakterii opartą na zjawisku dyfrakcji światła na koloniach bakteryjnych” przez Wrocławską Radę Federacji Stowarzyszeń Naukowo – Technicznych NOT w 2017 roku.

5. *Nagroda zespołowa JM Rektora Politechniki Warszawskiej stopnia II za osiągnięcia naukowe dla zespołu kierowanego przez prof. M. Kujawińską, w składzie: prof. dr hab. inż. Małgorzata Kujawińska, mgr inż. Wojciech Krauze, mgr inż. Arkadiusz Kuś, mgr inż. Michał Dudek, mgr inż. Paulina Pura, dr inż. Piotr Makowski, dr inż. Igor Buzalewicz. Nagrodę przyznano za opracowanie algorytmów i zbudowanie nowatorskich w skali międzynarodowej systemów mikroskopów i tomografów holograficznych do analizy trójwymiarowego rozkładu współczynnika załamania w mikroobiektach biologicznych i inżynierskich, tworząc metody i systemy, które mogą być uznane za „state-of-the-art” w obszarze tomografii fazowej, 2017 r.*
6. *Nagroda JM Rektora Politechniki Wrocławskiej za działalność na rzecz Uczelni, 2016 r.*
7. *Nagroda JM Rektora Politechniki Wrocławskiej za wybitnie osiągnięcia w dziedzinie komercjalizacji wyników badań, 2014 r.*
8. *Laureat prestiżowego konkursu o Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla Młodych Wybitnych Naukowców, 2014 r.*
9. *Laureat stypendium naukowego za wybitne osiągnięcia naukowe dla Młodych Doktorów w ramach projektu „Młoda Kadra - rozwój potencjału naukowo-dydaktycznego pracowników Politechniki Wrocławskiej”, 2014 r.*

6.2 Ukończone szkolenia

1. *Ukończone szkolenie świadomościowe w ramach projektu „Politechnika równych szans” dotyczące wiedzy w zakresie funkcjonowania osób z niepełnosprawnościami, ograniczenia strachu przed nieznanym, umiejętnego zachowania w momencie pracy z osobami z niepełnosprawnościami, 13.06.2022, Wrocław, Polska.*
2. *Ukończone szkolenie „International Workshop on Optical Diagnosis of Infectious Diseases” w ramach programu UE COST (Raman4clinics) w zespole prof. Jurgena Poppa, Friedrich-Schiller University, 19–21.10.2015, Jena, Niemcy.*
3. *Ukończone szkolenie z zakresu komercjalizacji wiedzy, prawa własności intelektualnej oraz transferu technologii w ramach projektu „Kluczowy Stażysta” organizowanego przez Poznański Akademicki Inkubator Przedsiębiorczości prowadzonego przez dr inż. Jarosława Osiadacza, 14–16.06.2013, Poznański Akademicki Inkubator Przedsiębiorczości; Wrocław, Polska.*
4. *Ukończony kurs Pedagogiki Szkoły Wyższej, Politechnika Wroclawska (wymiar: 120h), 01.10.2013–28.02.2014, Wrocław, Polska.*
5. *Ukończone szkolenie SPIE (The International Society for Optics and Photonics) pt. „Effective scientific papers” prowadzone przez Jean-Luca Dougmonta podczas konferencji naukowej Optics and Photonics 2011, 22.08. 2011, San Diego (USA).*

6. Ukończone szkolenie SPIE (The International Society for Optics and Photonics) pt. „*Effective technical presentation*” prowadzonego przez Jean-Luca Dougmonta podczas konferencji naukowej Optics and Photonics 2011 w dn. 22.08. 2011, San Diego (USA).
7. Ukończone szkolenie SPIE (The International Society for Optics and Photonics) pt. „*Team development workshop*” prowadzone przez Sherry Nooravi podczas Student Leadership Workshop, 21.08.2011 w San Diego (USA).
8. Ukończone szkolenie *6th Advanced Study Course on Optical Chemical Sensors and Biosensors* (ASCOS 2008), University of Graz, 31.08–6.09. 2008, Graz, Austria.

7 Literatura

- [1] P. T. Heller M., *Elementy filozofii przyrody*. Kraków: COPERNICUS CENTER PRESS, 2014.
- [2] S. A. Kelly, T. M. Panhuis, and A. M. Stoehr, “Phenotypic Plasticity: Molecular Mechanisms and Adaptive Significance,” *Compr Physiol*, vol. 2, no. 2, pp. 1417–1439, Apr. 2012, doi: 10.1002/CPHY.C110008.
- [3] O. O. Thomas, H. Shen, R. L. Raaum, W. E. H. Harcourt-Smith, J. D. Polk, and M. Hasegawa-Johnson, “Automated morphological phenotyping using learned shape descriptors and functional maps: A novel approach to geometric morphometrics,” *PLoS Comput Biol*, vol. 19, no. 1, p. e1009061, Jan. 2023, doi: 10.1371/JOURNAL.PCBI.1009061.
- [4] Z. Moscato, D. Jaiswal, K. Dixit, C. J. Langanis, K. P. Claffey, and K. Hoshino, “Label-Free Morphological Phenotyping of In Vitro 3D Microtumors,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 2394, pp. 31–46, 2022, doi: 10.1007/978-1-0716-1811-0_3.
- [5] K. Yao, N. D. Rochman, and S. X. Sun, “Cell Type Classification and Unsupervised Morphological Phenotyping From Low-Resolution Images Using Deep Learning,” *Scientific Reports 2019 9:1*, vol. 9, no. 1, pp. 1–13, Sep. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-50010-9.
- [6] B. Zhang, Y. Shimada, J. Kuroyanagi, N. Umemoto, Y. Nishimura, and T. Tanaka, “Quantitative Phenotyping-Based In Vivo Chemical Screening in a Zebrafish Model of Leukemia Stem Cell Xenotransplantation,” *PLoS One*, vol. 9, no. 1, p. e85439, Jan. 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0085439.
- [7] Y. Suzuki *et al.*, “Label-free chemical imaging flow cytometry by high-speed multicolor stimulated Raman scattering,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 116, no. 32, pp. 15842–15848, Aug. 2019, doi: 10.1073/PNAS.1902322116.
- [8] J. P. Giraldo, H. Wu, G. M. Newkirk, and S. Kruss, “Nanobiotechnology approaches for engineering smart plant sensors,” *Nature Nanotechnology 2019 14:6*, vol. 14, no. 6, pp. 541–553, Jun. 2019, doi: 10.1038/s41565-019-0470-6.
- [9] E. Holmes, I. D. Wilson, and J. K. Nicholson, “Metabolic phenotyping in health and disease,” *Cell*, vol. 134, no. 5, pp. 714–717, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.08.026.
- [10] J. K. Nicholson, E. Holmes, J. M. Kinross, A. W. Darzi, Z. Takats, and J. C. Lindon, “Metabolic phenotyping in clinical and surgical environments,” *Nature 2012 491:7424*, vol. 491, no. 7424, pp. 384–392, Nov. 2012, doi: 10.1038/nature11708.
- [11] M. Kubánková *et al.*, “Physical phenotype of blood cells is altered in COVID-19,” *Biophys J*, vol. 120, no. 14, pp. 2838–2847, Jul. 2021, doi: 10.1016/J.BPJ.2021.05.025.
- [12] J. Lin *et al.*, “High-throughput physical phenotyping of cell differentiation,” *Microsystems & Nanoengineering 2017 3:1*, vol. 3, no. 1, pp. 1–7, May 2017, doi: 10.1038/micronano.2017.13.

- [13] E. M. Darling and D. Di Carlo, "High-throughput assessment of cellular mechanical properties," *Annu Rev Biomed Eng*, vol. 17, pp. 35–62, Dec. 2015, doi: 10.1146/annurev-bioeng-071114-040545.
- [14] J. W. Goodman, *Introduction to Fourier Optics*, 3rd ed., no. 5. Englewood, Colorado: Roberts & Company Publishers, 2005.
- [15] M. Nieto-Vesperinas, *Scattering and diffraction in physical optics, Second edition*. World Scientific Publishing Co., 2006. doi: 10.1142/5833.
- [16] H. P. Baltes, *Inverse Scattering Problems in Optics*, vol. 20. in Topics in Current Physics, vol. 20. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1980. doi: 10.1007/978-3-642-81472-3.
- [17] J. R. Norris and H. Swain, "Chapter II Staining Bacteria," *Methods in Microbiology*, vol. 5, pp. 105–134, Jan. 1971, doi: 10.1016/S0580-9517(08)70520-8.
- [18] J. Aslanzadeh, "Biochemical profile-based microbial identification systems," *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*, pp. 84–116, 2006, doi: 10.1007/0-387-32892-0_6/COVER.
- [19] M. Maiwald, "Broad-Range PCR for Detection and Identification of Bacteria," *Mol Microbiol*, pp. 491–505, Jun. 2011, doi: 10.1128/9781555816834.CH31.
- [20] B. Pang *et al.*, "Development of a low-cost paper-based ELISA method for rapid Escherichia coli O157:H7 detection," *Anal Biochem*, vol. 542, pp. 58–62, Feb. 2018, doi: 10.1016/J.AB.2017.11.010.
- [21] Y. Xu, H. Wang, C. Luan, Y. Liu, B. Chen, and Y. Zhao, "Aptamer-based hydrogel barcodes for the capture and detection of multiple types of pathogenic bacteria," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 100, pp. 404–410, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.bios.2017.09.032.
- [22] L. Bourassa and S. M. Butler-Wu, "MALDI-TOF mass spectrometry for microorganism identification," in *Methods in Microbiology*, Academic Press Inc., 2015, pp. 37–85. doi: 10.1016/bs.mim.2015.07.003.
- [23] S. A. Yoon, S. Y. Park, Y. Cha, L. Gopala, and M. H. Lee, "Strategies of Detecting Bacteria Using Fluorescence-Based Dyes," *Front Chem*, vol. 9, p. 668, Aug. 2021, doi: 10.3389/FCHEM.2021.743923.
- [24] L. Yaroslavsky, "Digital Holography and Digital Image Processing," *Digital Holography and Digital Image Processing*, 2004, doi: 10.1007/978-1-4757-4988-5.
- [25] J. C. Li and P. Picart, "Digital Holography," *Digital Holography*, Jan. 2013, doi: 10.1002/9781118562567.
- [26] U. Schnars, C. Falldorf, J. Watson, and W. Jüptner, "Digital Holography," *Digital Holography and Wavefront Sensing*, pp. 39–68, 2015, doi: 10.1007/978-3-662-44693-5_3.
- [27] P. Langehanenberg, G. von Bally, and B. Kemper, "Autofocusing in digital holographic microscopy," *3D Research*, vol. 2, no. 1, pp. 1–11, Nov. 2011, doi: 10.1007/3DRES.01(2011)4.
- [28] T. Kozacki, K. Lizewski, and J. Kostencka, "Holographic method for topography measurement of highly tilted and high numerical aperture micro structures," *Opt Laser Technol*, vol. 49, pp. 38–46, Jul. 2013, doi: 10.1016/J.OPTLASTEC.2012.12.001.
- [29] T. Kozacki, M. Józwiak, and K. Lizewski, "High-numerical-aperture microlens shape measurement with digital holographic microscopy," *Optics Letters*, Vol. 36, Issue 22, pp. 4419–4421, vol. 36, no. 22, pp. 4419–4421, Nov. 2011, doi: 10.1364/OL.36.004419.
- [30] T. Zhang and I. Yamaguchi, "Phase-shifting digital holography," *Optics Letters*, Vol. 22, Issue 16, pp. 1268–1270, vol. 22, no. 16, pp. 1268–1270, Aug. 1997, doi: 10.1364/OL.22.001268.
- [31] E. Bae, N. Bai, A. Aroonnuan, J. P. Robinson, A. K. Bhunia, and E. D. Hirleman, "Modeling light propagation through bacterial colonies and its correlation with forward scattering patterns," *J Biomed Opt*, vol. 15, no. 4, p. 045001, 2010, doi: 10.1117/1.3463003.

- [32] E. Bae, P. P. Banada, K. Huff, A. K. Bhunia, J. P. Robinson, and E. D. Hirleman, "Biophysical modeling of forward scattering from bacterial colonies using scalar diffraction theory," *Applied Optics*, Vol. 46, Issue 17, pp. 3639-3648, vol. 46, no. 17, pp. 3639–3648, Jun. 2007, doi: 10.1364/AO.46.003639.
- [33] T. S. Alsulami, X. Zhu, M. U. Abdelhaseib, A. K. Singh, and A. K. Bhunia, "Rapid detection and differentiation of Staphylococcus colonies using an optical scattering technology," *Anal Bioanal Chem*, vol. 410, no. 22, 2018, doi: 10.1007/s00216-018-1133-4.
- [34] H. Kim, A. K. Singh, A. K. Bhunia, and E. Bae, "Laser-induced speckle scatter patterns in Bacillus colonies," *Front Microbiol*, vol. 5, p. 537, Oct. 2014, doi: 10.3389/fmicb.2014.00537.
- [35] U. Minoni, A. Signoroni, and G. Nassini, "On the application of optical forward-scattering to bacterial identification in an automated clinical analysis perspective.," *Biosens Bioelectron*, vol. 68, pp. 536–43, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.bios.2015.01.047.
- [36] P. R. Marcoux *et al.*, "Optical forward-scattering for identification of bacteria within microcolonies," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 98, no. 5, pp. 2243–2254, Mar. 2014, doi: 10.1007/s00253-013-5495-4.
- [37] W. Xu, M. H. Jericho, I. A. Meinertzhagen, and H. J. Kreuzer, "Digital in-line holography for biological applications," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, no. 20, pp. 11301–11305, Sep. 2001, doi: 10.1073/PNAS.191361398
- [38] A. K. Singh and A. K. Bhunia, "Optical scatter patterns facilitate rapid differentiation of Enterobacteriaceae on CHROMagar™ Orientation medium," *Microb Biotechnol*, vol. 9, no. 1, 2016, doi: 10.1111/1751-7915.12323.
- [39] P. P. Banada *et al.*, "Optical forward-scattering for detection of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species.," *Biosens Bioelectron*, vol. 22, no. 8, pp. 1664–71, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.bios.2006.07.028.
- [40] M. U. Abdelhaseib, A. K. Singh, and A. K. Bhunia, "Simultaneous detection of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in food using a light scattering sensor," *J Appl Microbiol*, vol. 126, no. 5, pp. 1496–1507, May 2019, doi: 10.1111/jam.14225.
- [41] E. Bae *et al.*, "Portable bacterial identification system based on elastic light scatter patterns.," *J Biol Eng*, vol. 6, no. 1, p. 12, Jan. 2012, doi: 10.1186/1754-1611-6-12.
- [42] M. U. Abdelhaseib, A. K. Singh, and A. K. Bhunia, "Simultaneous detection of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in food using a light scattering sensor," *J Appl Microbiol*, vol. 126, no. 5, pp. 1496–1507, 2019, doi: 10.1111/jam.14225.
- [43] H. Kim, B. Rajwa, A. K. Bhunia, J. P. Robinson, and E. Bae, "Development of a multispectral light-scatter sensor for bacterial colonies," *J Biophotonics*, vol. 10, no. 5, pp. 634–644, May 2017, doi: 10.1002/jbio.201500338.
- [44] B. Lugtenberg and F. Kamilova, "Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria," <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>, vol. 63, pp. 541–556, Sep. 2009, doi: 10.1146/ANNUREV.MICRO.62.081307.162918.
- [45] H. Kim, N. Bai, A. K. Bhunia, G. B. King, E. D. Hirleman, and E. Bae, "Development of an integrated optical analyzer for characterization of growth dynamics of bacterial colonies," *J Biophotonics*, vol. 6, no. 11–12, pp. 929–937, Dec. 2013, doi: 10.1002/JBIO.201200224.
- [46] R. Juarez-Salazar, C. Mendoza-Rodriguez, J. E. Hernandez-Beltran, and C. Robledo-Sanchez, "How do phase-shifting algorithms work?," *Eur J Phys*, vol. 39, no. 6, p. 065302, Nov. 2018, doi: 10.1088/1361-6404/aae3c2.
- [47] I.-J. Doh, H. Kim, J. Sturgis, B. Rajwa, J. P. Robinson, and E. Bae, "Optical multi-channel interrogation instrument for bacterial colony characterization," *PLoS One*, vol. 16, no. 2, p. e0247721, Feb. 2021, doi: 10.1371/journal.pone.0247721.

- [48] P. Di Martino and P. Di Martino, "Extracellular polymeric substances, a key element in understanding biofilm phenotype," *AIMS Microbiology* 2018 2:274, vol. 4, no. 2, pp. 274–288, 2018, doi: 10.3934/MICROBIOL.2018.2.274.
- [49] O. E. Petrova and K. Sauer, "A Novel Signaling Network Essential for Regulating *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development," *PLoS Pathog*, vol. 5, no. 11, p. e1000668, Nov. 2009, doi: 10.1371/journal.ppat.1000668.
- [50] G. A. O'Toole, "Microtiter Dish Biofilm Formation Assay," *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, no. 47, p. e2437, Jan. 2011, doi: 10.3791/2437.
- [51] P. N. Tawakoli, A. Al-Ahmad, W. Hoth-Hannig, M. Hannig, and C. Hannig, "Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm," *Clin Oral Investig*, vol. 17, no. 3, pp. 841–850, Apr. 2013, doi: 10.1007/S00784-012-0792-3.
- [52] R. Chollet and S. Ribault, "Use of ATP Bioluminescence for Rapid Detection and Enumeration of Contaminants: The Milliflex Rapid Microbiology Detection and Enumeration System," *Bioluminescence - Recent Advances in Oceanic Measurements and Laboratory Applications*, Feb. 2012, doi: 10.5772/37055.
- [53] L.-M. Joubert and K. McDonald, "SEM Visualization of Biological Samples using Hitachi Ionic Liquid HILEM® IL 1000: a Comparative Study," *undefined*, vol. 22, no. S3, pp. 1170–1171, Jul. 2016, doi: 10.1017/S1431927616006693.
- [54] M. Mir, B. Bhaduri, R. Wang, R. Zhu, and G. Popescu, *Quantitative Phase Imaging*, vol. 57. 2012. doi: 10.1016/B978-0-44-459422-8.00003-5.
- [55] Y. Park, C. Depeursinge, and G. Popescu, "Quantitative phase imaging in biomedicine," *Nat Photonics*, vol. 12, pp. 578–589, 2018, doi: 10.1038/s41566-018-0253-x.
- [56] T. K. Gaylord and M. H. Jenkins, "Three-dimensional quantitative phase imaging via tomographic deconvolution phase microscopy," *Applied Optics*, Vol. 54, Issue 31, pp. 9213-9227, vol. 54, no. 31, pp. 9213–9227, Nov. 2015, doi: 10.1364/AO.54.009213.
- [57] W. Krauze, "Optical diffraction tomography with finite object support for the minimization of missing cone artifacts," *Biomedical Optics Express*, Vol. 11, Issue 4, pp. 1919-1926, vol. 11, no. 4, pp. 1919–1926, Apr. 2020, doi: 10.1364/BOE.386507.
- [58] Y. Cotte *et al.*, "Marker-free phase nanoscopy," *Nat Photonics*, vol. 7, no. 2, pp. 113–117, Feb. 2013, doi: 10.1038/nphoton.2012.329.
- [59] D. Kim, S. Lee, M. Lee, J. Oh, S. A. Yang, and Y. K. Park, "Holotomography: Refractive Index as an Intrinsic Imaging Contrast for 3-D Label-Free Live Cell Imaging," *Adv Exp Med Biol*, vol. 1310, pp. 211–238, 2021, doi: 10.1007/978-981-33-6064-8_10.
- [60] A. Kuś *et al.*, "Holographic tomography: techniques and biomedical applications [Invited]," *Applied Optics*, Vol. 60, Issue 10, pp. B65-B80, vol. 60, no. 10, pp. B65–B80, Apr. 2021, doi: 10.1364/AO.416902.
- [61] V. Lauer, "New approach to optical diffraction tomography yielding a vector equation of diffraction tomography and a novel tomographic microscope," *J Microsc*, vol. 205, no. 2, pp. 165–176, Feb. 2002, doi: 10.1046/j.0022-2720.2001.00980.x.
- [62] S. Shin, C. Park, and Y. Park, "Generalized quantification of three-dimensional resolution in optical diffraction tomography using the projection of maximal spatial bandwidths," *JOSA A*, Vol. 35, Issue 11, pp. 1891-1898, vol. 35, no. 11, pp. 1891–1898, Nov. 2018, doi: 10.1364/JOSAA.35.001891.
- [63] J. Oh *et al.*, "Three-dimensional label-free observation of individual bacteria upon antibiotic treatment using optical diffraction tomography," *Biomed Opt Express*, vol. 11, no. 3, p. 1257, Mar. 2020, doi: 10.1364/boe.377740.

- [64] P. Y. Liu *et al.*, "Cell refractive index for cell biology and disease diagnosis: Past, present and future," *Lab on a Chip*, vol. 16, no. 4. Royal Society of Chemistry, pp. 634–644, Feb. 09, 2016. doi: 10.1039/c5lc01445j.
- [65] C. A. Iacobuzio-Donahue, C. Michael, P. Baez, R. Kappagantula, J. E. Hooper, and T. J. Hollman, "Cancer biology as revealed by the research autopsy," *Nature Reviews Cancer* 2019 19:12, vol. 19, no. 12, pp. 686–697, Sep. 2019, doi: 10.1038/s41568-019-0199-4.
- [66] A. V. Belashov *et al.*, "Determination of the refractive index of dehydrated cells by means of digital holographic microscopy," *Technical Physics Letters*, vol. 43, no. 10, pp. 932–935, 2017, doi: 10.1134/S1063785017100169.
- [67] L. M. Doyle and M. Z. Wang, "Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis," *Cells*, vol. 8, no. 7, Jul. 2019, doi: 10.3390/CELLS8070727.
- [68] Y. Chen, Y. Tang, G. C. Fan, and D. D. Duan, "Extracellular vesicles as novel biomarkers and pharmaceutical targets of diseases," *Acta Pharmacologica Sinica* 2018 39:4, vol. 39, no. 4, pp. 499–500, Apr. 2018, doi: 10.1038/aps.2018.15.
- [69] T. W. Gu, M. Z. Wang, J. Niu, Y. Chu, K. R. Guo, and L. H. Peng, "Outer membrane vesicles derived from *E. coli* as novel vehicles for transdermal and tumor targeting delivery," *Nanoscale*, vol. 12, no. 36, pp. 18965–18977, Sep. 2020, doi: 10.1039/D0NR03698F.
- [70] C. Gardiner *et al.*, "Measurement of refractive index by nanoparticle tracking analysis reveals heterogeneity in extracellular vesicles," *J Extracell Vesicles*, vol. 3, no. 1, 2014, doi: 10.3402/jev.v3.25361.
- [71] D.-S. Lee *et al.*, "The implications of human metabolic network topology for disease comorbidity," 2008.
- [72] R. J. Deberardinis and C. B. Thompson, "Cellular metabolism and disease: What do metabolic outliers teach us?," *Cell*, vol. 148, no. 6. Elsevier B.V., pp. 1132–1144, Mar. 16, 2012. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.032.
- [73] W. Wu *et al.*, "Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance," *Pharmacol Res*, vol. 171, p. 105780, Sep. 2021, doi: 10.1016/J.PHRS.2021.105780.
- [74] R. Shao *et al.*, "YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis," *Oncogene* 2009 28:50, vol. 28, no. 50, pp. 4456–4468, Sep. 2009, doi: 10.1038/onc.2009.292.
- [75] G. Steponaitis *et al.*, "High CHI3L1 expression is associated with glioma patient survival," *Diagn Pathol*, vol. 11, no. 1, pp. 1–8, Apr. 2016, doi: 10.1186/S13000-016-0492-4.
- [76] M. A. Welte, "Proteins under new management: lipid droplets deliver," *Trends Cell Biol*, vol. 17, no. 8, pp. 363–369, Aug. 2007, doi: 10.1016/J.TCB.2007.06.004.
- [77] J. Enderle and J. Bronzino, *Introduction of Biomedical Engineering*, 3rd-rd ed. Oxford: Academic Press, 2012.



.....
(podpis Wnioskodawcy)