



Institute of Physical Chemistry Polish Academy of Sciences

Department of Physical Chemistry of
Biological Systems

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

Prof. dr hab. Maciej Wojtkowski

Head of Department

Physical Optics and Biophotonics Group

Email: mwojtkowski@ichf.edu.pl

Tel. +(48 22) 343 3283

+(48 22) 343 20 00

Fax +(48 22) 343 33 33

+(48 22) 632 52 76

E-mail: ichf@ichf.edu.pl

Warszawa, 19 grudnia 2023

Szanowna Pani

Prof. dr hab. Agnieszka Dobrzyń

Dyrektor Instytutu Biologii Doświadczalnej im

Marcelego Nenckiego, Polska Akademia Nauk

ul. Ludwika Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Recenzja dorobku habilitacyjnego pana doktora Błażeja Ruszczyckiego

1. Ocena dorobku naukowego i innych osiągnięć twórczych

Pan doktor, Błażej Ruszczycki uzyskał w roku 2007 stopień doktora nauk na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Miami, Coral Gables w USA za pracę zatytułowaną "Nonlinear sigma models with tachyon and dilation field" pod opieką prof. Orlando Alvareza. Za pracę tę uzyskał wyróżnienie „Award of academic merit”. W latach 2008-2009 pan doktor Ruszczycki był zatrudniony na stanowisku postdoca w Complex Systems Reserach Group na tym samym uniwersytecie. W roku 2010 rozpoczął pracę w Instytucie Biologii Doświadczalnej im Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie (IBD), początkowo jako postdoc w ramach programu ERANET, a później w programie BIOIMAGE. W latach 2014-2023 pracował w charakterze specjalisty w IBD a od roku 2023 jego kariera sformatowała się na bardziej akademicki charakter poprzez zatrudnienie się jako adiunkt w Katedrze Fizyki Medycznej i Biofizyki, Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH im S. Staszica w Krakowie. Pan doktor Błażej Ruszczycki jest autorem lub współautorem jednej monografii oraz 27 publikacji opublikowanych w renomowanych czasopismach, które są monitorowane przez Clarivate Analytics (Web of Science). Całkowita liczba cytowań (bez autocytowań) wynosi ponad 1000, odpowiadający jej h-indeks to 11. Pan Ruszczycki nie kierował dotychczas żadnym grantem, brał jedynie udział w czterech grantach jako wykonawca. Ma on w dorobku jedynie kilka wystąpień konferencyjnych bez referatów zaproszonych.

Artykuły, których współautorem jest dr Błażej Ruszczycki publikowane są w bardzo dobrych czasopismach branżowych o światowym zasięgu, w których przeprowadzany jest profesjonalny proces redakcyjny. Z tego punktu widzenia nie można kwestionować kompetencji Pana Ruszczyckiego jako wysokiej klasy eksperta w swojej dziedzinie o unikalnych umiejętnościach technicznych i wiedzy dziedzinowej. Działalność naukowa Pana Ruszczyckiego pozostaje oryginalna i twórcza. W niewielkiej części prac dostrzega się wiodącą rolę habilitanta - zwłaszcza w

opracowywaniu niestandardowych koncepcji badawczych oraz w sferze projektowania narzędzi analizy obrazów. Generalnie wpływ prac Habilitanta na dziedzinę przejawiający się liczbą cytowań jest znaczący, potwierdzający dobry poziom kompetencji. Nie budzi też wątpliwości umiejętność prowadzenia przez pana doktora Ruszczyckiego prac w interdyscyplinarnych zespołach badawczych. W obecnym modelu uprawiania nauki ważnym elementem aktywności zawodowej samodzielnego pracownika jest umiejętność pozyskiwania finansowania i zarządzania realizacją projektów. Habilitant dotychczas nie potwierdził swoich umiejętności w tym zakresie.

W swojej aktywności naukowej pan Ruszczycki zajmuje się ilościowym obrazowaniem biologicznym – interdyscyplinarną specjalizacją wykorzystującą zaawansowane techniki obrazowania i algorytmy obliczeniowe do pomiaru oraz analizy struktur i procesów biologicznych. W swoich pracach badawczych habilitant wykorzystuje różnorodne eksperymentalne metody biologiczne, fizyczne (optyczne, spektroskopowe), chemiczne, bioinformatyczne oraz techniki przetwarzania sygnałów, a także modelowanie matematyczne wykonywane w celu uzyskania np. charakterystyki morfometrycznej obserwowanych struktur, czy oszacowania parametrów optymalnych warunków procesów obrazowania. Opracowane metody zostały zastosowane w badaniach procesów plastyczności synaptycznej, remodelowania architektury jąder neuronów, obrazowania kolców dendrytycznych, oraz w obrazowaniu przestrzennej struktury chromatyny.

2. Ocena osiągnięcia naukowego przedstawionego w rozprawie habilitacyjnej

Recenzowana seria powiązanych tematycznie artykułów naukowych nosi tytuł "Rozwój i optymalizacja metod ilościowego obrazowania biologicznego i biologicznej analizy obrazu na poziomie komórkowym i subkomórkowym". Cykl ten składa się z pięciu prac (czterech oryginalnych i jednej przeglądowej) opublikowanych w czasopiśmie znajdujących się na liście JCR. W czterech pracach dr Ruszczycki jest pierwszym autorem, a w jednej ostatnim i korespondencyjnym autorem. Prace te są reprezentatywne dla kolejnych około dwudziestu prac, których współautorem jest habilitant, a które były skutkiem działań zawartych w pięciu przedstawionych pracach cyklu.

Tematyka prac badawczych przedstawionych we wniosku koncentruje się głównie na ilościowych metodach obrazowania biologicznego na poziomie komórkowym i subkomórkowym. W szczególności dr Ruszczycki jest zainteresowany wprowadzeniem zaawansowanych technik kwantyfikacji opartych na danych morfometrycznych pozyskiwanych w pomiarach najnowszymi typami mikroskopów. W optycznych metodach obrazowania jednym z najważniejszych zadań jest wprowadzenie nowych sposobów kwantyfikacji informacji uzyskanych daną techniką, które pomagają określić stan układu biologicznego w sposób jednoznaczny, czuły i selektywny. Ilościowe metody optyczne nabrały szczególnego znaczenia w momencie zastosowania zaawansowanych technik obliczeniowych, które pomagają optymalnie wykorzystać informacje dostarczane przez systemy pomiarowe i wskazywać nowe, nieznanе dotąd czynniki korelujące ze stanem analizowanego układu biologicznego. Wiedza i umiejętności pozwalające na realizację takich zadań są unikalne ze względu na konieczność łączenia doświadczeń z różnych dziedzin: optyki, inżynierii, informatyki i konkretnej gałęzi biologii. Prace badawcze habilitanta w zakresie badań biologicznych skupiły się głównie na metodach badania plastyczności tkanki nerwowej mózgu. Od jakiegoś czasu bardzo ważną morfologiczną strukturą są kolce dendrytyczne oraz sama strukturalna reorganizacja sieci neuronalnej na poziomie synaps. Procesy remodelowania kolców dendrytycznych mogą być obserwowane poprzez różne techniki obrazowania dla próbek *in vitro* (w inkubowanych skrawkach mózgu), *ex vivo* (przy wykorzystaniu utrwalonych skrawków), lub *in vivo* (przy wykorzystaniu hodowli neuronalnych lub w obrazowaniu przyżyciowym zwierząt). Krytyczne jest tutaj obserwowanie dynamiki zmian w występowaniu i morfologii kolców. Ze względu na dużą zmienność w warunkach obserwacji ilościowe analizy są trudne. Habilitant opracował własne metody segmentacji kolców dendrytycznych w obrazach bazujących na konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej i przeanalizował systematycznie optymalne warunki do uzyskania wiarygodnych i ilościowych analiz tej struktury. Wprowadzona metoda służy opracowaniu znormalizowanych metod

ilościowego porównania morfologii kolców dendrytycznych, z określeniem różnych źródeł wariacji pochodzącej od zmiennych warunków pomiarowych i różnic morfologii. Rozwinięta metoda wraz z oprogramowaniem, zostały bezpośrednio zastosowane kilku pracach, których współautorem jest dr Ruszczycki, a które nie są explicite wskazane w cyklu ze względu na ich czysto biologiczny charakter. W wyniku tych działań uzyskano również patent "Method and a system for processing an image comprising dendritic spines (US20140169647A1 EP11461530A).

W innym sposobie obrazowania - tzw. metodach lokalizacji fluorescencji, takich jak PALM/STORM, gęstość lokalizujących fluoroforów jest krytyczna dla jakości uzyskiwanych rekonstrukcji. W przypadku nadmiaru cząsteczek może zostać zaburzona precyzja lokalizacji i tym samym rozdzielczość techniki. Z drugiej strony niedobór emiterów fluorescencji może wpływać na utratę użytecznych informacji morfologicznych i tym samym na wierność rekonstrukcji. Habilitant po raz pierwszy przedstawił analizę ilościową demonstrującą łączny wpływ niedokładności lokalizacji i próbkowania na wierność rekonstruowanych obrazów. W wyniku tych prac wskazano, że poprawę jakości obrazu można osiągnąć poprzez zbieranie sygnałów z większej liczby emiterów fluorescencji, nawet z mniejszą precyzją niż precyzja odpowiadająca pożądanej rozdzielczości obrazu. W tym przypadku nie ma również potrzeby maksymalizowania dokładności lokalizacji. Wynika to z faktu, że gęstość próbkowania jest parametrem lokalnym, na który wpływa architektura oznaczanej struktury biologicznej. Chociaż w wielu dyskusjach argumenty te pojawiły się jako główna krytyka metody PALM/STORM, dane ilościowe dotyczące połączonego wpływu błędów próbkowania i lokalizacji na dokładność rekonstrukcji są rzadkie. Z tego powodu przedstawiona praca jest ważnym wkładem w tę dziedzinę. I choć nie poświęcono jej większej uwagi (tylko 3 cytowania), stanowi ona ważny element budowania warsztatu badań mikroskopowych i ekspertyzy habilitanta.

W innej grupie aktywności doktor Błażej Ruszczycki zajmował się badaniami morfometrycznymi architektury jąder komórkowych neuronów mających kluczową rolę w ich różnicowaniu, co z kolei wpływa na plastyczność neuronalną. Pomiarów obrazowe uzyskiwane były przy użyciu technik trójwymiarowej mikroskopii fluorescencyjnej. Automatyczna segmentacja jąder jest utrudniona ze względu na ich dużą gęstość i zróżnicowaną strukturę. Habilitant opracował własną metodę automatycznej trójwymiarowej segmentacji i rekonstrukcji jąder neuronów. Wykorzystując wysoce oryginalne, autorskie metody zaawansowanej analizy obrazu, uzyskano ilościowe analizy morfometryczne gęstej architektury jąder komórkowych, które nie mogły być wykonane przy użyciu wcześniej dostępnych narzędzi. Udowodniono również, że prezentowana metoda jest odporna na szereg sygnałów pasożytniczych obecnych w obrazach mikroskopii fluorescencyjnej. Metoda ta została również opatentowana jako "A method and a system for segmenting a 3D image comprising round objects", EP2549433B. Stworzono również oprogramowanie, które zostało zastosowane w wielu innych pracach badawczych realizowanych w IBD.

W ostatniej grupie ocenianych aktywności habilitanta uczestniczył on w opracowaniu nowej metody ultra-rozdzielczej wizualizacji struktury specyficznego regionu upakowanej chromatyny, łączącej techniki mikroskopii elektronowej z mikroskopią fluorescencyjną poprzez technikę hybrydyzacji in-situ. Metoda ta została nazwana 3D-EMISH, a oryginalna publikacja ukazała się w prestiżowym czasopiśmie Nature Communications. Nowa technika obrazowania, która osiąga ultra rozdzielczość ($5 \times 5 \times 30$ nm) i pozwala uchwycić specyficzne trójwymiarowe struktury związania chromatyny w poszczególnych jądrach, została wykorzystana do analizy ponad 200 trójwymiarowych struktur wyodrębnionych z poszczególnych jąder limfoblastycznych linii komórkowych. Aby wprowadzić tę metodę, należało rozwiązać wiele ograniczeń technicznych i porównać technikę z innymi stosunkowo nowymi metodami obrazowania na najlepszym światowym poziomie, za co odpowiedzialny był dr Ruszczycki.

W celu uzasadnienia swojej opinii i oceny osiągnięcia naukowego będącego przedmiotem rozprawy, załączone publikacje zostały szczegółowo przeanalizowane pod kątem ich oryginalności, znaczenia dla dziedziny i jakości artykułów. Z analizy tej wynikają następujące wnioski:

1. Przedstawione publikacje stanowią spójny cykl dotyczący badań w dziedzinie ilościowego obrazowania biologicznego związanego z badaniem plastyczności neuronalnej.
2. Wszystkie przedstawione publikacje wchodzące w skład jednotematycznego zbioru były opublikowane w języku angielskim w najlepszych branżowych czasopismach o światowym zasięgu i o wysokiej jakości. Tym samym podlegały one rzetelnemu procesowi recenzenckiemu.
3. Łatwo jest zidentyfikować indywidualny charakter prac habilitanta wskazujący na jego osobiste zaangażowanie i pozwalający na wykazanie jego wiodącej roli we wszystkich przedstawionych pracach.
4. Badania były prowadzone w zespołach interdyscyplinarnych, co zaowocowało publikacjami zawierającymi wieloaspektowe ujęcie danego zagadnienia.
5. Wszystkie publikacje zebrane jako jednotematyczny zbiór prac mają znaczną liczbę cytowań. Oznacza to, że tematy badań są aktualne i zauważane przez innych badaczy pracujących w tej dziedzinie.
6. Aplikacyjny aspekt rozwoju metod analizy obrazów wskazuje na duży potencjał nowo opracowanych narzędzi do ich szerokiego wykorzystania, co potwierdzają zgłoszenia patentowe.
7. wszystkie publikacje wchodzące w skład osiągnięcia habilitanta reprezentują wysoki poziom jakości i nowości, a także istotności dla dziedziny.

Szczegółowe wnioski z analizy artykułów stanowiących jednotematyczny cykl publikacji zebrane zostały w poniżej tabeli:

Lp	Tytuł pracy	Element nowości i określenie roli habilitanta	Znaczenie dla rozwoju dziedziny
1.	Ruszczycki, B., Szepesi, Z., Wilczynski, G., Bijata, M., Kalita, K., Kaczmarek, L., Włodarczyk, J* . (2012). Sampling issues in quantitative analysis of dendritic spines morphology. BMC bioinformatics, 13(1), 1–12.	Oryginalna praca przedstawiająca analizę wpływu różnorodności obrazowania kolców dendrytycznych na uzyskane wyniki neurobiologiczne. Przeprowadzono symulacje Monte Carlo, badając różne konfiguracje eksperymentalne i podejścia statystyczne na podstawie danych z mikroskopii fluorescencyjnej. Dr Ruszczycki opracował szczegółowy projekt prac badawczych przedstawionych w artykule. Przedstawił autorską metodę segmentacji i analizy morfometrycznej kolców dendrytycznych na podstawie dostarczonych obrazów z mikroskopii konfokalnej oraz zaproponował zastosowanie metodologii opartej na symulacjach Monte Carlo. Przeprowadził również symulacje, napisał główną część artykułu i pomógł w przygotowaniu rysunków.	Artykuł jest pierwszym systematycznym podejściem do statystycznej analizy wykorzystania parametrów morfologicznych kolców dendrytycznych jako markera stanu układu nerwowego. Znaczące zainteresowanie społeczności odzwierciedla liczba 58 cytowań od 2012 roku.
2.	Ruszczycki, B*, Bernaś, T. Quality of biological images, reconstructed using localization microscopy data. Bioinformatics, 34(5), 845–852, (2018).	Praca oryginalna pokazująca kwantyfikację procesu obrazowania z wykorzystaniem dyskretnych emiterów w mikroskopii lokalizacyjnej. Habilitant opracował koncepcję i metodykę całego artykułu. Stworzył oprogramowanie, przeprowadził obliczenia i analizy statystyczne, napisał artykuł oraz stworzył figury.	Przedstawiona praca zawiera część obliczeniową oraz eksperymentalną. Dzięki zaproponowanej metodzie ilościowej określania połączonego wpływu błędów próbkowania i lokalizacji na dokładność rekonstrukcji. Praca jest cytowana jedynie 3 razy.

3.	Ruszczycki, B*, Pels, K., Walczak, A., Zamłyńska, K., Such, M., Szczepankiewicz, A., Hall, M., Magalska, A., Magnowska, M., Wolny, A., Bokota, G., Basu, S., Ayan Pal, A., Plewczyński, D., Wilczyński, G*. Three-dimensional segmentation and reconstruction of neuronal nuclei in confocal microscopic images. <i>Frontiers in neuroanatomy</i> , 13, 81 (2019).	Oryginalna publikacja wprowadzająca nową metodę automatycznej trójwymiarowej segmentacji i rekonstrukcji rozkładów jąder neuronów. Praca z głównym udziałem autora - opracowanie koncepcji nowej metody, opracowanie i implementacja algorytmów, udział w przeprowadzonych eksperymentach oraz napisanie manuskryptu.	W publikacji przedstawiono nowy algorytm do rekonstrukcji powierzchni jądra komórkowego i oddzielenia go od sąsiednich jąder. Przedstawiony algorytm nie wykorzystuje wstępnie zbudowanego modelu jądra, ani nie wykonuje progowania obrazu, co czyni go odpornym na zmiany intensywności obrazu i słaby kontrast. Przedstawiona metoda jest ogólnie przeznaczona do segmentacji zatłoczonych, nakładających się obiektów w przestrzeni 3D. Istotny wkład do dziedziny dostrzeżony przez ekspertów (11 cytowań od 2019 roku).
4.	Trzaskoma, P#, Ruszczycki, B#, Lee, B#, Pels, K., Krawczyk, K., Bokota, G., Szczepankiewicz, A., Aaron, J., Walczak, A., Śliwińska, M., Magalska, A., Kadlof, M. Wolny A., Parteka Z., Arabasz S., Kiss-Arabasz M., Plewczynski D., Yijun R., Wilczynski G. Ultrastructural visualization of 3D chromatin folding using volume electron microscopy and DNA in situ hybridization. <i>Nature communications</i> , 11(1), 1–9 (2020).	Oryginalna praca, w której po raz pierwszy zademonstrowano metodę łączącą mikroskopię elektronową z fluorescencyjną hybrydyzacją in situ. Wkład wnioskodawcy w tę pracę polegał na opracowaniu metody identyfikacji, segmentacji i analizy określonego regionu upakowanej chromatyne zlokalizowanej w obrębie ludzkiego genomu oraz zastosowaniu jej do rekonstrukcji i analizy obrazu. Ponadto dr Ruszczycki uczestniczył w projektowaniu eksperymentów i metod przetwarzania danych, opracował oprogramowanie niezbędne do uzyskania wyników i przygotował analizy statystyczne.	Praca jest bardzo istotnym wkładem pokazującym nową metodę pomiarów trójwymiarowej struktury fałdowania chromatyne. 20 cytowań w ciągu 3 lat potwierdza istotne zainteresowanie środowiska naukowego działającego w tym obszarze.
5.	Baczyńska, E., Pels, K., Basu, S., Włodarczyk, J., Ruszczycki, B*. Quantification of Dendritic Spines Remodeling under Physiological Stimuli and in Pathological Conditions. <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , 22(8), 4053, (2021).	Praca przeglądowa w której habilitant wprowadził systematyczny przegląd metodyki doświadczalnej używanej w ilościowym obrazowaniu remodelowania kolców dendrytycznych (metod obrazowania, przygotowania próbek, modeli biologicznych, używanych narzędzi programistycznych jak również analiz statystycznych). Praca z dominującym wkładem dr Ruszczyckiego.	Jako praca przeglądowa stanowi istotny wkład w rozwój metod obrazowania stosowanych w biologii. Główny nacisk pracy położony jest na przegląd obserwowanych efektów ilościowych w obrazach wpływających na ocenę zjawisk plastyczności neuronalnej. Praca o znacznym wpływie na dziedzinę z potwierdzeniem 33 cytowań w ciągu 3 lat w bazie Web of Science.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawione do recenzji osiągnięcie naukowe w formie cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w branżowych czasopismach naukowych o zasięgu globalnym reprezentuje osiągnięcie naukowe o wystarczającym stopniu nowości, jakości i znaczenia dla rozwoju dziedziny obrazowania biologicznego, i moim zdaniem może stanowić podstawę do nadania stopnia doktora habilitowanego. Na uwagę zasługuje dobra jakość opublikowanych prac, oryginalność pomysłów, nowatorstwo i aktualność tematyki badawczej. Bardzo istotne jest również dobry poziom rzemiosła naukowego aplikanta, jego umiejętności

praktycznych oraz zdolności współpracy i adaptacji swoich umiejętności do potrzeb badaczy działających w innych dyscyplinach naukowych. Należy również podkreślić wysokie umiejętności komunikacyjne przejawiające się bardzo syntetycznym i informatywnym autoreferatem.

Słabe strony w dotychczasowej pracy naukowej to niewielka liczba wystąpień konferencyjnych oraz brak doświadczenia w kierowaniu grantami badawczymi. Może to sugerować pewne deficyty w przygotowaniu Pana Ruszczyckiego do roli kierownika grupy badawczej lub promotora prac doktorskich (samodzielnego pracownika naukowego). Powodem tego może być silnie techniczna i usługowa działalność kandydata w pierwszych projektach, w których uczestniczył jako młody doktor i podczas których zmieniał swoje zainteresowania naukowe z fizyki cząstek elementarnych na obszar zastosowań optyki. Zauważalna jest jednak duża oryginalność i świeżość pomysłów oraz niestandardowe myślenie o rozwiązywanych problemach, co pozytywnie równoważy wspomniane niedociągnięcia.

Biorąc pod uwagę wszystkie powyżej zawarte informacje oświadczam, że osiągnięcia naukowe aplikanta odpowiadają wymaganiom określonym w art. 219 ust. 1 pkt 2, i opiniuję pozytywnie wniosek o nadanie stopnia doktora habilitowanego panu doktorowi Błażejowi Ruszczyckiemu.

Prof. dr hab. Maciej Wojtkowski

