

Warszawa 27.02.2025

Prof. dr hab. Maciej Wojtkowski
Kierownik Międzynarodowego Centrum Badań Oka,
Instytut Chemii Fizycznej,
Polska Akademia Nauk
ul. Kasprzaka 44, 01-224 Warszawa

Recenzja pracy doktorskiej pana magistra Pawła Szczypkowskiego

Opiniowana praca doktorska pana magistra Pawła Szczypkowskiego zatytułowana „Spatiotemporal Light Manipulation for Nonlinear Microscopy” została wykonana pod promotorską opieką pana Profesora dr hab. Tadeusza Stacewicza oraz dr Radka Łapkiewicza na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego. Rozprawa doktorska ma formę monografii zawierającej streszczenie w języku polskim i angielskim, listę skrótów, 6 rozdziałów oraz dodatki z dokładną charakterystyką i praktycznymi wskazówkami dotyczącymi zbudowanych stanowisk pomiarowych. Dodatkowo w monografii znajdują się: bibliografia, podziękowania, lista osiągnięć autora oraz deklaracja autorstwa. Pan Szczypkowski jest autorem lub współautorem 5 manuskryptów, z których trzy opublikowane są w źródłach open access (ArXiv i bioRxiv), jedna pierwszoautorska praca opublikowana jest w Biomedical Optics Express – czasopiśmie o znaczącej renomie międzynarodowej i jeden artykuł jest w przygotowaniu. Na liście umieszczono szczegółowo wkład autora do wieloautorskich publikacji poprzez określenie opisowe udziału w podjętych pracach badawczych.

Rozprawa doktorska pana magistra Pawła Szczypkowskiego ma charakter eksperymentalny z głównym skupieniem uwagi na metodach mikroskopii optycznej w warunkach obrazowania przez ośrodki silnie rozpraszające. Zagadnienie to stanowi jedno z kluczowych wyzwań współczesnej optyki fizycznej. W tkankach biologicznych wielokrotne rozpraszanie prowadzi do zaniku składowej balistycznej, degradacji funkcji rozprzestrzeniania punktu (PSF) oraz gwałtownego spadku stosunku sygnału do szumu wraz z głębokością. Klasyczne podejście dyfrakcyjne przestaje być adekwatne, a propagacja światła ma charakter statystyczny. Przełomem koncepcyjnym były prace Allarda Moskasa i Ivo Vellekoopa, które wykazały, że mimo pozornej losowości pola za ośrodkiem rozpraszającym zachowuje deterministyczny charakter i może być kontrolowane poprzez kształtowanie frontu fali. Zastosowanie modulacji fazowej (np. SLM) umożliwiło ogniskowanie światła za dyfuzorem oraz odzyskiwanie informacji przestrzennej, inicjując dynamiczny rozwój technik wavefront shaping i optyki złożonych ośrodków. Strategie wykorzystujące nieliniowość optyczną stały się kluczowym

narzędziem selekcji sygnału z głębi próbki w warunkach rozpraszania. Mikroskopia dwufotonowa umożliwia wzbudzenie fluorescencji wyłącznie w ognisku, co istotnie redukuje tło spoza płaszczyzny obrazowania i zwiększa głębokość penetracji. Jej rozwinięciem jest temporal focusing, w którym kompresja impulsu femtosekundowego zachodzi tylko w zadanej warstwie, zapewniając osiową selektywność przy szerokopółowym wzbudzeniu. Uzupełnieniem tych podejść są techniki detekcyjne, takie jak Image Scanning Microscopy (ISM), które poprzez analizę przestrzennego rozkładu sygnału umożliwiają numeryczne zawężenie efektywnej funkcji PSF i poprawę rozdzielczości oraz kontrastu, także w obecności aberracji i rozproszenia. Równolegle rozwijana jest inżynieria profilu wiązki, zwłaszcza wykorzystanie wiązek Bessela o wydłużonym ognisku i właściwościach samoodtwarzania. W mikroskopii fluorescencyjnej i wielofotonowej zwiększają one stabilność ogniska i efektywną głębokość obrazowania w niejednorodnych tkankach. Drugą komplementarną strategią są metody oparte na skończonej spójności światła, w tym OCT, gdzie bramkowanie spójnością światła pozwala selektywnie izolować sygnał z określonej głębokości i ograniczać wpływ wielokrotnego rozpraszania. Wspólnie podejścia te – nieliniowość wzbudzenia, kształtowanie wiązki oraz kontrola spójności – tworzą zestaw komplementarnych narzędzi umożliwiających obrazowanie o wysokiej rozdzielczości w wymagających, silnie rozpraszających ośrodkach.

Sama rozprawa doktorska Pana Pawła Szczypkowskiego poświęcona jest rozwojowi i zrozumieniu metod mikroskopii nieliniowej w kontekście fundamentalnego ograniczenia dyfrakcyjnego oraz kompromisu głębokość–rozdzielczość w ośrodkach niejednorodnych optycznie, który stanowi jedno z głównych wyzwań współczesnego obrazowania optycznego. Autor wychodzi od podstaw teoretycznych, omawiając klasyczne sposoby przekraczania limitu dyfrakcji oraz rolę nieliniowości optycznej jako mechanizmu poprawy selektywności przestrzennej. Centralnym przesłaniem rozprawy jest teza, że silne nieliniowości optyczne nie tylko zwiększają kontrast i rozdzielczość, ale mogą stać się kluczowym narzędziem w przewyżnianiu ograniczeń narzucanych przez rozpraszanie i propagację w złożonych ośrodkach.

Znaczną część pracy stanowi rozwój i krytyczna analiza platform dwufotonowych, w tym mikroskopii dwufotonowej, jej wariantów takich jak image scanning microscopy oraz wzbudzania wiązką Bessela, a także techniki temporal focusing w połączeniu z Super-resolution Optical Fluctuation Imaging (SOFI). Autor nie tylko prezentuje wyniki publikacyjne, ale również szczegółowo dokumentuje budowę i optymalizację układów eksperymentalnych, ich ograniczenia praktyczne oraz parametry pracy, kładąc nacisk na reprodukowalność i dostępność wiedzy technologicznej. Istotnym elementem jest ocena, które koncepcje – mimo teoretycznego potencjału – w praktyce nie przyniosły oczekiwanej poprawy jakości obrazowania.

Kulminacją rozprawy jest przedstawienie nowej koncepcji obrazowania nieliniowego z wykorzystaniem silnych nieliniowości i oświetlenia plamkowego – NISE (Nonlinear Imaging with Speckle Excitation). Metoda ta proponuje nowy paradygmat obrazowania przez ośrodki silnie rozpraszające, pokazując, że odpowiednio wysoka nieliniowość może umożliwić uzyskanie superrozdzielczości i skuteczne obrazowanie przez warstwy rozpraszające bez złożonej korekcji frontu fali. Praca ma charakter zarówno koncepcyjny, jak i inżynierski: łączy rozwój nowych idei z ich pełną implementacją eksperymentalną oraz dokumentacją użytkową, tworząc fundament pod przyszłe techniki wysokorozdzielczego obrazowania w wymagających warunkach biologicznych. W metodzie tej połączenie właściwości statystycznych i efektu pamięci kątowej pól plamkowych (angular memory effect AME) oraz silnie nieliniowej odpowiedzi nanocząstek fotonowych (ANP) umożliwia uzyskanie obrazowania o superrozdzielczości i niskim tle głęboko pod warstwą rozpraszającą. Kluczowym mechanizmem jest generacja zlokalizowanego punktu wzbudzenia w wyniku losowego oświetlenia plamkowego próbki i wykorzystanie wysokiej nieliniowości ośrodka do uzyskania odpowiedzi fluorescencyjnej z subdyfrakcyjną ograniczoną lokalizacją. Dzięki efektowi AME możliwe jest klasyczne skanowanie rastrowe bez konieczności kształtowania frontu fali. Centralnym punktem i w mojej opinii świetnym pomysłem jest wykorzystanie statystyki pola plamkowego do ustawienia poziomów interakcji z silnie nieliniowym fluoroforem, która umożliwia wykorzystanie dobrze izolowanych jasnych plamek o rozmiarach ograniczonych dyfrakcyjnie do wzbudzenia fluorescencji. Dodając do tego własność AME można wykorzystać taki unikatowy wzór plamkowy do skanowania obrazowanego obiektu. W pracy pokazano teoretycznie jak obliczyć odpowiednią różnicę intensywności plamek bazując na fundamentalnym opisie optyki statystycznej.

Ta autorska metoda została zaimplementowana w zmodyfikowanym mikroskopie skaningowym (wzbudzenie 1064 nm, detekcja emisji konwersji w górę ~800 nm) z użyciem nanokryształów domieszkowanych jonami lantanowców. Osiągnięto rozdzielczość poprzeczną 560 nm (FWHM), ponad dwukrotnie lepszą niż limit Abbego dla zastosowanej konfiguracji (1,2 μm). Technika nie wymaga optyki adaptacyjnej, złożonych układów ani iteracyjnych algorytmów rekonstrukcji, a poprawa rozdzielczości skaluje się jak \sqrt{N} dla nieliniowości rzędu N . Autor wspomina, że metoda ta oferuje także potencjalnie większą głębię obrazowania niż mikroskopia wielofotonowa, jednak potwierdzenia tej tezy brakuje w pracy. Ograniczeniem pozostaje czas pomiaru (ok. 1 ms), determinowany dynamiką odpowiedzi nieliniowej, a nie obciążeniem obliczeniowym. Metoda jest kompatybilna z konwencjonalnymi mikroskopami skaningowymi i otwiera perspektywy zastosowań hybrydowych w zaawansowanym obrazowaniu optycznym.

W pracy opisano szczegółowo podstawy fizyczne nowej metody oraz warunki przeprowadzonego eksperymentu, który zrealizowany był przez konstrukcję „od zera”

zaawansowanego układu optycznego. Opisano również własności wykorzystanych fluoroforów silnie nieliniowych przygotowanych przez współpracowników pana Szypkowskiego z Instytutu Niskich Temperatur PAN we Wrocławiu. Pokazano wyniki charakteryzacji wykorzystanych kryształów – w szczególności badano intensywność sygnałów fluorescencji w funkcji mocy wiązki wzbudzającej – pokazując silnie nieliniowy charakter działania fluoroforów. W pracy pokazano bardzo przekonujący wynik obrazowania mikrokryształu ANP przez klasyczny skaningowy mikroskop bez warstwy rozpraszacza i z warstwą rozpraszacza gdzie sygnał fluorescencyjny był całkowicie zaburzony. Po zastosowaniu nowej metody NISE obraz struktury mikrokryształu był odtworzony z dużą wiernością do oryginalnego pomiaru bez rozpraszacza.

Oczywiście jak każda metoda superrozdzielcza NISE może pracować poprawnie jedynie przy ograniczonych warunkach. Metoda ta wykazuje istotną wrażliwość na poziom mocy wzbudzenia oraz strukturę wzoru plamkowego. Jej działanie opiera się na przekroczeniu progu lawinowej nieliniowości nanocząstek – zbyt niska moc nie generuje sygnału, natomiast zbyt wysoka prowadzi do nasycenia i udziału wielu ziaren plamkowych w tworzeniu obrazu. W efekcie pojawiają się tzw. „obrazy bliźniacze”, czyli przesunięte duplikaty wynikające z konkurencji kilku jasnych ziaren. Oznacza to, że poprawne odwzorowanie obiektu zachodzi tylko dla wybranych realizacji pola plamkowego, w których jedno ziarno dominuje nad pozostałymi. W praktyce wymaga to wykonywania wielu skanów z różnymi wzorami plamek oraz opracowania wiarygodnej metryki identyfikującej obraz wolny od artefaktów, ewentualnie zastosowania złożonych procedur rekonstrukcyjnych. Metoda nie jest więc w pełni deterministyczna i jej jakość zależy od statystycznych właściwości oświetlenia. Drugą grupę ograniczeń stanowią wyzwania związane z obrazowaniem w grubych, objętościowych ośrodkach rozpraszających. Choć intensywność najjaśniejszego ziarna plamkowego maleje z głębokością wolniej niż ognisko balistyczne, całkowita moc potrzebna do przekroczenia progu nieliniowości pozostaje wysoka, co w praktyce prowadzi do ryzyka fotouszkodzeń – szczególnie przy progach lawinowych rzędu setek $\text{kW}\cdot\text{cm}^{-2}$. Dodatkowo efekt AME szybko zanika z grubością ośrodka, ograniczając pole widzenia i utrudniając skanowanie, a brak naturalnej sekcjonowania osiowego powoduje integrację sygnału z różnych głębokości. Przejście od cienkich warstw do rzeczywistego obrazowania głębokiego wymaga więc zarówno obniżenia progów nieliniowości znaczników, jak i opracowania skutecznych strategii sekcjonowania i stabilnego skanowania w warunkach silnego, objętościowego rozpraszania. Te ograniczenia zostały właściwie zaakcentowane w pracy pokazując dojrzałość autora w kwestii zrozumienia realnych ograniczeń fizycznych i technicznych dla nowej metody.

Autor w swojej rozprawie wskazuje aktualny stan wiedzy na bazie literatury światowej. Analizę źródeł przedstawioną w rozprawie dokonano bez zarzutu. Choć tematyka pracy podjęta przez pana Szczypkowskiego jest bardzo dynamicznie rozwijana przez wiele ośrodków na świecie i jest jednym z najważniejszych wyzwań dla współczesnej optyki fizycznej to sama idea nowej metody wprowadzonej w grupie dr Łapkiewicza jest absolutnie konkurencyjna do najlepszych ośrodków na świecie zajmujących się tym tematem. Dodatkowo droga, która prowadziła pana Szczypkowskiego poprzez prace laboratoryjne nad (opisanymi również w rozprawie) alternatywnymi technikami obrazowymi potwierdza jego świetne eksperckie przygotowanie i osiągnięcie odpowiedniego poziomu samodzielności. Przyjęta przez kandydata metoda badań nie budzi zastrzeżeń we wszystkich przedstawionych w rozprawie aspektach i pokazuje na jego wysoki poziom przygotowania merytorycznego. Sama praca jest napisana przejrzysto i zrozumiale. Generalnym mankamentem pracy jest subiektywny charakter narracji, który nie jest typowy dla rozpraw doktorskich. Można to traktować jako pewne oryginalne i twórcze podejście, które ma pomóc w komunikacji i wyjaśnianiu szczegółów kolejnym adeptom w grupie dr Łapkiewicza. Moim zdaniem taki jest główny – utylitarny cel pracy doktorskiej, tym bardziej, że prace doktorskie w polskim systemie nie mają statusu pełnoprawnych publikacji – pomimo wysiłku włożonego w proces edycji tak ze strony twórców, opiekunów jak i recenzentów. W tak dużym tekście nie sposób uniknąć drobnych podknięć, uproszczeń czy błędów językowych. Poniżej przedstawiam kilka z nich, które udało mi się wyłapać.

Drobne błędy merytoryczne i językowe:

1. Rozdział 3.1 :

- „validation of figure 2.2 on your own skin” brzmiało by lepiej : “a simple validation of Figure 2.2 using your own skin”
- “The increase, however, should be subtle” brzmiałoby lepiej jako “The increase, however, must be carefully managed”
- Zdanie „We have just confirmed that the longer wavelengths get through biological tissue better than shorter ones.” - jest pewnym uproszczeniem, chodzi o pewne okno optyczne, gdzie osłabienie wiązki propagującej przez rozpraszacz jest mniejsze dla dłuższych długości fal (NIR) – nie jest to prawda dla wszystkich „dłuższych fal”.

2. Rozdział 3.5

- Zdanie : „I have heard that some physicists are this kind of people, who think they can become experts in any field.” jest niefrasobliwe i może zbyt generalizujące jak na rozprawę doktorską.

- GCaMP quench fluorescence if there aren't many calcium ions – jest pewnym uproszczeniem – to zmiana konformacji CaM w obecności Ca⁺ powoduje zmianę jasności sygnału fluorescencji

3. Rozdział 4.1

- “no energy is lost during propagation” – można dodać “ assuming that”
- Akapit zawierający zdanie : “Such imaging of the grating causes the pulse to be spatially chirped and hence temporally elongated away from the grating’s image plane” jest dla mnie niejasny – jak rozumiem obrazowanie siatki na płaszczyźnie próbki gwarantuje, że różne składowe spektralne łączą się ponownie tylko na płaszczyźnie sprzężonej; poza tą płaszczyznę chirp przestrzenny prowadzi do efektywnego rozszerzenia impulsu czasowego.

4. Rozdział 4.5

- Zbędny przypis: “Listening to music on a loud-speaker resulted in focus shift along with the beat.”

5. Rozdział 5.1

- Zdanie sufficiently high optical nonlinearity, by itself, can sort of remove the scattering layer as if it was not present in the beam path” jest sporym uproszczeniem można to ująć bardziej precyzyjnie, np.: „...może skutecznie tłumić wpływ wszystkich z wyjątkiem najjaśniejszych ziaren plamkowych, sprawiając, że warstwa rozpraszająca wydaje się przezroczysta pod względem lokalizacji wzbudzenia.”
- “...as well as immunity to aberrations” – to nie jest do końca prawda ponieważ aberracje mogą zmienić rozkład ekstremów pola plamkowego – szczególnie istotne jest to w trakcie skanowania.
- „The imaging depth, improved by higher-order nonlinear responses, has the potential to exceed that of multiphoton microscopy.’ – nie ma w pracy potwierdzenia tej tezy więc jest to na tym etapie jedynie spekulacja.
- “należałoby unikać wyrażen typu “ super-resolution, beyond the reach of current methods” – są jednak nieprecyzyjne w świetle aktualnego stanu rozwoju proponowanej metody.
- Wiele stwierdzeń dotyczących statystyki plamek w tym rozdziale dotyczy w pełni wyewoluowanego pola plamkowego (statystyka, separowalność maximów etc) jednak w przypadku prawdziwych biologicznych rozpraszaczy mamy do czynienia z niejednorodnościami we właściwościach rozpraszania, co prowadzi

zwykle do powstawania bardzo złożonych i częściowo wyewoluowanych pól plamkowych - jak to wpływa na stosowalność metody?

- Zdanie : the maximum intensity of the speckle grain can also be approximated with the negative exponential.” jest niezrozumiałe. Czy chodzi o to, że maksymalna intensywność jest zgodna z rozkładem wartości ekstremalnych wyprowadzonym z statystyki plamek o rozkładzie ujemnowykładniczym?

6. Rozdział 5.2

- Opis soczewek T2 w tekście i w podpisie obrazka 5.7 wskazuje na inne ogniskowe (raz $f = -100$ mm, $f = 150$ mm a w podpisie $f = -75$ mm, $f = 100$ mm).
- “The third $4f$ (L6, L6)” – prawdopodobnie jest literówka w oznaczeniu jednej z soczewek.
- Sformułowanie „in the form of $R\{I_{exc} = I^n_{exc}\}$ ” jest dla mnie niezrozumiałe.
- Czy sformułowanie: “...the cycle repeats, doubling the number of excited ions each ‘round’” jest zawsze prawdziwe?
- “I used 0.5deg holographic diffuser (Edmund Stock #47-988). The light after this diffuser contains less than 1% of ballistic light, and transmits more than 80% of the beam, and is spread over a relatively small area, being ideal for my experiments.” – nie jestem pewien czy taka sytuacja jest możliwa przy tak małym kącie rozpraszania. 1% fotonów balistycznych wygląda na zbyt małą liczbę. Czy można to potwierdzić odnośnikiem lub eksperymentalnie?

Podsumowując stwierdzam, że praca doktorska Pana magistra Piotra Szcypkowskiego w pełni spełnia warunki stawiane pracom doktorskim przez ustawę o tytule Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późniejszymi zmianami) i stawiam wniosek o dopuszczenie jej do publicznej obrony. Pomimo dotychczasowego niewielkiego zatwierdzonego dorobku publikacyjnego uważam, że poziom ekspertyzy jaką osiągnął kandydat i poziom pracy o metodzie NISE (Pawel Szcypkowski, Adrian Makowski, Wojciech Zwoliński, Katarzyna Prorok, Piotr Wasylezyk, Artur Bednarkiewicz, Radek Lapkiewicz, "Overcoming light scattering with high optical nonlinearity", Arxiv (2025)) - która zakładam, że przygotowywana jest do publikacji w jednym z naczelných czasopism z dziedziny optyki - **stawiam wniosek o wyróżnienie tej dysertacji w oparciu o ocenę ekspercką osiągnięcia naukowego kandydata.** W szczególności osiągnięciem kandydata jest wprowadzenie metody obrazowania mikroskopowego Nonlinear Imaging with Speckle Excitation (NISE).

Z poważaniem,

