



**Wojskowa
Akademia
Techniczna**
im. Jarosława Dąbrowskiego

Instytut
Optoelektroniki 

dr hab. inż. Przemysław Wachulak
Instytut Optoelektroniki
Wojskowa Akademia Techniczna
ul. W. Urbanowicza 2
00-908 Warszawa

Warszawa, 5 marca 2018 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr. Wojciecha Krauze
pt. „Methods for the numerical analysis of phase biological microsamples
in limited -angle optical tomography”**

Praca doktorska magistra Wojciecha Krauze powstała pod kierunkiem Pani prof. dr hab. inż. Małgorzaty Kujawińskiej oraz dr. inż. Piotra Makowskiego – promotora pomocniczego. Praca została złożona na Wydziale Mechatroniki Politechniki Warszawskiej w 2018 roku. Praca dotyczy aktualnych i bardzo ważnych zagadnień związanych z obrazowaniem trójwymiarowym przy ograniczonym zakresie kątowym akwizycji projekcji tomograficznych w zakresie widzialnym promieniowania elektromagnetycznego. Podstawowym zastosowaniem zagadnień przedstawionych w rozprawie jest mikroskopowe, trójwymiarowe obrazowanie ilościowe komórek i wycinków tkanek biologicznych z pomiarem ilościowym fazy.

Detekcja i określenie ilościowe fazy promieniowania elektromagnetycznego jest od dawna niezmiernie ważnym aspektem obrazowania. W obrazowaniu to właśnie faza promieniowania elektromagnetycznego pochodzącego od obrazowanej próbki często niesie większość informacji zawartej w obrazach, ponadto, nie da się jej zmierzyć w sposób bezpośredni, a jedynie pośrednio poprzez jej zamianę na inne wielkości fizyczne. Tak dzieje się w holografii, gdzie faza promieniowania jest zamieniana na jego intensywność, rejestrowaną następnie za pomocą standardowych detektorów jakimi są kamery CMOS lub

CCD. W kolejnym kroku (rekonstrukcji) numerycznie zastępuje się proces optycznej rekonstrukcji, poprzez np. propagację wsteczną frontu falowego pochodzącego od obiektu do płaszczyzny, w której był on zlokalizowany podczas procesu rejestracji. Taka metodologia pozwala również na numeryczną rekonstrukcję w wielu płaszczyznach, zlokalizowanych blisko siebie, co pozwala na rekonstrukcję trójwymiarową badanego obiektu.

Innym sposobem pozwalającym na trójwymiarową rekonstrukcję obiektu badanego jest tomografia. Zazwyczaj, w tomografii obiekt obrazowany jest poprzez akwizycję wielu projekcji dla różnych kątów pomiędzy wybraną płaszczyzną obiektu, a osią optyczną układu obrazującego. Można to zrealizować najprościej poprzez obrót samego obiektu, lub też, np. w zastosowaniach medycznych poprzez obrót układu obrazującego względem stacjonarnego obiektu badanego. W niektórych jednak przypadkach nie jest możliwa akwizycja projekcji w kącie pełnym. Może to wynikać z ograniczeń dotyczących obiektu badanego (np. mikroskopijny obiekt umieszczony na podłożu o relatywnie dużych wymiarach uniemożliwiających pełny obrót), bądź też układu obrazującego (skanowanie wiązki w układzie optycznym mikroskopu może odbywać się w zakresie kątów określonym przez kąt maksymalny związany z aperturą numeryczną obiektywu). Zagadnienie wspomniane przeze mnie powyżej określane jest jako optyczna tomografia z ograniczonym zakresem kątowym projekcji.

Celem rozprawy było opracowaniem pełnej ścieżki przetwarzania danych, pozyskiwanych z układu optycznej tomografii z ograniczonym zakresem kątowym projekcji. Rozprawa przedstawia algorytm przetwarzania danych, w postaci hologramów pozyskanych dla różnych kątów propagacji wiązki promieniowania elektromagnetycznego w stosunku do badanego obiektu w pewnym skończonym zakresie kątowym, np. dla stałego kąta elewacji i pełnego zakresu kątów azymutalnych, w celu dokładnej, ilościowej rekonstrukcji rozkładu trójwymiarowego współczynnika załamania w strukturach biologicznych, takich jak komórki.

Rozprawa została przygotowana w formie tradycyjnej; dokumentu składającego się z sześciu rozdziałów na 92. stronach, 41 rysunków i obrazów oraz 99 odnośników literaturowych. W rozdziale pierwszym Doktorant przedstawia motywację, jaka skłoniła go do zajęcia się tematyką, w której się specjalizuje. Jest nią opracowanie metody niedestrukcyjnego, optycznego obrazowania ilościowego próbek biologicznych. Autor we wstępie opisuje dostępne metody obrazowania próbek biologicznych, takie jak mikroskopia w zakresie widzialnym, mikroskopia fluorescencyjna i konfokalna. Przedstawia też techniki obrazowania fazowego (QPI) takie jak cyfrowa mikroskopia holograficzna (DHM) i optyczna tomografia dyfrakcyjna (ODT) bazująca na akwizycji projekcji holograficznych. Opisuje zalety i wady pozyskiwania projekcji w pełnym kącie oraz w ograniczonym zakresie, konkludując, iż obecnie są metody do rekonstrukcji tomograficznej w ograniczonym zakresie kątów, ale nie są one dedykowane do obrazowania próbek biologicznych w skali mikro. W rozdziale tym Autor przedstawia zatem hipotezę swojej pracy, która mówi o możliwości minimalizacji błędu rekonstrukcji mikroobektów biologicznych poprzez użycie dedykowanej do tego celu procedury przetwarzania danych, nazwanej TVIC (ang. Total Variation Iterative Constraint). Metoda ta wykorzystuje

minimalizację wahań rekonstrukcji do odtworzenia granic obiektu oraz algorytm Gerchberga-Papoulisa (GP), w celu obliczenia rozkładu współczynnika załamania wewnątrz tych granic oraz w znaczący sposób zmniejsza zniekształcenia zrekonstruowanych obiektów biologicznych i błąd rozkładu współczynnika załamania.

W rozdziale drugim Autor przedstawia metody pomiaru fazy w próbkach o częściowej lub pełnej transmisji, takie jak cyfrowa mikroskopia holograficzna (DHM), fourierowska mikroskopia ptychograficzna (FPM), mikroskopia SLIM, tomografia SLIT, oraz, z uwagi na fakt, iż powyższe metody nie pozwalają na pełną, trójwymiarową reprezentację współczynnika załamania, przedstawia metodę ODT. Opisuje następnie procedurę akwizycji danych pomiarowych w tej metodzie i przedstawia możliwe konfiguracje eksperymentalne ODT. Z uwagi na fakt, iż obrazowanie próbek z użyciem metody ODT należy do problemów lub też zagadnień odwrotnych, do określenia parametrów wejściowych (w tym przypadku parametrów optycznych badanych obiektów) należy użyć procedur numerycznych, odpowiednio opracowanych do tego celu. W rozdziale tym Autor przedstawia podstawy fizyczne tych procedur oraz wprowadza Czytelnika do optycznej tomografii dyfrakcyjnej z ograniczonym zakresem kątowym projekcji (LAODT). W tym celu opisuje przybliżenia Borna i Rytova oraz określa warunki ich stosowania. Z uwagi na fakt, iż rozprawa poświęcona została analizie mikropróbek biologicznych, w których istnieją relatywnie niewielkie gradienty współczynnika załamania, w dalszej części pracy stosuje przybliżenia Rytova. Następnie przedstawia główne bloki w algorytmie LAODT, które dokładnie opisuje oraz przedstawia możliwe sposoby zmiany kąta oświetlenia próbki, które najczęściej są stosowane w LAODT. Do tych sposobów zalicza skanowanie wiązką za pomocą galwanometrycznie sterowanych zwierciadeł, mikroluster oraz fazowych modulatorów odbiciowych. Opisuje ich możliwości, wady i zalety w zastosowaniach do obrazowania mikropróbek biologicznych. W tym rozdziale Autor przedstawia także ograniczenia metody LAODT, takie jak zaniżanie wartości współczynnika załamania w zrekonstruowanych obrazach, a także, zniekształcenia występujące w rekonstrukcji wewnętrznej struktury obiektu oraz jego zewnętrznej geometrii, spowodowane ograniczeniem w zakresie kątów projekcji, powodującym braki sygnału w widmie rekonstrukcji. W końcowej części rozdziału opisuje niektóre przykłady metod rekonstrukcji, konkludując, iż metody algebraiczne nie biorą pod uwagę zjawiska dyfrakcji. Jednakże połączenie ich z metodą minimalizacji Total-p Variation (TpV) pozwala na uzyskanie wysokiej jakości rekonstrukcji w ODT. Takie połączenie ma jednak swoje ograniczenia, gdyż zakłada, iż obiekt badany może być aproksymowany funkcją skokowej zmiany współczynnika załamania (funkcja ma przedziałami stałą wartość), co nie zawsze jest prawdą.

W rozdziale trzecim Autor przybliży Czytelnikowi metodę TpV, która pozwala na częściowe wypełnienie braku sygnału w widmie rekonstrukcji, powodujące w następstwie zniekształcenia zrekonstruowanego obiektu. Jednakże metoda ta w skrajnych przypadkach bardzo uogólnia zrekonstruowany obiekt biologiczny, z tego powodu w niektórych przypadkach może być nieakceptowalna. Autor proponuje zatem metodę TVIC, która może być użyta do rekonstrukcji obiektów o ciągłej funkcji współczynnika załamania. Jest to główna nowość w rozprawie. W rozdziale tym opisuje dokładnie zaproponowaną przez

siebie metodę. Najprościej mówiąc, proces rekonstrukcji podzielony został na dwa podprocesy. W pierwszym z nich prawidłowo rekonstruowana jest zewnętrzna część obiektu (informacja o brzegach obiektu), zaś w drugim podprocesie rekonstruowany jest rozkład współczynnika załamania wewnątrz badanego obiektu. Następnie opisuje procedury „czyszczenia” zrekonstruowanego obrazu, które mają za zadanie usunięcie niechcianych, nierzeczywistych artefaktów, mogących pojawić się w zrekonstruowanej objętości. To wszystko przedstawione zostało przez Autora na podstawie rekonstrukcji numerycznych obiektów fantomowych o dobrze zdefiniowanych i znanych a-priori parametrach, gdzie porównane zostały zrekonstruowane obrazy dla klasycznego algorytmu rekonstrukcji GP z rekonstrukcjami wspomaganymi opracowaną przez Autora metodą TVIC (TVIC-GP). Wyniki w jasny i przekonujący sposób przedstawiają wyższość metody wspomaganą TVIC-GP. Z uwagi na fakt, iż metoda TVIC-GP jest w drugiej części iteratywna, wymaga określenia właściwego kryterium zatrzymania procesu rekonstrukcji. W przeciwnym wypadku, po osiągnięciu optymalnej rekonstrukcji dla pewnej liczby iteracji, dalsze ich zwiększanie zaczyna ją pogarszać. Autor, w swoich rozważaniach numerycznych, bada również wpływ ilości projekcji na jakość rekonstrukcji i określa ich liczbę na około 90 na podstawie wykresu jakości rekonstrukcji jako funkcji liczby projekcji. Na podstawie przedstawionych symulacji numerycznych procesu rekonstrukcji z użyciem metody TVIC-GP Autor stwierdza poprawność hipotezy badawczej, jednakże do pełnego sukcesu potrzebna jest również weryfikacja eksperymentalna. Algorytm TVIC-GP jest pierwszym algorytmem tego typu, dedykowanym bezpośrednio do rekonstrukcji próbek biologicznych w LAODT. Nie jest on jednak wolny od wad i artefaktów, które mimo wszystko pojawiają się w symulacjach numerycznych.

Aby częściowo rozwiązać ten problem, w rozdziale czwartym Autor przedstawia modyfikację algorytmu TVIC-GP, którą jest LAODT o rozszerzonej głębi ostrości. Modyfikacja polega na zmianie płaszczyzny rekonstrukcji poprzez zmianę ogniskowej elementu optycznego. Pozwala to na jednakową rozdzielczość rekonstrukcji w całej zrekonstruowanej objętości. Oprócz skanowania przestrzennego w układzie następuje również skanowanie wzdłuż osi optycznej, co pozwala na zebranie projekcji dla różnych płaszczyzn przecinających obiekt na różnej głębokości. Jest to bardzo ważne, jeśli grubość obiektu jest znacznie większa niż głębia ostrości (DOF) użytego obiektywu.

W rozdziale piątym Autor przedstawia weryfikację eksperymentalną swoich symulacji. W pierwszej części przeprowadza eksperyment, który udowadnia działanie i superlatywne właściwości metody TVIC-GP w porównaniu do innych klasycznych metod GP i DI. Jako próbek używa mikrokulki PMMA i komórki biologiczne, takie jak fibroblasty. W części drugiej rozdziału Autor potwierdza eksperymentalnie działanie LAODT o rozszerzonej głębi ostrości również na obiekcie rzeczywistym i biologicznym w postaci komórek raka prostaty. Wyniki eksperymentalne, wraz z poprzednio przedstawionymi symulacjami, w pełni potwierdzają hipotezę badawczą pracy. Autor stwierdza jednakże, iż głównym ograniczeniem zaproponowanych przez niego metod jest ilość danych zbieranych w procesie akwizycji oraz związany z tym czas potrzebny do ich rejestracji. Jednakże uważam, iż jest to ograniczenie, którego wpływ będzie minimalizowany wraz z dalszym rozwojem techniki komputerowej.

W ostatnim rozdziale pracy Autor przedstawia wnioski końcowe i plany na przyszłość, związane z tymi bardzo interesującymi i ważnymi z punktu widzenia obrazowania trójwymiarowego w zakresie widzialnym promieniowania elektromagnetycznego zagadnieniami.

Pracę przedstawioną przez Doktoranta, którą miałem przyjemność recenzować, nazwałbym pracą przede wszystkim teoretyczną z pewnym aspektem eksperymentalnym, który posłużył do weryfikacji symulacji numerycznych, udowadniając przy tym hipotezę pracy. Główny nacisk w pracy położony został jednak na symulacje numeryczne i opracowywanie nowych algorytmów, które sukcesywnie niwelują problemy lub też poszerzają obszar zastosowania poprzednich wersji. Algorytmy, będące osiągnięciem Autora, są według mnie najbardziej zaawansowanymi tego typu numerycznymi narzędziami do trójwymiarowego obrazowania fazowego, dedykowanego do zastosowań w obrazowaniu próbek biologicznych, jakie aktualnie występują. Zagadnienia przedstawione przez Autora w jego rozprawie zostały opublikowane w dwunastu publikacjach w czasopismach z listy filadelfijskiej, takich jak *Methods*, *Optics Express*, *Optical Engineering*, czy też *PLOS ONE* (6), czasopismach z listy B (1), oraz w *proceedingach SPIE* (5) w latach 2014-2017. Na podstawie badań, które Autor przedstawił w swojej rozprawie, mogę stwierdzić, iż jest on w światowej czołówce specjalistów zajmujących się tą tematyką.

Podsumowując, uzyskane przez Autora wyniki są bardzo ważne z punktu widzenia rozwoju metod trójwymiarowego obrazowania fazowego. Praca porusza problemy jak najbardziej aktualne i budzące duże zainteresowanie w środowisku naukowym, a także sugeruje sposób ich rozwiązania. Aparat matematyczny oraz algorytmika związana z przetwarzaniem dwu- i trójwymiarowych danych, jest na bardzo wysokim poziomie. Niektóre prace Autora opublikowane zostały w znanych i renomowanych czasopismach naukowych z listy JCR, takich jak na przykład *Methods* (IF = 3.802), *Optics Express* (IF = 3.148), *PLOS One* (IF = 2.806), *Journal of Biomedical Optics* (IF = 2.530). Aktualnie, liczba cytowań jego prac na podstawie danych z bazy Scopus wynosi 67, w tym dwa najbardziej cytowane artykuły z *Optics Express* (2016) i *Journal of Biomedical Optics* (2015), mają odpowiednio po 13 i 14 cytowań, co jest dobrym wynikiem pomimo krótkiego okresu czasu, jaki upłynął od chwili ich publikacji. Stwierdzam, iż rozprawa, jest przygotowana starannie. Napisana jest w języku angielskim, co z pewnością pomoże w jej łatwiejszym i szerszym odbiorze w zagranicznych środowiskach naukowych, zajmujących się pokrewną tematyką. Jej układ i struktura nie budzą zastrzeżeń. Jest napisana w sposób zwarty, prostym i zrozumiałym językiem. Wyniki badań Autor przedstawił i omówił w sposób przejrzysty i jasny, odnosząc się do treści zawartych w publikacjach naukowych swojego autorstwa, nie pomijając jednak doniesień innych grup badawczych, zajmujących się podobną tematyką. Wyciągnięte wnioski są poprawne i przekonujące.

Do pewnych mankamentów pracy lub jej aspektów wymagających doprecyzowania, według mnie należą:

1. strona 19: równanie 2.8 i potem 2.9 i 2.15: rozwiązanie równania 2.7, całka d^3r nie powinna być po wektorze. Potwierdzenie można znaleźć w D. Jackson, „*Classical Electrodynamics*”, 3ed. str. 245,
2. te same oznaczenia MO – main objective i MO – microscope objective (str. 17),

3. podpis pod rys. 2.2 “CCD - charged-coupled device” powinno być “CCD - charge-coupled device”,
4. strona 20, równanie 2.9, brak wyjaśnienia $u_b(r)$,
5. strona 22, rys. 2.4, α , γ – brak wyjaśnienia w tekście,
6. strona 30, równanie 2.19, wzór przedstawia dwuwymiarowy splot pomiędzy PSF i każdym punktem obiektu, jednak operator splotu nie był wspomniany w tekście,
7. strona 43: oznaczenia osi na rys a) i b). Dla większej przejrzystości lepiej byłoby oznaczyć je x [px], y [px], z [px]. Wtedy łatwiej byłoby zobaczyć, że przekrój przez płaszczyznę poziomą w a) jest na rys. b),
8. strona 70-71: rys. 5.4,5.5: przekroje A-A i B-B są odwrócone i niezgodne z kierunkiem osi y i z .

Proszę również o wyjaśnienie następujących kwestii podczas publicznej obrony:

1. Dlaczego szerokość fantoma sfery na rys 3.7 ma średnicę ok. 40-50 pikseli, a w przekrojach na rys. 3.9 ma 80-85 pikseli? Dlaczego wielkość piksela była zmieniana w tych dwóch przypadkach?
2. Strona 48: rys. 3.11., bardziej przekonujące co do stabilności rozwiązania byłoby przedstawienie kilku rezultatów rekonstrukcji na jednym wykresie. Czy wykonanie się kilkukrotnie kodu generuje takie same rekonstrukcje? Z mojego doświadczenia z tego typu kodami w otrzymanych rekonstrukcjach za każdym razem są różnice, jeśli inicjalizując proces rekonstrukcji zadaje się losową fazę.
3. Strona 49: „In the first group of algorithms, when the quality difference between two consecutive iterations drops below a certain value, the algorithm is stopped and next iterations are not calculated.” Te kryterium nie jest do końca dobre, moim zdaniem, ponieważ może się okazać, że dla dwóch sąsiednich iteracji, pomimo iż ich różnica (błąd) będzie bliska zeru, to quality factor będzie ciągle niski. Wtedy algorytm też się zatrzyma. Proszę o wyjaśnienie, czy trend krzywych Q_{xz} i RMSE jest zawsze taki jak np. na Rys. 3.14, czy też krzywa Q_{xz} może mieć inny kształt przy niezmienniej krzywej RMSE, co w praktyce pozwalałoby na taką możliwość.
4. Strona 63: wektor translacyjny został użyty w łączeniu fragmentów rekonstrukcji na różnych płaszczyznach. Natomiast jaki ma wpływ zmienne powiększenie otrzymane wskutek zmiany odległości płaszczyzny przedmiotowej od soczewki zmiennoogniskowej, co przy stałej wartości odległości obrazowej skutkuje minimalną zmianą powiększenia. Z uwagi na brak parametrów soczewki i jej możliwości przeogniskowywania jest to trudne do oceny. Czy wpływ był badany numerycznie / eksperymentalnie i czy jest on znaczący?
5. Strona 79: rys. 5.10: niektóre obszary w obrazach a) i b) dla różnych metod rekonstrukcji różnią się znacznie od siebie. Niektóre ze zmian można zrozumieć biorąc pod uwagę lepszą rozdzielczość w F-TT, ale niektóre po prostu wyglądają inaczej. Czy jest to efekt działania programów rekonstrukcyjnych, czy też próbka zmieniła się w czasie podczas akwizycji obrazów?

Moje komentarze zostały przekazane Autorowi pracy.

Bazując na przedstawionej przez Doktoranta pracy mogę stwierdzić, iż jej wykonanie wymagało od niego dogłębnego zrozumienia zjawisk zachodzących w czasie propagacji promieniowania elektromagnetycznego przez obiekty fazowe i częściowo absorbujące to promieniowanie. Uważam również, iż opanował on w szerokim zakresie wiedzę z fizyki (przede wszystkim w zakresie optyki) i matematyki. Posługuje się on również biegle algorytmiką w programowaniu w środowisku MATLAB. Zdobyta w trakcie studiów wiedza pozwoliła Doktorantowi na samodzielne posługiwanie się nią i wdrażanie jej w trakcie opracowania nowatorskich idei przedstawionych w jego pracy doktorskiej.

Z pełnym przekonaniem uważam, iż przedstawione w pracy wyniki badań spełniają w zupełności wymagania ustawowe stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę o dopuszczenie magistra Wojciecha Krauze do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, z uwagi na wysoki poziom merytoryczny rozprawy, liczne publikacje w renomowanych czasopismach z listy JCR, mających wysoki współczynnik impact factor (IF), rozpoznawalność międzynarodową prac naukowych, w których prezentowano przedstawione w rozprawie wyniki badań, a także znaczną liczbę cytowań tych prac wnioskuję o wyróżnienie jego pracy doktorskiej.



dr hab. inż. Przemysław Wachulak