

Autoreferat

1. Imię i nazwisko

Katarzyna Komar

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2007 – Instytut Maszyn Przepływowych im. Roberta Szewalskiego PAN w Gdańsku, stopień doktora nauk technicznych w zakresie mechaniki na podstawie rozprawy: „Zastosowanie technik spektroskopowych LIF oraz LIPS do diagnostyki przy renowacji laserowej zabytków piśmiennictwa”

2001 – Politechnika Gdańska, Wydział Fizyki Technicznej i Matematyki Stosowanej stopień magistra inżyniera fizyki technicznej

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

2001 – 2002: Specjalista, Zakład Fotofizyki i Techniki Laserowej, Instytut Maszyn Przepływowych PAN, Gdańsk

2002 – 2007: Asystent, Zakład Fotofizyki i Techniki Laserowej, Instytut Maszyn Przepływowych PAN, Gdańsk

2008 – 2011: Adiunkt, Wyższa Szkoła Informatyki w Łodzi

2011 – obecnie: Adiunkt, Instytut Fizyki, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (0.5 etatu od 2016)

2016 – 2019: pracownik naukowy, Bałtycki Instytut Technologiczny w Gdyni (0.5 etatu)

2020 – obecnie: Starszy Badacz/Adiunkt, Międzynarodowe Centrum Badań Oka ICTER, Instytut Chemii Fizycznej PAN, Warszawa (0.5 etatu do 2024, obecnie: cały etat)

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego:

Charakterystyka i zastosowania widzenia dwufotonowego

4.2 Lista publikacji składających się na osiągnięcie wraz z krótkim opisem:

Moim głównym osiągnięciem naukowym jest jednotematyczny cykl dziesięciu publikacji, które potwierdzają mój autorski wkład w rozwój badań widzenia dwufotonowego oraz jego zastosowań. Widzenie dwufotonowe to mechanizm percepcji wzrokowej oparty o absorpcję dwufotonową zachodzącą w pigmentach wzrokowych, która indukuje fototransdukcję w fotoreceptorach siatkówki. Każda pozycja z poniższej listy jest opatrzona

krótkim opisem wskazującym moją rolę w jej powstaniu, a bardziej szczegółowe omówienie znaczenia tych prac znajduje się w dalszej części autoreferatu.

H1: G. Palczewska, F. Vinberg, P. Stremplewski, M. P. Bircher, D. Salom, **K. Komar**, J. Zhang, M. Cascella, M. Wojtkowski, V. J. Kefalov, K. Palczewski, *Human infrared vision is triggered by two-photon chromophore isomerization*, Proceedings of National Academy of Sciences 111 (50), (2014), E5445-E5454. DOI: 10.1073/pnas.1410162111

Impact factor: 9.4, kwartył: Q1 (Multidisciplinary Sciences), Liczba cytowań: 86 (Scopus)

Praca ta jest fundamentalna dla współczesnych badań widzenia dwufotonowego. Wykazaliśmy w niej, że absorpcja dwufotonowa w pigmentach wzrokowych jest najbardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem powtarzających się od lat sześćdziesiątych XX wieku doniesień, że ludzie postrzegają krótko-impulsowe wiązki laserowe z zakresu bliskiej podczerwieni. Wiazki te miały kolor zbliżony do ich odpowiedników z zakresu widzialnego o dwa razy mniejszej długości fali. Wcześniejsze prace wskazywały na dwa możliwe mechanizmy (generacja drugiej harmonicznej lub absorpcja dwufotonowa) i dwa prawdopodobne miejsca powstawania (rogówka lub siatkówka) tego efektu nie przedstawiając wystarczająco wyczerpujących dowodów popierających jeden z nich.

Artykuł jest wynikiem pracy czterech zespołów badawczych o komplementarnych kompetencjach. Wkład naszego zespołu z UMK w Toruniu polegał na dostarczeniu danych z eksperymentów z udziałem ludzi. Praca ma 11 współautorów, a mój wkład w nią jest następujący: zaproponowałam i zaprojektowałam obydwa eksperymenty przeprowadzone w Toruniu, brałam aktywny udział w budowie układu optycznego oraz w eksperymentach przeprowadzonych z jego użyciem, jak również w analizie wyników, ich prezentacji oraz pisaniu tych części manuskryptu, które dotyczyły naszych eksperymentów, co jest udokumentowane w opisie wkładu poszczególnych autorów w tym artykule.

H2: P. Artal, S. Manzanera, **K. Komar**, A. Gambin-Regadera, M. Wojtkowski, *Visual acuity in two-photon infrared vision*, Optica 4 (12), (2017), 1488-1491. DOI: 10.1364/OPTICA.4.001488

Impact factor: 8.4, kwartył: Q1 (Optics), Liczba cytowań: 22 (Scopus)

Celem badań przedstawionych w tej pracy było sprawdzenie czy ostrość wzroku dla widzenia dwufotonowego może być lepsza niż dla widzenia jednofotonowego. Lepsza „przestrzenna rozdzielczość” dwufotonowych bodźców wzrokowych mogłaby wynikać z faktu, że absorpcja dwufotonowa zachodzi tylko w ognisku wiązki pobudzającej, a więc jest lepiej ograniczona przestrzennie niż jednofotonowa.

Eksperymenty zostały wykonane w laboratorium optycznym w Murcji, w Hiszpanii. Mój wkład w tę pracę polegał na wdrożeniu metody projekcji bodźców dwufotonowych z użyciem szybkiego skanowania, którą stosowałam wcześniej w swoim układzie w Toruniu, np. w eksperymentach z pracy [H1]. Przeprowadziłam też obliczenia, w oparciu o normy bezpieczeństwa, maksymalnych bezpiecznych poziomów mocy laserów pobudzających. Uczestniczyłam w pomiarach w Murcji oraz w późniejszej analizie

wyników, a także w pisaniu manuskryptu: wstępu, wniosków oraz suplementu obejmującego obliczenia bezpiecznych dla oka poziomów mocy.

- H3: D. Ruminski, G. Palczewska, M. Nowakowski, A. Zielińska, V. Kefalov, **K. Komar**, K. Palczewski, M. Wojtkowski, *Two-photon microperimetry: sensitivity of human photoreceptors to infrared light*, Biomedical Optics Express 10(9) (2019), 4551-4567. DOI: 10.1364/BOE.10.004551

Impact factor: 2.9, kwartył: Q2 (Optics), Liczba cytowań: 25 (Scopus)

Ta praca jest wynikiem dalszej współpracy z grupą prof. Palczewskiego i stanowi kontynuację pracy [H1]. Wyniki uzyskano z wykorzystaniem prototypu mikroperymetru dwufotonowego, czyli urządzenia, które pozwala na mapowanie czułości siatkówki na bodźce jedno- i dwufotonowe. W układzie optycznym tego urządzenia, znajdującego się wówczas w Case Western Reserve University w Cleveland, skonstruowałam moduły odpowiedzialne za projekcję i detekcję bodźców: dwufotonowych (1040 nm) oraz jednofotonowych (520 nm). Praca dokumentuje kilka różnych aspektów widzenia dwufotonowego korzystnych dla mikroperymetrii, które szczegółowo omówię w dalszej części autoreferatu. Dodatkowo część wyników zaprezentowanych w tej pracy (krzywe adaptacji do ciemności) uzyskaliśmy na układzie z Torunia.

Mój wkład w materiał zawarty w tej pracy obejmuje, poza wkładem w projekt i budowę obu systemów: zaplanowanie części eksperymentów (progi widzenia na tle, funkcja psychometryczna, badanie powtarzalności oraz adaptacja do ciemności), aktywny udział w części eksperymentów (funkcja psychometryczna, powtarzalność, adaptacja do ciemności), analizę wyników i udział w pisaniu manuskryptu.

- H4: G. Łabuz, A. Rayamajhi, J. Usinger, **K. Komar**, P. Merz, R. Khoramnia, G. Palczewska, K. Palczewski, G.U. Auffarth, *Clinical Application of Infrared-Light Microperimetry in the Assessment of Scotopic-Eye Sensitivity*, Translational Vision Science & Technology 9(8), (2020), 7-7. DOI: 10.1167/tvst.9.8.7

Impact factor: 2.6, kwartył: Q2 (Ophthalmology), Liczba cytowań: 10 (Scopus)

Następny prototypowy system do mikroperymetrii dwufotonowej, który współtworzyłam został umieszczony w klinice okulistycznej szpitala uniwersyteckiego Uniwersytetu w Heidelbergu, a ta publikacja jest pierwszą z serii kilku prac klinicznych uzyskanych z jego użyciem. Określiliśmy w niej wartości referencyjne czułości dwufotonowej zmierzonej w warunkach skotopowych dla 45 osób zdrowych w różnym wieku oraz dodatkowo zbadaliśmy 10 osób z chorobami siatkówki. Pokazaliśmy, że czułość dwufotonowa w grupie zdrowych osób nie zależała istotnie od wieku pacjenta, podczas gdy osoby z chorobami siatkówki miały znacząco obniżoną czułość na bodźce dwufotonowe.

Skonstruowałam system optyczny i zaplanowałam metody badawcze (protokoły pomiaru progu widzenia), zaproponowałam również przeprowadzenie eksperymentów

opisanych w tej pracy, uczestniczyłam w analizie wyników oraz w pisaniu manuskryptu (wstęp, opis układu eksperymentalnego, wnioski).

- H5: M. J. Marzejon, Ł. Kornaszewski, J. Bogusławski, P. Ciąćka, M. Martynow, G. Palczewska, S. Maćkowski, K. Palczewski, M. Wojtkowski, **K. Komar**, *Two-photon microperimetry with picosecond pulses*, Biomedical Optics Express 12(1), (2021), 462-479. DOI: 10.1364/BOE.411168

Impact factor: 2.9, kwartył: Q2 (Optics), Liczba cytowań: 16 (Scopus)

Kolejny układ będący mikroperymetrem dwufotonowym, który zaprojektowałam i zbudowałam wraz z doktorantem, powstał w Bałtyckim Instytucie Technologicznym w Gdyni. W tej pracy zastosowaliśmy ten system do porównania dwufotonowych progów widzenia dla dwóch laserów o podobnych długościach fali, natomiast różniących się częstotliwościami repetycji i czasem trwania impulsu. Pokazaliśmy po raz pierwszy, że kliniczne mikroperymetry dwufotonowe nie wymagają użycia drogich i dużych laserów na ciele stałym, tylko o wiele tańszych i wygodniejszych w użyciu laserów światłowodowych.

To jest pierwsza praca z niniejszego cyklu, w której pełnię rolę autora korespondencyjnego, a jej pierwszym autorem jest dr inż. Marcin Marzejon, nad którym sprawowałam wówczas opiekę naukową jako promotor pomocniczy.

Mój wkład w tę pracę obejmuje główną koncepcję pracy, zaprojektowanie układu optycznego i aktywny udział w jego budowie, zaplanowanie eksperymentów, analizę i interpretację wyników oraz pisanie manuskryptu.

- H6: A. Zielińska, P. Ciąćka, M. Szkulmowski, **K. Komar**, *Pupillary Light Reflex induced by two-photon vision*, Investigative Ophthalmology & Visual Science 62(15):23, (2021), 33107. DOI: 10.1167/iovs.62.15.23

Impact factor: 5, kwartył: Q1 (Ophthalmology), Liczba cytowań: 10 (Scopus)

Pierwszą autorką w tej pracy jest dr inż. Agnieszka Zielińska, a ja, jako jej promotor pomocniczy jestem autorem korespondencyjnym. Praca powstała jako wynik eksperymentów przeprowadzonych w Instytucie Fizyki w Toruniu, jej celem było zbadanie reakcji źrenicy na bodziec dwufotonowy 1040 nm w porównaniu do jednofotonowego 520 nm o tej samej jasności i kolorze. Wyniki wskazały jednoznacznie, że reakcja na bodziec dwufotonowy była słabsza. Zaproponowaliśmy dwa wyjaśnienia: słabiej pobudzane pręciki w widzeniu dwufotonowym (mają one większy wpływ niż czopki na reakcję źrenicy na bodźce o umiarkowanej jasności) lub przestrzenne ograniczenie absorpcji dwufotonowej do ogniska wiązki (rozproszone fotony światła 520 nm mogą przyczyniać się do silniejszego pobudzenia fotoreceptorów i silniejszej reakcji źrenicy, podczas gdy bodziec dwufotonowy 1040 nm pobudza układ wzrokowy tylko w ognisku wiązki).

Mój wkład w tę pracę obejmuje główną jej koncepcję, zaplanowanie eksperymentów, aktywny udział w powstawaniu układu optycznego, analizę wyników i pisanie manuskryptu.

H7: G. Łabuz, A. Rayamajhi, **K. Komar**, R. Khoramnia, G. U. Auffarth, *Infrared- and white-light retinal sensitivity in glaucomatous neuropathy*, Scientific Reports 12, (2022), 1961. DOI: 10.1038/s41598-022-05718-6

Impact factor: 3.8, kwartył: Q1 (Multidisciplinary Sciences), Liczba cytowań: 8 (Scopus)

Praca powstała z użyciem systemu mikroperymetru dwufotonowego w klinice okulistycznej w Heidelbergu, podobnie jak praca [H4]. Celem było sprawdzenie czy mikroperymetria dwufotonowa ma zalety w porównaniu do konwencjonalnej mikroperymetrii. Zbadano pacjentów cierpiących na jaskrę, czyli schorzenie, dla którego badanie czułości siatkówki jest jedną z podstawowych metod diagnostycznych. Czułość siatkówki mierzono zarówno mikroperymetrem dwufotonowym, jak i konwencjonalnym (MP-1, Nidek Technologies). Wyniki prowadzą do wniosku, że mniejszy rozrzut progów widzenia dwufotonowego, który jest związany z kwadratową zależnością jasności bodźca od średniej mocy wiązki stymulującej, może umożliwić lepsze wykrywanie i diagnozowanie zmian funkcjonalnych spowodowanych jaskrą.

Mój wkład w pracę polegał na przygotowaniu systemu dwufotonowego (dostosowanie warunków pomiaru do stosowanych w MP-1), analizie i interpretacji wyników oraz udziale w pisaniu manuskryptu (metody dotyczące mikroperymetrii dwufotonowej, wnioski).

H8: M. J. Marzejon, Ł. Kornaszewski, M. Wojtkowski, **K. Komar**; *Laser pulse train parameters determine the brightness of a two-photon stimulus*; Biomedical Optics Express 14 (6), (2023), 2857-2872. DOI: 10.1364/BOE.489890

Impact factor: 2.9, kwartył: Q2 (Optics), Liczba cytowań: 5 (Scopus)

Praca rozwija i poszerza zagadnienie wpływu parametrów czasowych lasera na dwufotonową widzialność bodźców. Zmierzyliśmy progi widzenia zdrowych ochotników w szerokim zakresie tych parametrów (długości impulsów: od 197 fs do 759 ps oraz częstotliwości repetycji: 19 MHz, 51.5 MHz i 62.65 MHz) dla trzech różnych laserów o zbliżonych widmach emisji (1020-1040 nm). Impulsy były również poszerzane stretcherem optycznym lub w światłowodach o różnej długości. Następnie pokazaliśmy, że stosując model matematyczny oparty o prawdopodobieństwo absorpcji dwufotonowej możemy dzięki tym danym określić wielkość współczynnika charakteryzującego wydajność widzenia dwufotonowego w różnych odległościach od centrum plamki na siatkówce. Wyniki te pozwalają przewidywać progi widzenia dwufotonowego dla źródeł laserowych z tego zakresu spektralnego w szerokim zakresie czasów trwania impulsu i częstotliwości repetycji.

Jestem autorem głównej koncepcji tej pracy i jej autorem korespondencyjnym. Pomiar przeprowadziliśmy w Międzynarodowym Centrum Badań Oka w Warszawie, po zainstalowaniu tam układu z Bałtyckiego Instytutu Technologicznego. Planowałam eksperymenty i brałam w nich udział oraz częściowo pisałam manuskrypt: uczestniczyłam w sformułowaniu modelu, analizie wyników opartej o ten model, dyskusji i wnioskach.

H9: O. Kaczkoś, A. Zielińska, J. Pniewski, M. Wojtkowski, **K. Komar**, *Method for the determination of the luminance of two-photon vision stimuli*, Biomedical Optics Express 15 (10), (2024), 5818-5830. DOI: 10.1364/BOE.525180

Impact factor: 2.9, kwartyl: Q2 (Optics), Liczba cytowań: 0 (Scopus)

Dotychczasowe badania skupiały się na progach widzenia, czyli najmniejszej mocy wiązki potrzebnej do tego, żeby bodziec dwufotonowy był dostrzeżony. Z punktu widzenia zastosowań istotna jest jednak jasność bodźca wyrażona w wielkościach fizycznych, które można odnieść do wielkości fotometrycznych: luminancji (cd/m^2) lub natężenia oświetlenia (luks). W niniejszej pracy wyznaczyliśmy jasność bodźców dwufotonowych o różnych rozmiarach kątowych poprzez porównywanie ich do bodźców jednofotonowych. Zaproponowaliśmy wprowadzenie nowej wielkości fizycznej - dwufotonowego natężenia oświetlenia siatkówki - i pokazaliśmy, że zależy ona liniowo od stosunku kwadratu mocy wiązki i oświetlonej powierzchni siatkówki. Wyniki pozwoliły przewidzieć, że bodźce dwufotonowe mogą mieć jasność odpowiadającą luminancjom rzędu kilkuset cd/m^2 , co czyni realnym zastosowanie tych bodźców w technologiach rozszerzonej rzeczywistości (ang. *Augmented Reality*: AR).

Jestem autorem koncepcji oraz autorem korespondencyjnym w tej pracy, pierwszą autorką jest moja obecna doktorantka, Oliwia Kaczkoś. Pomiary zostały wykonane na układzie w Toruniu. Zaproponowałam zastosowane metody badawcze oraz brałam udział w analizie danych i pisaniu manuskryptu.

H10: **K. Komar**, *Two-photon vision – Seeing colors in infrared*, Vision Research 220 (2024), 108404; DOI: 10.1016/j.visres.2024.108404.

Impact factor: 1.5, kwartyl: Q3 (Ophthalmology), Liczba cytowań: 3 (Scopus)

Po dziesięciu latach badań nad widzeniem dwufotonowym pojawiła się potrzeba dokonania podsumowania. Podjęłam się tego zadania jako autorka 15 z 26 publikacji dotyczących widzenia dwufotonowego opublikowanych po 2014 roku. W pracy omówiłam mechanizm oraz najważniejsze cechy widzenia dwufotonowego, między innymi: zakres spektralny i postrzegane kolory, kwadratową zależność jasności od mocy i jej konsekwencje dla percepcji wzrokowej, a także dwufotonową mikroperymetrię, jako główne rozwijane do tej pory zastosowanie. Przygotowałam również wykresy obejmujące dane pochodzące z prac różnych autorów dotyczących widzenia dwufotonowego, które dokumentują zaobserwowane w różnych badaniach podobne cechy tego efektu.

4.3 Cele badawcze, wyniki i opis opartych na nich publikacji, wpływ na przyszłe badania:

Wstęp

Widzenie dwufotonowe to zjawisko, którym zajmuję się od ponad dziesięciu lat, tworząc podwaliny nowego obszaru wiedzy o oddziaływaniu ultrakrótkich impulsów laserowych z tkankami oka oraz ich wpływu na funkcjonowanie zmysłu wzroku. Jest to prawdziwie interdyscyplinarne pole badań, w którym optyka nieliniowa łączy się z fizjologią widzenia, a badania podstawowe przeplatają się z translacyjnymi, czyli pracą nad tym, żeby wyniki badań naukowych przekształciły się w korzystne dla społeczeństwa zastosowania.

Moje badania widzenia dwufotonowego rozpoczęły się w 2013 roku, gdy w zespole prof. Macieja Wojtkowskiego w Toruniu zauważyliśmy, że podczerwone wiązki o krótkich impulsach, których chcieliśmy użyć do obrazowania siatkówki, widzimy tak, jakby miały kolor odpowiadający połowie ich długości fali. Przeszukanie dotychczas opublikowanych prac pokazało, że efekt ten nie został do tej pory jednoznacznie wyjaśniony, chociaż w literaturze można było znaleźć pojedyncze prace raportujące, że faktycznie ma on miejsce. Dostarczenie udokumentowanego wyjaśnienia tego zjawiska stało się motywacją do nawiązanej właśnie współpracy z prof. Krzysztofem Palczewskim z, wówczas, Case Western Reserve University w Cleveland, który jest uznanym ekspertem w obszarze biochemii widzenia. Dzięki międzynarodowej współpracy czterech grup badawczych o wzajemnie uzupełniających się kompetencjach, przedstawiliśmy wyjaśnienie obserwowanego efektu, a wyniki opublikowaliśmy w prestiżowym PNAS (praca [H1]). Postawiliśmy wówczas tezę i wsparliśmy ją szeregiem różnych eksperymentalnych wyników, że wiązki te widzimy dzięki dwufotonowej absorpcji, która zachodzi, gdy pigmenty wzrokowe fotoreceptorów oddziałują z krótkimi impulsami światła. Nasz toruński zespół dostarczył danych pozyskanych z udziałem ludzi w wyniku eksperymentów zaproponowanych i zaprojektowanych przeze mnie, które zrealizowałam wspólnie ze współpracownikami. Moje pomysły na te badania wymagały wyjścia poza ramy właściwe dla sposobu myślenia fizyka: kiedy okazało się, że nie jesteśmy w stanie żadną dostępną nam techniką zarejestrować obiektywnego sygnału, który będzie dowodem na to, że ludzie widzą te wiązki, zaproponowałam, żebyśmy użyli człowieka jako detektora. Nie wiedziałam wtedy jeszcze, że taki rodzaj eksperymentów ma długą tradycję w obszarze nauk o widzeniu, który zresztą też tworzyli często fizycy. Praca [H1] zyskała duży rozgłos, chociaż ten medialny znacznie przewyższył naukowy: należy do górnych 5% wszystkich publikacji w rankingu Altmetric Attention Score. Można się było tego spodziewać – opisaliśmy nowy mechanizm percepcji światła, co rozbudziło ciekawość w środowisku, ale potrzebne były dalsze badania żeby go scharakteryzować i poszukać dla niego praktycznych zastosowań. Jako jedyna ze współautorów postanowiłam dalej aktywnie naukowo rozwijać ten obszar. **Moim celem stało się poszerzenie wiedzy o widzeniu dwufotonowym, określenie różnic między nim a normalną percepcją wzrokową, oraz sprawdzenie czy ma ono cechy, które okażą się użyteczne w praktycznych zastosowaniach.**

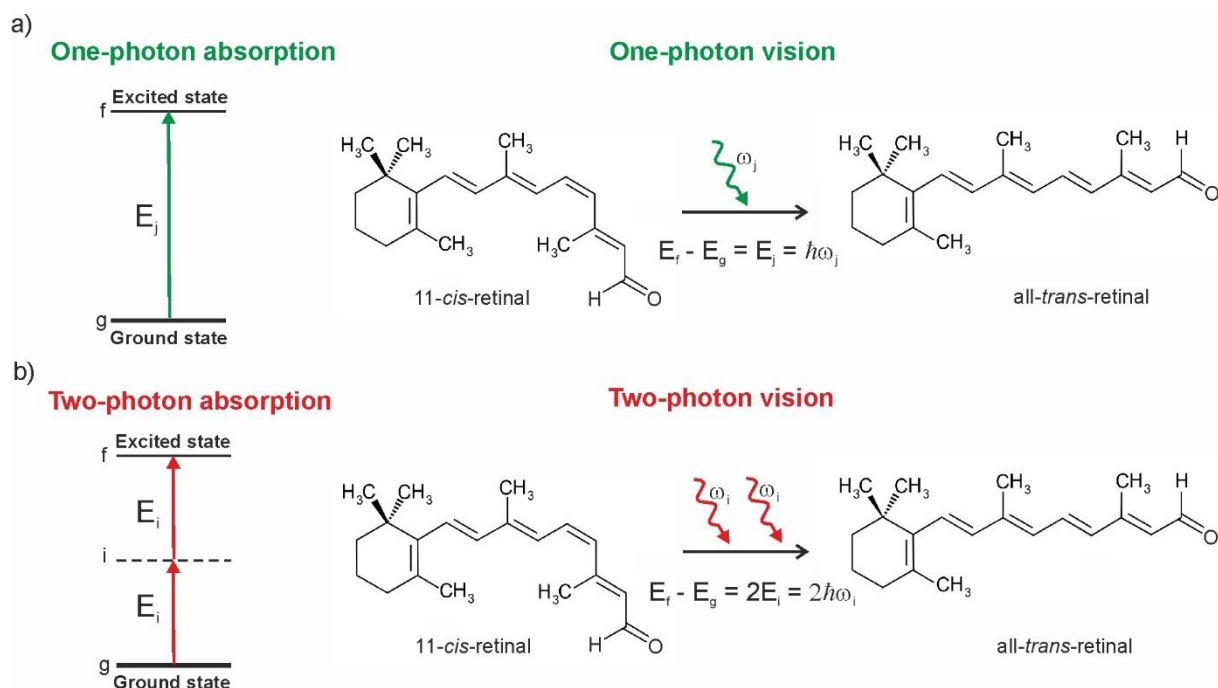
Absorpcja dwufotonowa

Absorpcja dwufotonowa to nieliniowy proces optyczny znany fizykom od prawie stu lat. Został przewidziany teoretycznie przez Marię Göppert-Mayer w jej pracy doktorskiej już

w 1931 roku [1], ale pierwszy dowód eksperymentalny na absorpcję dwufotonową dostarczyli Kaiser i Garret dopiero w roku 1961, po wynalezieniu lasera [2]. Jak pokazano na Rys. 1 a), jednofotonowa absorpcja zachodzi, gdy atom lub cząsteczka absorbuje jeden foton $\hbar\omega_j$ o energii E_j odpowiadającej różnicy między poziomami energii E_f (stan końcowy) i E_g (stan podstawowy). Proces dwufotonowej absorpcji (Rys. 1 b)) wymaga oddziaływania dwóch fotonów, każdy o energii E_i , z cząstką. Pierwszy pochłonięty foton (E_i) wzbudza cząstkę do wirtualnego stanu pośredniego, który nie jest jej stanem własnym. W rezultacie cząstka może pozostawać w tym stanie tylko przez czas dozwolony przez zasadę nieoznaczoności, który wynosi 10^{-15} - 10^{-16} sekundy dla przejść w zakresie częstości widzialnych [3]. Interakcja z drugim fotonem energii E_i w tym przedziale czasu może prowadzić do wzbudzenia do stanu końcowego E_f . Ten prosty model pozwala na przybliżone oszacowanie wielkości przekroju czynnego absorpcji dwufotonowej zgodnie z równaniem (1):

$$\sigma_{2PA} = \sigma_{gi}\sigma_{if}\tau_i, \quad (1)$$

gdzie σ_{gi} i σ_{if} są przekrojami czynnymi na absorpcję jednofotonową dla wzbudzenia ze stanu podstawowego do stanu pośredniego i ze stanu pośredniego do stanu końcowego, a τ_i jest czasem życia stanu pośredniego. Ponieważ przekrój czynny na absorpcję jednofotonową szacuje się na 10^{-16} - 10^{-17} cm² dla dipola o długości 10^{-8} cm, szacowana wartość σ_{2PA} wynosi 10^{-49} cm⁴s/foton [3]. Przekrój czynny na absorpcję dwufotonową jest czasami mierzony w jednostkach GM (Göppert-Mayer) wynoszących 10^{-50} cm⁴s [4].



Rys. 1. Porównanie mechanizmów widzenia jednofotonowego i dwufotonowego: a) W widzeniu jednofotonowym (normalnym widzeniu) cząsteczka chromoforu wzrokowego ulega izomeryzacji w wyniku absorpcji jednego fotonu o energii E_j odpowiadającej różnicy poziomów energii cząsteczki. b) Widzenie dwufotonowe występuje w wyniku izomeryzacji chromoforu po natychmiastowej absorpcji dwóch fotonów o energii E_i , co nazywane jest procesem absorpcji dwufotonowej.

Rozwój laserów emitujących piko- i femtosekundowe impulsy umożliwił uzyskanie bardzo dużych chwilowych strumieni fotonów i pozwolił na rozwój technik spektroskopowych opartych na absorpcji dwufotonowej, stosowanych również do badania właściwości

chromoforów wzrokowych [5,6]. Kiedy powstał skaningowy mikroskop laserowy [7–9], do generowania obrazu mikroskopowego również wykorzystano fluorescencję wzbudzaną dwufotonowo. Metoda ta, znana jako mikroskopia dwufotonowa, szybko stała się jednym z najcenniejszych narzędzi w obrazowaniu próbek biologicznych [10,11]. W mikroskopii dwufotonowej, liczba fotonów N_a pochłoniętych przez cząsteczkę na jeden impuls w procesie absorpcji dwufotonowej jest dana równaniem (2), zgodnie z [10]:

$$N_a = \sigma_{2ph} \frac{\langle P \rangle^2}{\tau_p F_p^2} \left(\frac{NA^2}{2\hbar c \lambda} \right)^2, \quad (2)$$

gdzie σ_{2ph} to przekrój czynny na absorpcję dwufotonową; $\langle P \rangle$ jest średnią mocą lasera; τ_p i F_p są, odpowiednio, czasem trwania impulsu i częstotliwością repetycji lasera; NA to apertura numeryczna obiektywu mikroskopowego; $\hbar$ jest zredukowaną stałą Plancka; c to prędkość światła; a λ jest długością fali lasera. Równanie (2) zakłada przybliżenie przyosiowe i prostokątne impulsy laserowe. Dla impulsów o dowolnym kształcie, zależność przybiera następującą formę (3):

$$N_a = \sigma_{2ph} \frac{\langle P \rangle^2}{F_p^2} \left(\frac{NA^2}{2\hbar c \lambda} \right)^2 \xi, \quad (3)$$

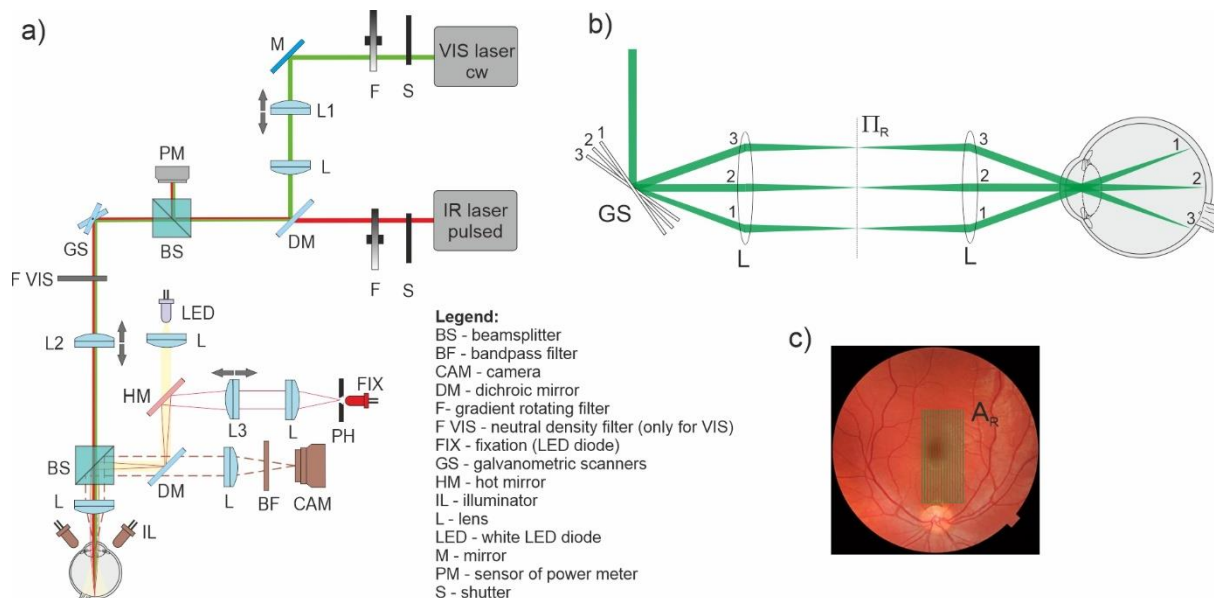
gdzie $\xi = \frac{\langle P^2 \rangle}{\langle P \rangle^2}$, to czynnik zależny od kształtu impulsu nazywany czasem „two-photon advantage” [12]. Na przykład, $\xi \cong \frac{0.664}{\tau_p F_p}$ dla impulsów gaussowskich; a $\xi \cong \frac{0.558}{\tau_p F_p}$ dla impulsów o kształcie hiperbolicznego secansa, typowych dla laserów impulsowych na ciele stałym.

Powyższe wyrażenia, chociaż wyprowadzone dla mikroskopii dwufotonowej, mają również zastosowanie do widzenia dwufotonowego, ponieważ percepcja wzrokowa zależy od liczby fotonów pochłoniętych przez pigmenty wzrokowe. Z tego powodu jasność bodźców dwufotonowych wyświetlanych na siatkówce przez impulsowy laser podczerwony zależy kwadratowo od średniej mocy lasera, co pokazaliśmy w pracach [H3, H6 i H9]. Wpływ na jasność bodźców mają również czas trwania impulsu, kształt impulsu i częstotliwość powtarzania lasera, zgodnie z wynikami prac [H1, H3, H5, H8]: lasery generujące krótsze impulsy i pracujące z niższymi częstotliwościami powtarzania osiągają wyższą jasność dwufotonową przy tej samej średniej mocy. Implikacje silnej zależności od apertury numerycznej istnieją [13], ale mają ograniczony wpływ na praktyczne zastosowania widzenia dwufotonowego. Po pierwsze, maksymalna apertura ludzkiego oka wynosi tylko 0.23 przy całkowicie rozszerzonej źrenicy [14], co nie jest dużą wartością w porównaniu z obiektywami mikroskopowymi. Po drugie, z uwagi na aberracje optyczne oka, nawet całkowite wykorzystanie tej apertury bez korekcji z użyciem optyki adaptacyjnej nie daje ograniczonego dyfrakcją ogniska na siatkówce. W praktyce stosujemy wiązki o średnicy poniżej 2.5 mm, dla których zdrowe oko może być traktowane jak system optyczny ograniczony dyfrakcją [15], co ogranicza aperturę numeryczną naszych systemów do około 0.1.

Metodyka

Znacząca większość eksperymentów psychofizycznych charakteryzujących widzenie dwufotonowe, które weszły w skład niniejszego cyklu publikacji przeprowadzona została z użyciem czterech układów optycznych. Ich obecna lokalizacja to: Instytut Fizyki UMK w Toruniu, Międzynarodowe Centrum Badań Oka będące częścią Instytutu Chemii Fizycznej

PAN w Warszawie, Oddział Okulistyki Szpitala Uniwersyteckiego w Heidelbergu oraz UCI Center for Translational Vision Research (Uniwersytet Kalifornijski w Irvine). Na Rys. 2a) przedstawiono ogólny schemat modułu pobudzającego tych układów; dwa ostatnie systemy wyposażone są dodatkowo w moduł skaningowego oftalmoskopu laserowego umożliwiając obrazowanie siatkówki, którego nie umieszczono na schemacie.



Rys. 2. Wyświetlanie dwufotonowych bodźców na siatkówce. a) Ogólny schemat układu do badań widzenia dwufotonowego. b) Schemat optyczny skanowania siatkówki oka. c) Przykładowy prostokątny bodziec o powierzchni A_R , który powstaje w wyniku skanowania siatkówki gęstym rastrem. Szczegółowy opis w tekście.

Dwufotonowe bodźce wzrokowe generowane były przy użyciu impulsowych źródeł laserowych (w zależności od eksperymentu czas trwania impulsu wynosił od 200 fs do 760 ps) z zakresu bliskiej podczerwieni (800-1200 nm) pracujących z częstotliwościami repetycji 20-76 MHz. Bodźce jednofotonowe (czyli zwykłe „widzialne”) były również generowane za pomocą wiązek laserowych - w przywołanych eksperymentach miały one długość fali 520 nm. W torach obu wiązek umieszczono automatyczne migawki S oraz okrągłe filtry gradientowe F na silnikach krokowych, co pozwoliło na regulację mocy lasera wprowadzanej do oka i jasności wyświetlanych bodźców. W torze wiązki VIS dodatkowo umieszczono teleskop, w którym zmiana położenia soczewki L1 (realizowana również za pomocą silnika krokowego) kompensowała przesunięcie chromatyczne między wiązkami IR a VIS. Dzięki temu obydwa bodźce mogły być skupiane na siatkówce badanego oka dla tego samego położenia soczewki L2, kompensującego jego wadę refrakcji. Po zwierciadle dichroicznym DM obie wiązki propagowały wspólnym torem optycznym. Część wiązek była odsprężana na sensor miernika mocy PM, co pozwalało na kontrolę poziomu mocy trafiającej do oka. Sensor PM stanowił główny przyrząd pomiarowy w opisywanych eksperymentach, dlatego jego kalibracja miała kluczowe znaczenie dla jakości uzyskiwanych wyników. Kalibrację sensora PM przeprowadzano umieszczając identyczny sensor na wyjściu z systemu każdorazowo po ustawieniu ruchomych soczewek (L1 oraz L2) w sposób właściwy dla badanego oka i osobno dla każdej długości fali. Następnie zmieniając położenie odpowiedniego filtra F, program pomiarowy zapisywał wskazania obu sensorów. Dla wiązki VIS, na którą wzrok ludzki jest bardzo czuły, należało w czasie pomiarów między miernikiem PM a okiem umieszczać

dodatkowy filtr szary o zmierzonym wcześniej współczynniku osłabienia (F_{VIS}). Filtr ten był też w niektórych eksperymentach umieszczany w torze VIS przed zwierciadłem DM, gdy potrzebne było jednoczesne wyświetlanie obu bodźców.

Para skanerów galwanometrycznych GS, umieszczona w płaszczyźnie sprzężonej optycznie z płaszczyzną źrenicy, umożliwiała wyświetlanie na siatkówce bodźców o różnych kształtach i rozmiarach. Rozmiar kątowy skanowanych bodźców ograniczony jest dwoma czynnikami: ogniskową ostatniej soczewki układu oraz szybkością pracy skanerów GS. Ten drugi czynnik wiąże się z faktem, że aby uniknąć wrażenia migotania, bodźce są wyświetlane z częstością przewyższającą CFF (ang. *Critical Flicker Frequency*), czyli częstością odświeżania, powyżej której bodziec wzrokowy jest postrzegany jako stały [16]. W większości przypadków w pracach z opisywanego cyklu było to 100 Hz. Rys. 2b) przedstawia bardziej szczegółowo sposób wyświetlania na siatkówce bodźców za pomocą szybkiego skanowania. Zwierciadło skanera GS, pokazane w trzech pozycjach oznaczonych kolejnymi numerami od 1 do 3, kreśli linię na siatkówce od pozycji 1 do 3. Dla oka miarowego wiązka jest skolimowana w płaszczyźnie źrenicy i skupiona na siatkówce. Zmieniając położenie płaszczyzny Π_R poprzez ruch jedną z soczewek L można skompensować wadę refrakcji badanego oka. Drugie zwierciadło (niepokazane na Rys. 2 b)), obracające się w osi prostopadłej do osi pierwszego, umożliwia przesunięcie linii po każdej zmianie kierunku pierwszego zwierciadła w efekcie dając skanowanie rastrowe siatkówki pokazane na Rys. 2 c). Wypełnione bodźce o powierzchni A_R (np. litera E) mogą powstawać poprzez modyfikację amplitudy wychylenia jednego zwierciadła [H9] lub poprzez umieszczenie maski w płaszczyźnie sprzężonej z siatkówką (Π_R na rys. 2b)). W badaniach stosowano także bodźce o innych kształtach: okręgu [H3, H4, H5, H7, H8], spirali [H6] lub krzyża [H6], w przypadku których sygnały sterujące zwierciadłami skanerów były inne niż w przypadku bodźców rastrowych (np. funkcje harmoniczne).

Pozostałe tory optyczne systemu przedstawionego na Rys. 2 a) obejmują tor tła, fiksacji oraz kamery źrenicznej. Wszystkie trzy tory łączą się z torem wiązek pobudzających poprzez dzielnik wiązki BS. Jednorodne tło otrzymujemy umieszczając diodę LED w tzw. konfiguracji *Maxwellian view* [17] z okiem poprzez sprzężenie optyczne źrenicy oka i diody LED. Czerwona (630 nm) dioda fiksacyjna FIX oświetla od tyłu niewielki otwór PH (ang. *pinhole*), którego obraz tworzy się na siatkówce służąc za punkt fiksacyjny. W tym torze również konieczne jest dopasowanie do wady refrakcji oka poprzez zmianę położenia soczewki L3. Na kamerze CAM tworzony jest obraz oka w oparciu o światło z iluminatora IL (stosujemy różne długości fali w zależności od eksperymentu: 860 nm, 880 nm lub 920 nm). Przed kamerą umieszczony jest filtra pasmowy BF przepuszczający tylko światło iluminatora. Obraz z kamery źrenicznej umożliwia kontrolę pozycji oka, poprzez korekcję pozycji głowy badanego ochotnika za pomocą zmotoryzowanego podbródka, którym operuje prowadzący eksperyment. Oprogramowanie sterujące pracą obu systemów laboratoryjnych (IF UMK oraz ICTER IChF) jest tworzone w LabVIEW, natomiast obydwa systemy kliniczne mają oprogramowanie w C# stworzone przez spółkę spin-off z Torunia AM2M (obecnie: Inoko Vision).

Maksymalną dopuszczalną moc wiązki wpadającej do oka określano w oparciu o międzynarodowe standardy bezpieczeństwa używania laserów w części dotyczącej urządzeń okulistycznych: ANSI Z136.1 oraz EN 60825-1. W środowisku znana jest również, i bardzo pomocna, praca obejmująca interpretację tych norm w przypadku celowej i długotrwałej ekspozycji oka na wiązki laserowe, w tym na wiązki o krótkich impulsach [18]. W niektórych

publikacjach zamieszczaliśmy, czasem w suplementach, szczegółowe obliczenia maksymalnej dopuszczalnej mocy wiązki docierającej do oka [H2, H3, H6, H8, H9].

Wszystkie badania z udziałem zdrowych ochotników i pacjentów były prowadzone w zgodzie z zasadami Deklaracji Helsińskiej i zostały zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu lub odpowiednie komisje bioetyczne w innych miejscach prowadzenia badań. Uczestnicy byli informowani o charakterze eksperymentu i potencjalnym ryzyku z nim związanym oraz podpisywali formularze zgody na udział w badaniach.

Wyniki i opis osiągnięcia

Proces widzenia zaczyna się od absorpcji fotonu: w błonach komórkowych fotoreceptorów siatkówki, a dokładniej mówiąc ich zewnętrznych segmentów, znajdują się białka (opsyny), wewnątrz których osadzone są cząsteczki 11-*cis*-retinalu (chromoforu). Chromofor absorbuje foton i zmienia konformację do formy *all-trans*. Jest to zdarzenie uruchamiające biochemiczną maszynę procesu fototransdukcji, w którym kaskada biochemicznych zmian prowadzi do hiperpolaryzacji fotoreceptora, a więc przekształcenia sygnału optycznego na elektryczny. Ta zmiana potencjału czynnościowego propaguje następnie, i jest równocześnie przetwarzana, przez kolejne warstwy neuronów siatkówki (komórki bipolarne i zwojowe), nerwem wzrokowym, aż do mózgu.

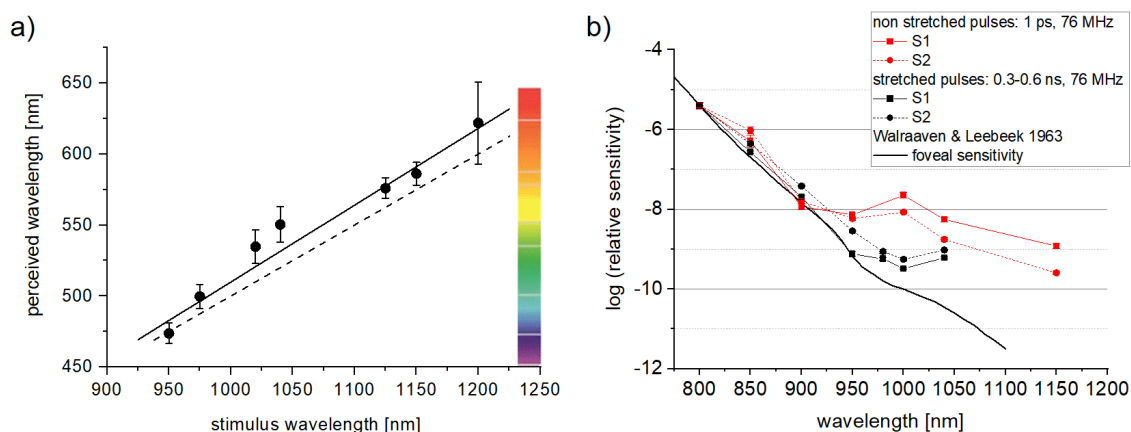
Pigmentami wzrokowymi nazywamy kompleksy opsyn z chromoforem, którym u wszystkich kręgowców jest 11-*cis*-retinal. Różne rodzaje fotoreceptorów mają opsyny o innej budowie, co skutkuje różnicami w pasmach absorpcji chromoforu. Zasadniczo ludzie mają cztery rodzaje fotoreceptorów: pręciki i trzy typy czopków, których pigmenty wzrokowe absorbują fotony światła w różnych zakresach spektralnych (mamy też specyficzny typ komórek zwojowych siatkówki wrażliwych na światło niebieskie, ale nie uczestniczą one w świadomej percepcji wzrokowej [19]). W sumie pasma absorpcji fotoreceptorów pokrywają długości fali od około 390 nm do 830 nm [20]. Dzięki temu nasz zmysł wzroku jest czuły na ten zakres promieniowania elektromagnetycznego i dlatego nazwaliśmy go zakresem widzialnym. Jednak czułość wzroku nie spada do zera dla długości fali większych od 830 nm - fotony tego światła również mogą pobudzić fotoreceptory, jeżeli natężenie promieniowania jest wystarczająco duże. Badania czułości wzroku w zakresie bliskiej podczerwieni prowadzono już w latach trzydziestych i czterdziestych XX wieku [21–24]. W szczególności Griffin ze współpracownikami zmierzili w 1947 progi widzenia w obszarze peryferyjnym siatkówki zdrowych ochotników aż do 1050 nm: czułość wzroku malała wraz z długością fali eksponencjalnie, a dla 1050 nm była $3 \cdot 10^{-13}$ mniejsza niż w maksimum [24]. Dane pokazywały, że progi widzenia dla długości fali powyżej 1050 nm musiałyby być wyższe niż znane wówczas progi czułości skóry na ciepło, tym samym autorzy stwierdzili, że jest to praktyczny kres możliwości detekcji światła przez ludzki wzrok. W 1963 roku Walraven i Leebeek zaproponowali niewielką korektę tych danych o absorpcję wody, która jest głównym składnikiem tkanek oka [25]. Jednak po wynalezieniu laserów zaobserwowano ciekawy efekt: w pewnych sytuacjach promieniowanie podczerwone z zakresu bliskiej podczerwieni było postrzegane, a kolor tego światła odpowiadał kolorowi połowy długości jego fali. Pierwsza udokumentowana obserwacja tego zjawiska pochodzi od Vasilenki i współpracowników z 1965 roku [26]. Linie spektralne od 948.6 nm do 1179.0 nm lasera gazowego Ne-H₂ emitującego

krótkie (5 μ s) impulsy były postrzegane jako żółto-zielone, żółte, pomarańczowe i czerwone. W 1976 efekt był badany przez Slineya i współpracowników [27]: mierzyli oni progi widzenia dla laserów o różnych długościach fali i czasach trwania impulsu. Zaobserwowali percepcję koloru innego niż czerwony dla 1064 nm wówczas, gdy oko były wystawione na impulsy krótsze niż 1 ms. Dodatkowo, im krótsze były te impulsy, tym mniejsza ich energia była potrzebna, żeby wywołać wrażenie widzenia. Ponieważ jest to niezgodne ze znanym w naukach o widzeniu prawem Blocha [28], autorzy pracy potwierdzili tym samym, że za badanym efektem stoi nowy proces fizyczny, i że jest to nieliniowy proces optyczny. Chociaż przywołali we wnioskach generację drugiej harmonicznej (SHG, ang. *second harmonic generation*), jednak nie wskazali jednoznacznie czy miałyby ona zachodzić w rogówce, czy w strukturach siatkówki. Inny mechanizm zaproponował Dmitriev ze współpracownikami w pracy z 1979 roku [29]. Przeprowadzili oni kilka eksperymentów wykorzystujących oscylator parametryczny (OPO) pompowany drugą harmoniczną lasera Nd:YAG, co umożliwiło im zbadanie zjawiska w szerokim zakresie długości fali (800-1350 nm) dla impulsów o czasie trwania 10-20 ns oraz częstotliwości repetycji 25 Hz. Wyniki doprowadziły ich do konkluzji, że nieliniowy efekt optyczny, dzięki któremu widać te wiązki, ma miejsce w siatkówce i że jest nim prawdopodobnie absorpcja dwufotonowa zachodząca w pigmentach wzrokowych. W wyniku tej absorpcji fotoreceptory ulegają pobudzeniu tak, jakby były oświetlane światłem z zakresu 400-700 nm. Z tą interpretacją nie zgodzili się Zaidi i Pokorny, którzy w swojej pracy z 1988 [30] przeanalizowali ponownie dostępne dane, głównie z trzech wspomnianych powyżej artykułów [26,27,29]. Argumentowali oni, że dwufotonowej absorpcji w pigmentach wzrokowych towarzyszyłaby emisja fluorescencji, co powinno spowodować przesunięcie wszystkich postrzeganych barw w stronę dłuższych długości fal. Tymczasem wyniki Dmitrieva wskazywały, że postrzegany kolor był przesunięty w stronę krótszych fal dla wiązki pobudzającej <1000 nm, a w stronę dłuższych fal dla wiązki >1000 nm. Zdaniem Zaidiego i Pokornego najlepszym wytłumaczeniem dotychczasowych obserwacji była SHG w rogówce. Należy tu podkreślić, że nie przeprowadzili oni weryfikacji eksperymentalnej swoich tez, opierali się jedynie na opublikowanych wcześniej wynikach, m. in. z pracy Fine'a i Hansena, którzy badali emisję SHG z rogówek zwierząt [31].

Publikując pracę [H1] udało nam się położyć kres tym kontrowersjom, głównie dzięki interdyscyplinarnemu podejściu do badanego zagadnienia. Pokazaliśmy szereg wyników uzyskanych różnymi technikami eksperymentalnymi stosowanymi przez cztery zespoły badawcze, a wszystkie one wskazywały na absorpcję dwufotonową, jako najbardziej prawdopodobne wyjaśnienie obserwacji. Wspomniane techniki obejmują: (1) pomiary psychofizyczne z udziałem ludzi (zespół prof. Wojtkowskiego), które omówię szczegółowo poniżej, (2) analizę sygnałów elektrofizjologicznych zmierzonych na wyizolowanych mysich siatkówkach (zespół prof. Kefalova), (3) badania pigmentów wzrokowych (zespół prof. Palczewskiego) oraz (4) wyniki modelowania numerycznego dla rodopsyny (prof. Cascella). Nie będę tutaj szczegółowo omawiać wyników wszystkich zespołów, odniosę się tylko do tego, że w kwestii miejsca pochodzenia efektu mieliśmy następujące argumenty (poza tymi pochodzącymi od ludzi): wyizolowane mysie siatkówki, pozbawione soczewki i rogówki, były pobudzane impulsowym laserem 1000 nm, przy czym zależność tego pobudzenia od średniej mocy wiązki była ponadliniowa ($n = 1.8 \pm 0.2$) wskazując na efekt kwadratowo zależny od mocy; rodopsyna (pigment wzrokowy pręcików) była wybielana impulsami lasera 1000 nm i

była to reakcja odwracalna, podobnie jak dla aktywacji światłem widzialnym; modelowy chromofor również wykazał przejście z formy 11-*cis* do all-*trans* po aktywacji impulsowym laserem podczerwonym; a wyniki matematycznego modelowania przekroju czynnego dla rodopsyny na absorpcję dwufotonową dały niepomijalne wartości tego przekroju dla długości fal między 950 nm a 1150 nm, z maksimum około 1000 nm.

Mój wkład w tę pracę polegał na zaproponowaniu, zaplanowaniu i przeprowadzeniu wraz z zespołem badań psychofizycznych z udziałem ludzi. Pierwszy eksperyment miał na celu określenie, jakiej długości fali odpowiada kolor wiązek postrzeganych dwufotonowo. Układ eksperymentalny bazował na zmodyfikowanym autofluorescencyjnym skaningowym oftalmoskopie laserowym, który skonstruowaliśmy wcześniej [32]. Wykorzystując układ optyczny tego oftalmoskopu wprowadziliśmy do oka dwie wiązki światła: podczerwoną z oscylatora parametrycznego (OPO; $\tau_p = 200$ fs, $F_{rep} = 76$ MHz) oraz pochodzącą z lampy halogenowej przefiltrowanej przez monochromator. Dzięki zastosowaniu szybkiego skanowania, uczestnik postrzegał dwie poziome linie sąsiadujące ze sobą jedna nad drugą, a jego zadaniem było dopasowanie koloru linii „widzialnej” do podczerwonej poprzez zmianę położenia siatki dyfrakcyjnej w monochromatorze. W eksperymencie wzięło udział 30 ochotników, a uśrednione wyniki przedstawione są na Rys. 3 a). Dopasowane kolory, podobnie jak u Dmitrieva, różniły się istotnie od linii połowy długości fali (zaznaczonej linią przerywaną). Jednak nasz eksperyment pokazał, że prawie wszystkie badane wiązki miały kolor istotnie przesunięty ku większym długościom fali (poza dwoma skrajnymi: niebieską 950 nm i czerwoną 1200 nm). Obserwowane przesunięcie barwne nie mogło być wyjaśnione domieszką czerwieni, bo w przypadku naszego źródła jedynie dla krótszych fal (<950 nm) postrzegane linie były mieszaniną dwóch kolorów: czerwonego wynikającego z percepcji jednofotonowej oraz niebieskiego, dwufotonowego, a eksperyment z dopasowaniem kolorów obejmował długości fali ≥ 950 nm, postrzegane jako czyste barwy.



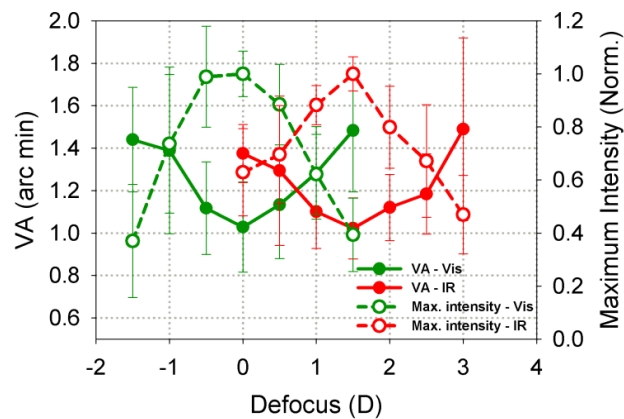
Rys. 3. Psychofizyczne badania widzenia dwufotonowego opublikowane w pracy [H1]. a) Eksperyment z dopasowaniem kolorów: do 7 długości fali wiązki podczerwonej (pozioma oś) 30 uczestników dopasowało długości fali światła widzialnego, przefiltrowanego przez monochromator (pionowa oś). Słupki błędów oznaczają odchylenia standardowe. b) Pomiary czułości siatkówki na widzenie dwufotonowe dla dwóch ochotników (S1 i S2). Czarna ciągła linia odpowiada normalnemu widzeniu zgodnie z literaturą [25]. Punkty leżące powyżej tej linii wskazują na nowy mechanizm percepcji wzrokowej charakteryzujący się w tym obszarze spektralnym wyższą czułością i zależny od czasu trwania impulsu wiązki pobudzającej.

SHG generowana w oku powinna mieć długość fali równą połowie długości fali wiązki wzbudzającej, natomiast w przypadku pobudzenia fotoreceptorów poprzez absorpcję dwufotonową istnieją czynniki, które mogą wpłynąć na zmianę postrzeganej barwy. Mózg identyfikuje kolor po względnym stopniu pobudzenia różnych typów fotoreceptorów – jest to tzw. *univariance principle* [33]. W związku z tym nawet niewielkie różnice w wydajności procesu między różnymi pigmentami wzrokowymi (opsynami czopków S, M i L oraz rodopsyną) w porównaniu do normalnego widzenia jednofotonowego, powodowałyby inny stopień pobudzenia tych typów fotoreceptorów i w efekcie zmianę postrzeganej barwy. Generacja wzbudzonej dwufotonowo fluorescencji w siatkówce i jej wtórna detekcja przez fotoreceptory jest również możliwa, ale wąski rozrzut dopasowanych długości fali między uczestnikami wskazywałby raczej na to, że kolory postrzegane były jako barwy monochromatyczne. Największy rozrzut zaobserwowano dla barwy czerwonej, ale wynikał on przede wszystkim z tego, że wiązka 1200 nm, jako silniej absorbowana w ciele szklistym oka składającym się głównie z wody, była gorzej widoczna dla uczestników. **Wyniki dopasowania kolorów wskazywały więc na absorpcję dwufotonową, a nie SHG, jako bardziej prawdopodobne źródło obserwowanego efektu.**

Drugi eksperyment przeprowadziliśmy z udziałem dwóch ochotników – polegał on na pomiarze progu widzenia (najmniejszej średniej mocy wiązki potrzebnej, żeby bodziec był widoczny) dla różnych długości fali w dwóch przypadkach: (1) gdy wiązki OPO były transmitowane przez jednomodowy światłowód o długości 1 km, co spowodowało dyspersyjne poszerzenie czasu trwania impulsów do 0.3-0.6 ns (*stretched pulses* na Rys. 3b)), (2) gdy światłowód miał tylko 2 m długości i impulsy trwały ok. 1 ps (*non-stretched pulses* na Rys. 3 b)). Na osi pionowej wykresu pokazano zlogarytmowaną odwrotność progu widzenia dopasowaną do krzywej Walravena-Leebeeka dla 800 nm, czyli logarytm względnej czułości wzrokowej na bodziec o danej długości fali. Dla krótszych impulsów oznaczonych czerwonymi symbolami bodźce 800-900 nm miały rosnące progi widzenia (malejącą czułość) wraz z długością fali, zgodnie z krzywą Walravena-Leebeeka charakteryzującą normalne widzenie [25]. Natomiast progi widzenia dla 950 nm i większych długości fali wykazują odstępstwo od przewidywanych wartości: czułość oka staje się większa niż spodziewana, czemu towarzyszy percepcja koloru o połowie długości fali – widzenie dwufotonowe. Minimalny dwufotonowy próg, a więc maksymalną czułość dwufotonową, obaj ochotnicy mieli dla długości fali 1000 nm. Dla wydłużonych impulsów (czarne symbole) ta sama moc średnia oznacza mniejszą moc szczytową i widzenie dwufotonowe w mniejszy sposób wpływa na mierzone progi: odstępstwa od krzywej Walravena-Leebeeka występują dla większych długości fali i są mniejsze. Maksimum czułości dwufotonowej przesunęło się również w stronę większych długości fali. Dla wydłużonych impulsów wiązka 1150 nm nie była widoczna w zakresie bezpiecznych dla oka mocy średnich. **Wynik ten jednoznacznie wykazał, że za percepcją wzrokową impulsowych wiązek w tym zakresie spektralnym stoi nowy proces fizyczny i że jest to proces nieliniowy optycznie, zależny od mocy szczytowej lasera.**

Kolejna praca cyklu jest efektem współpracy z Laboratorio Optica Universidad de Murcia prof. Pablo Artala, nawiązanej po publikacji pracy [H1]. W widzeniu dwufotonowym, podobnie jak w przypadku mikroskopii dwufotonowej, rejestrowany sygnał pochodzi z ograniczonego obszaru ogniska wiązki. Jedynie w tym obszarze strumień fotonów jest wystarczająco duży, żeby akty dwufotonowej absorpcji w pigmentach wzrokowych zachodziły istotnie często

wywołując wrażenie wzrokowe. Ma to odzwierciedlenie również w subiektywnych wrażeniach ochotników – bodźce dwufotonowe wydają się bardziej wyraźne i ostre niż ich jednofotonowe odpowiedniki. Postanowiliśmy sprawdzić czy nasze subiektywne wrażenia przełożą się na ostrość wzroku, która określa najmniejszy bodziec (o największej częstotliwości optycznej) rozpoznawalny przez układ wzrokowy przy maksymalnym kontraście (100%). Układ optyczny umożliwiał wyświetlanie na siatkówce optotypów o kształcie litery E o różnych rozmiarach i orientacji dla dwóch wiązek laserowych: 543 nm (pracy ciągłej) oraz 1040 nm ($\tau_p = 543$ fs, $F_{rep} = 63$ MHz). Zadaniem uczestnika było określenie minimalnego rozmiaru kąowego bodźca, dla którego był on w stanie ocenić orientację wyświetlanej litery dla obydwu długości fali (postrzeganych jako zielone). To zadanie powtarzano dla siedmiu wartości rozogniskowania poprzez umieszczanie przed okiem soczewek optometrycznych o różnej mocy optycznej. Dodatkowo, kamera w układzie optycznym położona w płaszczyźnie sprzężonej optycznie z siatkówką, umożliwiała rejestrację obrazu plamki lasera pobudzającego na siatkówce (ang. *double-pass image*) dla wszystkich wartości rozogniskowania. Badania przeprowadzono dla 6 zdrowych ochotników. Wyniki zaprezentowane są na Rys. 4.



Rys. 4. Zależność ostrości widzenia (VA, ang. *Visual Acuity*) od rozogniskowania dla optotypu wyświetlanego przy pomocy wiązek: widzialnej 543 nm (zielone pełne koła połączone linią ciągłą) oraz podczerwonej 1040 nm, postrzeganej dwufotonowo (czerwone pełne koła połączone linią ciągłą) – wartości podano na lewej pionowej osi. Na tym samym wykresie pokazano maksymalne natężenie z zarejestrowanych obrazów plamki lasera na siatkówce: dla wiązki podczerwonej (czerwone okręgi połączone przerywaną linią) oraz widzialnej (zielone okręgi połączone przerywaną linią) – wartości podano na prawej pionowej osi. Wyniki pochodzą z pracy [H2].

Pomiar ostrości widzenia nie wykazał różnic między widzeniem normalnym a dwufotonowym: w obu przypadkach najmniejszy rozpoznawalny optotyp miał średni rozmiar kąowy 1 minuty łuku, co odpowiada normie fizjologicznej. W przypadku widzenia centralnego wynika ona z odstępów między czopkami w dołeczku siatkówki [34]. Analiza obrazów plamki lasera na siatkówce wykazała, że maksymalne natężenie tych obrazów odpowiada minimum krzywych rozogniskowania. Wynika z tego, że ostrość wzroku dla obydwu typów widzenia jest największa gdy wiązka pobudzająca jest zogniskowana na siatkówce. **Ten wynik stanowi potwierdzenie, że proces widzenia dwufotonowego zachodzi na siatkówce, podobnie jak normalne widzenie.** Ostatecznie wyklucza to SHG w rogówce lub soczewce jako ewentualne źródło efektu: w takim przypadku ogniskowanie wiązki na rogówce, odpowiadające dodatnim wartościom rozogniskowania, dawałoby najwyraźniejszy bodziec. W ostatnim czasie ukazały się jeszcze dwie prace, które niezależnie, innymi metodami również wskazały siatkówkę, a dokładniej warstwę fotoreceptorów, jako miejsce, w którym zachodzi proces widzenia

dwufotonowego [35,36]. Omawiane eksperymenty z pracy [H2] przyniosły jeszcze jedną praktyczną informację: pomiar przesunięcia chromatycznego między wiązką zieloną 543 nm, a podczerwoną 1040 nm, które jest równe 1.5 D, jak wynika z przesunięcia krzywych rozogniskowania na Rys. 4. Oznacza to, że oko miarowe potrzebuje korekcji +1.5 D, żeby ostro postrzegać bodźce dwufotonowe 1040 nm i należy to uwzględnić projektując układ optyczny, który ma służyć do porównywania bodźców normalnych i dwufotonowych.

Praca [H3] wprowadza kliniczne zastosowanie widzenia dwufotonowego, czyli mikroperymetrię dwufotonową. W czasie kilku krótszych pobytów w Case Western Reserve University wprowadziłam w tematykę widzenia dwufotonowego Daniela Rumińskiego, pierwszego autora pracy [H3], który w tym czasie odbywał tam staż podoktorski i zebrał większość danych eksperymentalnych. Pozostała część danych pochodzi z układu, który powstał w Toruniu według mojego projektu i z moim udziałem, w ramach doktoratu Agnieszki Zielińskiej, dla której byłam promotorką pomocniczą.

Mikroperymetria to technika diagnostyczna w okulistyce, w której mierzy się mapę czułości siatkówki pacjenta [37,38]. Od standardowego badania pola widzenia (perymetrii) różni się rozmiarem i precyzją tworzonej mapy czułości. W czasie testu siatkówka jest cały czas obrazowana, co pozwala określić ruchy oka i ocenić sprawność fiksacji pacjenta. Zmniejsza to istotnie niepewność uzyskanych wyników poprawiając precyzję pobudzania siatkówki, ponieważ nawet fiksujące oko jest w nieustannym ruchu.

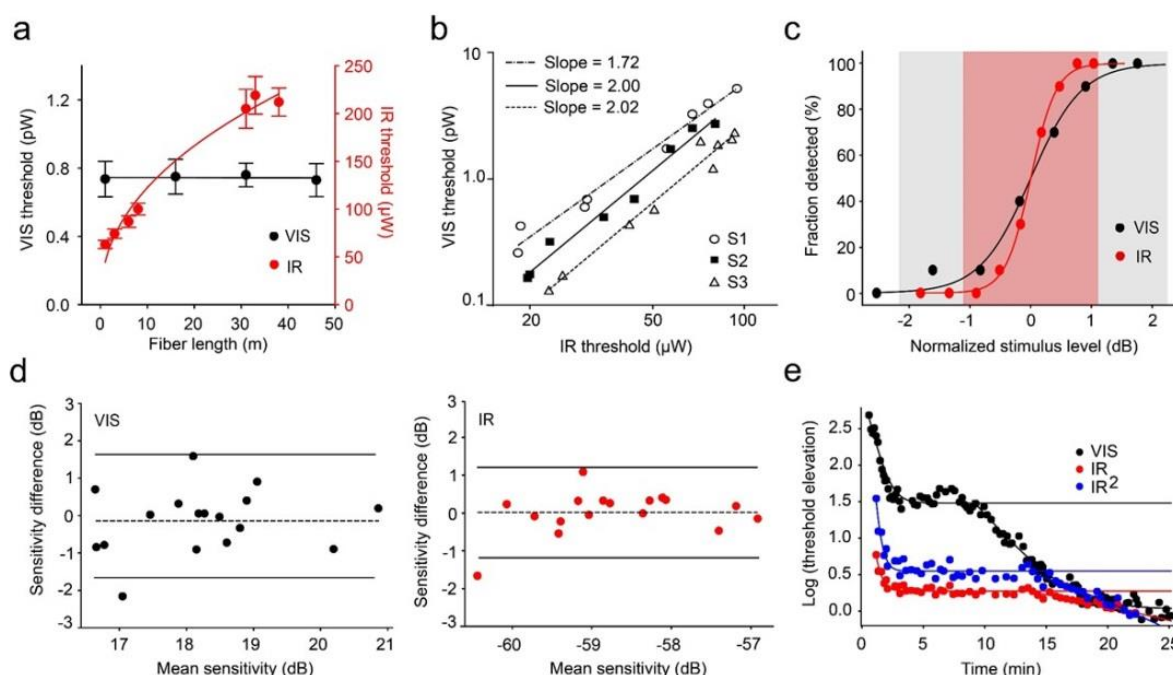
Mikroperymetria dwufotonowa zamiast normalnego, jednofotonowego bodźca, bada czułość siatkówki wykorzystując bodźce dwufotonowe. Z uwagi na fakt, że obydwa typy widzenia wykorzystują te same fotoreceptory (widzenie dwufotonowe zachodzi zarówno w czopkach, jak i w pręcikach, co pokazaliśmy w pracy [H1]), można użyć widzenia dwufotonowego do funkcjonalnych badań wzroku w diagnostyce medycznej. Rys. 5 pokazuje wyniki pięciu różnych eksperymentów wskazujących na te cechy widzenia dwufotonowego, które są istotne dla badania czułości siatkówki, na podstawie pracy [H3].

Wykres na Rys. 5a pokazuje jakościowo wpływ zmiany czasu trwania impulsu lasera na mierzony próg widzenia. Dla wiązki VIS czułość siatkówki nie zależała od długości impulsu (czarne punkty) podczas gdy wydłużanie impulsu poprzez dyspersję zachodzącą w światłowodzie o długości podanej na osi poziomej zmieniało istotnie próg widzenia dwufotonowego (IR threshold).

Rys. 5b pokazuje, że widzenie dwufotonowe jest efektem, który zależy od kwadratu mocy wiązki pobudzającej, co jest zgodne z równaniami (2) i (3). Troje zdrowych ochotników mierzyło progi widzenia: dla wiązki 1040 nm (IR) oraz 520 nm (VIS) na jednorodnym tle o wzrastającym natężeniu. Każdy punkt na wykresie odpowiada progom VIS i IR danego ochotnika (S1, S2, S3) zmierzonym na tle o danym natężeniu. Z uwagi na to, że widzenie dwufotonowe zależy kwadratowo od mocy wiązki, a normalne widzenie liniowo, na wykresie ze zlogarytmowanymi obydwoimi osiami punkty dla poszczególnych ochotników układają się wzdłuż linii o nachyleniu w przybliżeniu równym 2.0.

Kolejny wykres na Rys. 5c pokazuje różnice w kształcie funkcji psychometrycznych dla obu rodzajów widzenia. Funkcja psychometryczna dla progu widzenia opisuje prawdopodobieństwo zauważenia bodźca o danym natężeniu [39]. Natężenie bodźca odłożone jest na osi poziomej, która ma zwyczajowo skalę logarytmiczną. Prawdopodobieństwo zauważenia bodźca można opisać funkcją sigmoidalną, której punkt przegięcia, odpowiadający

50% prawdopodobieństwu zauważenia bodźca, wypada dla natężenia określanego jako próg widzenia (na znormalizowanej skali logarytmicznej ma on wartość równą zero). Na Rys. 5c natężenie bodźca wyrażone zostało przez średnią moc wiązki. Kwadratowa zależność jasności bodźca od mocy wiązki, wynikająca z równań (2) i (3), powoduje, że funkcja psychometryczna dla widzenia dwufotonowego (czerwone punkty, czerwona linia) jest bardziej stroma niż dla widzenia jednofotonowego (czarne punkty, czarna linia). Kształt funkcji psychometrycznej wpływa z kolei na rozrzut wyników uzyskiwanych przy pomiarze progu widzenia: bardziej stromej funkcji odpowiada węższy przedział uzyskiwanych wyników. Oznacza to, że **pomiar progu widzenia dwufotonowego powinien dawać bardziej precyzyjne i powtarzalne wyniki niż pomiar progu widzenia jednofotonowego**.



Rys. 5. Pomiary czułości wzroku na światło podczerwone i widzialne. a) Zależność progu widzenia od długości światłowodu/czasu trwania impulsu dla wiązki VIS (520 nm, czarne punkty) oraz IR (1040 nm, czerwone punkty). b) Wykres pokazuje kwadratową zależność widzenia dwufotonowego od mocy wiązki (opis w tekście). Zaznaczono progi widzenia 3 ochotników (S1: okręgi, S2: kwadraty, S3: trójkąty) zmierzone na jednorodnym tle 505 nm o coraz większym natężeniu. c) Funkcje psychometryczne: wielokrotne (90 razy dla każdej długości fali) testy widzialności bodźców o określonym natężeniu u jednego ochotnika pozwoliły na oszacowanie prawdopodobieństwa zobaczenia bodźca o danym natężeniu (VIS: punkty czarne, IR: punkty czerwone). Wartości mocy wiązki pobudzającej odpowiadające natężeniom wiązek VIS i IR zostały znormalizowane tak, żeby próg widzenia odpowiadał 50% prawdopodobieństwu zauważenia bodźca. Do punktów dopasowano funkcje logistyczne (szczegóły w [H3]) oznaczone ciągłymi liniami. Funkcja psychometryczna dla widzenia dwufotonowego (czerwona) okazała się mieć dwa razy węższy zakres przejściowy (od -1 dB do +1 dB) niż funkcja dla widzenia jednofotonowego (czarna: od -2 dB do 2 dB). d) Wykresy Blanda Altmana [40] porównujące powtarzalność pomiaru progu widzenia za pomocą wiązki postrzeganej jednofotonowo (VIS, czarne punkty) oraz dwufotonowo (IR, czerwone punkty). d) Pomiary adaptacji do ciemności po silnym błysku białego światła w chwili $t = 0$ z użyciem bodźców próbujących 520 nm (VIS, czarne punkty) i 1040 nm (IR, czerwone punkty). Na pionowej osi pokazano logarytm stosunku progu chwilowego do progu przed błyskiem światła dla zaadaptowanego do ciemności oka. Niebieskie punkty to podniesione do kwadratu wyniki dla wiązki IR. Szczegółowy opis w tekście poniżej. Wszystkie wyniki pochodzą z pracy [H3].

Sprawdziliśmy tę hipotezę w kolejnym eksperymencie, którego wyniki są pokazane na Rys. 5d. 17 ochotników mierzyło swoje progi widzenia VIS i IR dwukrotnie w odstępie

2 godzin. Progi widzenia zmierzone dla obydwu wiązek (VIS i IR) były następnie przeliczane na logarytmiczną skalę czułości wzroku S zgodnie ze wzorem (4):

$$S = \log\left(\frac{100pW}{P_T}\right) \quad (4)$$

gdzie P_T to próg widzenia odpowiadający mocy wiązki wyrażonej w watach dla danej długości fali. Dlatego czułość dla widzenia jednofotonowego jest wartością dodatnią (P_T dla VIS były mniejsze niż 100 pW), a dla widzenia dwufotonowego wartością ujemną (P_T dla IR były większe niż 100 pW). Wyniki zaprezentowano w formie wykresów Blanda-Altmana [40] pokazujących różnice między tymi dwoma pomiarami w zależności od średniej z tych pomiarów. Wykresy Blanda-Altmana są często stosowane w medycynie w celu porównania dwóch technik mierzących ten sam parametr (wtedy badamy każdą osobę obydwoima technikami) lub do zbadania powtarzalności dla jednej techniki (wykonujemy pomiar dwa razy dla każdego badanego, jak w naszym przypadku). Analizując wyniki z Rys. 5 d, po pierwsze można zauważyć, że rozrzut wyników dla obu metod badania czułości siatkówki oscyluje wokół zera (średnia różnica czułości między dwoma testami wynosi 0 dla VIS i IR), co jest oczekiwane, bo oznacza, że średnio czułość ochotników nie zmieniła się między jednym a drugim pomiarem. Po drugie, rozrzut czułości dla widzenia dwufotonowego okazał się istotnie węższy niż dla jednofotonowego (poziome linie odpowiadają 95% przedziałowi ufności): wyniósł 2.2 dB (± 1.1 dB) dla widzenia dwufotonowego i 3.4 dB (± 1.7 dB) dla widzenia jednofotonowego. **Potwierdziliśmy tym samym, że mikroperymetria dwufotonowa daje bardziej powtarzalne wyniki niż jej klasyczny wariant.**

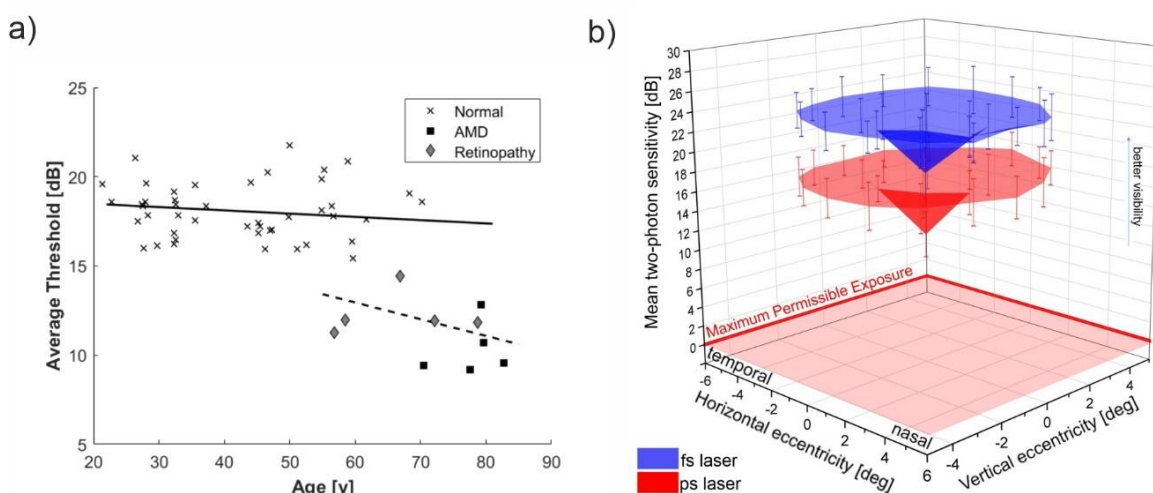
Wykres na Rys. 5e prezentuje wyniki pomiarów adaptacji do ciemności przeprowadzonych w Instytucie Fizyki UMK w Toruniu. Pomiar adaptacji do ciemności pozwala rozdzielić odpowiedź czopków i pręcików na bodziec świetlny z uwagi na różny czas re-adaptacji do ciemności, którym charakteryzują się te fotoreceptory [41]. Pręciki są bardziej czułe na światło, ale po wybieleniu wolniej odnawia się w nich pigment wzrokowy (rodopsyna). Czas pełnej readaptacji do ciemności dla pręcików wynosi około 30 minut. Opsyny czopkowe odnawiają się znacznie szybciej po wybieleniu – czas ten w ich przypadku wynosi zaledwie 3-4 minuty. Z powodu tych różnic zmiany w czasie progu widzenia, po krótkotrwałym silnym błysku światła wybielającym oba typy fotoreceptorów, mają charakter dwufazowy: najpierw czułość na światło odzyskują czopki (na Rys. 5e czarne punkty (VIS) układają się w krzywą malejącą z czasem i osiągającą chwilowe plateau między 4 a 9 minutą po błysku), a dopiero później pręciki (na Rys 5e krzywa określona czarnymi punktami maleje ponownie około 9-10 minuty po błysku, bo wówczas pręciki stają się bardziej czułe od czopków, a około 25 minuty oko odzyskuje swoją początkową czułość, sprzed błysku). Przebieg adaptacji do ciemności pozwala, między innymi, określić różnicę w czułości na bodziec świetlny o danej długości fali (nazwijmy go bodźcem próbkującym) między czopkami i pręcikami w testowanym miejscu siatkówki. Jeżeli bodziec próbkujący miałby długość fali powyżej 650 nm to krzywa adaptacji nie będzie składała się z dwóch faz, bo pręciki nie są bardziej czułe na tę długość fali niż czopki: oko odzyska swoją maksymalną czułość po 3-4 minutach. Z kolei największe różnice między plateau czopkowym a pręcikowym można zaobserwować dla bodźców o długości fali 450-510 nm, dla których w czułość spektralna czopków i pręcików najbardziej się różni [42]. W eksperymencie, którego wyniki pokazane są na Rys. 5e, dla bodźca 520 nm (VIS) w odległości 6 stopni od centrum plamki, zaobserwowano różnicę czułości 1.5 rzędu wielkości

między czopkami a pręcikami, co jest zgodne z literaturą [43]. W taki sam sposób uzyskano wyniki pokazane czerwonymi punktami, z tym że tym razem bodziec próbkujący to była dwufotonowo postrzegana wiązka 1040 nm (IR). Oba bodźce próbkujące były postrzegane jako zielone o zbliżonej barwie, jednak różnice w przebiegu adaptacji do ciemności są znaczące – bodziec IR ma praktycznie tylko jedno plateau, czopkowe. Z uwagi na kwadratową zależność jasności bodźca od mocy dla widzenia dwufotonowego, porównanie kształtu obu krzywych wymaga podniesienia wartości progów dla IR do kwadratu – niebieskie punkty na Rys. 5 e. Można zauważyć, że dla niebieskich punktów występują dwie fazy: czopkowa, która trwa do około 15 minut, i jest mniej wyniesiona nad fazę pręcikową, której przebieg pokrywa się z czarnymi punktami dla VIS. Różne kształty krzywych adaptacji do ciemności dla bodźców próbkujących 520 nm i 1040 nm oznaczają, że różnica w czułości między czopkami a pręcikami na postrzegane dwufotonowo światło 1040 nm jest mniejsza niż dla postrzeganego jednofotonowo światła 520 nm. W analizowanym przypadku wynosiłaby około 0.5 rzędu wielkości dla 1040 nm, zamiast 1.5 rzędu wielkości dla 520 nm. Ta hipoteza znalazła potwierdzenie również w kształcie mapy czułości pokazanym w pracy [H3]: skotopowa mapa czułości dla 1040 nm wykazywała mniejsze różnice między centrum a odległością 5 stopni niż skotopowa mapa dla 520 nm. Mniejsza różnica w czułości między czopkami a pręcikami może oznaczać, że występuje jakiś czynnik, który zwiększa efektywność absorpcji dwufotonowej w czopkach w porównaniu do pręcików. W pracy [H3] postawiliśmy hipotezę, że może to być związane z falowodowymi własnościami wewnętrznych segmentów czopków. Byłby to mechanizm, który zwiększałby strumień fotonów padających na zewnętrzne segmenty czopków, w których znajdują się opsyny. Innym możliwym wyjaśnieniem byłyby różnice w kształcie widma wzbudzenia dwufotonowego dla rodopsyny i opsyn czopkowych, które mogą być inne niż widma wzbudzenia jednofotonowego. Obie hipotezy nie zostały jeszcze eksperymentalnie potwierdzone. **Omówione powyżej wyniki z pracy [H3] dostarczają kilku istotnych przesłanek o czopkowym charakterze widzenia dwufotonowego.**

W tym samym czasie skonstruowaliśmy kolejny prototypowy system mikroperymetru dwufotonowego, który trafił do kliniki okulistycznej szpitala uniwersyteckiego w Heidelbergu, do zespołu prof. Gerda U. Auffartha. W tym systemie również zaprojektowałam i zbudowałam moduł pobudzający, tor kamery źrenicznej, fiksacji i tła. Moduł SLO, automatykę i oprogramowanie dostarczyła spółka spin-off AM2M (obecnie: Inoko Vision). Pierwsza praca, która powstała z wykorzystaniem tego systemu miała na celu określenie zakresu normalnych czułości siatkówki na widzenie dwufotonowe w warunkach skotopowych [H4]. Przebadanych zostało 45 zdrowych osób z 5 grup wiekowych między 20 a 70 rokiem życia. Czułość wzroku przeliczaliśmy na skalę logarytmiczną zgodnie ze zmodyfikowanym wzorem (4), biorąc za moc referencyjną największą moc wiązki 1040 nm na wyjściu z systemu, czyli 400 μ W (ograniczenie mocy średniej wynika z norm bezpieczeństwa). Dzięki temu, tak jak normalnej perymetrii i mikroperymetrii, czułość 0 dB oznaczała, że pacjent nie widzi najjaśniejszego bodźca. Warto zauważyć, że z uwagi na brak fotometrycznych jednostek dla widzenia dwufotonowego, dokładna kalibracja bodźców dwufotonowych jest trudna: opierać się musi o subiektywne dopasowanie jasności do bodźców jednofotonowych. Wyniki przedstawiono na Rys. 6 a). Mediana czułości dwufotonowej badanych zdrowych osób wynosiła 17.9 dB (rozstęp międzykwartylowy: 17.0-19.1 dB) i lekko malała z wiekiem (-0.18 dB na dekadę), jednak ten trend nie był istotny statystycznie. W tej samej pracy, dla porównania badaliśmy osoby

z chorobami siatkówki: 5 osób z AMD (ang. *Age Related Macular Dystrophy* – zwyrodnienie plamki żółtej związane z wiekiem) oraz 5 osób z retinopatią cukrzycową. Osoby te miały istotnie mniejszą dwufotonową czułość siatkówki: 11.5 dB (9.6-12.0 dB), co potwierdziło założenie, że **badanie mikroperymetrią dwufotonową jest czule na stan funkcjonalny siatkówki**.

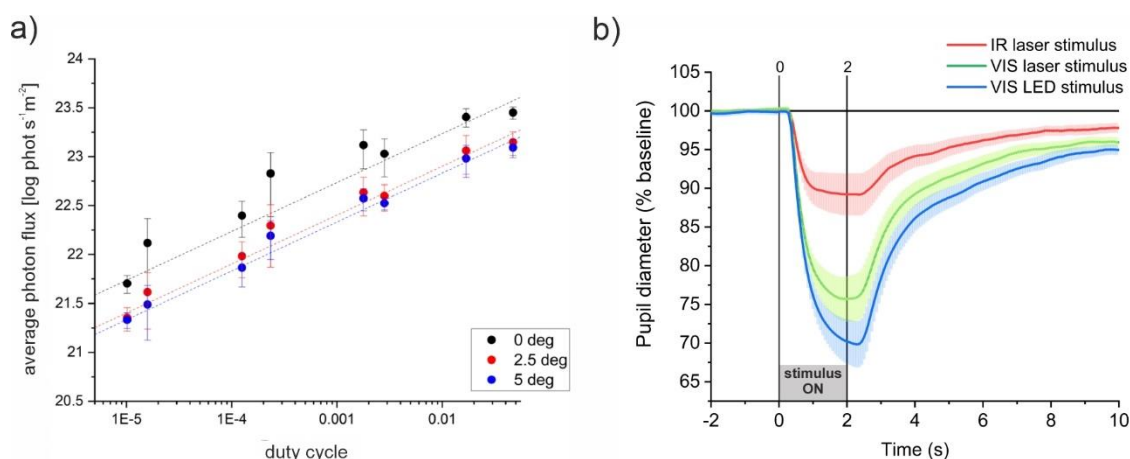
Następna kliniczna praca będąca owocem tej współpracy skupia się na badaniu osób z jaskrą [H7]. W tym badaniu chcieliśmy porównać wyniki uzyskiwane z mikroperymetrii dwufotonowej oraz klasycznej mikroperymetrii, z użyciem komercyjnego systemu MP-1 (Nidek). Dodatkowo badane osoby miały przeprowadzone badanie obrazowe OCT (Spectralis, Heidelberg) pozwalające określić grubość warstwy włókien nerwowych siatkówki (RNFL, ang. *Retinal Nerve Fiber Layer*). Obydwa te badania stanowią standard diagnostyczny w przypadku jaskry, w której przebiegu następuje zmniejszenie grubości RNFL oraz spadek czułości wzroku. Do badania zrekrutowano 32 pacjentów z jaskrą oraz 32 osoby do grupy kontrolnej. Z uwagi na fakt, że MP-1 mierzy czułość na tle, w tym badaniu używaliśmy toru tła w układzie dwufotonowym. Tła miały tę samą luminancję (1.27 cd/m^2), a maksymalne bodźce miały porównywalną jasność. Na tamtym etapie sprawdziliśmy to subiektywnie, a obecnie dane z pracy [H9] pozwalają już potwierdzić, że natężenie oświetlenia siatkówki dla obu maksymalnych bodźców było takie samo, przy założeniu emetropowego oka i optymalnego ogniskowania bodźca dwufotonowego na siatkówce. Czułość dwufotonowa lepiej korelowała z grubością RNFL niż jednofotonowa: nie tylko współczynniki korelacji były wyższe, ale również korelacje były bardziej istotne statystycznie. Prawdopodobnie jest to związane z mniejszym rozrzutem progów widzenia mierzonych procesem nieliniowym, zgodnie z wynikami pracy [H3]. **Mikroperymetria dwufotonowa w tym badaniu okazała się być bardziej precyzyjna w ocenie stanu funkcjonalnego siatkówki w jaskrze niż zwykła mikroperymetria**, i to pomimo tego, że ergonomia naszego prototypowego systemu była z pewnością gorsza niż urządzenia komercyjnego.



Rys. 6. Mikroperymetria dwufotonowa. a) Próg widzenia dwufotonowego w funkcji wieku dla populacji normalnej (krzyżyki) w porównaniu z pacjentami z AMD (czarne kwadraty) i retinopatią cukrzycową (szare romby). Linie ciągła i przerywana odnoszą się odpowiednio do mediany czułości dla zdrowych i z chorobami siatkówki. Wyniki z pracy [H4]. b) Średnie mapy (16 ochotników) skotopowej czułości dwufotonowej dla lasera femtosekundowego (1040 nm, 253 fs, 63 MHz) i pikosekundowego (1028 nm, 12.2 ps, 19 MHz). Słupki błędów odpowiadają jednemu odchyleniu standardowemu. Poziom MPE jest zaznaczony jako półprzezroczysta czerwona płaszczyzna na dole wykresu. Wyniki z pracy [H5].

Rozwój klinicznych zastosowań wymaga zwiększenia dostępności elementów składowych systemu – obydwa omawiane prototypy (z prac [H3] oraz [H4] i [H7]) wykorzystują stosunkowo drogie lasery femtosekundowe. Co więcej, jedynie niewielki ułamek mocy wyjściowej tych laserów można bezpiecznie wprowadzić do oka. Część mocy wykorzystuje się co prawda na generację drugiej harmonicznej jako wiązki referencyjnej, gdyż obydwa systemy mogą pobudzać oko dwufotonowo i jednofotonowo połową długości fali, ale taniej i praktyczniej byłoby zastąpić moduł SHG widzialnym laserem półprzewodnikowym. Dlatego w pracy [H5] postanowiliśmy sprawdzić czy laser femtosekundowy (HighQ-2, Spectraphysics: $\tau_p = 253$ fs, $F_{rep} = 63$ MHz) można by było zastąpić laserem światłowodowym o impulsach pikosekundowych (Jive, Fluence: $\tau_p = 12.2$ ps, $F_{rep} = 19$ MHz). Do pomiarów mikroperymetrycznych zastosowaliśmy układ skonstruowany w Bałtyckim Instytucie Technologicznym w Gdyni. Zmierzyliśmy skotopową czułość siatkówki 16 zdrowych ochotników. Średnia różnica w czułości między laserami wynosiła 5.9 ± 2.8 dB, co pokazano na Rys. 6 b). Ta różnica wynika z innych parametrów czasowych obu laserów, co pokazaliśmy stosując zależność między mocą średnią lasera a prawdopodobieństwem absorpcji dwufotonowej. Dla zastosowań klinicznych istotny jest zakres dostępnych mocy ograniczony w przypadku widzenia dwufotonowego normami bezpieczeństwa. Średnia czułość dla lasera światłowodowego określona względem poziomu mocy bezpiecznej dla oka wynosiła 17.4 ± 1.9 dB, co jest bliskie 20 dB, które oferuje np. MP-1. Pokazaliśmy tym samym, że **kliniczne dwufotonowe mikroperymetry mogą być znacznie tańsze i łatwiejsze w eksploatacji**, gdyż lasery światłowodowe są mniejsze i mniej wrażliwe na warunki otoczenia: wilgotność, temperaturę, drgania i inne czynniki, których stabilność nieraz trudno jest zapewnić w klinice okulistycznej.

Kontynuację badania wpływu parametrów czasowych lasera na dwufotonową widzialność wiązki laserowej stanowi praca [H8]. Naszym celem było sprawdzenie zgodności modelu zaproponowanego w pracy [H5] z danymi eksperymentalnymi w szerokim zakresie parametrów czasowych lasera. W pracy [H8] model matematyczny opisany jest znacznie bardziej szczegółowo m. in. uwzględnia również różnice w kształcie impulsu. Pomiary czułości były przeprowadzone z użyciem tego samego układu co w pracy [H5], modyfikowaliśmy natomiast źródła pobudzające wykorzystując trzy lasery o podobnych długościach fali (1030-1040 nm) oraz poszerzając ich impulsy siatką dyfrakcyjną lub dyspersją w światłowodzie. We wszystkich przypadkach charakteryzowaliśmy kształt widma i mierzyliśmy czas trwania impulsów. W ten sposób otrzymaliśmy 8 źródeł różniącym się iloczynem czasu trwania impulsu i częstotliwości repetycji (ang. duty cycle) w szerokim zakresie: od $1.01 \cdot 10^{-5}$ do $4.7 \cdot 10^{-2}$. Dla każdego z tych źródeł mierzyliśmy czułość siatkówki zdrowym ochotnikom: badana grupa to 22 osoby w wieku 20-48 lat. Zgodnie z testowanym modelem, progi czułości były proporcjonalne do pierwiastka kwadratowego z duty cycle, co przedstawia wykres na Rys. 7 a). Dopasowane zależności umożliwiają określenie wartości progu widzenia dwufotonowego w trzech odległościach od centrum siatkówki dla dowolnego lasera impulsowego o długości fali 1030-1040 nm. Wynika z nich również, że **nawet nanosekundowe impulsy mogą być postrzegane dwufotonowo z zachowaniem norm bezpieczeństwa, co znacząco zwiększa praktyczne możliwości zastosowania widzenia dwufotonowego w różnych obszarach technologii**.



Rys. 7. a) Zależność progu widzenia od cyklu pracy lasera. Próg widzenia wyrażony został jako średni strumień fotonów na siatkówce w trzech odległościach od centrum plamki: 0 stopni, 2.5 stopnia oraz 5 stopni. Słupki błędów odpowiadają jednemu odchyleniu standardowemu. Przerywane linie są dopasowanymi prostymi ze współczynnikiem nachylenia 0.5. Wyniki z pracy [H8]. b) Reakcja źrenicy na bodziec dwufotonowy 1040 nm (kolor czerwony) jest słabsza niż na bodźce jednofotonowe o tej samej jasności: bodziec uzyskany w wyniku szybkiego skanowania laserem 520 nm (zielony) oraz bodziec z diody LED 520 nm (niebieski). Ciągłe linie reprezentują średnią reakcję 14 uczestników, a zacienione kolorowe obszary - niepewność standardową średniej (SEM). Wyniki z pracy [H5].

Praca [H6] dotyczy odruchowej reakcji źrenicy na bodziec dwufotonowy. Głównym zadaniem odruchu źrenicznego jest regulacja natężenia oświetlenia siatkówki w celu przeciwdziałania nasyceniu fotoreceptorów. Badania tego odruchu doprowadziły niedawno do odkrycia piątego typu fotoreceptora w siatkówce: komórek zwojowych wrażliwych na światło [44], które są powiązane z regulacją rytmu dobowego, chociaż nie odpowiadają za świadomą percepcję światła. Postanowiliśmy sprawdzić czy odruch źreniczny wywołany przez bodźce postrzegane dwufotonowo jest taki sam, jak w przypadku normalnych bodźców wzrokowych. Badania były przeprowadzone z użyciem systemu z Torunia: prezentowaliśmy 14 zdrowym uczestnikom w wieku 20-42 lata bodźce dwufotonowe 1040 nm (200 fs, 76 MHz) oraz jednofotonowe 520 nm o takiej samej jasności. Jasność bodźców była dopasowywana przez każdego uczestnika w osobnej procedurze. Bodźce jednofotonowe były dwojakiego rodzaju: uzyskane przez skanowanie laserem 520 nm w kształcie gęstej spirali o średnicy 3.5 stopnia (podobnie jak 1040 nm) oraz z diody LED 520 nm (jednorodne koło o średnicy 3.5 stopnia). Reakcja źrenicy została określona na podstawie jej obrazów zebranych kamerą źreniczną i przeanalizowanych autorskim oprogramowaniem (LabVIEW i Python). Wyniki pokazane są na Rys. 7 b). Najsilniejszą reakcję źrenicy wywołał bodziec LED – był on lepiej wypełniony niż spirala – jednak dokładna analiza parametrów charakteryzujących tę reakcję (minimalna średnica źrenicy, średnia prędkość jej kurczenia, opóźnienie, czas maksymalnego zwężenia), że nie były one znacząco różne między obydwoma bodźcami widzialnymi. Natomiast reakcja na bodziec podczerwony była istotnie słabsza, co jest widoczne zarówno na wykresie na Rys. 7 b), jak i wynikało z wyżej wspomnianych analiz. Jasności naszych bodźców były zbyt małe, żeby można było te różnice przypisywać wspomnianym wyżej komórkom zwojowym siatkówki: nawet nasze bodźce jednofotonowe nie powinny w istotny sposób ich pobudzić. Wskazaliśmy dwie inne przyczyny: słabsze pobudzenie pręcików przez bodziec dwufotonowy (wskazane wcześniej w pracy [H3]) oraz brak postrzegania światła rozproszonego w przypadku bodźców dwufotonowych, które również może przyczyniać się do reakcji układu wzrokowego.

Wyniki badań reakcji źrenicy na bodziec podczerwony są dowodem na to, że istnieją istotne różnice między jednofotonowym i dwufotonowym pobudzeniem układu wzrokowego.

Celem niedawno opublikowanej pracy [H9] było porównanie możliwości dwufotonowego wyświetlacza siatkówkowego z tradycyjnymi wyświetlaczami poprzez określenie jasności bodźców dwufotonowych. Badania te mają znaczenie praktyczne – są związane z pracami nad prototypem dwufotonowych okularów do rozszerzonej rzeczywistości (AR, ang. *Augmented Reality*), który aktualnie powstaje w Międzynarodowym Centrum Badań Oka ICTER w ramach realizacji projektu Proof of Concept FNP. Jasność zwykłych monitorów i wyświetlaczy określa się podając ich luminancję. Jednak luminancja monitora nie determinuje ilości światła docierającej do siatkówki – ta zależy od wielkości źrenicy osoby, która korzysta z niego korzysta. W przypadku wyświetlacza siatkówkowego opartego o skanującą wiązkę laserową ilość światła docierająca do siatkówki jest jednoznacznie powiązana z mocą tej wiązki, bo system optyczny zapewnia, że światło wpadającego do oka nie jest ograniczane źrenicą (Rys. 1b)). W naukach o widzeniu do charakteryzowania bodźców wzrokowych wyświetlanych na siatkówce używa się wielkości fizycznej nazywanej natężeniem oświetlenia siatkówki (ang. *retinal illuminance*). Znając moc wiązki P i obszar oświetlanej nią siatkówki A_R można policzyć natężenie oświetlenia siatkówki E_R w trolandach [td] [45]:

$$E_R = \frac{683}{3590} \cdot V(\lambda) \cdot \frac{P}{A_R} \quad (5)$$

gdzie stałe liczbowe wynikają z przyjętego układu jednostek oraz ogniskowej emetropowego oka, a $V(\lambda)$ to funkcja skuteczności świetlnej dla normalnego widzenia (jednofotonowego).

Z drugiej strony, znając natężenie oświetlenia siatkówki E_R można policzyć luminancję monitora L , który mógłby je wywołać, jednak trzeba założyć powierzchnię źrenicy oka A_p , które obserwuje ten monitor:

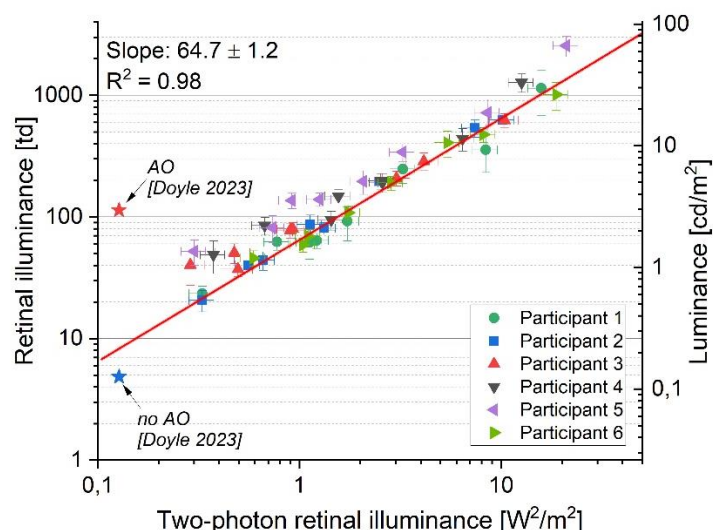
$$L = E_R \cdot \frac{(f_e)^2}{A_p} \quad (6)$$

gdzie f_e to długość optyczna emetropowego oka (16.7 mm) [45].

Badając dwufotonową jasność w pracy [H9] przeprowadziliśmy eksperyment z udziałem sześciu zdrowych ochotników w wieku 26-46 lat prezentując im sąsiadujące ze sobą bodźce 1040 nm i 520 nm w kształcie liter E o ośmiu różnych rozmiarach kątowych. Zadanie polegało na dopasowaniu mocy 520 nm do pięciu poziomów mocy 1040 nm tak, aby postrzegana jasność była jednakowa. Następnie moce 520 nm zostały przeliczone na trolandy, zgodnie ze wzorem (5). Okazało się, że liniowa zależność między widzeniem dwufotonowym, a jednofotonowym występuje, gdy wprowadzimy zaproponowaną przez nas wielkość nazwaną dwufotonowym natężeniem oświetlenia siatkówki E_R^{2phot} (ang. *two-photon retinal illuminance*), którego jednostka fizyczna ma wymiar $[W^2/m^2]$:

$$E_R^{2phot} = C \frac{P^2}{A_R} \quad (7)$$

gdzie stała C zawiera w sobie kilka czynników wynikających z równań (2) i (3): dwufotonową skuteczność świetlną, parametry związane z czasem trwania impulsu i częstością repetycji lasera pobudzającego oraz wydajnością ogniskowania na siatkówce, związaną ze średnicą wiązki wpadającej do oka (efektywną NA) i wpływem aberracji wyższych rzędów. Na Rys. 8 pokazano uzyskane wyniki pogrupowane według uczestników.



Rys. 8. Związek między jasnościami bodźców jedno- i dwufotonowych. Pokazano wyniki dopasowania jasności przez sześciu zdrowych uczestników dla bodźców o ośmiu różnych wielkościach. Punkty pokazane za pomocą gwiazdek to obliczone jasności bodźców używanych w pracy [36]: niebieskim kolorem jasność bodźca przed korekcją, a czerwonym po korekcji z użyciem optyki adaptacyjnej (AO). Wyniki z pracy [H9].

Obydwie osie wykresu na Rys. 8 mają skalę logarytmiczną, ale prosta zaznaczona czerwoną ciągłą linią została dopasowana w skali liniowej. Ma ona współczynnik nachylenia 64.7 ± 1.2 , który odpowiada stałej C z równania (7) dla bodźców generowanych w tym eksperymencie. Prawa pionowa oś przedstawia luminancję obliczoną ze wzoru (6) przy założeniu całkowicie rozszerzonej źrenicy (równej 7 mm). Jasność bodźców dwufotonowych w tym eksperymencie odpowiadała jasności, jaką oko postrzeżałoby, obserwując monitor o luminancji podanej na prawej osi pionowej przy całkowicie rozszerzonej źrenicy. Wiązki laserowe generujące bodźce w tym eksperymencie nie miały największej możliwej, wynikającej z norm bezpieczeństwa, mocy. Znalaziona zależność pozwala jednak przewidzieć, że używając tego lasera w zakresie mocy bezpiecznych dla oka można uzyskać bodźce, których jasność odpowiadałaby luminancji nawet 670 cd/m^2 (bez korekcji AO), co jest wartością porównywalną z dostępnymi na rynku okularami AR opartymi o widzenie jednofotonowe. Tę jasność można byłoby jeszcze zwiększyć optymalizując parametry czasowe lasera, zgodnie z wynikami z pracy [H8].

Ostatnia praca z cyklu [H10] to podsumowanie aktualnego stanu wiedzy o widzeniu dwufotonowym. Takie podsumowanie jest użyteczne nie tylko dla badaczy zajmujących się już tym zagadnieniem, ale przede wszystkim dla nowych osób w tej dziedzinie. Pracując ze studentami i doktorantami zauważyłam taką potrzebę w mojej niewielkiej grupie, ale okazało się, że taka potrzeba istnieje również szerzej w środowisku. Już po opublikowaniu pracy [H10] dostałam propozycję napisania rozdziału o widzeniu dwufotonowym w nowej edycji „Handbook of Visual Optics” pod edycją prof. Pablo Artala. Mam nadzieję, że praca [H10] przyczyni się do szerszej popularyzacji widzenia dwufotonowego.

Plany badawcze na przyszłość

Mam zamiar nadal kontynuować badania widzenia dwufotonowego, ponieważ ten obszar dopiero zaczął się rozwijać i nadal jest wiele naukowych pytań, na które chciałabym znaleźć odpowiedzi. Swoje plany na przyszłość podzieliłam na badania podstawowe i stosowane.

Badania podstawowe planuję realizować zarówno w ramach niedawno pozyskanego grantu OPUS NCN, jak i w innych projektach: zarówno tych, które teraz realizuję (MAB FENG FNP) jak i takich, o które aktualnie aplikuję (np. Pathfinder Open EIC 2025: jestem liderem jednej z grup konsorcjum, które aplikuje o projekt związany metodami optycznymi do badania mechanizmów rozwoju krótkowzroczności). Badania stosowane rozpoczęłam ostatnio realizując projekt Proof of Concept FNP i mam zamiar nadal podążać ścieżką komercjalizacji okularów AR opartych o widzenie dwufotonowe. W planach jest założenie spółki spin-off, kiedy prototyp okularów będzie gotowy.

Badania podstawowe:

1. Badania czułości poszczególnych typów fotoreceptorów na widzenie dwufotonowe: planowane są eksperymenty psychofizyczne, elektrofizjologiczne oraz optoretinografia. Długofalowym celem jest wprowadzenie jednostek fotometrycznych dla widzenia dwufotonowego.
2. Charakterystyka wpływu aberracji optycznych oka na widzenie dwufotonowe: badania na powstającym teraz układzie dwufotonowego symulatora widzenia z optyką adaptacyjną (TP-AO VS, ang. *Two-Photon Adaptive Optics Visual Simulator*). Długofalowy cel to dane umożliwiające modelowanie dwufotonowej PSF (ang. *Point Spread Function*) w oku.
3. Wpływ akomodacji na widzenie dwufotonowe: badania z użyciem układu TP-AO VS oraz układu OCT obrazującego przedni odcinek oka. Czy reakcja akomodacji na bodziec dwufotonowy jest taka sama jak na normalny? Ten problem badawczy wiąże się zarówno z okularami AR, jak i z zastosowaniem widzenia dwufotonowego w badaniach mechanizmu rozwoju krótkowzroczności.

Badania stosowane:

Rozwój okularów AR opartych o widzenie dwufotonowe: zastosowanie ich w praktyce klinicznej i optometrycznej (dwufotonowa mikroperymetria, badanie czułości kontrastowej) oraz do zastosowań specjalnych (lotnictwo, wojsko, medycyna).

Wpływ na rozwój dyscypliny

Prowadzone przeze mnie badania spotykają się z coraz większym zainteresowaniem w środowisku badaczy zajmujących się widzeniem, a ostatnio również wśród producentów systemów AR/VR. Od roku 2014 wygłosiłam w sumie 23 referaty o widzeniu dwufotonowym: 15 na konferencjach (w tym 7 referatów zaproszonych), a 8 pozostałych odwiedzając współpracowników zainteresowanych tym efektem w kraju i za granicą. Jestem wieloletnim członkiem Optica (dawniej Optical Society of America), a w 2021 zostałam wyróżniona członkostwem typu Senior Member. Jestem też członkiem komitetu Optica Edgar Tillyer Award na lata 2023-2025 przyznającego nagrodę Optica za wybitne osiągnięcia w dziedzinie nauk o widzeniu oraz członkiem komitetu naukowego szkoły letniej Biophotonics for EyE Research 2025 organizowanej przez Spanish Optical Society (SEDOPTICA). Jak wspominałam wcześniej, współpracuję blisko z badaczami z kilku zagranicznych ośrodków, w których również prowadzone są badania widzenia dwufotonowego: UCI Center for Translational Vision Research z Irvine, USA; Wydział Okulistyki Szpitala Uniwersyteckiego w Heidelbergu, Laboratorio Optica Universidad Murcia, a ostatnio również z Institute of Optics CSIC w Madrycie. W Polsce najbliższą współpracuję

z Grupą Elektroniki Laserowej i Światłowodowej z Politechniki Wrocławskiej, z kliniką Oculomedica z Bydgoszczy oraz dr hab. Jackiem Pniewskim z Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego.

Badania widzenia dwufotonowego od samego początku miały aspekt translacyjny. Praca nad zastosowaniami klinicznymi widzenia dwufotonowego zaowocowała amerykańskim patentem, którego jestem współautorką [46]. Ostatnio pracuję nad opracowaniem okularów AR wykorzystujących widzenie dwufotonowe – aktualnie mamy złożoną i opublikowaną w 2024 europejską aplikację patentową chroniącą ten pomysł [47]. W ICTER realizujemy właśnie projekt Proof of Concept finansowany przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej, którego celem jest zbudowanie prototypu takich okularów. **Obydwa te patenty stanowią moje kolejne osiągnięcia, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2c ustawy o szkolnictwie wyższym.**

Ważnym dla mnie aspektem pracy naukowej jest tworzenie grupy młodszych ode mnie badaczy, którzy badając widzenie dwufotonowe rozwijają swój warsztat naukowy. Dwoje moich doktorantów już obroniło z wyróżnieniem swoje prace doktorskie: Agnieszka Zielińska (2023, Instytut Fizyki UMK) jest teraz na stażu podoktorskim w Heidelbergu, a Marcin Marzejon (2022, Wydział Elektroniki, Telekomunikacji i Informatyki Politechniki Gdańskiej) pracuje obecnie w nieco innej tematyce jako post-doc w ICTER. Obecnie opiekuję się kolejną dwójką doktorantów: Oliwia Kaczkoś jest uczestniczką Międzydziedzinowej Szkoły Doktorskiej Uniwersytetu Warszawskiego, a Mateusz Grochalski Akademii Copernicana UMK. W roku 2024 miałam też pod swoją opieką studentki odbywające płatne staże w moim laboratorium: wakacyjny staż Eleny Moreno z Complutense University of Madrid był finansowany w ramach programu letniego Toruń Student Summer Program in Exact Sciences UMK, a staż Magdaleny Smolis z Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego był finansowany przez program Rezonatory fundacji Candela. W sumie do tej pory pod moim kierunkiem powstało sześć prac magisterskich dotyczących widzenia dwufotonowego (trzy na fizyce technicznej UMK i trzy na optometrii na Wydziale Fizyki UW) oraz jedna inżynierska, dotycząca aspektów konstrukcyjnych układu.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

Pracę naukową rozpoczęłam jeszcze w czasie studiów magisterskich na kierunku fizyka techniczna na Politechnice Gdańskiej. Po odbyciu praktyk studenckich w Zakładzie Fotofizyki i Techniki Laserowej Instytutu Maszyn Przepływowych PAN rozpoczęłam tam badania do pracy magisterskiej, a następnie doktorskiej. Zajmowałam się zastosowaniem technik spektroskopowych wykorzystujących wiązki laserowe (LIBS, ang. *Laser Induced Breakdown Spectroscopy* oraz LIF, ang. *Laser Induced Fluorescence*) do badania obiektów zabytkowych, a w szczególności obiektów z papieru i pergaminu. Ten okres mojej pracy zaowocował dwoma grantami na moje badania (promotorskim i grantem Młody Badacz) oraz kilkoma publikacjami i kilkunastoma wystąpieniami konferencyjnymi umieszczonymi w załączonym wykazie - niektóre z nich są opublikowane pod moim panińskim nazwiskiem: Ochocińska. Szczególnie praca opublikowana w *Journal of Cultural Heritage* w 2003 roku była pierwszą, w której

pokazaliśmy użyteczność techniki LIBS do monitoringu laserowego oczyszczania papieru [48]. Praca ta nadal jest cytowana (ma Field Weight Citation Index wg Scopus = 7.23), co sprawia mi szczególną satysfakcję, gdyż jest to moja pierwsza publikacja: materiał do niej pochodził jeszcze z mojej pracy magisterskiej.

Po uzyskaniu stopnia doktora:

Od 2011 zaczęłam pracę naukową w Instytucie Fizyki UMK, w grupie prof. Macieja Wojtkowskiego, zmieniając również tematykę badawczą na prace nad rozwojem metod obrazowania siatkówki oka ludzkiego. W 2012 zaczęliśmy realizację grantu TEAM Fundacji na rzecz Nauki Polskiej „Novel optical techniques for enhanced structural, functional and dynamical imaging of anterior and posterior segments of the eye”, w którym pracowałam jako post-doc. Zbudowaliśmy wtedy układ skaningowego oftalmoskopu laserowego do obrazowania siatkówki w oparciu o naturalną fluorescencję lipofuscyn ocznych wzbudzaną laserem pracy ciągłej 488 nm [32]. W czasie pracy w tym projekcie zdobyłam kompetencje przydatne w moich późniejszych badaniach widzenia dwufotonowego: związane z projektowaniem i budową układów optycznych współpracujących z okiem ludzkim, jak również zapoznałam się z normami bezpieczeństwa ekspozycji oka na wiązki laserowe, co do tej pory leży w obszarze mojej ekspertyzy, którą dzielę się ze współpracującymi ze mną badaczami. Praca w zespole prof. Wojtkowskiego zaowocowała również kontaktami międzynarodowymi: konstruując i uruchamiając systemy optyczne do badania widzenia dwufotonowego odbyłam trzy dłuższe i sporo krótszych naukowych wizyt: na Case Western Reserve University w Cleveland, w Szpitalu Uniwersyteckim Uniwersytetu w Heidelbergu i w Laboratorium Optycznym na Uniwersytecie w Murcii. Z uwagi na sytuację rodzinną (mam troje dzieci urodzonych w latach 2004-2009) nie planowałam długich wyjazdów w tamtym czasie. Jednak uważam, że w szczególności współpraca z prof. Palczewskim, która trwa od 2013 roku, może być uznana za wykazywanie się istotną aktywnością naukową w uczelni zagranicznej: odwiedziłam jego laboratorium 9 razy (6 razy na CWRU w Cleveland i 3 razy na UCI w Irvine), zbudowałam i uruchomiłam system, który był tam wykorzystywany, jak również sprawowałam naukową opiekę nad Danielem Rumińskim, który jako młody post-doc pracował w Cleveland z tym układem, kiedy powstawała praca [H3].

Poza widzeniem dwufotonowym, uczestniczyłam w pracach badawczych dotyczących dwufotonowego obrazowania siatkówki, a ostatnio również optoretinografii, czyli rejestracji za pomocą OCT zmian długości optycznej w warstwie fotoreceptorów wywołanych pobudzeniem bodźcem widzialnym. Ta ostatnia technika jest rozwijana w ICTER i chciałabym ją zastosować również w przyszłości do badań widzenia dwufotonowego.

Rozwój widzenia dwufotonowego wymaga nakładów na badania – pozyskałam do tej pory trzy granty w tej tematyce. W latach 2017-2022 (grant przedłużony z powodu utrudnień wynikających z pandemii COVID-19) realizowałam w Instytucie Fizyki UMK projekt OPUS NCN „Widzenie dwufotonowe - mechanizm, charakterystyka i zastosowania”, dzięki któremu powstał układ w Toruniu, opracowałam metodologię badań psychofizycznych widzenia dwufotonowego i uzyskałam dużą część omówionych tutaj wyników. Powstało dzięki niemu 10 publikacji z listy JCR o sumarycznym IF równym 49.861 (6 z nich weszło do mojego cyklu habilitacyjnego) i zaprezentowano 20 wystąpień konferencyjnych na 17 konferencjach

międzynarodowych. Obecnie w centrum ICTER Instytutu Chemii Fizycznej PAN realizuję projekt Proof of Concept FNP „Wyświetlacz siatkówkowy oparty na widzeniu dwufotonowym dla potrzeb rozszerzonej rzeczywistości”. Otrzymałam również pozytywną decyzję o finansowaniu projektu OPUS NCN „Charakterystyka czułości czopków i pręcików na stymulację dwufotonową”, który zaplanowany jest na trzy lata i zacznie być realizowany w październiku 2025 w ICTER. Badania zaplanowane w tym granicie mają dostarczyć danych o czułości poszczególnych typów fotoreceptorów na widzenie dwufotonowe i stworzyć podstawy pod opracowanie jednostek fotometrycznych dla tego widzenia.

Podsumowując, dotychczas pracowałam w trzech różnych polskich instytucjach naukowych: Instytucie Maszyn Przepływowych PAN w Gdańsku, Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu oraz Instytucie Chemii Fizycznej PAN w Warszawie. Od wielu lat ściśle współpracuję również z zagraniczną grupą badawczą, która najpierw była zlokalizowana na Case Western Reserve University, Cleveland, a od 2018 r. jest z University of California Irvine.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Dydaktyczne umiejętności zaczęłam rozwijać przede wszystkim po zrobieniu doktoratu, kiedy przeprowadziłam się do rodzinnego Włocławka i zaczęłam pracować w Wydziale Zamiejscowym Wyższej Szkoły Informatyki w Łodzi we Włocławku. Prowadziłam wykłady i ćwiczenia z fizyki, metod akwizycji i opracowania danych doświadczalnych, probabilistyki oraz ćwiczenia z matematyki dyskretnej, algebry liniowej i analizy matematycznej. Pełniłam również funkcję koordynatora praktyk studenckich i byłam promotorem kilku prac inżynierskich. Przez dwa semestry prowadziłam również wykłady i ćwiczenia z fizyki w Państwowej Wyższej Szkole Zawodowej we Włocławku (obecnie Państwowa Akademia Nauk Stosowanych), kiedy został tam uruchomiony kierunek Informatyka Stosowana.

Po rozpoczęciu pracy na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika prowadziłam ćwiczenia z fizyki ogólnej, podstaw mechaniki, wprowadzenia do tomografii, pracownię komputerową LabVIEW, laboratoria z projektowania systemów optycznych (program OSLO) oraz laboratoria w I pracowni fizycznej, jak i pracownię projektów fizycznych. W latach 2016-2019 współprowadziłam wykład dla doktorantów „Nowoczesne techniki eksperymentalne”. Od 2020 roku zaczęłam sama prowadzić wykłady, głównie dla studentów fizyki technicznej II stopnia z: „Wprowadzenia do tomografii”, „Oka i instrumentów optycznych” oraz „Optyki laserowej”. Poza tematyką widzenia dwufotonowego na UMK byłam też promotorem dwóch innych prac magisterskich: dotyczących mikroskopii fluorescencyjnej oraz obrazowania oka.

Swój warsztat dydaktyczny rozwijałam również na dwóch mobilnościach Erasmus plus typu STA (ang. *Staff Mobility for Teaching*), w czasie których wygłosiłam po 9 godzin wykładów dla doktorantów z Center for Translational Vision Research, Gavin Herbert Eye Institute, University of California, Irvine dotyczących: dwufotonowej oftalmoskopii laserowej, bezpieczeństwa stosowania wiązek o krótkich impulsach do obrazowania oka oraz widzenia dwufotonowego i perymetrii dwufotonowej.

Od bieżącego roku akademickiego pełnię funkcję koordynatora kierunku Fizyka Techniczna na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UMK w Toruniu. Z

uwagi na zmniejszającą się ilość chętnych na ten kierunek, podjęłam się dodatkowych prac w komisji, której celem jest wprowadzenie zmian w programie mających na celu jego unowocześnienie i uatrakcyjnienie dla obecnych absolwentów szkół średnich.

Od wielu lat angażuję się w popularyzowanie nauki: już na studiach zorganizowaliśmy w naszym kole naukowym studentów fizyki pokaz ciekawych doświadczeń fizycznych, które sami wyszukaliśmy i opracowaliśmy. W czasie pracy we Włocławku współorganizowałam Festiwal Nauki i Przedsiębiorczości w 2010 i prowadziłam wykłady w ramach Uniwersytetu Małego Człowieka w latach 2009-2010. Uczestniczyłam również w Festiwalu Nauki i Sztuki w Toruniu w 2015 roku i w Dniach Otwartych Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UMK w latach 2021 i 2023. W latach 2016-2020 organizowałam zwiedzanie laboratoriów badawczych dla grup uczniów szkół średnich w Instytucie Fizyki UMK w ramach akcji „zawsze na fali”. W sumie w tych latach odwiedziło nasze laboratoria ponad 1600 uczniów. Po kilku latach tej akcji zauważyłam, że większość uczniów odniosłaby korzyść edukacyjną raczej z zajęć praktycznych, a zwiedzanie laboratoriów powinniśmy zostawić tylko dla kół naukowych i innych grup mocno zainteresowanych fizyką. Dlatego wraz z trojgiem kolegów, pracowników naszego wydziału, opracowaliśmy kilka ćwiczeń z pracowni fizycznej w taki sposób, żeby trzy z nich mogły być wykonane przez uczniów w czasie 1.5-godzinnej wizyty. Zaangażowaliśmy kilkoro doktorantów i innych pracowników, i od 2023 ruszyło Eksperymentarium. Te zajęcia cieszą się bardzo dużym zainteresowaniem – w ciągu dwóch pierwszych lat odwiedziło nas około 500 uczniów. Ćwiczenia w większości odpowiadają podstawie programowej dla zakresu rozszerzonego z fizyki dla szkół średnich, a uczniowie mogą samodzielnie je wykonać po krótkim wprowadzeniu przez opiekuna ćwiczenia.

Oprócz powyższych działań, nakierowanych bardziej na ogólną edukację fizyczną, staram się popularyzować również widzenie dwufotonowe. W tym roku (29 kwietnia 2025) wygłosiłam na zaproszenie wykład na obozie Krajowego Funduszu Zdolni (dawniej: Krajowy Fundusz na Rzecz Dzieci) dla uzdolnionej młodzieży pt. „Granice ludzkiego wzroku”, który cieszył się dużym zainteresowaniem. Udzieliłam też trzech wywiadów o moich badaniach w mediach ogólnopolskich:

- Audycja w Radiu Tok FM „Czy człowiek może widzieć podczerwień” wyemitowana 24.03.2018:
<https://audycje.tokfm.pl/podcast/60546,Czlowiek-moze-widziec-spodczewien>
- Wywiad o widzeniu dwufotonowym na kanale Ciekawizja red. Wiktora Niedzickiego, którego udzieliłam w 2021 roku:
<https://www.youtube.com/watch?v=tDCT-n7sSnE>
- Audycja Wieczór Odkrywców – Ludzie Nauki w Programie I Polskiego Radia w paśmie „Eureka” poprowadzona przez red. Krzysztofa Michalskiego 24.08.2024:
<https://jedynka.polskieradio.pl/artykul/3418139,Okulary-rozszerzonej-rzeczywisto%C5%9Bci-a-widzenie-dwufotonowe-w-podczewieni>

Po publikacji naszej ostatniej pracy [H9], ukazał się też, na podstawie wywiadu ze mną, artykuł w czasopiśmie popularnonaukowym towarzystwa Optica „Optics and Photonics news” o wynikach z tej publikacji: „Measuring Two-photon vision”: https://www.optica-opn.org/home/newsroom/2024/november/measuring_two-photon_vision/

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Czuję się w obowiązku wyjaśnić dłuższy niż przeciętnie w naukach fizycznych okres czasu między moim doktoratem (2007), a wnioskiem o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego. Z uwagi na sytuację osobistą i rodzinną przez pierwsze 4 lata po doktoracie nie byłam aktywna naukowo: zmieniłam miejsce zamieszkania (przeprowadziłam się z Gdańska do rodzinnego Włocławka) i skupiłam się przede wszystkim na obowiązkach matki małych dzieci: mam troje dzieci urodzonych w latach 2004, 2007 i 2009. Kiedy podjęłam pracę na UMK w grupie prof. Wojtkowskiego w 2011 roku, zmieniłam również zupełnie tematykę badawczą: do tej pory zajmowałam się spektroskopią laserową do diagnostyki obiektów zabytkowych. Trudno byłoby zdefiniować jedno osiągnięcie, które obejmuje tak różne obszary wiedzy, więc zaczęłam gromadzić dorobek od nowa. Nasza pierwsza praca z Torunia, która dotyczy skaningowego oftalmoskopu laserowego opartego o autofluorescencję, ukazała się w roku 2013 i to od niej należałoby liczyć moment mojego powrotu do nauki [32]. Niedługo później zaczęliśmy badać widzenie dwufotonowe. W projekcie TEAM FNP, który wtedy realizowaliśmy, pełniłam rolę pośrednią między studentami/doktorantami a szefem grupy. Pracując jako post-doc w dużym zespole najczęściej nie byłam ani pierwszym, ani ostatnim autorem publikacji, nawet jeżeli byłam odpowiedzialna za realizację projektu i opiekę naukową nad mniej doświadczonymi członkami zespołu. Dobrym przykładem jest tu praca [H1], w przypadku której mój wkład był znaczący, ale zabrakło dla mnie miejsca w gronie pierwszych autorów. Od roku 2016 pracuję w dwóch różnych miastach, a mieszkam w trzecim, co również negatywnie wpływa na moją efektywność, bo sporo czasu spędzam w podróży. Na przykład w latach 2016-2019 budowałam dwa układy do badania widzenia dwufotonowego w Polsce: jeden w Toruniu, z doktorantką Agnieszką Zielińską, a drugi w Bałtyckim Instytucie Technologicznym w Gdyni, z doktorantem Marcinem Marzejonem. Równolegle budowałam wtedy też dwa prototypy mikroperymetrów dwufotonowych: dla Case Western Reserve University w Cleveland i dla Szpitala Uniwersyteckiego w Heidelbergu. System z Gdyni jest od 2020 roku w Warszawie, a ja od 2020 pracuję na UMK w Toruniu i w ICTER w Warszawie. Pomimo życia w rozjazdach, stopniowo wypracowałam sobie pozycję lidera niewielkiej grupy zajmującej się widzeniem dwufotonowym. Trochę pomogła w tym pandemia i regularne wspólne seminaria on-line, które wówczas rozpoczęłam dla wszystkich moich studentów i doktorantów: z Torunia i z Warszawy. Dlatego poczynając od prac [H5] i [H6] opublikowanych w roku 2021 jestem już na pozycji autora korespondencyjnego. Dopiero gdy udało się zgromadzić kilka takich prac ([H5, H6, H8, H9]) uznałam, że moja wiodąca rola jako lidera badań widzenia dwufotonowego jest wystarczająco udokumentowana. Chciałam też, żeby mój cykl publikacji stanowił domknietą całość. Dlatego gdy pojawiła się możliwość opublikowania podsumowania dotychczasowego stanu wiedzy o widzeniu dwufotonowym w znanym w dziedzinie nauk o widzeniu czasopiśmie *Vision Research*, skorzystałam z niej i powstała praca [H10]. Dopiero w tym momencie uznałam, że mam wystarczająco mocne podstawy, żeby ubiegać się o stopień doktora habilitowanego.

Bibliografia

1. M. Göppert-Mayer, "Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen," *Ann. Phys.* **401**(3), 273–294 (1931).
2. W. Kaiser and C. G. B. Garrett, "Two-photon excitation in CaF₂: Eu²⁺," *Phys. Rev. Lett.* **7**(6), 229–231 (1961).
3. C. Xu and W. W. Webb, "Multiphoton excitation of molecular fluorophores and nonlinear laser microscopy," in *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Volume 5: Nonlinear and Two-Photon-Induced Fluorescence*

- (Springer, 2002), pp. 471–540.
4. W. R. Zipfel, R. M. Williams, and W. W. Webb, "Nonlinear magic: Multiphoton microscopy in the biosciences," *Nat. Biotechnol.* **21**(11), 1369–1377 (2003).
 5. R. R. Birge, J. A. Bennett, L. M. Hubbard, B. M. Pierce, H. L. Fang, G. E. Leroi, and D. S. Kliger, "Two-Photon Spectroscopy of all-trans-Retinal. Nature of the Low-Lying Singlet States," *J. Am. Chem. Soc.* **104**(9), 2519–2525 (1982).
 6. R. R. Birge, "Two-Photon Spectroscopy of Protein-Bound Chromophores," *Acc. Chem. Res.* **19**(5), 138–146 (1986).
 7. P. Davidovits and M. D. Egger, "Scanning laser microscope," *Nature* **223**(5208), 831 (1969).
 8. P. Davidovits and M. D. Egger, "Scanning Laser Microscope for Biological Investigations," *Appl. Opt.* **10**(7), 1615 (1971).
 9. C. J. R. Sheppard, "Scanning optical microscope," *IEE Rev.* **26**(2), 166–172 (1980).
 10. W. Denk, J. Strickler, and W. Webb, "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy," *Science* **248**(4951), 73–76 (1990).
 11. C. Xu and W. W. Webb, "Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm," *J. Opt. Soc. Am. B* **13**(3), 481 (1996).
 12. W. Denk, D. W. Piston, and W. W. Webb, "Multi-photon molecular excitation in laser-scanning microscopy," in *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (Springer, 2006), pp. 535–549.
 13. K. Komar, A. Zielinska, P. Ciacka, D. Ruminski, M. Szkulmowski, and M. Wojtkowski, "Effect of stimulating beam diameter on two-photon visual thresholds," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **63**(7), 2233 – F0441 (2022).
 14. M. Kaschke, K.-H. Donnerhacke, and M. S. Rill, "Optics of the Human Eye," in *Optical Devices in Ophthalmology and Optometry* (Wiley Online Library, 2014), pp. 15–48.
 15. W. J. Donnelly and A. Roorda, "Optimal pupil size in the human eye for axial resolution," *J. Opt. Soc. Am. A* **20**(11), 2010 (2003).
 16. D. H. Kelly, "Visual Responses to Time-Dependent Stimuli.* I. Amplitude Sensitivity Measurementst," *J. Opt. Soc. Am.* **51**(4), 422–429 (1961).
 17. S. A. Burns and R. H. Webb, "Optical generation of the visual stimulus," *Handb. Opt.* New York McGraw Hill **28**(2), (1994).
 18. F. C. Delori, R. H. Webb, and D. H. Sliney, "Maximum permissible exposures for ocular safety (ANSI 2000), with emphasis on ophthalmic devices," *J. Opt. Soc. Am. A* **24**(5), 1250–1265 (2007).
 19. M. T. H. Do and K.-W. Yau, "Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells," *Physiol Rev.* **90**(4), 1547–1581 (2010).
 20. A. Stockman and L. T. Sharpe, "The spectral sensitivities of the middle- and long-wavelength-sensitive cones derived from measurements in observers of known genotype," *Vision Res.* **40**(13), 1711–1737 (2000).
 21. C. F. Goodeve, "Relative Luminosity in the Extreme Red," *Proc. R. Soc. London. Ser. A-Mathematical Phys. Sci.* **155**(886), 664–683 (1936).
 22. N. I. Pinegin, "The cone sensitivity of the eye in the region from $\lambda = 302 \mu$ to 950μ ," *Probl. Physiol. Opt.* **64**, 11–16 (1947).
 23. E. Lau and W. Leo, "Ueber die Augenempfindlichkeit an der ultraroten Grenze [About the sensitivity to the eyes on the ultra red border]," *Ann Phys.* **2**(5–6), 242–255 (1948).
 24. D. R. Griffin, R. Hubbard, and G. Wald, "The sensitivity of the human eye to infra-red radiation.," *J. Opt. Soc. Am.* **37**(7), 546–554 (1947).
 25. P. L. Walraven and H. J. Leebeek, "Foveal sensitivity of the human eye in the near infrared.," *J. Opt. Soc. Am.* **53**(June), 765–766 (1963).
 26. L. Vasilenko, V. Chebotaev, and Y. Troitskii, "Visual Observation of Infrared Laser Emission," *Sov. J. Exp. Theor. Phys.* **21**, 513 (1965).
 27. D. H. Sliney, R. T. Wangemann, J. K. Franks, and M. L. Wolbarsht, "Visual Sensitivity of the Eye To Infrared Laser Radiation.," *J Opt Soc Am* **66**(4), 339–341 (1976).
 28. A. M. Mckendrick and C. A. Johnson, *37 - Temporal Properties of Vision*, Eleventh E (Elsevier Inc., 2018).
 29. V. G. Dmitriev, V. N. Emel'yanov, M. A. Kashintsev, V. V. Kulikov, A. A. Solov'ev, M. F. Stel'makh, and O. B. Cherednichenko, "Nonlinear perception of infrared radiation in the 800–1355 nm range with human eye," *Sov. J. Quantum Electron.* **9**(4), 475–479 (1979).
 30. Q. Zaidi and J. Pokorny, "Appearance of pulsed infrared light: second harmonic generation in the eye," *Appl. Opt.* **27**(6), 1064–8 (1988).
 31. S. Fine and W. P. Hansen, "Optical Second Harmonic Generation in Biological Systems," *Appl. Opt.* **10**(10), 2350 (1971).
 32. K. Komar, P. Stremplewski, M. Motoczyńska, M. Szkulmowski, and M. Wojtkowski, "Multimodal instrument for high-sensitivity autofluorescence and spectral optical coherence tomography of the human eye fundus," *Biomed. Opt. Express* **4**(11), 2683 (2013).

33. R. W. Rodieck, *The First Steps in Seeing*. (Sinauer Associates, 1998).
34. A. J. Jackson and I. L. Bailey, *Visual Acuity*, Eleventh E (Elsevier Inc., 2004), 5.
35. M. M. Bartuzel, A. Consejo, P. Stremplewski, M. Sylwestrzak, M. Szkulmowski, and I. Gorczynska, "In vivo identification of the retinal layer containing photopigments in OCT images through correlation with two-photon psychophysics," *Sci. Rep.* **14**(1), 1–16 (2024).
36. H. K. Doyle, S. R. Herbeck, A. E. Boehm, J. E. Vanston, R. Ng, W. S. Tuten, and A. Roorda, "Boosting 2-photon vision with adaptive optics," *J. Vis.* **23**(12), 4 (2023).
37. S. N. Markowitz and S. V. Reyes, "Microperimetry and clinical practice: an evidence-based review," *Can. J. Ophthalmol. Can. d'Ophthalmologie* **48**(5), 350–357 (2013).
38. M. Crossland, M.-L. Jackson, and W. H. Seiple, "Microperimetry: a review of fundus related perimetry," *Optom. Reports* **2**(1), 2 (2012).
39. F. A. A. Kingdom and N. Prins, "Psychometric Functions," in *Psychophysics: A Practical Introduction* (Academic Press, 2016), pp. 55–117.
40. J. M. Bland and D. G. Altman, "Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement," *Lancet* **1**(8476), 307–310 (1986).
41. T. D. Lamb and E. N. Pugh Jr., "Dark adaptation and the retinoid cycle of vision," *Prog. Retin. Eye Res.* **23**(3), 307–380 (2004).
42. H. Davson, *Physiology of the Eye*, Fifth Edit (The Macmillan Press LTD, 1990).
43. C. Owsley, G. McGwin, M. E. Clark, G. R. Jackson, M. A. Callahan, L. B. Kline, C. D. Witherspoon, and C. A. Curcio, "Delayed Rod-Mediated Dark Adaptation Is a Functional Biomarker for Incident Early Age-Related Macular Degeneration," *Ophthalmology* **123**(2), 344–351 (2016).
44. D. M. Berson, F. A. Dunn, and M. Takao, "Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock," *Science* **295**(5557), 1070–1073 (2002).
45. R. W. Nygaard and R. A. Schuchard, "SLO radiant power and brightness," *J. Rehabil. Res. Dev.* **38**(1), 123–128 (2001).
46. G. Palczewska, K. Komar, P. Stremplewski, and M. Wojtkowski, "Systems and methods of infrared psychophysical measurement," U.S. patent US 10856734 (2020).
47. K. Komar, M. Marzejon, and M. Wojtkowski, "Augmented reality glasses based on two-photon vision," U.S. patent EP4339663A1 (2024).
48. K. Ochocińska, A. Kamińska, and G. Śliwiński, "Experimental investigations of stained paper documents cleaned by the Nd:YAG laser pulses," *J. Cult. Herit.* **4**, 188–193 (2003).

.....
(podpis wnioskodawcy)