

Warszawa, 25.08.2023 r.

dr hab. Piotr Fita, prof. UW
Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego
ul. Pasteura 5
02-093 Warszawa
tel. (22) 55 32 733
email: fita@fuw.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Stanisława Nizińskiego pod tytułem
Exploring the photoresponse of Orange Carotenoid Protein:
a subpicosecond to minute time-resolved absorption studies

Recenzowana rozprawa doktorska została napisana przez mgr. Stanisława Nizińskiego na podstawie badań przeprowadzonych we współpracy międzynarodowej realizowanej przez zespół z Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu oraz kilka zespołów z Francji i Niemiec. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. Gotard Burdziński z Uniwersytetu Adama Mickiewicza, a promotorem pomocniczym dr Michel Sliwa, z Uniwersytetu w Lille, dyrektor naukowy CNRS. Rozprawa ma postać zbioru czterech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, poprzedzonych bardzo obszernym, liczącym niemal 100 stron wprowadzeniem.

Wprowadzenie rozpoczyna się krótkim rozdziałem wstępnym, w którym Autor przedstawia tematykę rozprawy i formułuje jej cele. Rozprawa poświęcona jest badaniom mechanizmu działania kompleksu karotenoidowo-białkowego (oznaczanego w pracy akronimem OCP od angielskiej nazwy *orange carotenoid protein*), który pełni funkcję fotoprotekcyjną w sinicach i cechuje się tym, że aktywną formę przyjmuje dopiero w warunkach nadmiernego oświetlenia. Celem badań prowadzonych przez Autora było opisanie mechanizmu fotokonwersji OCP, identyfikacja form pośrednich powstających w trakcie tworzenia się formy fotoaktywnej oraz wyjaśnienie, co ogranicza wydajność kwantową tworzenia tych form i formy fotoaktywnej.

W rozdziale 2 wprowadzenia Autor opisuje metodologię pomiarów spektroskopowych, które wykorzystywał w badaniach. Opis ten jest precyzyjny, a zarazem przystępny, nie epatuje nadmiarem szczegółów technicznych, a jednocześnie zawiera wszystkie istotne informacje. Wykorzystane techniki pomiarowe obejmowały:

1. Pomiary widm absorpcji przejściowej z femtosekundową rozdzielczością czasową i próbkowaniem obejmującym szeroki zakres spektralny od bliskiego nadfioletu do bliskiej podczerwieni.
2. Pomiary kinetyk absorpcji przejściowej przy wzbudzeniu nanosekundowym impulsem laserowym, w długim oknie czasowym sięgającym do 1 s, co wymagało zastosowania kilku konfiguracji układu eksperymentalnego. Dzięki wykorzystaniu aktynometrii porównawczej z wykorzystaniem związku referencyjnego pomiary te umożliwiły ilościowe wyznaczenie wydajności tworzenia fotoproduktu.
3. Pomiary absorpcji stacjonarnej z jednoczesnym naświetlaniem kuwety z badanym roztworem, co umożliwiło śledzenie tworzenia i zaniku długożyjących fotoproduktów w skali sekund i minut. Aby uzyskać ilościowe dane o wydajności tworzenia fotoproduktów aktynometrycznie wyznaczono liczbę fotonów docierających do kuwety pomiarowej ze źródła naświetlającego.

Na uznanie zasługuje jakość i estetyka zamieszczonych w tym rozdziale schematów układów pomiarowych. Podkreślić warto też fakt, że Autor bardzo szczegółowo, posługując się przykładami, przedstawił złożone zagadnienie analizy danych uzyskiwanych w wyniku czasowo-rozdzielczych pomiarów spektroskopowych. W mojej ocenie rozdział 2 świadczy o dojrzałości Autora jako badacza posługującego się metodami doświadczalnymi. Na podstawie odnośników literaturowych, do których Autor odwołuje się w tym rozdziale wnioskuję także, że jest on współtwórcą napisanych w języku

Python programów do analizy widm absorpcji przejściowej oraz kinetyki absorpcji zarejestrowanych w trakcie naświetlania próbek.

Jak wynika z rozdziału 2 rozprawy, w badaniach wykorzystano kilka zaawansowanych technik pomiarowych, by uzyskać dane spektroskopowe i kinetyczne dotyczące fotokonwersji OCP. Eksperymenty były starannie przemyślane, a układy pomiarowe scharakteryzowane tak, by w jak największym stopniu uzyskiwać informacje ilościowe. Uzyskane dane były poddane złożonej analizie, do której wykorzystano specjalnie w tym celu napisane oprogramowanie. Niewątpliwie przeprowadzone badania były bardzo wymagające od strony eksperymentalnej, również ze względu na konieczność pracy z nietrwałym materiałem biologicznym. Zarówno zakres przeprowadzonych doświadczeń, jak i ich opis świadczą o tym, że Autor posiada już duże umiejętności i doświadczenie w zakresie czasowo-rozdzielczych technik spektroskopowych.

W rozdziale 3 Autor opisuje fotofizykę karotenoidów, zaczynając od wprowadzenia prostego modelu polienów w postaci studni potencjału, który dzięki wykorzystaniu teorii grup do opisu symetrii cząsteczki pozwala wyjaśnić jakościowo podstawowe własności fotofizyczne polienów i karotenoidów. Autor prowadzi w tej części wnikliwą dyskusję, nie przemilczając kłopotliwego faktu, że wnioski oparte na wysokiej symetrii polienów, takie jak wzbroniony charakter przejścia $S_0 \rightarrow S_1$ pozostają słuszne dla karotenoidów, mimo ich niższej symetrii. W dalszej części rozdziału 3 Autor omawia strukturę elektronową karotenoidów, zwracając szczególną uwagę na pośrednie stany energetyczne występujące na ścieżce relaksacji elektronowo wzbudzonych karotenoidów, których istnienie było postulowane w literaturze, by wyjaśnić rezultaty wcześniejszych badań prowadzonych za pomocą spektroskopii absorpcji przejściowej (stan z przeniesieniem ładunku – ICT, stan oznaczany w literaturze jako S^*). W tej części rozdziału 3 Autor dokonuje starannego i bardzo obszernego przeglądu literatury, przedstawiając pojawiające się w niej różne, często sprzeczne ze sobą interpretacje. Na pochwałę zasługuje krytyczne i analityczne podejście Autora do opublikowanych dotychczas wyników. Rozdział 3 kończy się omówieniem własności stanów trypletowych i kationowych rodników karotenoidów, które również mają znaczenie z punktu widzenia protekcyjnej funkcji OCP.

W rozdziale 4 Autor przedstawia strukturę i własności OCP, omawiając strukturę kompleksu w formie OCP^O i OCP^R , jego funkcję biologiczną z uwzględnieniem fotokonwersji i konformacji karotenoidu w obu formach i współistnienie dwóch form OCP^O w stanie podstawowym. Na tle wcześniejszych rozdziałów ten rozdział wydaje się być nieco gorzej uporządkowany i mniej spójny. Np. w rozdziale 4.1 Autor posługuje się pojęciem RCP (*red carotenoid protein*), nie wyjaśniając dobrze, czym jest RCP, a wyjaśnienie to pojawia się dopiero w rozdziale 4.4. Z kolei na stronach 77/78 Autor dyskutuje kwestię niehomogeniczności populacji OCP^O w stanie podstawowym. Najpierw przedstawia argumenty przemawiające za tym, że to różnice w lokalizacji wiązań wodorowych między karotenoidem i białkiem, a nie struktura karotenoidu odpowiadają za heterogeniczność. Następnie pokazuje dwie struktury cząsteczki różniące się orientacją pierścienia z grupą karbonylową i twierdzi, że to one odpowiadają dwóm populacjom OCP w stanie podstawowym. Ta rozbieżność została pozostawiona bez komentarza. Pomimo pewnych niejasności pojawiających się w tym rozdziale stanowi on obszerne i wartościowe wprowadzenie do zagadnień związanych z biologiczną aktywnością OCP.

W rozdziale 5 Autor syntetycznie przedstawia wynikający z literatury opis procesów zachodzących po wzbudzeniu optycznym OCP prowadzących do konwersji formy OCP^O w OCP^R . Bardzo podoba mi się struktura tego rozdziału, w której wyraźnie wyróżnione zostały wszystkie pośrednie stany elektronowe karotenoidu oraz formy białka, które pojawiają się na ścieżce reakcji. Te stany i formy zostały częściowo przedstawione we wcześniejszych rozdziałach, jednak ze względu na ich mnogość zebranie ich krótkiej charakterystyki i zwięzły opis kolejnych transformacji jest dużym ułatwieniem dla czytelnika.

Rozdział 1 oraz rozdziały 3-5, liczące łącznie blisko 50 stron, stanowią niemal podręcznikowe wprowadzenie do spektroskopowych badań OCP oraz obszerny przegląd literatury tego tematu. Być może warto, by Autor wraz z Promotorami rozważyli opublikowanie tych rozdziałów jako artykułu przeglądowego, bo w mojej ocenie szkoda, by grono czytelników ograniczało się do recenzentów rozprawy. Treść i forma tych rozdziałów nie pozostawiają żadnych wątpliwości, że Autor doskonale opanował wiedzę teoretyczną w zakresie tematyki rozprawy.

Na 6 rozdział części wprowadzającej składają się streszczenia wchodzących w skład rozprawy publikacji, ze szczególnym uwzględnieniem prac wykonanych osobiście przez Autora i precyzujące jego własny wkład w powstanie tych publikacji. Biorąc pod uwagę, że rozprawa stanowi zbiór publikacji wieloautorskich treść tego rozdziału pozwala właściwie ocenić wkład Autora w prace badawcze, których wynikiem jest recenzowana rozprawa doktorska.

W rozdziale 7 wprowadzenia Autor podsumowuje najważniejsze wnioski wynikające z przeprowadzonych badań i trafnie komentuje je, stawiając również ważne pytania wciąż pozostające bez odpowiedzi i wymagające dalszych badań. Ten krótki rozdział również potwierdza, że Autor ma bardzo dobrą znajomość obszaru badań, którego dotyczy rozprawa i wykazuje się dobrym zrozumieniem uzyskanych wyników.

Głównym elementem badań opublikowanych w pierwszym z wchodzących w skład rozprawy artykułów, „*Unifying perspective of the ultrafast photodynamics of orange carotenoid proteins from Synechocystis: Peril of high-power excitation, existence of different S^* states, and influence of tagging*” są pomiary absorpcji przejściowej OCP w zakresie widzialnym i bliskiej podczerwieni oraz badania fotokonwersji OCP przy stałym oświetleniu. Autorzy zauważają, że w pomiarach czasowo-rozdzielczych, gdzie stosuje się impulsy femtosekundowe po wzbudzeniu mogą zachodzić procesy wielofotonowe, które prowadzą do pobocznych produktów, nie pojawiających się w naturalnych warunkach, dlatego wskazują na konieczność wykonania pomiarów dla różnych mocy impulsów wzbudzających. Pomiary widm absorpcji przejściowej zostały ponadto wykonane przy dwóch długościach fali stosowanych we wcześniejszych eksperymentach innych grup badawczych i dla dwóch wariantów znakowania białka. Widma absorpcji przejściowej mają bardzo dobry stosunek sygnału do szumu i są dobrze opisane, zwięzłe i przejrzyste. Analiza wyników jest przeprowadzona starannie i nie budzi wątpliwości, założenia są wyraźnie opisane. Uzyskano istotne rezultaty, wskazujące m. in. na to, że wbrew niektórym wcześniejszym hipotezom, pierwszy fotoprodukt P_1 powstaje wprost ze stanu wzbudzonego S_1 karotenoidu, a nie ze stanu oznaczanego w literaturze przez S^* . Stwierdzono również, że proces różnicujący wydajność fotokonwersji różnych wariantów OCP zachodzi w dłuższych skalach czasowych, po relaksacji elektronowych stanów wzbudzonych.

Drobnym błędem redakcyjnym w artykule jest to, że na stronie 1090 artykułu niewłaściwie zapisane są wyniki z niepewnościami – nie zgadza się liczba miejsc dziesiętnych w wyniku i jego niepewności.

Zgodnie z deklaracją Autora jego wkład w powstanie tej publikacji polegał na wykonaniu wstępnych doświadczeń, pomiarów absorpcji przejściowej i pomiarów przy stałym natężeniu oświetlenia, oraz przeanalizowaniu wyników i napisaniu wstępnej wersji manuskryptu. Nie ulega więc wątpliwości, że Autor rozprawy miał wiodący wkład w powstanie tej publikacji.

W drugiej publikacji wchodzącej w skład rozprawy, „*Structure-function-dynamics relationships in the peculiar Planktothrix PCC7805 OCP1: Impact of his-tagging and carotenoid type*”, opisano bardzo obszerne badania OCP pochodzących z dwóch różnych szczepów sinic, znakowanych i nieznakowanych, sfunkcjonalizowanych dwoma różnymi karotenoidami. Poza stacjonarnymi oraz czasowo-rozdzielczymi pomiarami spektroskopowymi (z rozdzielczością femtosekundową w oknie czasowym do nanosekundy i z rozdzielczością nanosekundową w oknie czasowym do sekundy)

przeprowadzono krystalizację białek i wyznaczono ich strukturę. Pomiary spektroskopowe umożliwiły weryfikację wpływu znakowania i pochodzenia OCP na kinetykę fotokonwersji oraz potwierdziły postawioną w pierwszej publikacji hipotezę, że różnice w wydajności fotokonwersji obserwowane dla różnych wariantów OCP są spowodowane procesami zachodzącymi już po dezaktywacji elektronowych stanów wzbudzonych. Połączenie badań spektroskopowych i strukturalnych pozwoliło na znalezienie powiązań pomiędzy strukturą białka i rodzajem karotenoidu a dynamiką procesów prowadzących do fotokonwersji OCP. Jest to oryginalny i ważny wkład do wiedzy o mechanizmie funkcjonowania OCP, który niewątpliwie był trudny do osiągnięcia.

Publikacja w około połowie zawiera wyniki uzyskane za pomocą badań strukturalnych, a w połowie – spektroskopowych. Autor rozprawy był odpowiedzialny za te drugie i mimo że nie jest pierwszym autorem artykułu wniósł bardzo duży wkład w jego powstanie. Czasowo-rozdzielcze pomiary spektroskopowe, które opisano w artykule musiały być trudne do wykonania, a ich wyniki trudne do analizy i interpretacji. Autor bardzo dobrze podołał obu zadaniom. Zaprezentowane widma mają bardzo dobrą jakość, a ich analiza wydaje się być w pełni poprawna.

W dwóch pierwszych artykułach moje wątpliwości budzi terminologia związana z analizą globalną widm absorpcji przejściowej i bezpośrednio przypisywanie widm związanych z zanikiem (DAS od ang. *decay associated spectra*) do konkretnych stanów, np. na stronie 1090 pierwszego artykułu i w dalszej dyskusji wyników, a także w drugiej publikacji. DAS, jak sama nazwa wskazuje, są związane z zanikiem i jeśli pewne widmo DAS odpowiada charakterystycznemu czasowi przejścia pomiędzy stanami np. A i B, A->B, to jest kombinacją widm form A i B z przeciwnymi znakami. Aby uzyskać widma przypisane konkretnym stanom na podstawie DAS oblicza się widma związane z konkretnym stanem lub formą cząsteczki, zazwyczaj oznaczane jako SAS od ang. terminu *species associated spectra*. Ta nieścisłość jest tym bardziej zastanawiająca, że w rozdziale 2 wprowadzenia do rozprawy Autor poprawnie i bardzo szczegółowo opisuje analizę wyników pomiarów widm absorpcji przejściowej, dużo miejsca poświęcając zagadnieniu wyznaczenia SAS na podstawie DAS. Moim zdaniem stosowanie terminologii, zgodnie z którą to DAS są przypisywane poszczególnym stanom w przypadku badanego białka powinno zostać odpowiednio skomentowane i uzasadnione.

Trzecia z wchodzących w skład rozprawy publikacji, „*Oligomerization processes limit photoactivation and recovery of the orange carotenoid protein*”, podobnie jak druga, przedstawia bardzo obszerne wyniki skomplikowanych badań spektroskopowych i strukturalnych, przy czym w tym wypadku badania strukturalne również były czasowo-rozdzielcze. Połączenie i wspólna interpretacja wyników uzyskanych za pomocą obu technik dostarczyło wielu nowych informacji na temat fotoaktywności OCP. W szczególności stwierdzono, że procesy prowadzące do utworzenia fotoaktywnej formy OCP^R są jeszcze bardziej skomplikowane niż wskazywały na to wcześniejsze doświadczenia i biorą w nich udział również dimery i wyższe oligomery OCP. Bardzo istotne jest odkrycie, że po absorpcji jednego fotonu dimery tworzą formę pozostającą w stanie ciemnym przez co najmniej 0,5 μs. Tymczasem utworzenie fotoaktywnej formy OCP^R wymaga wzbudzenia obu cząsteczek w dimerze. Wskutek tego ciąg procesów następujących po wzbudzeniu krótkim, femto- lub nanosekundowym, impulsem światła jest inny niż w przypadku naświetlania próbki OCP światłem o stałym natężeniu i nie prowadzi do utworzenia formy fotoaktywnej. Ma to kluczowe znaczenie dla interpretacji wyników pomiarów uzyskanych techniką pompa-sonda i oznacza, że forma, obserwowana w pomiarach czasowo-rozdzielczych dla długich czasów po wzbudzeniu nie jest formą OCP^R.

Dzięki połączeniu badań strukturalnych i spektroskopowych Autorzy byli w stanie zaproponować dość szczegółowe schematy procesów następujących w warunkach ciągłego i impulsowego wzbudzenia OCP, uwzględniające zmiany w strukturze białka i oddziaływania między karotenoidem i białkiem. Uważam, że jest to bardzo duży sukces, odniesiony dzięki interdyscyplinarnym badaniom i wyrafinowanym eksperymentom. Również w tej pracy Autor rozprawy był odpowiedzialny za przeprowadzenie czasowo-rozdzielczych badań spektroskopowych. W

tym przypadku były to pomiary z rozdzielczością nanosekundową, w oknie czasowym od 50 ns do 1 s. Ze względu na to, że część doświadczeń została wykonana przy bardzo dużych stężeniach OCP, Autor musiał zmodyfikować układ w taki sposób, by przeprowadzić pomiary w bardzo cienkich kuwetach, co było możliwe tylko przy niemal współliniowej geometrii wiązek pompujących i sondujących. Niewątpliwie bez pomiarów wykonanych przez Autora rozprawy nie byłoby możliwe zaproponowanie tak szczegółowych schematów procesów zachodzących w OCP po wzbudzeniu optycznym, zaś wykonanie tych pomiarów było zadaniem trudnym i wymagającym dużych umiejętności doświadczalnych.

Po lekturze trzeciej publikacji nasuwa mi się jedno pytanie. W pierwszym artykule Autorzy sugerują, że forma pośrednia P_1 , wbrew wcześniejszym doniesieniom, powstaje ze stanu S_1 , nie ze stanu S^* . W trzeciej publikacji Autorzy wracają do bardziej tradycyjnej wersji, że to stan S^* jest prekursorem stanu P_1 . Co jest powodem tej zmiany interpretacji?

Opisana w trzeciej publikacji obserwacja, że dwa następujące po sobie akty absorpcji fotonu przez ten sam dimer OCP są niezbędne do konwersji $OCP^O \rightarrow OCP^R$ stała się motywacją badań przedstawionych w czwartej publikacji wchodzącej w skład rozprawy, „*Is orange carotenoid protein photoactivation a single-photon proces?*”. W pracy tej wyznaczono wydajność fotokonwersji dla różnych natężeń światła przy oświetleniu ciągłym oraz wykonano bardzo ciekawe pomiary kinetyki absorpcji przejściowej OCP w oknie czasowym do 1 sekundy, w warunkach, gdy próbka była jednocześnie wzbudzana światłem o stałym natężeniu. Pomiary stacjonarne pokazały, że dla OCP znakowanej histydyną na końcu C rzeczywiście tylko procesy dwufotonowe prowadzą do powstania formy OCP^R , podczas gdy dla OCP znakowanej na końcu N zarówno absorpcja jednego jak i dwóch fotonów prowadzi do fotokonwersji do formy biologicznie aktywnej. Wnioski te zostały potwierdzone przez pomiary czasowo-rozdzielcze. Wykonane doświadczenia przekonująco dowodzą, że po absorpcji jednego fotonu przez znakowaną histydyną OCP powstaje forma o czasie życia rzędu dziesiątek lub setek milisekund, która dopiero po absorpcji kolejnego fotonu staje się formą biologicznie aktywną. Rodzi się tutaj jednak pytanie o możliwość wykonania analogicznych doświadczeń dla nieznakowanej, występującej w przyrodzie OCP, bo duże różnice widoczne pomiędzy OCP znakowaną na końcach C i N wskazują na istotny wpływ znakowania.

W publikacji bez komentarza pozostawiono bardzo zastanawiający wynik – silną zależność kinetyki powrotu OCP z formy OCP^R do formy OCP^O od natężenia światła wzbudzającego (tabela S1). Czy istnieje jakaś hipoteza wyjaśniająca tę zależność? Podane w tabeli czasy zaniku nie tylko silnie zależą od natężenia światła, ale też wykazują niemonotoniczną zależność. Czy zależność ta na pewno jest niemonotoniczna, czy też chaotyczne zmiany wartości tych czasów mogą być artefaktem wynikającym z niejednoznaczności dopasowania funkcji dwuwykładniczej?

W przypadku ostatniej publikacji Autor był odpowiedzialny za wykonanie wszystkich doświadczeń, analizę wyników i przygotowanie ich do prezentacji. Tym samym miał zdecydowanie wiodący wkład w jej powstanie.

Kończąc recenzję chciałbym zauważyć, że pierwsze prace doktoranta pochodzą z roku 2015, co oznacza, że obecnie prowadzi on już działalność naukową od ponad 8 lat. Odzwierciedla to rozprawa doktorska, napisana w sposób bardzo dojrzały, a także wysoki poziom opisanych w niej badań naukowych. Pokazuje to, że wbrew obecnym trendom, stworzenie rozprawy doktorskiej na wysokim poziomie w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych wymaga czasu i fakt, że rozprawa nie powstała w czasie oczekiwanych 4 lat pracy doktoranta nie może być przedmiotem krytyki.

Podsumowując, treść i forma wprowadzenia do rozprawy wskazują, że Autor znakomicie opanował ogólną wiedzę teoretyczną w zakresie, którego dotyczy rozprawa. Opisane badania przyniosły oryginalne i ważne wyniki dotyczące fotokonwersji OCP, częściowo nakazujące zrewidowanie dotychczas przyjmowanych modeli. Uzyskanie tych wyników było możliwe jedynie dzięki wykonanym przez Autora pomiarom, które zdecydowanie nie były rutynowe, a wymagały starannego

planowania i modyfikacji układów doświadczalnych. Udział Autora w badaniach, których wyniki zostały opublikowane we wchodzących w skład rozprawy artykułach nie pozostawia wątpliwości, że posiada on umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. **Tym samym stwierdzam, że recenzowana rozprawa spełnia formalne wymagania wyrażone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” i wnioskuję o dopuszczenie Autora do publicznej obrony.**

Jednocześnie stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy, uzasadniając go trzema argumentami:

1. Wprowadzenie do rozprawy jest napisane w bardzo dojrzały sposób, co dowodzi, że Autor nie tylko dogłębnie zapoznał się z literaturą tematu, ale także przeanalizował ją i był w stanie wyciągnąć własne wnioski. Wprowadzenie to ma dużą wartość dydaktyczną, a jego treść wykracza poza oczekiwania stawiane wprowadzeniu do rozprawy doktorskiej mającej formę zbioru artykułów.
2. Przeprowadzone przez Autora doświadczenia musiały być bardzo trudne do wykonania, a ich wyniki trudne w analizie. Autor musiał zmodyfikować techniki pomiarów spektroskopowych, tak, by móc prowadzić pomiary przy bardzo dużych stężeniach OCP i w warunkach naświetlania światłem o stałym natężeniu. Na stopień trudności przeprowadzonych doświadczeń wskazuje między innymi fakt, że impulsy laserowe wzbudzające próbkę w pomiarach z rozdzielczością nanosekundową były generowane co 20 s. Przy tak niskiej częstotliwości repetycji impulsów pomiary musiały trwać bardzo długo, a to z kolei zapewne wiązało się z trudnościami w utrzymaniu stabilności układu pomiarowego i próbki o charakterze biologicznym. Z kolei analiza widm absorpcji przejściowej z rozdzielczością femtosekundową poprzez dopasowanie funkcji o 4 i więcej komponentach wykładniczych musiała sprawiać problemy z uzyskaniem jednoznacznych wyników. By przeanalizować dane Autor musiał stworzyć odpowiednie oprogramowanie. W mojej ocenie Autor tak dobrze opanował warsztat spektroskopowych pomiarów czasowo-rozdzielczych, że zasługuje to na wyróżnienie.
3. Autor jest współautorem nie tylko 4 artykułów składających się na rozprawę, ale i 10 innych artykułów. Według bazy Web of Science były one już cytowane (pomijając autocytowania) 126 razy. Dla doktoranta jest to wyróżniający dorobek publikacyjny.

Piotr Fite