

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. farm. Dariusza Kruszki
pt.: „Zmiany metabolomu *Arabidopsis thaliana* i *Hypericum perforatum* w odpowiedzi na
oddziaływanie nanocząstek metali”, w związku z powierzeniem obowiązków recenzenta
przez Radę Naukową Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

Rozprawa doktorska powstała w Zakładzie Biologii Roślin i Nanotechnologii Instytutu Genetyki Roślin PAN pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Kachlickiego. Praca została przygotowana w formie manuskryptu zalecanego dla prac promocyjnych i obejmuje 146 stron wraz z suplementem, przedstawiona została w formie bardzo obszernej. Recenzent uznaje niniejszą rozprawę jako bardzo dobrą, co wynika z zakresu problematyki realizowanej przez Autora.

Rozprawa doktorska powstała w wyniku realizacji projektu OPUS 11 2016/21/B/NZ9/01980, pt. HyperNano - Badanie zmian metabolizmu wtórnego u *Hypericum perforatum* pod wpływem nanocząsteczek poprzez zastosowanie zintegrowanego podejścia i technologii 'omics', którego kierownikiem był dr Franklin Gregory. Doktorant ponadto opublikował część wyników w dwóch publikacjach:

- 1) **Kruszka D**, Sawikowska A, Kamalabai Selvakesavan R, Krajewski P, Kachlicki P, Franklin G. *Silver nanoparticles affect phenolic and phytoalexin composition of Arabidopsis thaliana*. Sci Total Environ. 2020; 716, 135361. IF 7,963, 200 pkt.
- 2) **Kruszka D**, Kamalabai Selvakesavan R, Kachlicki P, Franklin G. *Untargeted metabolomics analysis reveals the elicitation of important secondary metabolites upon treatment with various metal and metal oxide nanoparticles in Hypericum perforatum L. cell suspension cultures*. Ind Crops Prod. 2022; 178, 114561. IF 6,449, 200 pkt.

Rozprawę rozpoczyna **Spis treści**. Następnie Autor zamieścił **Streszczenie** w języku polskim i angielskim, jak również **Spis stosowanych skrótów**, **Spis tabel** oraz **Spis rysunków**, na łącznie 9 stronach. We **Wstępie** obejmującym 19 stron Doktorant wprowadza w zagadnienia związane z realizacją rozprawy doktorskiej przedstawiając podstawowe zastosowania nanocząstek w rolnictwie i biotechnologii, przechodzi następnie do możliwości wykorzystania metabolomiki jako narzędzia badawczego poprzez opis stosowanych metod analitycznych, zastosowanie metabolomiki roślin w biologii systemów oraz podejścia metabolomicznego w fitotoksykologii. W kolejnej części Wstępu przechodzi do zmian metabolomicznych powstających w roślinach w wyniku oddziaływania z nanocząstkami. Zagadnienie to rozwija poprzez opis sygnalizacji komórkowej i fitohormonów, wpływ nanocząstek na metabolizm pierwotny i wtórny roślin, kończąc na przedstawieniu nanocząstek jako elicytorów związków

farmaceutycznie czynnych. W ostatniej części Wstępu, Doktorant charakteryzuje wybrane roślinne modele badawcze obejmujące rzodkiewnik pospolity *Arabidopsis thaliana* L. i dziurawiec zwyczajny *Hypericum perforatum* L. jako przykład znanej rośliny leczniczej. Wszystkie części Wstępu zostały wzbogacone tabelami i rycinami, ta część wprowadzająca w zagadnienia poruszane w rozprawie wnosi do rozprawy cały szereg kluczowych informacji, bardzo przydatnych w czytaniu rozprawy i umożliwia płynne przejście do kolejnej części obejmującej **Cele badawcze**. Rozprawa doktorska oparta jest na założeniu, że nanocząstki metali i ich tlenków mogą być potencjalnymi elicytorami, które indukują akumulację metabolitów wtórnych w tym fitoaleksyn. Głównym celem badań było określenie zmian zachodzących w metabolizmie pierwotnym i wtórnym roślin pod wpływem nanocząstek. Ponadto Doktorant założył wytypowanie nanocząstek i warunków ich stosowania sprzyjających akumulacji metabolitów wtórnych. Podjęto również próbę zbadania mechanizmu hormonalnego, który pośredniczy w działaniu nanocząstek. W badaniach założono wykorzystanie hodowli zawieszinowych dziurawca *Hypericum perforatum* oraz siewek *Arabidopsis thaliana* w układach *in vitro*. Cele uważam za bardzo ambitne, trudne do realizacji ze względu na olbrzymi zakres podjętych prac.

Rozdział **Materiały i metody** został przedstawiony na 11 stronach. Doktorant wyróżnił tutaj kilka części, począwszy od szerokiego przedstawienia materiałów obejmujących materiały niezbędne do kultur komórkowych, stosowane nanocząstki metali i tlenki metali aż do materiałów stosowanych w analizach metabolicznych. Następnie opisuje metodykę dotyczącą badania wpływu nanocząstek na zawiesinę komórkową *Hypericum perforatum*, obejmującą trzy doświadczenia. Przechodzi od wpływu nanocząstek Ag na metabolizm *Arabidopsis thaliana*, poprzez przygotowanie próbek i ekstrakcję metabolitów wtórnych, niecelowane analizy metabolomiczne z użyciem wysokorozdzielczej spektrometrii mas, celowane analizy obejmujące oznaczanie zawartości kwasu abscysynowego (ABA), jasmonowego (JA), i salicylowego (SA) i kamaleksyny aż do przedstawienia metod statystycznych.

Rozdział **Wyniki** Autor przedstawił na 57 stronach, obejmujących także tabele i ryciny. Doktorant wyróżnił pięć części począwszy od charakterystyki profilu metabolomicznego kultur komórkowych dziurawca *Hypericum perforatum*, jako układu odniesienia, poprzez przedstawienie efektu fitotoksycznego stosowanych nanocząstek oraz wpływu nanocząstek metali i ich tlenków na akumulację metabolitów wtórnych i molekuł sygnałowych aż do szczegółowych badań dotyczących profilu metabolitów wtórnych *H. perforatum* w obecności nanocząstek srebra i złota oraz rzodkiewnika *Arabidopsis thaliana* w odniesieniu do

nanocząstek srebra. Wyróżnione bloki tematyczne ściśle odpowiadają założonym celom rozprawy.

Pierwsza część badań dotyczyła charakterystyki metabolomu dziurawca obejmując przygotowanie biblioteki, jako punktu odniesienia. Doktorant przedstawił dane dotyczące analiz z zastosowaniem UPLC-HRMS/MS przeprowadzone dla ekstraktów uzyskanych z kultur komórkowych *H. perforatum*. Następnie bardzo szczegółowo przedstawił wyniki identyfikacji różnych substancji, wprowadzając jednocześnie numerację ułatwiającą dalszą identyfikację związków. Wśród analizowanych substancji, w tym fragmentów tych substancji były: kwasy hydroksycynamonowe i fenylopropanoidy (substancje 1-14), flawonoidy (substancje 15-39), związki benzoesowe i ich pochodne (substancje 40-55), benzofenony (substancje 56-66), ksantony i ich pochodne (substancje 67-154), związki antrachinonowe (substancje 164-174), związki triterpenowe (substancje 175-181), wśród metabolitów pierwotnych związki azotowe (substancje 182-216) oraz cukry i kwasy organiczne (substancje 217-238). Część ta jest ilustrowana strukturami wybranych substancji i widmami fragmentacyjnymi, a wszystkie wykryte związki zamieszczono w Tabeli S1.

Spośród szeregu badanych metali i tlenków metali Doktorant wybrał nanocząstki srebra, dla których efekt fitotoksyczny widoczny był po 24 godz. i nasilał się po 48 i 72 godz. hodowli. Ta część wyników opublikowana była w publikacji **Kruszka D**, Kamalabai Selvakesavan R, Kachlicki P, Franklin G. *Untargeted metabolomics analysis reveals the elicitation of important secondary metabolites upon treatment with various metal and metal oxide nanoparticles in Hypericum perforatum L. cell suspension cultures*. Ind Crops Prod. 2022; 178, 114561. IF 6,449, 200 pkt.

Bardzo ciekawa część rozprawy poświęcona jest analizie wpływu nanocząstek na akumulację metabolitów w biomasie komórkowej. Spośród badanych metali i ich tlenków Doktorant wskazał, że nanocząstki srebra oraz złota wykazują istotne różnice w porównaniu z kontrolą oraz nanocząstkami innych metali dla antrachinonów, benzofenonów, ksantonów, prenylowanych ksantonów, związków triterpenowych, kwasu jasmonowego, a z molekuł sygnałowych kwas jasmonowy. Doktorant zaobserwował występowanie statystycznie istotnych związków w grupie ksantonów (88% zidentyfikowanych związków), ksantolignanów (81%), benzofenonów (80%), cukrów (86%), aminokwasów (84%) i kwasów organicznych (83%). Z kolei najmniej statystycznie istotne związki występowały w grupie pochodnych kwasu cynamonowego (64) i w grupie pochodnych purynowych (65%). Wśród metabolitów wtórnych, Doktorant zaobserwował występowanie zmian w akumulacji pochodnych kwasu benzoesowego, benzofenonów, ksantonów oraz ich prenylowanych pochodnych,

ksantolignanów, ksantonoidów, pochodnych kwasu cynamonowego, flawonoidów, antrachinonów oraz triterpenów pod wpływem różnych nanocząstek. W przypadku wpływu nanocząstek na poziom metabolitów pierwotnych, Doktorant wykazał występowanie istotnych zmian w poziomie kwasów organicznych wchodzących w cykl kwasu cytrynowego pod wpływem nanocząstek srebra Ag, złota Au oraz miedzi Cu. Wykazał występowanie zmian w akumulacji kwasów organicznych, cukrów i polioli, kwasów tłuszczowych, aminokwasów, peptydów, zasad pirymidynowych, purynowych oraz witamin i niesklasyfikowanych związków. Ta część jest bogato ilustrowana, zawiera wykresy pudełkowe zmian w akumulacji dla sumarycznego poziomu metabolitów, mapy cieplne istotnych zmian wybranych związków pomiędzy traktowaniem a kontrolą.

Doktorant podjął się również analizy metabolitów wydzielanych do pożywki, zidentyfikował 47 metabolitów wtórnych i 38 metabolitów pierwotnych, przy czym wszystkie nanocząstki prowadziły do istotnych zmian w wydzielanych do pożywki związkach. Ponadto zaobserwował istotny wpływ nanocząstek srebra Ag i miedzi Cu na poziom pochodnych kwasu benzoowego, cynamonowego, ksantonów, ksantonoidów, jak również związków purynowych.

Analiza endogennych fitohormonów wykazała istotne obniżenie poziomu kwasu abscysynowego w kulturach traktowanych nanocząstkami srebra, złota i miedzi w porównaniu z kontrolą wzrost stężenia kwasu jasmonowego pod wpływem nanocząstek srebra i złota. W przypadku kwasu salicylowego istotny wzrost stężenia związany był z nanocząstkami palladu.

Następnie Doktorant wybrał nanocząstki srebra i złota do oceny ich wpływu na profil metabolitów wtórnych dziurawca *H. perforatum*, ustalając, że najkorzystniejsze stężenie nanocząstek wynosi $25 \text{ mg mg} \cdot \text{L}^{-1}$ z zakresu wyjściowego $0\text{-}50 \text{ mg mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Zaobserwował, że nanocząstki Ag i Au prowadziły do istotnych zmian poziomu dla 97 wspólnych metabolitów, nanocząstki srebra prowadziły do zmian poziomu 25 metabolitów, a nanocząstki złota dla 19 metabolitów. Doktorant analizował ponadto zmiany metabolitów po 4, 12, 24 i 72 godz. działania nanocząstkami Ag i Au przy ich stężeniu $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Wyniki przedstawił w postaci mapy cieplnej, wskazując, że nanocząstki srebra najsilniej indukowały heksozyd kwasu benzoowego (po 4 godz. i 24 godz.), kemferol (po 12 godz.) oraz trihydroksymetoksyprenylksanton I (po 72 godz.), natomiast nanocząstki złota odpowiednio trihydroksybenzofenon (po 4 godz.), dihydroksymetoksyksanton (po 12 godz.), hyperksanton B (po 24 godz.) oraz pentahydroksyksanton (po 72 godz.). Z kolei nanocząstki srebra obniżały w porównaniu z kontrolą poziom antronu emodyny (po 4 godz.), trihydroksymetoksyksantonu I (po 12 godz.), O-heksozydu hyperksantonu D/E I (po 24 godz.) oraz O-heksozydu

chryzoobtuzyny (po 72 godz.), a nanocząstki złota obniżały poziom C-heksozydu trihydroksymetoksyksantonu I (po 4 godz.), trihydroksymetoksyrenylksantonu I (po 12 godz.), tetrahydroksybenzofenonu (po 24 godz.), jak również kwasu p-kumarowego (po 72 godz.).

Ciekawą część rozprawy stanowi analiza wpływu nanocząstek srebra i złota na stężenia kwasów salicylowego, jasmonowego i abscysynowego w kulturze komórkowej dziurawca *H. perforatum*, szczególnie w odniesieniu do nanocząstek srebra.

Doktorant oceniał również wpływ nanocząstek srebra na poziom metabolitów wtórnych w roślinie modelowej jaką stanowi rzodkiewnik *Arabidopsis thaliana*. Wykazał występowanie 115 głównych związków obejmujących glukozynolany, związki indolowe, aminokwasy i peptydy, pochodne kwasu benzoowego, pochodne kwasu cytrynowego i kumaryny, lignany jak również flawonoidy. Spośród 47 wierzchołków chromatograficznych, 46 było istotnych ze względu na czas, osiem wierzchołków chromatograficznych istotnie różniło się ze względu na wariant traktowania.

Wyniki są bogato ilustrowane, a Doktorant przedstawił uzyskane dane w suplementach. Materiał zawarty w tej części jest bardzo obszerny i trudny do przedstawienia, natomiast Doktorantowi udało się tego dokonać w sposób nie zanudzający czytelnika. Rozdział ten oceniam bardzo wysoko.

Dyskusja została przedstawiona na 19 stronach, obejmując profil metabolomiczny kultur komórkowych *H. perforatum*, wpływ nanocząstek metali i ich tlenków na kulturę komórkową *H. perforatum*. Następnie odnosi się do nanocząstek srebra Ag i złota Au jako efektywnych elicytorów i dyskutuje zależność poziomu fitohormonów w kulturze komórkowej *H. perforatum* od nanocząstek. Dyskusja kończy się odniesieniem do indukcji akumulacji fitoaleksyn u *A. thaliana* przez nanocząstki srebra. Doktorant odnosi swoje wyniki do dostępnych danych, tą część rozprawy można uznać za w pełni satysfakcjonującą.

Najważniejsze wyniki Doktorant przedstawił w dziewięciu punktach w rozdziale **Podsumowanie i wnioski** (2 strony). Rozdział ten opatrzony jest półstronicowym streszczeniem rozprawy. Doktorant wykazał, że najbardziej toksyczne dla hodowli komórkowych *H. perforatum* są nanocząstki srebra Ag i miedzi Cu a fitotoksyczność nanocząstek wpływa na metabolizm pierwotny i wtórny komórek *H. perforatum*. Stres wywołany nanocząstkami aktywuje systemy obronne obejmujące działania antyoksydacyjne, chelatujące jony metali i wydzielanie fitoaleksyn. Wskazał na funkcjonowanie konkurencyjnych szlaków metabolomicznych związanych z odmiennym profilem akumulacji związków fenolowych indukowanych przez nanocząstki metali. Doktorant wykazał, że

nanocząstki srebra Ag i złota Au są bardzo efektywnymi elicytorami o odmiennym mechanizmie działania, a odpowiedź metabolomiczna na działanie nanocząstek jest uwarunkowana przez stężenie elicytora i czas trwania eksperymentu. Następnie odnosi się do indukcji zmian w poziomie fitohormonów odpowiedzialnych za reakcje roślin na stres środowiskowy oraz akumulacji w komórkach *Arabidopsis thaliana* metabolitów wtórnych w tym fitoaleksyny pod wpływem różnych form nanocząstek srebra Ag poprzez uwolnienie jonów Ag⁺. Bardzo ciekawy jest wniosek ostatni, w którym Doktorant odnosi się do możliwości wykorzystania zdolności stymulacji biosyntezy metabolitów wtórnych w tym fitoaleksyn przez nanocząstki do produkcji w układach *in vitro* ważnych z gospodarczego punktu widzenia metabolitów wtórnych. Wskazuje również na możliwość zwiększenia odporności roślin użytkowych na stres biotyczny lub abiotyczny. Wnioski są przedstawione bardzo obszernie. Doktorant prawdopodobnie sugerował się podziałem wyników i wniosków dotyczących dwóch modeli roślin, można by jednak pokusić się o połączenie wniosków np. dotyczących zmiany metabolizmu w odniesieniu do stresu.

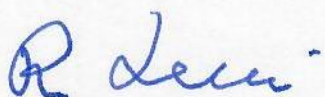
Bibliografia obejmuje 208 pozycji (13 stron) pochodzących głównie z ostatnich 10 lat. Suplement przedstawiony na 16 stronach zawiera dwie tabele z metabolitami wtórnymi i pierwotnymi występujące w kulturach komórkowych *Hypericum perforatum* oraz metabolity obecne w *Arabidopsis thaliana*.

Doktorant przy przygotowywaniu rozprawy nie ustrzegł się drobnych błędów. Należy tu wymienić nieprawidłową numerację rozdziałów w Materiałach i metodach oraz Wynikach. Tym nie mniej powyższe uwagi nie umniejszają wartości przygotowanej przez mgr. farm. Dariusza Kruszki rozprawy doktorskiej, wspominam o nich jedynie z obowiązku recenzenta.

Wniosek końcowy. Zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo mgr. farm. Dariuszowi Kruszcze. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. o - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.).

Ze względu na opracowanie bardzo szerokiej problematyki związanej z charakterystyką metabolomu dwóch roślin w warunkach stresu wywołanego podaniem nanocząstek metali i tlenków metali zgłaszam **wniosek o wyróżnienie rozprawy**. Wyróżnienie uzasadniam uzyskaniem bardzo wartościowych wyników przy zastosowaniu pogłębionych analiz, o czym świadczy ukazanie się publikacji zawierających część wyników powstałych w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej o łącznej wartości punktów ministerialnych wynoszącej 400 i łącznym IF wynoszącym 14,412, przy czym Doktorant jest pierwszym autorem:

- 1) **Kruszka D**, Sawikowska A, Kamalabai Selvakesavan R, Krajewski P, Kachlicki P, Franklin G. *Silver nanoparticles affect phenolic and phytoalexin composition of Arabidopsis thaliana*. Sci Total Environ. 2020; 716, 135361. IF 7,963, 200 pkt.
- 2) **Kruszka D**, Kamalabai Selvakesavan R, Kachlicki P, Franklin G. *Untargeted metabolomics analysis reveals the elicitation of important secondary metabolites upon treatment with various metal and metal oxide nanoparticles in Hypericum perforatum L. cell suspension cultures*. Ind Crops Prod. 2022; 178, 114561. IF 6,449, 200 pkt.



Poznań, 21.10.2022 r.

Prof. dr hab. Ryszard Słomski