



Warszawa, 30.07.2021 r.

Prof. dr hab. n. farm. Agnieszka Pietrosiuk
Zakład Biologii Farmaceutycznej
i Biotechnologii Roślin Leczniczych
Wydział Farmaceutyczny
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Angeliki Małgorzaty Michalak
pt. "Kultury *in vitro* i *in vivo* roślin z gatunku *Iris pseudacorus* źródłem związków biologicznie czynnych" (*In vitro* and *in vivo* cultures of *Iris pseudacorus* plants as a source of biologically active compounds)

Rozprawa została przygotowana pod opieką Pani dr hab. inż. Aleksandry Królickiej, prof. UG w Zakładzie Badania Związków Biologicznie Czynnych Uniwersytetu Gdańskiego.

Temat badawczy podjęty przez Doktorantkę wpisuje się w aktualny i istotny z poznawczego oraz aplikacyjnego punktu widzenia nurt badań z zakresu poszukiwań związków biologicznie czynnych w materiale roślinnym różnego pochodzenia.

Z powodu zakażeń wywoływanych przez odporne drobnoustroje wzrasta śmiertelność, ulegają również wyczerpaniu opcje terapeutyczne z tym związane. Antybiotykooporność jest coraz częstszym i coraz bardziej odczuwalnym zagrożeniem dla pacjentów. Zakres tego zjawiska spowodował, że jest jednym z podstawowych niebezpieczeństw dla zdrowia publicznego na całym świecie. Choroby nowotworowe zaliczane są również do największych aktualnych zagrożeń dla zdrowia i życia człowieka. Wobec tego podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza mająca na celu określenie czy materiał roślinny z gatunku *Iris pseudacorus* otrzymany w warunkach *in vitro* i *in vivo* wytwarza z dużą wydajnością związki o określonej aktywności biologicznej - jest niezmiernie ważna i aktualna, dotyczy poszukiwań związków o działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwnowotworowym wśród roślinnych metabolitów wtórnych.

Pracę doktorską stanowi manuskrypt o układzie klasycznym, który obejmuje: wykaz skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp wprowadzający w tematykę pracy, hipotezę badawczą z uzasadnieniem wyboru problematyki badawczej, cele pracy. Następne rozdziały to: materiały i metody, wyniki i dyskusja, wnioski, bibliografia, suplement, wykazy: tabel, fotografii, rycin, wykresów, rozdział poświęcony upowszechnieniu wyników i dorobkowi naukowemu Doktorantki oraz podziękowania. Praca liczy 162 strony i jest bardzo dobrze udokumentowana. Istotne dane i wyniki przedstawione są w 26 tabelach, na 17 fotografiach, pięciu rycinach i na pięciu wykresach. W rozdziale – Suplement - umieszczono: profile antybiotykooporności izolatów klinicznych wykorzystywanych w badaniach, kopie chromatogramów badanych ekstraktów, widma masowe w trybie jonów dodatnich i ujemnych związków aktywnych: iristektorigeniny B i nieznanego dimetoksy-dihydroksy-izoflawnonu, zidentyfikowanych w ekstrakcie z pożywki po hodowli korzeni anatomicznych *I. pseudacorus* (ekstrakt C) oraz w ekstrakcie z korzeni słabo rosnących. Piśmiennictwo cytowane jest

bogate, obejmuje 274 pozycje; jest właściwie dobrane do tematyki pracy - prezentuje aktualny stan wiedzy w tym zakresie - co stanowiło istotną podstawę teoretyczną do sformułowania celów rozprawy doktorskiej i wyboru właściwych metod badawczych. Rozprawa doktorska mgr Angeliki M. Michalak została przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim i poprawności językowej, co budzi uznanie. Podczas lektury rozprawy dostrzegłam nieliczne literówki i nieliczne niefortunne sformułowania oraz szereg uwag do piśmiennictwa cytowanego. Uwagi te nie wpływają na wartość merytoryczną pracy i zostały przekazane Doktorantce.

Przechodząc do oceny merytorycznej - przedmiotem badań recenzowanej rozprawy doktorskiej jest *Iris pseudacorus* – kosaciec żółty (Iridaceae) znany w polskiej florze i powszechnie występujący na świecie gatunek roślinny. *Iris pseudacorus* nie jest wymieniony w „Rozporządzeniu Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014 r. w sprawie ochrony gatunkowej roślin” jako gatunek zagrożony wyginięciem w Polsce i dlatego nie jest objęty ochroną, tak jak dwa inne gatunki z tego rodzaju: *Iris aphylla* (kosaciec bezlistny) i *Iris sibirica* (kosaciec syberyjski).

Ponadto z przeglądu piśmiennictwa naukowego przedstawionego przez Doktorantkę wynika, że badany gatunek ma wiele zalet: łatwo rozmnaża się w naturalnych warunkach, jest odporny na niekorzystne warunki środowiskowe i obecność metali ciężkich, może być wykorzystywany w bioremediacji wód i gleby, jest bogatym źródłem, m. in. terpenów, związków fenolowych, izoflawonów i flawonoidów. Niektóre związki z tych grup metabolitów wtórnych są już objęte badaniami naukowymi ukierunkowanymi na zastosowanie medyczne.

Jednakże wiedza dotycząca mikrorozmnażania, chemizmu i właściwości biologicznych *I. pseudacorus* nie jest jeszcze bogato udokumentowana, co stwarza pole do nowych odkryć.

Uzasadniona jest zatem hipoteza badawcza sformułowana przez Doktorantkę – „Rośliny *Iris pseudacorus* mogą stanowić nowe, łatwo dostępne źródło metabolitów wtórnych o szerokim spektrum aktywności biologicznej, w tym przeciwbakteryjnej i przeciwnowotworowej”.

Rozwinięciem dla tej konkluzji są przedstawione następnie cele pracy, t.j.: pozyskanie materiału roślinnego *I. pseudacorus* z hodowli *in vitro* do badań fitochemicznych i biologicznych ze szczególnym uwzględnieniem aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów z tkanek i pożywki pohodowlanej z kultur *in vitro*, zbadanie aktywności przeciwbakteryjnej i cytotoksycznej ekstraktów pozyskanych z roślin *I. pseudacorus* uprawianych w glebie, izolacja i identyfikacja związków o aktywności przeciwbakteryjnej z roślin *I. pseudacorus*.

Co istotne, Doktorantka zbadła także możliwość wykorzystania ekstraktów z tego gatunku, jako czynnika redukującego w ekologicznej syntezie przeciwbakteryjnych nanocząstek srebra. Wpisuje się to w nurt tzw. zielonej syntezy, w której nie wykorzystuje się szkodliwych reagentów oraz takich związków, których pozyskanie lub utylizacja wiąże się z ujemnym wpływem na środowisko.

Doktorantka prowadziła badania materiału roślinnego *I. pseudacorus* pozyskanego zarówno z uprawy w gruncie, jak i z hodowli *in vitro*. Nawiązując do tej informacji, chcę zwrócić uwagę na niezbyt fortunate zastosowanie terminologii odnośnie hodowli. Stosowano sformułowanie - hodowla w glebie. Hodowla odnosi się do takich działań praktycznych, których celem jest uzyskanie roślin lepszych jakościowo, czyli dotyczy polepszenia ich cech dziedzicznych. Natomiast Doktorantka stosowała w swoich badaniach rośliny *I. pseudacorus* pochodzące z kolekcji Ogrodu Roślin Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego GUMed,

czyli z uprawy w gruncie, w której starano się stworzyć optymalne dla tych roślin warunki środowiskowe. Natomiast hodowla *in vitro*, czy kultura *in vitro* – odnosi się do działań niosących dla roślin nienaturalne, sztuczne środowisko, które może wywoływać zmiany somaklonalne w materiale roślinnym otrzymanym tym sposobem. W tym przypadku stosowano właściwą terminologię.

Za cenne osiągnięcia Doktorantki w obrębie przeprowadzonych badań, które jednocześnie cechuje nowość uważam:

1. Opracowanie metody otrzymywania pędów *I. pseudacorus* w kulturze *in vitro* z zastosowaniem hipokotyli tych roślin w połączeniu ze stymulacją określonymi regulatorami wzrostu.

Opracowanie metody mikropropagacji dla gatunku, który mnoży się szybko i bez problemów bytuje w środowisku naturalnym może wydawać się nieuzasadnione. Należy jednak wziąć pod uwagę, że gotowa metoda może być przydatna w przypadku mnożenia *in vitro* innych gatunków z rodzaju *Iris*, np. zagrożonych wyginięciem, czy wytwarzających cenne pod względem medycznym metabolity wtórne, co jest korzystne i opłacalne. Oczywiście metoda może potrzebować tylko pewnych modyfikacji do wymagań danego gatunku.

2. Otrzymanie wydajnie rosnących kultur *in vitro* korzeni anatomicznych *I. pseudacorus* niewymagających udziału regulacji hormonalnej, co stanowi korzystną alternatywę dla kultur korzeni włóśnikowych.
3. Wykazanie możliwości integracji T-DNA z plazmidu bakterii *Rhizobium rhizogenes* do genomu rośliny z rodzaju *Iris* i uzyskanie kultur teratomów *I. pseudacorus*.

W badaniach nie uzyskano planowanych kultur typowych korzeni włóśnikowatych, co potwierdza fakt że rośliny z klasy jednoliściennych w przeciwieństwie do roślin dwuliściennych są praktycznie niewrażliwe na transformację za pośrednictwem wektorów bakteryjnych, pomimo stymulacji acetosiryngonem. Jednakże analiza przeprowadzona dla sekwencji rolB i rolC z TL-DNA potwierdziła uzyskanie teratomów – transformowanych pędów, których kłącza zawierały ok. 2 razy więcej związków fenolowych, niż kłącza rośliny nietransformowanej. Wynik ten potwierdza fakt, że transformacja genetyczna może być atrakcyjnym sposobem zwiększania zdolności tkanek roślinnych do biosyntezy metabolitów wtórnych.

4. Poznanie potencjału przeciwbakteryjnego ekstraktów z tkanek oraz metabolitów wtórnych *I. pseudacorus*.
5. Wykrycie iristektorigeniny B w kulturach *in vitro* roślin z rodzaju *Iris* i dowiedzenie aktywności przeciwbakteryjnej tego związku.
6. Wykrycie w kulturze *in vitro* korzeni *I. pseudacorus* dwóch znanych związków z grupy izoflawonów: daidzeiny i genisteiny o aktywności estrogenowej, przeciwutleniającej, modulującej i przeciwnowotworowej.
7. Wskazanie na możliwość zastosowania ekstraktu z roślin *I. pseudacorus* w zwalczaniu gronkowcowego biofilmu bakteryjnego - stężenie ekstraktu A otrzymanego z roślin *I. pseudacorus* z upraw w gruncie powodowało eradykację biofilmu *S. aureus* w stężeniu tylko 2,5-krotnie wyższym od stężenia zastosowanego wobec kultury planktonicznej tej bakterii.

8. Wykazanie, że tkanki *I. pseudacorus* charakteryzują się wysokim stężeniem tanin, co sugeruje możliwość pozyskiwania tych związków z *I. pseudacorus* do różnorodnych celów przemysłowych.

Ponadto Doktorantka prowadziła długoterminową hodowlę roślin *I. pseudacorus* w systemie okresowo-zalewowym Platform oraz w systemie okresowo-zalewowym w kolumnie bioreaktora barbotażowego. Eksperymenty te miały na celu uzyskanie dużej objętości biomasy roślinnej do oznaczenia związków fenolowych. Stosowano również zabiegi biotechnologiczne, np.: elicytację w celu intensyfikacji biosyntezy związków fenolowych w badanych roślinnych systemach *in vitro*. Zastosowano elicytory biotyczne (lizat *Cronobacter sakazakii*, ekstrakt z mszycy) i abiotyczne (kwas jasmonowy, fenyloalaninę, zmniejszenie zawartości azotu w pożywce MS) oraz różny czas elicytacji. Badania te wykazały, że wiek tkanki oraz warunki hodowli roślin mają kluczowe znaczenie dla biosyntezy związków aktywnych, w tym przypadku przeciwbakteryjnych, w kulturach *in vitro* *I. pseudacorus*.

Praca doktorska mgr Angeliki M. Michalak jest wieloaspektowa. Wszystkie przeprowadzone przez Doktorantkę badania wymagały bardzo dużo czasu i pracy.

Na podkreślenie zasługują zastosowane w pracy nowoczesne i odpowiadające współczesnym wymaganiom dla tych kierunków poszukiwań techniki badawcze (TLC jednokierunkowa, TLC dwukierunkowa, HPTLC, HPLC, wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (HPLC–DAD–ESI–MS), PCR, bioautografia metodą agaru górnego, test MTT, analiza obrazowa (TEM), spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR), analiza dynamicznego rozpraszania światła (DLS).

Poza wnikliwą dyskusją połączoną z omówieniem wyników i wspomnianymi wcześniej elementami nowości, istotnymi zaletami recenzowanej pracy są:

1. Bardzo dokładnie przeprowadzone oraz omówione badania i wyniki dotyczące procesu transformacji roślin z wykorzystaniem, jako wektora *Rhizobium rhizogenes* oraz izolacji DNA plazmidowego z bakterii, jak i izolacji DNA genomowego z tkanek roślinnych nietransformowanych i transformowanych.
2. Przeprowadzenie w szerokim zakresie badań właściwości przeciwbakteryjnej ekstraktów z tkanek *I. pseudacorus* wobec bakterii patogennych dla człowieka, w tym wybranych szczepów referencyjnych (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, i *Enterobacter* spp.) oraz izolatów klinicznych, wrażliwych lub opornych na co najmniej dwie różne grupy komercyjnie stosowanych antybiotyków.
3. Wykazanie selektywnego działania „ekstraktu A” (ekstrakt z kłączy *I. pseudacorus*) wobec charakteryzujących się obecnością receptorów estrogenowych komórek linii nowotworu gruczołu piersiowego (MCF-7), co wskazuje na potencjał fitoestrogenów w terapii niektórych nowotworów.
4. Wykazanie, że ekstrakt z kłączy *I. pseudacorus* w połączeniu z komercyjnie dostępnymi nanocząstkami srebra opłaszczonymi ligandem HS-(CH₂)₁₁N(CH₃)₃ działają synergistycznie w zwalczaniu bakterii *P. aeruginosa*, co wskazuje na zasadność podjęcia szeregu nowych badań mających na celu sprawdzenie czy ekstrakty pochodzące z innych gatunków roślin wchodzi w takie interakcje z nanocząstkami srebra, które pozwolą na

obniżenie efektywnych dawek obu substancji, przy jednoczesnym zachowaniu bądź wzroście ich aktywności biologicznej.

5. Pogłębienie wiedzy z zakresu biotechnologii i kultur *in vitro* bezpośrednio gatunku *Iris pseudacorus* oraz pośrednio innych gatunków z rodziny Iridaceae i gatunków roślin z klasy jednoliściennych.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że praca doktorska powstała w wyniku realizacji Diamentowego Grantu - pt.: „Terapeutyczne zastosowanie metabolitów wtórnych roślin rodzaju *Iris*. Wydajne pozyskiwanie, analiza i zastosowanie ekstraktów aktywnych biologicznie” (grant Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, projekt nr 0145/DIA/2015/44) oraz grantu uzyskanego w wyniku Konkursu dla Młodych Pracowników Nauki 2017 pt.: „Opracowanie metod syntezy nanocząstek srebra o działaniu biologicznie czynnym przy użyciu *Iris pseudacorus* jako czynnika redukującego”. Ponadto, Autorka niniejszej pracy została objęta wsparciem ze środków na Działalność Statutową dla Zakładu Badania Związków Biologicznie Czynnych, Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed.

Ponadto, część wyników badań została już opublikowana w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Jest to oryginalna eksperymentalna praca z 2021 roku, w czasopiśmie *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (IF 3,935). Doktorantka jest również współautorką oryginalnej publikacji opublikowanej w *Arabian Journal of Chemistry* o znaczącym współczynniku oddziaływania (IF 5,165) i współtwórczynią patentu nr 226117 – „Sposób oczyszczania z chlorofili ekstraktów roślinnych zawierających metabolity wtórne” oraz brała czynny udział w licznych konferencjach naukowych.

Natomiast odnośnie uwag merytorycznych do pracy to są one następujące:

- 1) W pracy zabrakło systematyki badanego gatunku przy bardzo dobrze przedstawionej charakterystyce, występowaniu, chemizmie i znaczeniu gatunku.

- 2) W rozdziale wyniki i dyskusja, na stronie 93 jest następujące zdanie „Zidentyfikowany w niniejszej pracy związek (1) wykazujący aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do bakterii z gatunku *S. aureus*, oznaczony jako iristektorigenina B (5,7,4'-trihydroksy-6,3'-dimetoksy-izoflawon), występuje w wielu gatunkach irysów, w tym w: *I. tectorum* (Shu i in., 2010), *I. spuria* (Farag i in., 2009), *I. carthaliniae* (Farag i in., 1999), ale także w gatunkach spoza tej rodziny, w tym w *Belamcanda chinensis* (Li i in., 2009)” - w tym względzie nie zgadzam się z Doktorantką ponieważ *Belamcanda chinensis* L. DC. to nazwa synonimiczna gatunku *Iris domestica* (L.) Goldblatt et Mabb. z rodziny Iridaceae. Gatunek ten dostarcza *Belamcandae chinensis rhizoma* – kłącza iksji chińskiej. Monografia tej substancji roślinnej znajduje się w FP XI i XII oraz w Farmakopei Europejskiej.

Podczas obrony pracy doktorskiej chciałabym poprosić Doktorantkę o odniesienie się do powyższych uwag oraz o przedyskutowanie następujących zagadnień:

- w rozdziale rozprawy dotyczącym hipotezy badawczej napisano - "Globalne zapotrzebowanie na ekstrakty roślinne nieprzerwanie rośnie i jest ściśle związane z rozwojem przemysłu farmaceutycznego, kosmetycznego i spożywczego". Bardzo proszę o rozwinięcie tego stwierdzenia w kontekście znaczenia ekstraktów roślinnych dla rozwoju różnych gałęzi przemysłu,

- na jakiej podstawie wybierano rodzaj i stężenia regulatorów wzrostu i rozwoju roślin do modyfikacji podłoża w prowadzonych badaniach biotechnologicznych, np. do inicjacji kultury pędów *I. pseudacorus*.

Wniosek końcowy

Reasumując, rozprawa doktorska Pani mgr Angeliki Małgorzaty Michalak zawiera elementy nowości naukowej, wnosi elementy poznawcze oraz jest bardzo dobrze zaplanowanym oryginalnym zagadnieniem naukowym. Tematyka pracy jest aktualna i istotna w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w obszarze badań biologicznych, biotechnologicznych oraz badań związków naturalnych w materiale roślinnym o potencjale terapeutycznym. Wskazuje na wszechstronną wiedzę teoretyczną Doktorantki w reprezentowanej dyscyplinie naukowej, umiejętność prowadzenia prac eksperymentalnych oraz właściwą ich interpretację.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Angeliki Małgorzaty Michalak pt. „Kultury *in vitro* i *in vivo* roślin z gatunku *Iris pseudacorus* źródłem związków biologicznie czynnych” spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w Art. 13 Ustawy z dnia 27 września 2017 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2017 r., poz. 1789) oraz w Ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz.U. 2018 r., poz. 1668).

Przedstawiam zatem Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o dopuszczenie Pani mgr Angeliki Małgorzaty Michalak do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

mgr Angeliki Małgorzaty Michalak pt. „Kultury *in vitro* i *in vivo* roślin z gatunku *Iris pseudacorus* źródłem związków biologicznie czynnych” (*In vitro and in vivo cultures of Iris pseudacorus plants as a source of biologically active compounds*).

Rozprawa doktorska mgr Angeliki M. Michalak wnosi elementy nowości, ma udokumentowane znaczące osiągnięcie naukowe, które zostało opublikowane w recenzowanym czasopiśmie naukowym - Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis o współczynniku oddziaływania IF 3,935.

Jest to publikacja pt.: „*Iris pseudacorus* as an easily accessible source of antibacterial and cytotoxic compounds”, w której Doktorantka jest pierwszą autorką (Michalak, A., Krauze-Baranowska, M., Migas, P., Kawiak, A., Kokotkiewicz, A., Królicka, A. (2021). *Iris pseudacorus* as an easily accessible source of antibacterial and cytotoxic compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 195, 1–11).

Badania Doktorantki poszerzyły wiedzę na temat chemizmu gatunku *Iris pseudacorus* oraz wykazały jego aktywność biologiczną. Dowiodły, że kłącza *I. pseudacorus* syntetyzują galokatechinę o aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec ludzkich patogenów, w tym izolatów klinicznych i *Staphylococcus aureus* tworzących biofilm oraz wykazują aktywność cytotoksyczną wobec komórkowych linii nowotworowych, szczególnie wobec estrogenowo dodatniej linii komórek raka piersi MCF-7. Ponadto zaproponowano nowy sposób pozyskiwania związków polifenolowych o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, zwłaszcza pochodnych flawan-3-olu, w hodowli *in vitro* korzeni anatomicznych *I. pseudacorus* niezależnej od egzogennych hormonów wzrostu i rozwoju roślin.

KIEROWNIK
Zakładu Biologii Farmaceutycznej i
Biotechnologii Roślin Leczniczych

prof. dr hab. n. farm. Agnieszka Pietrosiuk