



Zakład Farmakognozji
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
ul. Mickiewicza 2a, 15-230 Białystok, Polska
tel.: 85-748-56-92; fax.: 85-748-54-16
e-mail: michal.tomczyk@umb.edu.pl



Białystok, 27 sierpnia 2021 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej

na temat „Kultury *in vitro* i *in vivo* roślin z gatunku *Iris pseudacorus* źródłem związków biologicznie czynnych”

mgr Angeliki Małgorzaty Michalak

**wykonanej pod kierunkiem Dr hab. inż. Aleksandry Królickiej, prof. UG,
w Zakładzie Badania Związków Biologicznie Czynnych, Międzyuczelnianego
Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu
Medycznego**

Obserwowane obecnie intensywne zainteresowanie związkami pochodzenia roślinnego niesie za sobą pewne niebezpieczeństwa związane z potrzebą ochrony przed nadmierną eksploatacją zasobów roślinnych ze stanu naturalnego. Coraz częściej wskazuje się na dodatkowe źródła poszukiwań surowców w tym obecnych w nich metabolitów wtórnych, a pozyskiwanych alternatywnymi metodami między innymi z kultur tkankowych i komórkowych uzyskanych w modelach *in vitro*. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska wpisuje się w aktualny nurt prowadzonych obecnie na całym świecie badań w zakresie udoskonalania technik biotechnologicznych w zakresie materiału roślinnego, potencjalnie leczniczego w połączeniu zarówno z precyzyjną oceną jego składu chemicznego oraz aktywności biologicznej.

Postawione przez Doktorantkę w rozprawie hipotezy badawcze z uzasadnieniem wyboru podjętej tematyki badawczej nie budzą moich zastrzeżeń tym bardziej, że stawia Ona sobie za zadanie odpowiedź na pytanie czy kosaćcowate, *Iris pseudacorus* L. (kosaćcowate, Iridaceae Juss.) może być bogatym źródłem substancji biologicznie aktywnych. Jasno sprecyzowane cele naukowe obejmujące szereg modułów zadaniowych w tym 1) opracowanie metod hodowli tkankowej i mikrorozmnażania w warunkach *in vitro* roślin

z gatunku *I. pseudacorus*, w celu pozyskiwania związków o aktywności biologicznej, 2) analizę aktywności biologicznej (przeciwbakteryjnej i cytotoksycznej) ekstraktów z tkanek roślin *I. pseudacorus* hodowanych w glebie, 3) ocenę aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów z tkanek i pożywki pochodzącej z kultur *in vitro*, 4) podjęcie się prób izolacji i identyfikacji związków biologicznie czynnych, o aktywności przeciwbakteryjnej oraz 5) analizę możliwości wykorzystania ekstraktów z *I. pseudacorus* jako czynnika redukującego w ekologicznej syntezie przeciwbakteryjnych nanocząstek srebra czy oceną aktywności cytotoksycznej. Istotną kwestią, poza aspektem poznawczym, na którą wskazuje Doktorantka jest potencjalne wykorzystanie analizowanego surowca w produkcji suplementów diety czy zastosowaniu jako czynnika żywności funkcjonalnej o wysokim potencjale farmaceutycznym.

Praca doktorska Pani mgr Angeliki Michalak stanowi bardzo logiczne rozwiązywanie szeregu zadań badawczych opartych o prawidłowo postawione hipotezy i cele badawcze. Wszystkie zadania zostały wzorowo zaplanowane począwszy od wprowadzenia roślin *I. pseudacorus* do kultury *in vitro*, poprzez transformację roślin przy pomocy bakterii *Rhizobium rhizogenes* celem zainicjowania kultury korzeni włóściwkowych czy transformowanych pędów, teratomów. W dalszej kolejności zainicjowała kultury pędowe z wykorzystaniem dwóch typów eksplantatów znajdujących się w warunkach *in vitro*: hipokotyli oraz merystemów wierzchołkowych młodych klonów roślin. Co ważne, zastosowanie hipokotyli w połączeniu ze stymulacją regulatorami wzrostu nie była dotąd stosowana do uzyskiwania kultury pędów roślin z rodzaju *Iris*. Kolejne etapy, bardzo pracochłonnego eksperymentu biotechnologicznego oparła na zainicjowaniu kultury nietransformowanych korzeni anatomicznych z odciętych korzeni przybyszowych roślin *I. pseudacorus* utrzymywanych w warunkach *in vitro*. Eksperyment przedstawiony na tym etapie pracy pozwolił sprawdzić, czy możliwe jest uzyskanie podobnej kultury korzeni, wykorzystując jako eksplantaty korzenie odcięte od prawidłowo rozwijających się roślin, bez stosowania suplementacji regulatorami wzrostu. Z analizy dostępnej literatury naukowej wynika, że dotychczas nie opisano tego typu kultury dla żadnego z przedstawicieli roślin rodzaju *Iris*.

Bardzo precyzyjny warsztat laboratoryjny Pani mgr Michalak, zasługujący na podkreślenie, w dalszej kolejności przyczynił się do podjęcia się prób analizy obecności i identyfikacji metabolitów wtórnych obecnych w biomacie uzyskanych korzeni

anatomicznych analizowanego gatunku. Wykorzystane w tym etapie pracy zostały bardzo trudne techniki w analizie fitochemicznej w tym chromatografia TLC z elementami autobiografii – ocena aktywności przeciwbakteryjnej czy wielkoskalowe techniki separacyjne z różnymi typami detektorów - LC-DAD-ESI-MS. Dodatkowo, doktorantka wykorzystuje półpreparatywną TLC do izolacji związków biologicznie czynnych z bardzo trudnej i złożonej matrycy roślinnej. To niewątpliwie bardzo czasochłonne zadanie. **Jednakże, nie odnajduję tutaj informacji o ilości uzyskanych związków: 1 (iristektorigeniny B) i 3 (prawdopodobnie dimetoksy-trihydroksyizoflawon) z ekstraktów z pożywki po hodowli korzeni *I. pseudacorus* oraz związku 4 (galokatechina) uzyskanego z ekstraktu z kłącza rośliny. Dyskusyjna jest również informacja o analizie zawartości dwóch izoflawonów genisteiny i daidzeiny, podczas gdy nie odnajduję w tekście rozprawy jakichkolwiek danych analitycznych (rozdział 7.7.7.). Cennym byłoby poznanie tych wartości szczególnie w kontekście ich znanych cennych właściwości farmakologicznych a w szczególności w kontekście badanego gatunku.** W pracy wykazano jedynie ogólną ilościową zawartość związków o charakterze polifenoli. Precyzyjne określenie struktury wyizolowanych związków wymaga dodatkowo szczegółowej charakterystyki w oparciu o techniki spektralne w tym UV, IR, czy 1D, 2D NMR, jednak w tej pracy nie wykonywane. W dalszej części rozprawy Doktorantka podejmuje się oceny aktywności przeciwbakteryjnej zarówno przeciw bakteriom wzrastającym w kulturze planktonicznej, jak również przeciw mikroorganizmom zdolnym do wytwarzania biofilmu bakteryjnego. Aktywność przeciwbakteryjna ekstraktów z tkanek *I. pseudacorus* nie była jak dotąd przedmiotem wnikliwej analizy naukowej stąd stanowi dobrze przemyślane i zrealizowane uzupełnienie do właściwych badań. Niewątpliwie, wyniki tej oceny potwierdziły wcześniejsze przypuszczenia, iż *I. pseudacorus* jest źródłem związków o aktywności przeciwbakteryjnej w stosunku do wybranych do badań szczepów patogenów ludzkich *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli*. **W tym miejscu nasuwa się jednak pytanie, czy w badaniach mikrobiologicznych zastosowano kontrole pozytywne?** Bakterie *S. aureus* oraz *P. aeruginosa* to mikroorganizmy zdolne do tworzenia trudnego do zwalczania biofilmu. Podjęto również analizę aktywności ekstraktu również w stosunku do wytwarzanego przez nie biofilmu co stanowi pierwsze doniesienie wskazujące na możliwość zastosowania ekstraktu z tego gatunku roślin w walce z gronkowcowym biofilmem bakteryjnym. Ciekawym aspektem w ocenianej rozprawie jest również poszukanie odpowiedzi na pytanie czy biologicznie czynny ekstrakt z kłącza irysa, po połączeniu z inną

substancją przeciwbakteryjną, pozwoli na obniżenie efektywnych dawek obu substancji, przy jednoczesnym zachowaniu bądź wzroście ich aktywności biologicznej. W tym celu Doktorantka wykorzystwała komercyjnie dostępne nanocząstki srebra (AgNPs) łącząc je z metanolem ekstraktem z kłączy *I. pseudacorus*. Analiza wykazała, że zastosowanie nanocząstek srebra AgNPs wraz z ekstraktem, obniża aktywność przeciwdrobnoustrojową obu czynników, w stosunku do *S. aureus*, a tym samym wykazuje działanie antagonistyczne. W przypadku bakterii *P. aeruginosa*, zastosowanie ekstraktu A i AgNPs umożliwiło podwyższenie aktywności czynników i obniżenie dawek obu substancji ok. 4-krotnie w stosunku do szczepu referencyjnego PAK oraz ok. 16-krotnie dla ekstraktu i 2-krotnie dla AgNPs w stosunku do opornego izolatu klinicznego *P. aeruginosa*. Za bardzo wartościowy uważam pomysł kontynuacji badań mikrobiologicznych dodatkowo identyfikujących związki potencjalnie przeciwbakteryjne z wykorzystaniem bioautografii metodą agaru górnego z bakteriami *S. aureus* na płytkach TLC. Analiza potwierdziła, że uzyskana wcześniej galokatechina (związek 4) wykazuje działanie przeciwbakteryjne w stosunku do szczepu *S. aureus*. Galokatechina może więc być jednym z głównych związków odpowiedzialnych za aktywność przeciwbakteryjną ekstraktu metanolewego z kłączy *I. pseudacorus*. Dodatkowo, zostaje opisana obecność (metoda HPLC-DAD-ESI-MS) w badanym ekstrakcie innych związków w tym pochodnych prodelfinidyny B, które również mogą wpływać na aktywność biologiczną w tym na ocenianą w badaniu aktywność przeciwbakteryjną.

Ostatnim etapem w badaniach była ocena aktywności cytotoksycznej wybranego ekstraktu z kłączy *I. pseudacorus*, z wykorzystaniem trzech linii ludzkich komórek nowotworowych: MCF-7 (nowotwór gruczołu piersiowego), HeLa (nowotwór szyjki macicy), HCT-116 (nowotwór okrężnicy) oraz nienowotworowej linii: MCF-10A (komórki nabłonkowe gruczołu piersiowego). Najwyższą cytotoksyczność uzyskano wobec komórek linii MCF-7 w porównaniu do 3,7-krotnej niższej wrażliwości unieśmiertnionych komórek nabłonka gruczołu piersiowego (MCF-10A). **Prawidłowo przeprowadzony powyższy eksperyment nasuwa pytanie o wybór linii komórkowych do badań w aspekcie biodostępności związków o charakterze polifenoli oraz ich aktywnych metabolitów. Czy nie warto byłoby w przyszłości zastosować na przykład wybraną linię komórkową czerniaka skóry?**

Niezwykle wysoko oceniam rangę i znaczenie tych bez wątpienia wielokierunkowych badań podjętych w zespole badawczym Pani Prof. Aleksandry Królickiej i Jej współpracowników przedstawionych przez mgr Angelikę Michalak. Lektura dysertacji

uprawnia mnie do stwierdzenia, że Doktorantka wykazała się wyjątkową zdolnością w opanowaniu ogromnej ilości nowatorskich technik pracy w laboratorium nie tylko biotechnologicznym i fitochemicznym ale i biologicznym. Przedstawione w monografii poszczególne etapy badań jak i wyniki zostały zestawione z niebywałą starannością, a ich obszernie opisanie potwierdzają dojrzałość i dociekliwość badawczą Doktorantki oraz wysoką umiejętność rozwiązywania problemów badawczo-naukowych. Moją uwagę skupiły również ręcznie wykonane ryciny, co jednocześnie bardzo uwierzytelnia wysoki wkład włożony w uzyskanie tak obszernych wyników badań.

Przedstawione w recenzji komentarze nie wpływają na moją pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr Angeliki M. Michalak. Przedstawiono w niej szereg interesujących, nowych i ważnych dla nauki obserwacji. Wszystkie zostały rzeczowo przedyskutowane w oparciu o dobrą znajomość bardzo aktualnych danych literaturowych. Poza danymi literaturowymi monografia ma typowy układ pracy doktorskiej z zachowaniem poszczególnych jej elementów w tym bardzo dobrze przygotowanego wstępu pracy uwzględniającego omówienie znaczenia metabolizmu wtórego u roślin, poprzez zagadnienia związane bezpośrednio z roślinnymi kulturami tkankowymi w kontekście biotechnologicznym, a kończąc na opisie gatunków z rodzaju *Iris* L. W mojej ocenie to bardzo interesujący materiał poznawczy.

Kończąc swoją opinię, chciałbym również zwrócić uwagę na dotychczasowy dorobek naukowy mgr Angeliki Michalak obejmujący między innymi autorstwo i współautorstwo dwóch prac oryginalnych o łącznym współczynniku $IF_{2020} = 9.1$ (pkt MEiN=170), dwunastu doniesień zjazdowych oraz jednego patentu. Wyrazem bardzo jeszcze wczesnego zaangażowania naukowego oraz przygotowania do pracy naukowej jest otrzymanie stypendium „Diamentowy Grant” - Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Projekt nr 0145/DIA/2015/44, pt. „Terapeutyczne zastosowanie metabolitów wtórnych roślin rodzaju *Iris*. Wydajne pozyskiwanie, analiza i zastosowanie ekstraktów aktywnych biologicznie” oraz grantu uzyskanego w Konkursie dla Młodych Pracowników Nauki w roku 2017 jako kierownik projektu, nt. „Opracowanie metod syntezy nanocząstek srebra o działaniu biologicznie czynnym przy użyciu *Iris pseudacorus* jako czynnika redukującego”.

Podsumowując, jednoznacznie stwierdzam, że przedstawiona do oceny monografia rozprawy doktorskiej mgr Angeliki Małgorzaty Michalak jest niezwykle wartościowa zarówno z naukowego jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Wnoszę tym samym do Rady

Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Angeliki Małgorzaty Michalak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z racji na wysoką wartość merytoryczną rozprawy wnoszę o jej wyróżnienie.



Michał Tomczyk