

*Rodzinie najbliższej i rodzinie z wyboru.
Bez Was byłabym człowiekiem bez sensu,
a jak wskazują naukowe obserwacje,
bez sensu trudniej jest przeżyć niż bez jedzenia.*



**Uniwersytet
Gdański**



Uniwersytet Gdański,
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Rozprawa doktorska

mgr Angelika Małgorzata Michalak

**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.

Praca przedstawiona
Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego
celem uzyskania stopnia doktora
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych
w dyscyplinie nauki biologiczne.

Promotor dr hab. inż. Aleksandra Królicka, prof. UG
Zakład Badania Związków Biologicznie Czynnych

Gdańsk 2021

**Praca naukowa powstała dzięki
finansowaniu ze środków:**



**Diamantowy
Grant**

budżetowych na naukę w latach 2015-2019 jako projekt badawczy w ramach programu pod nazwą „Diamantowy Grant”,
Projekt nr 0145/DIA/2015/44,

„Terapeutyczne zastosowanie metabolitów wtórnych roślin rodzaju Iris. Wydajne pozyskiwanie, analiza i zastosowanie ekstraktów aktywnych biologicznie.”;



**Uniwersytet
Gdański**

grantowych uzyskanych w wyniku
Konkursu dla Młodych Pracowników Nauki 2017

„Opracowanie metod syntezy nanocząstek srebra o działaniu biologicznie czynnym przy użyciu Iris pseudacorus jako czynnika redukującego.”;



środków na Działalność Statutową
dla Zakładu Badania Związków Biologicznie Czynnych,
Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed.

Spis treści

1.	Wykaz skrótów	9
2.	Streszczenie.....	12
3.	Abstract.....	15
4.	Wstęp.....	18
4.1.	Znaczenie metabolizmu wtórnego u roślin	18
4.2.	Roślinne metabolity wtórne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym	18
4.3.	Kultury <i>in vitro</i> roślin jako narzędzie do rozmnażania klonalnego i pozyskiwania związków biologicznie czynnych.....	20
4.3.1.	Kultury <i>in vitro</i> organów roślinnych – korzeni anatomicznych i korzeni włóśnikowatych	22
4.4.	Infekcje bakteryjne i choroby nowotworowe jako globalny problem w ochronie zdrowia	25
4.4.1.	Problem antybiotykooporności bakterii	25
4.4.2.	Roślinne metabolity wtórne jako związki przeciwdrobnoustrojowe	26
4.4.3.	Związki pochodzenia roślinnego w terapiach przeciwnowotworowych.....	28
4.5.	Rośliny z rodzaju <i>Iris</i>	30
4.5.1.	Charakterystyka i znaczenie gatunku <i>Iris pseudacorus</i>	31
4.5.2.	Ekstrakty i metabolity wtórne z tkanek <i>I. pseudacorus</i>	33
5.	Hipoteza badawcza i uzasadnienie wyboru problematyki badawczej.....	35
6.	Cele pracy	38
7.	Materiały i metody.....	40
7.1.	Kultury <i>in vitro</i> roślin <i>I. pseudacorus</i>	40
7.1.1.	Pożywki do hodowli roślin i tkanek <i>I. pseudacorus</i>	40
7.1.2.	Podstawowe warunki hodowli.....	40
7.1.3.	Sterylizacja nasion i wprowadzenie roślin <i>I. pseudacorus</i> do kultury <i>in vitro</i>	40
7.1.4.	Długoterminowa hodowla <i>I. pseudacorus</i> w systemie okresowo-zalewowym <i>Plantform</i>	42
7.1.5.	Długoterminowa hodowla roślin w systemie okresowo-zalewowym w kolumnie bioreaktora barbotażowego	42
7.1.6.	Elicytacja biosyntezy związków fenolowych w tkankach <i>I. pseudacorus</i> w kulturach <i>in vitro</i>	45
7.1.7.	Inicjacja kultury pędów	46
7.1.8.	Inicjacja kultury korzeni anatomicznych. Analiza potencjalnych czynników wpływających na utrzymywanie się korzeni <i>I. pseudacorus</i> w kulturze <i>in vitro</i>	47
7.2.	Transformacja roślin z wykorzystaniem bakterii <i>Rhizobium rhizogenes</i> (<i>Agrobacterium rhizogenes</i>).....	48
7.2.1.	Inokulacja roślin bakteriami niosącymi plazmid Ri.....	48

7.2.2. Izolacja DNA plazmidowego z <i>R. rhizogenes</i> metodą lizy alkalicznej.....	50
7.2.3. Izolacja DNA genomowego z tkanek roślinnych.....	52
7.2.4. Analiza PCR genomowego DNA wyizolowanego z roślin transformowanych.....	53
7.3. Ekstrakcja roślinnych metabolitów wtórnych.....	55
7.3.1. Materiał roślinny.....	55
7.3.2. Ekstrakcja metabolitów wtórnych z liofilizowanych tkanek.....	55
7.3.3. Ekstrakcja tanin.....	56
7.3.4. Ekstrakcja metabolitów wtórnych z pożywki MS po hodowli korzeni anatomicznych.....	58
7.3.5. Ekstrakcja wodna ze świeżej tkanki – z roślin z hodowli w glebie.....	58
7.3.6. Frakcjonowanie ekstraktu metanolowego z kłączy <i>I. pseudacorus</i>	58
7.4. Analiza aktywności biologicznej ekstraktów – aktywność przeciwbakteryjna.....	59
7.4.1. Przygotowanie bakterii – patogenów ludzkich.....	59
7.4.2. Przygotowanie bakterii <i>R. rhizogenes</i>	60
7.4.3. Przygotowanie ekstraktów do analizy aktywności przeciwbakteryjnej.....	60
7.4.4. Analiza aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów metanolowych i wodnych wobec patogennych bakterii w kulturach planktonicznych.....	61
7.4.5. Analiza aktywności przeciwbiofilmowej ekstraktu metanolowego z kłączy <i>I. pseudacorus</i>	61
7.4.6. Analiza rodzaju interakcji pomiędzy ekstraktami z tkanek <i>I. pseudacorus</i> a nanocząstkami srebra w stosunku do wybranych patogenów ludzkich.....	62
7.5. Analiza aktywności biologicznej ekstraktów – aktywność cytotoksyczna.....	63
7.6. Analiza składu metabolicznego ekstraktów.....	64
7.6.1. Pomiar całkowitej zawartości związków fenolowych i tanin w kłączach <i>I. pseudacorus</i>	64
7.6.2. Hydroliza ekstraktów w środowisku kwasowym – określenie charakteru tanin.....	64
7.6.3. Pomiar całkowitej zawartości związków fenolowych w ekstraktach z tkanek roślin elicytowanych i roślin poddanych transformacji.....	65
7.6.4. Analiza statystyczna.....	65
7.7. Analiza chromatograficzna ekstraktów – chromatografia cienkowarstwowa, bioautografia metodą agaru górnego oraz wysokosprawną chromatografią cieczową.....	65
7.7.1. Wzorce.....	65
7.7.2. Jednokierunkowa chromatografia TLC.....	66
7.7.3. Dwukierunkowa chromatografia TLC.....	66
7.7.4. Bioautografia metodą agaru górnego.....	67
7.7.5. Warunki wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją diodową w świetle UV-VIS oraz detekcją masową (ESI-MS).....	67
7.7.6. Analiza chromatograficzna ekstraktów i frakcji z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej.....	68

7.7.7. Izolacja i identyfikacja związków aktywnych, w tym związków przeciwbakteryjnych, w ekstrakcie z pożywki po hodowli korzeni <i>I. pseudacorus</i> (ekstrakt C).....	68
7.7.8. Izolacja i identyfikacja związku przeciwbakteryjnego z ekstraktu z kłączy <i>I. pseudacorus</i> (frakcji A-O).....	69
7.8. Synteza nanocząstek srebra z wykorzystaniem ekstraktów z tkanek <i>I. pseudacorus</i> . Charakterystyka uzyskanych struktur.....	69
7.8.1. Ekologiczna synteza nanocząstek srebra z wykorzystaniem ekstraktów z tkanek <i>I. pseudacorus</i>	69
7.8.2. Analiza wielkości i kształtu nanocząstek z wykorzystaniem Transmisyjnego Mikroskopu Elektronowego (TEM).....	70
7.8.3. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR).....	70
7.8.4. Spektroskopia UV-VIS	70
7.8.5. Analiza dynamicznego rozpraszania światła (DLS).....	71
7.8.6. Analiza aktywności przeciwbakteryjnej nanocząstek srebra uzyskanych z wodnego ekstraktu z korzeni <i>I. pseudacorus</i> (ekstrakt E).....	71
8. Wyniki i dyskusja.....	73
8.1. Wprowadzenie roślin <i>I. pseudacorus</i> do kultury <i>in vitro</i> . Transformacja, inicjacja kultury pędów i kultury korzeni anatomicznych.....	73
8.1.1. Wprowadzenie roślin <i>I. pseudacorus</i> do kultury <i>in vitro</i>	73
8.1.2. Transformacja roślin <i>I. pseudacorus</i> za pomocą bakterii <i>R. rhizogenes</i>	73
8.1.3. Inicjacja kultury pędów	77
8.1.4. Autonomiczna kultura <i>in vitro</i> korzeni anatomicznych <i>I. pseudacorus</i>	82
8.2. Biosynteza związków biologicznie czynnych w kulturze korzeni anatomicznych <i>I. pseudacorus</i>	87
8.3. Kłącza <i>I. pseudacorus</i> są źródłem związków o aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwbiofilmowej.....	94
8.3.1. Analiza rodzaju interakcji pomiędzy ekstraktami z tkanek <i>I. pseudacorus</i> a nanocząstkami srebra w stosunku do wybranych patogenów ludzkich.....	98
8.4. Analiza składu ekstraktów	100
8.4.1. Całkowita zawartość związków fenolowych i tanin. Określenie charakteru tanin występujących w kłączy <i>I. pseudacorus</i>	100
8.4.2. Identyfikacja związków przeciwbakteryjnych z wykorzystaniem bioautografii oraz izolacja związku aktywnego z ekstraktu z kłączy <i>I. pseudacorus</i> (ekstrakt A).....	103
8.5. Aktywność cytotoksyczna ekstraktów z kłączy <i>I. pseudacorus</i> na ludzkich liniach komórkowych.....	107
8.6. Analiza aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów z tkanek <i>I. pseudacorus</i> uzyskanych z kultur <i>in vitro</i>	109
8.7. Wpływ elicytacji na zawartość związków fenolowych w tkankach roślin <i>I. pseudacorus</i> z kultur <i>in vitro</i>	111
8.8. Wykorzystanie ekstraktów wodnych z tkanek <i>I. pseudacorus</i> do ekologicznej syntezy przeciwbakteryjnych nanocząstek srebra	114

8.8.1. Synteza, analiza mikroskopowa (TEM) oraz obserwacja stabilności w roztworze nanocząstek srebra.....	114
8.8.2. Analiza UV-VIS nanocząstek srebra.....	116
8.8.3. Analiza FT-IR i DLS.....	117
8.8.4. Aktywność przeciwbakteryjna nanocząstek srebra uzyskanych w syntezie z ekstraktem z korzeni <i>I. pseudacorus</i> (ekstrakt E).....	119
9. Wnioski.....	122
10. Bibliografia.....	125
11. Suplement.....	145
12. Wykaz tabel.....	150
13. Wykaz fotografii.....	151
14. Wykaz rysunków.....	152
15. Wykaz wykresów.....	153
16. Upowszechnianie wyników oraz dorobek naukowy.....	155
17. Podziękowania.....	160

Wykaz skrótów



1. Wykaz skrótów

- atm.** – atmosfera, jednostka ciśnienia
- ACN** – acetonitryl
- AgNPs** – nanocząstki srebra (ang. *silver nanoparticles*)
- BAP** – 6-benzyloaminopuryna, cytokinina, regulator wzrostu roślin
- BHI** – bulion mózgowo-rdzeniowy (ang. *Brain Heart Infusion*)
- BSA** – surowicza albumina bydlęca (ang. *Bovine Serum Albumin*)
- CFU** – jednostka formująca kolonię (ang. *Colony-Forming Unit*)
- CTAB** – bromek heksadecylotrimetyloamoniowy
- DLS** – dynamiczne rozpraszania światła,
(ang. *Dynamic Light Scattering*)
- dNTPs** – trójfosforany deoksyrybonukleozydów
- DMSO** – dimetylosulfotlenek
- EDTA** – kwas wersenowy (etylenodiaminotetraoctowy)
- FBCi** – wskaźnik interakcji pomiędzy dwoma substancjami przeciwbakteryjnymi
(ang. *Fractional Bactericidal Concentration index*)
- FT-IR** – spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera
(ang. *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*)
- GA₃** – kwas giberelinowy, regulator wzrostu roślin
- HPLC-DAD-ESI-MS** – wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją diodową oraz określeniem masy cząstek z jonizacją za pomocą elektrozpylenia
(ang. *High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry*)
- HPTFE** – hydrofilizowany poli(tetrafluoroetylen) – rodzaj filtra strzykawkowego
- HPTLC** – wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa
(ang. *High Performance Thin Layer Chromatography*)
- IAA** – kwas indoliloctowy, auksyna, regulator wzrostu roślin
- IC₅₀** – stężenie związku przy którym dochodzi do zahamowania proliferacji komórek o 50% (ang. *half maximal inhibitory concentration*)
- LC** – chromatografia cieczowa (ang. *Liquid Chromatography*)
- NAA** – kwas 1-naftyloctowy, auksyna, regulator wzrostu roślin
- NPs** – nanocząstki (ang. *nanoparticles*)
- NP/PEG** – odczynnik do wykrywania flawonoidów: 1% roztwór difenyloboryloksyetyloamina w metanolu oraz 5% roztwór poli(etylenoglikolu) 400 w etanolu
- MBC** – minimalne stężenie bakteriobójcze
(ang. *Minimum Bactericidal Concentration*)
- MBEC** – minimalne stężenie eliminujące biofilm
(ang. *Minimum Biofilm Eradication Concentration*)
- McF** – skala McFarlanda (ang. *McFarland standards*)

MIC	– minimalne stężenie hamujące wzrost mikroorganizmów (ang. <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
MS	– Murashige i Skoog – podstawowa pożywka do hodowli roślin
MTT	– (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy
m/z	– stosunek masy cząsteczkowej do ładunku zjonizowanej cząstki
OD	– gęstość optyczna (ang. <i>Optical Density</i>)
PCR	– łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PTFE	– poli(tetrafluoroetylen), składnik filtra strzykawkowego
PVP	– poli(winylopirolidon)
pz	– pary zasad, jednostka długości cząsteczek DNA
R_F	– współczynnik opóźnienia (ang. <i>retardation factor</i>)
Ri	– plazmid infekcyjny bakterii z gatunku <i>Rhizobium rhizogenes</i>
rpm	– obroty na minutę (ang. <i>revolutions per minute</i>)
SA	– siarczan adeniny
sach.	– sacharoza
SDS	– dodecylosiarczan sodu, detergent
Sh	– pik na bocznej stronie głównego piku (ang. <i>shoulder peak</i>)
SIM	– obserwacja wybranych jonów (ang. <i>Selected Ion Monitoring</i>)
SM	– sucha masa tkanki wykorzystana do przygotowania ekstraktu roślinnego
TDZ	– tidiazuron, regulator wzrostu
THF	– tetrahydrofuran
TIS	– bioreaktor okresowo-zalewowy (ang. <i>Temporary Immersion System</i>)
TLC	– chromatografia cienkowarstwowa (ang. <i>Thin Layer Chromatography</i>)
Tris	– Tris (hydroksymetylo)aminometan
tys.	– tysiąc

Streszczenie



2. Streszczenie

Rośliny to przedstawiciele organizmów eukariotycznych, pozbawionych możliwości aktywnego przemieszczania się. Na drodze ewolucji wykształciły więc mechanizmy chemicznej interakcji z otoczeniem w postaci metabolitów wtórnych, które umożliwiają im przetrwanie w trudnych, zmiennych warunkach środowiska, jak również prowadzenie interakcji z innymi organizmami. Metabolity wtórne wytwarzane w tkankach roślinnych wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznych, dzięki czemu rośliny mogą, m.in. wabić owady, odstraszać roślinożerców, czy też bronić się przed patogennymi mikroorganizmami. Związki te oddziałują również na liczne cele molekularne w organizmie ludzkim. Dlatego też stały się obszarem badań nad możliwością ich wykorzystania jako substancji leczniczych.

W niniejszej pracy doktorskiej podjęto analizę możliwości wykorzystania szeroko rozpowszechnionego gatunku roślin *Iris pseudacorus* (kosaciec żółty) jako źródła związków biologicznie czynnych. Podjęto analizy aktywności ekstraktów uzyskanych z tkanek tych roślin hodowanych w glebie oraz w kulturach *in vitro*. Wykazano, że ekstrakty pozyskane z kłączy *I. pseudacorus* wykazują działanie przeciwbakteryjne w zakresie od 1,25 do 50 mg suchej masy tkanki/mL w stosunku do bakterii z gatunków: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli*, zarówno szczepów referencyjnych, jak również wrażliwych i opornych izolatów klinicznych. Wykazano, że ekstrakt pozyskany z kłączy *I. pseudacorus*, w stężeniu tylko ok. 2,5-krotnie wyższym niż w przypadku bakterii hodowanych w kulturze planktonicznej, jest skuteczny w zwalczaniu biofilmu *S. aureus*.

Analizy aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów z kosaćca żółtego poszerzono o badania ich interakcji z przeciwbakteryjnymi nanocząstkami srebra (AgNPs). Badania te miały dostarczyć informacji, czy możliwe jest zmniejszenie dawek obu czynników przeciwbakteryjnych, przy jednoczesnym zwiększeniu ich aktywności biologicznej (oddziaływanie synergistyczne). Łączenie różnych substancji przeciwbakteryjnych ma na celu skuteczniejszą walkę z drobnoustrojami i ograniczenie nabywania przez nie oporności. Przeprowadzone badania wykazały aktywność bliską synergii, po zastosowaniu ekstraktów z kosaćca żółtego i AgNPs, względem *P. aeruginosa* oraz antagonizm w działaniu przeciwko *S. aureus*.

Badania wykazały również aktywność cytotoksyczną ekstraktów metanolowych z kłączy *I. pseudacorus* względem ludzkich komórek nowotworowych linii: HeLa (szyjki macicy), HCT-116 (okrężnicy), MCF-7 (piersi) oraz nienowotworowej MCF-10A (nabłonkowe gruczołu piersiowego). Najwyższą skuteczność cytotoksyczną uzyskano w wyniku zastosowania ekstraktu wobec

komórek linii MCF-7 ($IC_{50} = 11,75 \pm 0,7 \mu\text{g}$ suchej masy ekstraktu/mL). Uzyskany wynik wskazał na ok. 3,7-krotnie wyższą aktywność cytotoksyczną w stosunku do komórek nowotworowych w porównaniu do komórek z nienowotworowej linii kontrolnej MCF-10A ($IC_{50} = 44 \pm 1 \mu\text{g}$ suchej masy ekstraktu/mL).

W ramach realizacji pracy doktorskiej opracowano również metodę mikrorozmnażania *I. pseudacorus* przez stymulację hipokotyli oraz model kultury tkankowej korzeni anatomicznych. Wykazano, że kultury korzeni kosańca żółtego syntetyzują związki fenolowe z grupy izoflawonów, w tym przeciwbakteryjną iristektorigeninę B i niezidentyfikowany, przeciwbakteryjny dimetoksydihydroksy-izoflawon. Ponadto, dzięki zastosowaniu chromatografii cienkowsarstwowej (TLC) oraz bioautografii techniką agaru górnego wykazano obecność związków aktywnych w stosunku do *S. aureus* w pożywce po hodowli *in vitro* korzeni anatomicznych *I. pseudacorus*. Podjęto również działania prowadzące do uzyskania kultur korzeni włóśnikowatych z wykorzystaniem transformacji rośliny za pośrednictwem bakterii *Rhizobium rhizogenes*. Uzyskano roślinę transformowaną (teratom), co zostało potwierdzone na poziomie molekularnym, ale tkanki irysa nie wytwarzały korzeni włóśnikowatych.

Szczegółowe analizy składu metabolicznego ekstraktów przeprowadzone z wykorzystaniem TLC oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją diodową oraz określeniem masy cząstek z jonizacją za pomocą elektrorozpylania (HPLC-DAD-ESI-MS) wykazały obecność licznych związków fenolowych, w tym tanin i izoflawonów. Wśród nich zidentyfikowano genisteinę, daidzeinę oraz iristektorigeniny B, a także zidentyfikowano związek działający przeciwbakteryjnie: galokatechinę.

Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują na potencjał gatunku *I. pseudacorus* jako źródła cennych związków o aktywności biologicznej.

Abstract



3. Abstract

Plants are representatives of eukaryotic organisms that cannot actively move. However, in the course of evolution, they developed mechanisms of chemical interaction with the environment – secondary metabolites. They enable them to survive in difficult, changing environmental conditions and to interact with other organisms in their surroundings. Secondary metabolites produced in plant tissues exhibit a wide range of biological activities. They can be used i.e.: to attract insects, discourage herbivores or defend plants against pathogenic microorganisms. These compounds also affect numerous molecular targets in the human body, which is the reason why they have become an area of extensive research.

This doctoral dissertation presents a wide range of analyses regarding the possibility of using plants of the species *Iris pseudacorus* (yellow flag iris) as a source of biologically active compounds. The activity of extracts obtained from the tissues of these plants grown in soil and in *in vitro* cultures were analysed. It has been shown that extracts obtained from rhizomes of *I. pseudacorus* have an antibacterial activity ranging from 1.25 to 50 mg of dry tissue weight/mL against bacteria from the species: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, both for reference strains as well as sensitive and resistant clinical isolates. It has been shown that the extract from *I. pseudacorus* rhizomes, in a concentration approx. 2.5-fold higher than in the case of bacteria grown in planktonic culture, is effective in combating *S. aureus* biofilm.

The analyses of the antibacterial activity of yellow flag iris extracts were extended to the study of their interaction with antimicrobial silver nanoparticles (AgNPs). These studies were performed to verify if combination of extract and AgNPs can give synergistic interaction (to reduce the doses of both antibacterial agents while increasing their biological activity). Combining different antibacterial substances can increase efficiency against microorganisms, limiting the possibility of gaining resistance. Studies have shown an activity close to synergy between extract from iris rhizomes and AgNPs against *P. aeruginosa* and antagonism in the activity against *S. aureus*.

The studies also showed the cytotoxic activity of methanolic extracts from *I. pseudacorus* rhizomes against the human cancer cell lines: HeLa (cervical), HCT-116 (colon), MCF-7 (breast) and non-cancerous MCF-10A (mammary gland epithelial cells). The highest cytotoxic efficacy was obtained against cells from MCF-7 line ($IC_{50} = 11.75 \pm 0.7 \mu\text{g}$ of dry extract/mL). The obtained result indicated

about 3.7-fold higher cytotoxic activity in relation to neoplastic cells as compared to cells from the non-neoplastic MCF-10A control line ($IC_{50} = 44 \pm 1 \mu\text{g dry extract/mL}$).

As a part of the doctoral thesis, a method of micropropagation of *I. pseudacorus* by stimulation of hypocotyls and a model of tissue culture of anatomical roots were developed. Anatomical root culture of yellow flag iris have been shown to synthesise phenolic compounds from isoflavone group, including the antibacterial iristectorigenin B and unidentified dimethoxy-dihydroxy-isoflavone. Moreover, thanks to the use of thin layer chromatography (TLC) and bioautography (soft top agar technique), the presence of active compounds against *S. aureus* in the post-culture medium was demonstrated.

To obtain hairy roots of *I. pseudacorus*, *Rhizobium rhizogenes* bacteria were used. Instead of hairy roots, a transformed shoot (teratoma) was obtained.

Detailed analyses of the metabolic composition of extracts using TLC and High Performance Liquid Chromatography with diode detection and particle mass determination with electrospray ionization (HPLC-DAD-ESI-MS) revealed the presence of numerous phenolic compounds, including tannins and isoflavones. Among them, genistein, daidzein and iristectorigenin B were identified. An antibacterial compound from rhizome extract was identified as galocatechin.

The obtained results clearly indicate the potential of the *I. pseudacorus* species as a valuable source of biologically active compounds.

Wstęp



4. Wstęp

4.1. Znaczenie metabolizmu wtórnego u roślin

Rośliny, podobnie jak wszystkie organizmy żywe, opierają swoje istnienie na metabolizmie, czyli cyklach przemian materii i energii, prowadzonych w celu podtrzymania podstawowych funkcji życiowych, takich jak: wzrost, odżywianie, akumulacja zapasów energetycznych, wymiana gazowa czy rozmnażanie (Dewick, 2009). Produkty pierwotnych przemian mogą podlegać dalszym modyfikacjom dając początek często bardzo skomplikowanym związkom – metabolitom wtórnym, które bezpośrednio nie są wykorzystywane do wzrostu i rozwoju roślin (Bernardini i in., 2018; Verpoorte i Alfermann, 2000).

Metabolity wtórne pełnią istotną rolę adaptacyjną. Odpowiadają one za komunikację z organizmami symbiotycznymi poprzez wydzielanie związków do otoczenia. Zapewniają również ochronę przed roślinożercami, patogenami, insektami, promieniowaniem UV, czy zmiennymi warunkami zasobów wodno-mineralnych. Metabolity wtórne biorą pośrednio udział we wzroście roślin poprzez działanie regulatorów wzrostu. Zapewniają ciągłość rozmnażania poprzez wabienie owadów i ptaków zapachem i kolorem kwiatów (Dixon, 2001; Michael, 2010; Wink, 2010). Dzięki swoim właściwościom związki te pozwalają roślinom przystosować się do niekorzystnych warunków środowiskowych i zasiedlać różnorodne nisze ekologiczne.

4.2. Roślinne metabolity wtórne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym

Rośliny, aby móc skutecznie prowadzić interakcję z otoczeniem, musiały dostosować produkowane przez siebie związki do oddziaływania z różnorodnymi celami molekularnymi w komórkach innych organizmów. Na drodze ewolucji powstało więc wiele związków roślinnych, które wchodzą w interakcję z receptorami, białkami, enzymami, kwasami nukleinowymi i innymi biomolekułami (Wink, 2010). Ich struktury oraz grupy funkcyjne bardzo często przypominają endogenne związki syntetyzowane w innych organizmach, imitując, m.in. substraty, neuroprzekaźniki, czy hormony, co czyni je skutecznymi w wywoływaniu podobnej odpowiedzi biologicznej lub blokowaniu możliwości jej wywołania poprzez związki dedykowane do tego pierwotnie w organizmie gospodarza (Hunter, 2008; Wink, 2010).

Rośliny są nie tylko źródłem materiału budulcowego, czy związków odżywczych, ale również substancji biologicznie czynnych o właściwościach

lecniczych (Sneader, 2005). Początkowo ekstrakty, a od początku XIX wieku, po wyizolowaniu pierwszego metabolitu – morfiny, także pojedyncze związki, stały się podstawą produkcji nowych leków. Znaleźć je można w składzie suplementów, leków, kosmetyków czy żywności (Fu i in., 1999; Gurib-Fakim, 2006; Prassas i Diamandis, 2008; Rates, 2001). Tylko w latach 1981-2010 na 1135 zatwierdzonych do użytku nowych leków, zaledwie 36% stanowiły leki czysto syntetyczne. Ponad 50% stanowiły natomiast związki pochodzenia naturalnego, pochodne tych związków, bądź ich analogi (Newman i Cragg, 2012). Wiele substancji wiodących w lekach wywodzi się właśnie ze związków odkrytych w roślinach (Kinghorn i in., 2011), a chemiczna synteza *de novo* nie była w stanie całkowicie ich zastąpić.

Szacuje się, że na świecie występuje ok. 400 000 gatunków roślin, z czego tylko ok. 20% scharakteryzowano pod względem składu chemicznego. Około 28 000 wykorzystywanych jest do celów medycznych (Willis, 2017), stanowiąc źródło związków biologicznie czynnych lub będąc częścią mieszanin i preparatów wykorzystywanych szczególnie w krajach, w których dostęp do zaawansowanych środków leczniczych jest ograniczony (Payyappallimana i Subramanian, 2015; World Health Organisation, 2013). Każdego roku przybywa doniesień naukowych na temat kolejnych około 2 000 nowych gatunków roślin (Willis, 2017). Wielu jednak z nich nie będziemy w stanie wykorzystać do celów pozyskiwania związków biologicznie czynnych, ze względu na ich pochodzenie, warunki hodowli, endemiczność, czy występowanie na terenach podlegających ścisłej ochronie. Nie brakuje też problemów z uwierzytelnianiem gatunków roślin i poprawnym ich nazewnictwem, nawet w takich opracowaniach jak narodowe farmakopee (Willis, 2017). Nie bez znaczenia są tu też zmiany klimatu i związane z nimi zdarzenia takie jak: powodzie, pożary, drastyczne zmiany temperatury czy wysychanie terenów (Gupta i in., 2019; Willis, 2017), które zmniejszają pulę dostępnych nowych związków. Niemniej jednak wiele łatwo dostępnych gatunków roślin, pomimo oznaczenia w nich niektórych metabolitów wtórnych, nie zostały jeszcze scharakteryzowane pod względem aktywności biologicznej zawartych w nich metabolitów i ich potencjalnego zastosowania. Na uwagę zasługuje powinny rośliny o szybkim przyroście biomasy, szeroko rozpowszechnione, odporne na trudne, zmienne warunki klimatyczne i środowiskowe, a przy tym nie będące dotychczas w puli roślin intensywnie wykorzystywanych jako źródło pokarmu lub substratów dla przemysłu. W obliczu intensywnego rozwoju i zwiększonego zainteresowania przemysłu związkami pochodzenia roślinnego, mając na względzie ochronę przed nadmierną eksploatacją zasobów naturalnych, poza poszukiwaniem nowych i łatwo dostępnych źródeł w naturze, konieczna jest ich dywersyfikacja. Jednym

z dodatkowych źródeł, które można rozpatrywać w kontekście pozyskiwania związków pochodzenia roślinnego są kultury tkankowe i komórkowe *in vitro*.

4.3. Kultury *in vitro* roślin jako narzędzie do rozmnażania klonalnego i pozyskiwania związków biologicznie czynnych

Roślinne kultury *in vitro*, od momentu pierwszego ich zastosowania (Haberlandt, 1943) otworzyły nowe ścieżki możliwości wykorzystania roślin przez człowieka i stały się narzędziem zarówno w badaniach podstawowych, jak również aplikacyjnych. Umożliwiły masową, klonalną propagację najcenniejszych bądź zagrożonych gatunków, w sposób niezależny od ich naturalnego cyklu życiowego, w ściśle kontrolowanych warunkach. Stały się również narzędziem do uwalniania roślin od patogenów oraz do wprowadzania modyfikacji genetycznych. Przede wszystkim pozwoliły jednak na zwiększenie skali pozyskiwania związków aktywnych biologicznie (Altpeter i in., 2016; Debnath i in., 2006; Karuppusamy, 2009; Thorpe, 2007). Intensywne badania prowadzone od lat 60. XX wieku doprowadziły do pojawienia się na rynku pierwszych metabolitów wtórnych pochodzących z kultur tkankowych *in vitro*. Wśród nich znalazły się m.in. skopolamina, kwas rozmarynowy, szikonina czy berberyna (Deno i in., 1987; Fu i in., 1999; Sato i Yamada, 1984). Sztandarowym przykładem wykorzystania kultur *in vitro* do pozyskiwania drogocennych substancji leczniczych jest historia substancji przeciwnowotworowej – paklitakselu. Związek ten, po odkryciu w 1966 roku, wyizolowaniu i opisanu przez Wani i współpracowników (1971), początkowo izolowano z kory naturalnie rosnącego cisa krótkolistnego (*Taxus brevifolia*). Stężenie tego związku w suchej masie, wynosi tylko ok. 0,01%. Szacuje się, że na potrzeby jednej dawki terapeutycznej dla pojedynczego pacjenta potrzebne było uzyskanie 300 mg tego związku z 3 kg kory 100 letniego drzewa (Horwitz, 1994). W przypadku nawet tak kluczowego chemioterapeutyku jakim jest paklitaksel, pozyskiwanie tego związku z naturalnych źródeł było ekonomicznie i ekologicznie nieuzasadnione, ze względu na długi cykl życiowy tej rośliny. Synteza chemiczna, pomimo przeprowadzenia jej z sukcesem, okazała się wysoce skomplikowana i charakteryzowała się znaczącą utratą wydajności niemal na każdym jej etapie. Potwierdzona skuteczność działania paklitakselu na liniach komórek nowotworowych i późniejsze sukcesy w badaniach klinicznych w leczeniu nowotworów, stały się motorem napędowym do prac nad uzyskaniem wielkoskalowej biosyntezy tego związku aktywnego. W rezultacie, badania doprowadziły do uzyskania komórek zawiesinowych syntezujących zarówno paklitaksel, jak również jego prekursor bakkatynę III. Związek ten z kolei dużo łatwiej jest przekształcić chemicznie do końcowego produktu, niż prowadzić

syntezę *de novo*. W 2002 roku zdolności produkcyjne w fermentorach dla komórek roślinnych dostarczających paklitaksel i jego prekursor wynosiły 75 000 L i stanowią wielomilionowy zysk z produkcji chemioterapeutyków (Tabata, 2004). Wciąż podejmowane są próby zwiększenia skali produkcji paklitakselu poprzez wykorzystanie inżynierii genetycznej i przeniesienie syntezy do nie-roślinnych systemów ekspresji, głównie mikroorganizmów. Jak dotąd nie udało się jednak zastąpić całkowicie roślinnych kultur *in vitro* komórek zawieszinowych *T. brevifolia*.

Synteza związków aktywnych bądź ich prekursorów w kulturach *in vitro* umożliwiła nie tylko wprowadzenie kontroli nad czystością mikrobiologiczną, ale także, jak pokazuje powyższy przykład, umożliwiła uniezależnienie produkcji od dostępności materiału pochodzącego ze środowiska naturalnego. Przede wszystkim pozwoliła na biosyntezę prowadzoną w sposób bardziej przewidywalny, powtarzalny i ściśle kontrolowany. Poprawie uległa wydajność procesów biosyntezy za sprawą zastosowaniu elicytorów, odpowiedniej pożywki hodowlanej, modyfikacji genetycznych, doboru odpowiednich metod hodowli, w tym immobilizacji komórek czy wykorzystania odpowiednich bioreaktorów i fermentorów (Hussain i in., 2012; Murthy i in., 2014; Paek i in., 2014; Thakur i in., 2019). Niestety liczba metabolitów wtórnych komercyjnie pozyskiwanych z kultur tkankowych i komórkowych do celów farmaceutycznych jest nadal niska. Związane jest to przede wszystkim z wysokimi wymaganiami tej branży, zarówno w kwestii wydajności procesów uzyskiwania związków aktywnych, jak również ich czystości i jakości. Nie oznacza to jednak, że zainteresowanie kulturami *in vitro* roślin jest małe. Innowacje i rozwój innych gałęzi przemysłu, szczególnie kosmetycznego, pociągają za sobą wzrost zapotrzebowania na składniki pochodzenia roślinnego. Wzrastająca świadomość konsumencka, troska o zrównoważony rozwój i środowisko, chęć korzystania z produktów skutecznych i bezpiecznych, o często egzotycznym pochodzeniu składników (m.in. z roślin endemicznych), będzie napędzać wykorzystanie roślinnych kultur *in vitro* (Fonseca-Santos i in., 2015). Ekstrakty z komórek roślinnych zawierające mieszaninę składników aktywnych biologicznie są już z powodzeniem stosowane w recepturach kosmetycznych. Warto też wspomnieć, że ekstrakty z roślin stosowane są w kosmetykach w minimalnym stężeniu, wystarczającym aby zachować ich pozytywny wpływ na skórę (Barbulova i in., 2015). Niskie stężenia związków uzyskiwanych w kulturach *in vitro* są tu mniej krytyczne, niż w przypadku zastosowań farmaceutycznych, zwłaszcza gdy w grę wchodzi potencjalne oddziaływanie synergistyczne pomiędzy składnikami ekstraktu.

Świat stoi w obliczu malejącej bioróżnorodności na skutek działań antropogenicznych, w tym zmian klimatu i nadmiernej eksploatacji zasobów naturalnych. Rosnące zapotrzebowanie na składniki pochodzenia roślinnego: barwniki, aromaty, dodatki do żywności, związki biologicznie czynne, składniki kosmetyczne oraz potrzeba posiadania rozległych terenów uprawnych dla roślin będących źródłem pożywienia, będą wymuszały poszukiwanie alternatywnych rozwiązań. Jak wskazują badania, kultury *in vitro* oraz metody biotechnologiczne mogą stać się kluczowym źródłem potrzebnych związków aktywnych (Eibl i in., 2018). Rozwój narzędzi inżynierii genetycznej umożliwiających modyfikację roślin będzie niewątpliwie ważnym czynnikiem wpływającym na postępy w przemysłowym pozyskiwaniu związków aktywnych, w tym z roślinnych kultur *in vitro*. Podejmując analizę potencjału zastosowania nowych gatunków roślin kluczowe jest więc sprawdzenie czy możliwe będzie utrzymanie jej w warunkach laboratoryjnych.

4.3.1. Kultury *in vitro* organów roślinnych – korzeni anatomicznych i korzeni włóśnikowatych

Kulturą najczęściej wykorzystywaną do masowej produkcji metabolitów wtórnych w warunkach *in vitro* jest zawiesina komórkowa. Biosynteza związków w tego typu kulturze nie zawsze jest jednak możliwa, głównie ze względu na specyficzną tkankową syntezę niektórych związków. Z tego też powodu, jako rozwiązanie alternatywne, rozwijane są inne metody prowadzenia kultur, w tym: pędów, korzeni czy embrionów (Baque i in., 2012; Giri i Narasu, 2000; Murthy i in., 2008; Verpoorte i in., 2002). W kulturach organów, struktura organu i jego integralność pozostają nienaruszone. Umożliwia to nie tylko badanie procesów komórkowych, ale również pozyskiwanie związków aktywnych. Pierwszymi kulturami *in vitro* izolowanych organów były kultury korzeni pomidora zainicjowane przez White'a (1934). Zapoczątkował on ścieżkę rozwoju kultur tkankowych, w tym kultur korzeni. Prowadzono na nich zarówno badania podstawowe, jak również analizowano możliwość pozyskiwania związków biologicznie czynnych (Bais i in., 2001; Loyola-Vargas i Miranda-Ham, 1995; Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002). Ze względu na ograniczone w tamtym czasie możliwości zwiększania skali produkcji związków biologicznie czynnych w kulturach korzeni, od lat 50. ubiegłego wieku zostały one niejako zapomniane na rzecz wydajniejszej zawiesiny komórkowej. Nie rozwiązało to jednak problemów specyficzności tkankowej biosyntezy, czy możliwej niestabilności genetycznej w kulturze (nazywanej zmiennością somaklonalną),

w niezróżnicowanych, szybko dzielących się komórkach w zawiesinie bądź kalusie.

Wraz z uzyskaniem pierwszej transformowanej kultury korzeni włóśnikowatych, powróciło też zainteresowanie naukowe kulturami korzeni (Tepfer, 1984). Ten specyficzny rodzaj kultury uzyskiwany jest dzięki wykorzystaniu bakterii z gatunku *Rhizobium rhizogenes* (dawniej *Agrobacterium rhizogenes*). Bakteria ta, zdolna do infekcji uszkodzonej rośliny, wykorzystuje fragment swojego DNA (T-DNA), zlokalizowanego w obrębie plazmidu Ri (ang. *root inducing*), aby po jego integracji do DNA genomowego rośliny i poprzez ekspresję tzw. onkogenów obecnych na integrowanym fragmencie, doprowadzić do wzrostu korzeni włóśnikowatych. Charakteryzują się one szybszym przyrostem biomasy niż korzenie anatomiczne, nie wykazują przyrostu wtórnego oraz mają zaburzony geotropizm (wzrastają w kierunku niezależnym względem wektora grawitacji) (Pistelli i in., 2010). Korzenie włóśnikowate wykazują wyższą stabilność genetyczną oraz charakteryzują się stabilniejszą produkcją metabolitów wtórnych, w porównaniu do niezróżnicowanych komórek zawiesinowych (Häkkinen i in., 2016; Peebles i in., 2009). Korzenie włóśnikowate są ważnym narzędziem do pozyskiwania związków biologicznie czynnych, szczególnie tych, których biosynteza zachodzi w sposób specyficzny w korzeniach anatomicznych. Są one zdolne do akumulacji metabolitów wtórnych, często w wyższych stężeniach, niż miało to miejsce w roślinie macierzystej, czy zawiesinie komórkowej, czego przykładem jest m.in. biosynteza alkaloidów (Rao i Ravishankar, 2002; Sevón i Oksman-Caldentey, 2002). Badania prowadzone z wykorzystaniem kultur korzeni *Withania somnifera* wykazały z kolei, że przeprowadzenie transformacji i uzyskanie korzeni włóśnikowatych pozwoliło na 2,7-krotne podniesienie w tkankach stężenia terpenoidu – witaloidu A, niż miało to miejsce w korzeniach nie poddanych transformacji (Murthy et al., 2008a). Kultura korzeni włóśnikowatych może być dobrym układem do aseptycznego pozyskiwania cennych metabolitów bez konieczności suplementowania kultury regulatorami wzrostu. Z jednej strony wpływa to na obniżenie kosztów utrzymania hodowli, z drugiej zaś obniża prawdopodobieństwo wystąpienia niekorzystnej zmienności somaklonalnej w kulturze. Korzenie włóśnikowate z powodzeniem utrzymuje się i namnaża w bioreaktorach (Stiles i Liu, 2013), co zwiększa ich wartość w masowej produkcji związków pochodzenia roślinnego.

Transformacja roślin za pośrednictwem bakterii z gatunku *R. rhizogenes* nie jest jednak narzędziem doskonałym i możliwym do zastosowania w każdym przypadku. Przede wszystkim, nie każdy gatunek roślin jest na nią podatny. Transformacja jest szczególnie trudna w przypadku roślin jednoliściennych, które

w naturze wykazują niższą wrażliwość na infekcję *R. rhizogenes* (Porter i Flores, 1991). Ważnym aspektem jest również fakt, że integracja fragmentu T-DNA do genomu rośliny zachodzi w sposób losowy (Tzfira i in., 2004), w różnej liczbie kopii. Każdy uzyskany korzeń włósnikowaty traktowany jest jako odrębny klon i wymaga niezależnej analizy fitochemicznej, co jest procesem czasochłonnym. Skuteczna transformacja potwierdzona obecnością T-DNA w genomie rośliny nie zawsze też prowadzi do wzrostu korzeni włósnikowatych (Porter i Flores, 1991). Z transformowanej tkanki możliwe jest jednak uzyskanie transformowanych pędów, tzw. teratomów, które podobnie jak w przypadku korzeni, mogą wykazywać zwiększoną biosyntezę, bądź akumulację cennych metabolitów wtórnych (Krolicka i in., 2010). W sytuacji, w której zarówno uzyskanie kultury korzeni włósnikowatych, jak również prowadzenie innego typu kultur (zawiesina, kalus, hodowla całych roślin) jest utrudnione lub niemożliwe, rozwiązaniem mogą okazać się kultury organów. Wśród nich najczęstsze są kultury pędów i korzeni.

Kultury korzeni, głównie przybyszowych, uzyskuje się poprzez organogenezę bezpośrednią bądź pośrednią, dzięki stymulacji tkanek odpowiednią kombinacją roślinnych regulatorów wzrostu, głównie auksyn (Geiss i in., 2009). Stymulacja regulatorami wzrostu ma za zadanie pobudzić komórki do przekształcenia się w organ i pozostania w tej formie przez cały czas pozyskiwania związków aktywnych, bez wykształcania innych organów i regeneracji w całą roślinę. Nietransformowane korzenie przybyszowe z powodzeniem uzyskano już dla wielu gatunków roślin leczniczych umożliwiając tym samym przeniesienie skali produkcji metabolitów wtórnych z hodowli w kulturze płynnej z wytrąsaniem w kolbach do skali półtechnicznej bądź technicznej w bioreaktorach (Baque i in., 2012; Murthy i in., 2008). Co więcej, dotychczasowe badania wskazują, że kultura korzeni przybyszowych może dostarczać nie tylko większej biomasy niż w przypadku zawiesiny komórkowej czy kalusa, ale również pozwala na uzyskanie wyższego stężenia związków biologicznie czynnych (Baque i in., 2012; Cui i in., 2013).

Poza kulturami korzeni przybyszowych inicjowanych z kalusa, możliwe jest także wykorzystanie korzeni odciętych bezpośrednio od rośliny (ang. *excised root culture*) (Butcher i Street, 1964; Marín i Marín, 1998). Korzenie takie wykazują wzrost w pożywce z udziałem (Sugimoto i Ueyama, 2008), bądź też bez udziału zewnętrznych regulatorów wzrostu (Jeziorek i in., 2019). Niezależnie od sposobu uzyskiwania kultury korzeni, jej głównym zastosowaniem jest biosynteza związków biologicznie czynnych, które pozyskiwać można zarówno z tkanek, jak również z pożywki po ich hodowli (Baque i in., 2012; Loyola-Vargas i Miranda-Ham, 1995).

4.4. Infekcje bakteryjne i choroby nowotworowe jako globalny problem w ochronie zdrowia

4.4.1. Problem antybiotykooporności bakterii

Choroby powodowane przez infekcje bakteryjne, zaraz po chorobach nowotworowych, to jedna z najczęstszych przyczyn zgonów, w rejonach świata, w których dostęp do podstawowej opieki medycznej i nowoczesnych terapii jest ograniczony (Ritchie i Roser, 2020; Roser i Ritchie, 2020). W krajach o niskich dochodach, w 2019 roku, choroby infekcyjne znalazły się wśród najczęstszych przyczyn zgonów (WHO, 2020). Problem infekcji nie omija krajów o średnich i wysokich dochodach. Według raportu Europejskiego Centrum Kontroli Chorób (ECDC), 330 000 ludzi na terenie Unii Europejskiej i terenie krajów z obszaru ekonomicznego Europy (EEA) umiera każdego roku bezpośrednio z powodu infekcji wywołanych zakażeniem bakteryjnymi szczepami opornymi na antybiotyki (Cassini i in., 2019). Jest to przyczyna zgonu porównywalna swoim zakresem do śmiertelności wywołanej łącznie przez grypę, gruźlicę i HIV/AIDS. Dane opublikowane przez WHO podkreślają, że wśród chorób infekcyjnych, największy problem stanowi właśnie lekooporność patogenów. W skali globalnej prowadzi ona do ok. 700 000 zgonów rocznie, a wartość ta ma szansę wzrosnąć do nawet 10 milionów do 2050 roku (WHO 2018, 2019). Koszty wynikające z problemu antybiotykooporności, w tym leczenia i hospitalizacji, w samej tylko Europie wynoszą ok. 9 miliardów euro rocznie (Llor i Bjerrum, 2014; Prestinaci i in., 2015) i rosną wraz ze wzrostem liczby zakażeń.

Antybiotyki są lekami pierwszego wyboru w leczeniu zakażeń bakteryjnych u ludzi i zwierząt. Od momentu ich wynalezienia pod koniec lat 20. XX wieku, stały się najważniejszym czynnikiem redukującym śmiertelność wynikającą z zakażeń bakteryjnych. W ślad jednak za kolejnymi nowymi antybiotykami zaobserwowano pojawienie się niepokojącego zjawiska jakim jest nabywanie przez mikroorganizmy oporności na stosowane metody ich zwalczania. Na globalny problem antybiotykooporności miały wpływ zarówno zwiększona migracja ludności, intensywne, często nieuzasadnione stosowanie antybiotyków u ludzi i zwierząt, ale również złe warunki sanitarne, w tym słaby dostęp do kanalizacji i oczyszczania ścieków, szczególnie w krajach o niskich i średnich dochodach (Singer i in., 2016). Zanieczyszczenie środowiska antybiotykami to warunki idealne do wytworzenia presji selekcyjnej, głównej siły napędowej do pojawienia się wielolekoopornych szczepów bakterii. Analizy wskazują, że największy udział w nadużywaniu antybiotyków ma przede wszystkim hodowla zwierząt (Van Boeckel i in., 2015). Pomimo wprowadzenia w 2005 roku przez Unię Europejską

zakazu stosowania antybiotyków do celów niemedycejskich (Komisja Europejska, 2005) ich zużycie nadal pozostaje wysokie.

Na rosnący problem antybiotykooporności ma także wpływ ograniczone tempo odkrywania nowych grup antybiotyków i rozwiązań terapeutycznych. Od lat 70. ubiegłego wieku tempo to drastycznie zmalało. W przeciągu ostatnich 30 lat tylko dwie klasy nowych leków zostały zatwierdzone do wykorzystania w lecznictwie i wprowadzone na rynek: oksazolidon i lipopeptydy, stosowane przeciwko bakteriom Gram (+) (Abreu i in., 2012). W przypadku bakterii Gram (-) wprowadzono jedynie lek kombinowany: Zerbaxa, będący inhibitorem β -laktamazy, złożonym z dwóch antybiotyków: ceftalozonu i tazobaktamu (Cheesman i in., 2017).

W walce z problemem antybiotykooporności samo odkrywanie nowych antybiotyków jest już niewystarczające. Kluczowym staje się stosowanie zróżnicowanych metod działania, np. poprzez wspieranie terapii antybiotykowych związkami przeciwbakteryjnymi, które oddziałują jednocześnie na różne cele molekularne lub blokują mechanizmy oporności (Brooks i Brooks, 2014). Poszukiwane są więc między innymi, rozwiązania oparte o oddziaływania synergistyczne. Łączenie dwóch lub więcej czynników przeciwbakteryjnych pozwala zarówno obniżać toksyczność dla człowieka dzięki zmniejszeniu dawki leków, przy jednoczesnym zwiększeniu ich skuteczności (Berenbaum, 1978). Do takich związków należą m.in. nanocząstki srebra (AgNPs). Są to metaliczne, trójwymiarowe struktury o wymiarach do 100 nm, uzyskane w wyniku redukcji jonów srebra i ustabilizowaniu ich przed agregacją za pomocą polimeru lub ligandów (Lee i Jun, 2019). AgNPs znajdują zastosowanie jako pojedyncze czynniki przeciwbakteryjne (Durán i in., 2016), ale możliwe jest ich łączenie z innymi związkami, w tym z antybiotykami (Ahmad i in., 2020; Panáček i in., 2016; Phitaktim i in., 2016), czy też ekstraktami roślinnymi (Krychowiak i in., 2014). Co więcej, możliwa jest też ich ekologiczna synteza np. z wykorzystaniem ekstraktów roślinnych (Banasiuk i in., 2020; Loo i in., 2012; Rónavári i in., 2017). Pozwala to obniżyć zarówno koszty syntezy, jak również zużycie toksycznych odczynników.

4.4.2. Roślinne metabolity wtórne jako związki przeciwdrobnoustrojowe

Wykorzystanie roślin jako źródła związków przeciwdrobnoustrojowych, dezynfekcyjnych i konserwujących znane było jeszcze przed odkryciem mikroorganizmów. Bazując na praktyce ich użycia zaobserwowano, że zastosowanie niektórych roślin poprawiało stan zdrowia ludzi zmagających się z infekcjami. Sok z żurawiny i berberysu stosowane w zakażeniu dróg moczowych,

czy też czosnek i wyciąg z drzewa herbacianego posiadające szerokie spektrum aktywności przeciwbakteryjnej, znajdują się od lat w podręcznikach do fitoterapii (Heinrich i in., 2004) i stosowane są do dziś. W składzie ekstraktów pozyskiwanych z wyżej wymienionych roślin znajdują się związki aktywne wchodzące w interakcję z mikroorganizmami, prowadząc do zaburzenia ich komunikacji, zapobiegając ich przyleganiu do powierzchni, czy też bezpośrednio działając na nie bakteriobójczo (Cowan, 1999).

W wielu rejonach świata, zwłaszcza w krajach o niskich dochodach gdzie dostęp do podstawowej opieki medycznej i leków jest nadal ograniczony, ok. 70-80% populacji korzysta z substancji leczniczych pochodzących ze źródeł naturalnych, głównie roślin (WHO, 2002). Zainteresowanie naturalnymi źródłami związków, w tym o aktywności przeciwbakteryjnej, nie ogranicza się tylko do tych regionów. Nasilający się problem antybiotykooporności, jak również wzrastający trend w zastosowaniu naturalnych środków konserwujących lub wzbogacających żywność i kosmetyki, przywrócił zainteresowanie roślinami jako źródła substancji aktywnych. W samych tylko Stanach Zjednoczonych w 2008 roku wydatki mieszkańców na produkty medycyny tradycyjnej bądź chińskiej wyniosły 14,4 miliarda dolarów (Nahin i in., 2009). Szacuje się, że wartość rynku samych tylko ekstraktów roślinnych do 2025 roku może osiągnąć 59,4 miliardy dolarów („Plant Extracts Market by Type - Global Forecast to 2025”, 2019).

Wykorzystanie ekstraktów i związków pochodzenia roślinnego rozpatrywane jest nie tylko w kontekście zastosowania farmaceutycznego, ale również jako naturalnych dodatków w produkcji żywności i kosmetyków. Na rynku znane są już komercyjne produkty pochodzenia roślinnego, których zadaniem jest zabezpieczanie produktu przed rozwojem mikroorganizmów. Wśród nich znajdują się wyciąg z bambusa (*Phyllostachys edulis*) oferowany pod nazwą Takeguard™ przez firmę Takex Labo (Osaka, Japan), czy też przeciwpleśniowa mieszanina naturalnych ekstraktów Biovia™ YM10 zawierająca między innymi ekstrakt z zielonej herbaty (Chibane i in., 2018).

Szeroko zakrojone badania wśród 50 najpopularniejszych roślin o znaczeniu medycznym z 26 różnych rodzin wykazały, że w 72% badanych gatunków znaleźć można związki o aktywności przeciwbakteryjnej. Aktywność ta skierowana była zarówno przeciwko bakteriom Gram (+) jak i Gram (-) (Srinivasan i in., 2001). Związki pochodzenia roślinnego wykazujące aktywność przeciwdrobnoustrojową należą przede wszystkim do flawonoidów, alkaloidów, terpenów, fenoli, polifenoli lub kumaryn.

Metabolity wtórne roślin oddziałują z mikroorganizmami zarówno bezpośrednio, najczęściej przez niespecyficzne wiązanie z białkami, destabilizację

blon komórkowych i zwiększanie ich przepuszczalności, oddziaływanie na kanały transblonowe i pompy efflux, jak również ograniczając przyleganie czy zaburzając komunikację opartą o *quorum sensing* (Borges i in., 2013; Cowan, 1999; Rios i Recio, 2005; Savoia, 2012). Bliższe poznanie struktur i mechanizmów działania związków pochodzenia roślinnego stwarza możliwości ich chemicznej modyfikacji, w celu podwyższenia ich skuteczności. To z kolei rozszerza ich potencjał w zastosowaniu do produkcji nowych leków.

Związki pochodzenia roślinnego mogą także wchodzić w interakcje synergistyczne z innymi składnikami ekstraktów, a także innymi związkami przeciwbakteryjnymi, m.in. antybiotykami (Sakagami i in., 2005), czy też nanocząstkami srebra (Krychowiak i in., 2014, 2018). Pozwala to obniżyć dawki substancji przy jednoczesnym zwiększeniu ich skuteczności. Co więcej związki pochodzenia roślinnego mogą pełnić funkcję ko-terapeutyków oraz tzw. czynników modyfikujących oporność (Abreu i in., 2012). Poprzez oddziaływanie z innymi celami komórkowymi, czy też inhibicją mechanizmów oporności bakterii, umożliwiają zastosowanie znanych już antybiotyków przeciwko bakteriom, które są już na nie odporne. Przykładem może być tu zastosowanie α -mangostyny izolowanej z owoców mangostanu (Phitaktim i in., 2016; Sakagami i in., 2005), czy też kaempferolu lub kwercetyny (Siriwong i in., 2016), które w połączeniu z antybiotykiem z grupy β -laktamów wykazywały oddziaływanie synergistyczne, zwiększając skuteczność terapeutyczną antybiotyków, w stosunku do szczepów opornych na β -laktamy.

4.4.3. Związki pochodzenia roślinnego w terapiach przeciwnowotworowych

Choroby nowotworowe, zaraz po chorobach układu krążeniowo-oddechowego, są jedną z najczęstszych przyczyn zgonów wśród ludzi na świecie. Tylko w 2018 roku zarejestrowano ok. 9,6 miliona zgonów oraz 18,1 miliona nowych przypadków zachorowań wywołanych przez nowotwory (Bray i in., 2018). Szacuje się, że do 2030 roku liczba przypadków śmiertelnych spowodowanych bezpośrednio przez nowotwory ma wzrosnąć do 27,1 miliona, zwłaszcza w krajach o wysokim dochodzie (Bray i in., 2018; Fitzmaurice i in., 2017). Czynniki wpływające na wzrost wskaźników zachorowania na nowotwory są złożone. Obejmują swym zakresem przede wszystkim wydłużenie czasu życia (Bray i in., 2018; Roser i Ritchie, 2015). Nie bez znaczenia pozostają także czynniki związane bezpośrednio ze stylem życia: palenie papierosów, nadużywanie alkoholu, nieprawidłowa dieta czy też zanieczyszczenie środowiska (Bray i in., 2018; Maule i Merletti, 2012). Niezależnie od przyczyny, nowi pacjenci będą potrzebowali skutecznych i bezpiecznych metod leczenia.

W ciągu ostatnich kilku dekad liczba dostępnych terapii przeciwnowotworowych poszerzyła się o wiele nowych metod i związków aktywnych. Wśród nich znajdują się leki biologiczne, leczenie hormonalne, immunoterapia i nowoczesna chemioterapia (Cancer Research UK, 2017). Nadrzędnym celem badań jest wprowadzanie na rynek skutecznych i bezpiecznych metod leczenia, o możliwie niskiej toksyczności i minimalnym działaniu niepożądanym (Sporn i Liby, 2005). Niestety, większość z dostępnych obecnie chemioterapeutyków charakteryzuje się wąskim oknem terapeutycznym z powodu niskiej selektywności względem komórek nowotworowych (Kratz i in., 2008), co wymusza dalsze poszukiwanie nowych związków i rozwiązań.

Związki pochodzenia roślinnego stanowią ważną gałąź rozwoju leków przeciwnowotworowych. Szacuje się, że dotychczas ponad 3 000 gatunków roślin wykorzystywanych było w terapiach przeciwnowotworowych (Kaur i in., 2011). Substancje wykryte w roślinach wykorzystywane były w leczeniu jako pojedyncze związki lecznicze, bądź stanowiły podstawę do produkcji całkowicie nowych związków. Wśród najbardziej rozpowszechnionych znajdują się taksany, w tym paklitaksel i jego pochodne, alkaloidy barwinka różyczkowego, inhibitory topoizomerazy z grupy epipodofilotoksyn, czy też pochodne alkaloidów chinolinowych (Amin i in., 2009; Iqbal i in., 2017; Kaur i in., 2011; Lichota i Gwozdziński, 2018; Solowey i in., 2014). Związki roślinne, dzięki analizie ich budowy i interakcji z innymi cząsteczkami, stanowią platformę do projektowania nowych, skutecznych, półsyntetycznych związków, o poprawionej selektywności i lepszej biodostępności, niż związki pierwotnie izolowane (Lichota i Gwozdziński, 2018). Nowoczesne narzędzia bioinformatyczne przyczyniają się natomiast do zwiększania tempa prowadzenia badań przesiewowych wśród związków opisywanych w roślinach, dzięki analizie podobieństwa z już dostępnymi na rynku, bądź badanymi substancjami aktywnymi przeciwnowotworowo (Dai i in., 2016).

Związki pochodzenia roślinnego wykazują najczęściej więcej niż jedną aktywność biologiczną mogąc jednocześnie oddziaływać na wiele celów molekularnych (Wink, 2010). W sposób pośredni mogą więc chronić przed nowotworami, osłaniać zdrowe tkanki lub wspierać działania terapeutyczne. Na szczególną uwagę zasługują właściwości przeciwtleniające, przeciwzapalne, ochronne dla komórek wątroby, immunomodulujące i chemoprewencyjne (Farombi i Owoeye, 2011; Ramawat i Goyal, 2009; Wollenweber i in., 2003; Yang i in., 2018). Podobnie jak miało to miejsce w przypadku wykorzystania substancji pochodzenia roślinnego do zwalczania mikroorganizmów, metabolity wtórne mogą również oddziaływać w sposób synergistyczny z innymi chemioterapeutykami lub uwrażliwiać komórki nowotworowe na inne leki (Ni i in.,

2018; Shao i in., 2013), poprawiając tym samym skuteczność działania stosowanych substancji leczniczych.

4.5. Rośliny z rodzaju *Iris*

Rośliny z rodzaju *Iris* są jedną z najpopularniejszych rodzin roślin ozdobnych spotykanych w ogrodach. Rodzaj ten obejmuje ok. 300 gatunków (Başer i in., 2011). Charakteryzują się one łatwością uprawy, trwałością i okazałym wyglądem kwiatów. Dzięki temu zyskały popularność wśród hodowców. Irysy cieszą się również zainteresowaniem ze względu na możliwość ich wykorzystania w przemyśle. Wśród nich najpopularniejsze gatunki: *Iris florentina*, *Iris pallida* i *Iris germanica*, stanowią źródło ekstraktów wykorzystywanych do aromatyzowania potraw, jako dodatek do ginu (Blue Sapphire, Magellan Blue), czy też jako źródło drogocennej esencji (ang. *orris root absolute*) do produkcji perfum i kosmetyków jako aromat i środek utrwalający inne zapachy (Crişan i Cantor, 2016). Ze względu na obecność w ich tkankach licznych związków, które korzystnie wpływają na kondycję skóry (działanie przeciwzmarszczkowe, ujędrniające i rozjaśniające przebarwienia), stały się obiektem ochrony patentowej w zastosowaniach kosmetycznych (Breton i in., 2002; Devilard i in., 2014). Co więcej, związki biologicznie czynne z irysów wykorzystywane do produkcji kosmetyków, z powodzeniem pozyskiwane są już z kultur *in vitro* komórek zawieszinowych (Georgiev i in., 2018).

Irysy są bogatym źródłem związków biologicznie czynnych: terpenoidów, ksantonów i związków fenolowych, wśród których największy udział mają flawonoidy i izoflawony (Kaššák, 2012; Kukula-Koch i in., 2015; Mykchailenko i Kovalyov, 2016; Wang i in., 2010; Wollenweber i in., 2003). Jak wskazują badania, rodzaj *Iris*, zaraz po rodzinie bobowatych (*Fabaceae*), jest jednym z największych znanych źródeł bioaktywnych izoflawonów. Związki dotychczas izolowane z tkanek irysów wykazywały właściwości estrogenowe, ochronne na komórki wątroby, przeciwnowotworowe, przeciwtelniające i przeciwzapalne (Basgedik i in., 2014; Chen i in., 2018; Fang i in., 2008; Kim i in., 2012; Mohamed i in., 2013; Rehab, 2017; Rigano i in., 2009; Telang i in., 2013; Wollenweber i in., 2003). Co więcej, przynajmniej jeden ze związków - tektorigenina, izolowany z *I. germanica*, znalazł zastosowanie w opatentowanej już, farmaceutycznej recepturze wykorzystywanej w leczeniu chorób hormonozależnych (Wuttke i in., 2002). Dane literaturowe wskazują również, że rośliny z rodzaju *Iris* mogą być źródłem związków o aktywności przeciwbakteryjnej. Analiza ekstraktów z kłaczy takich gatunków jak *Iris pseudopumila* czy *I. germanica* wykazały, że zawierają one związki hamujące wzrostu bakterii Gram (+), m.in. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*

i Gram (-) takich jak *Pseudomonas aeruginosa* czy *Escherichia coli* (Ibrahim i in., 2012; Orhan i in., 2003; Rigano i in., 2006).

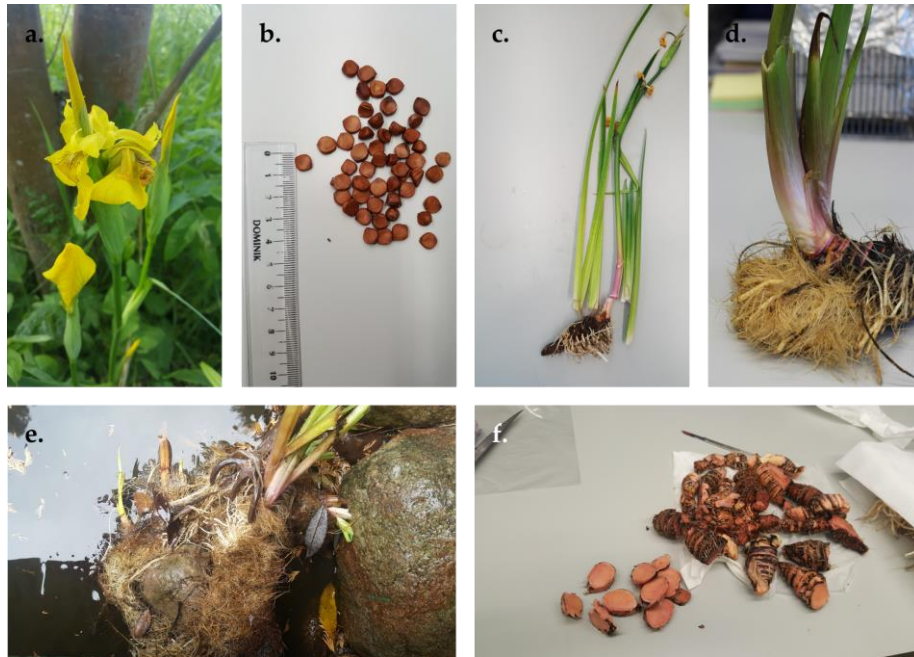
Rośliny z rodzaju *Iris* z powodzeniem wprowadzane były do kultur *in vitro*. Eksplantatami do inicjacji kultur były zazwyczaj liście (Stanišić i in., 2015) oraz korzenie (Akashi i in., 2005; Laublin i in., 1991). W dotychczasowych badaniach prezentowanych w literaturze naukowej, głównym punktem wyjścia było zastosowanie embriogenezy bądź organogenezy pośredniej przez stadium kalusa. Irysy regenerowano także z kultury protoplastów (Hida i in., 1999), jak również z kultury komórek zawieszinowych (Wang i in., 1999). Jak dotąd nie opisano możliwości zastosowania organogenezy bezpośredniej do mikrorozmnażania roślin z rodzaju *Iris*.

4.5.1. Charakterystyka i znaczenie gatunku *Iris pseudacorus*

Iris pseudacorus (kosaciec żółty), to wieloletnia, okrytonasienna, jednoliścienna bylina z rodziny kosaćcowatych (*Iridaceae*) zasiedlająca różnorodne środowiska, głównie zasobne w wodę. Występuje na mokradłach, brzegach rzek, jezior, stawów, cieków wodnych, w rowach melioracyjnych, ale także w przydomowych ogrodach wodnych (Sutherland, 1990). W środowisku naturalnym dorasta do nawet 1,5 m wysokości. *I. pseudacorus* kwitnie na żółto (**Fotografia 1a**) na przełomie maja i czerwca. Z zapylnych przez owady kwiatów zawiązują się zarodki zamknięte w nasionach (**Fotografia 1b**), które dojrzewają latem i jesienią, by na przełomie listopada i grudnia wysypać się do zimnej wody. Naprzemianległe, podługne, spłaszczone i ostro zakończone liście, odrastają koncentrycznie od podstawy łodygi, która wraz z przyrastaniem młodych liści, przekształcana jest w kłaczę (**Fotografia 1c, 1f**). Jest to główny merystem rośliny, z którego wyrastają kolejne klony irysa. Od kłacza odrastają liczne korzenie przybyszowe, które w sprzyjających warunkach tworzą gęstą sieć wnikającą w głąb podłoża (**Fotografia 1d**). Jest to jedną z przyczyn akumulacji osadów (**Fotografia 1e**), osuszania terenów i wypierania innych gatunków z zasiedlonego przez irysy terytorium.

I. pseudacorus jest gatunkiem rodzimym dla Europy, zachodniej Azji i północnej Afryki (Sutherland, 1990). W rejonach Stanów Zjednoczonych, Kanady, Nowej Zelandii i południowej Afryki uważany jest za gatunek inwazyjny, który rozprzestrzenił się w sposób niekontrolowany z przydomowych ogrodów (Jaca i Mkhize, 2015; Mopper i in., 2016; Sutherland, 1990). Kosaciec żółty rozprzestrzenia się łatwo za pośrednictwem płynącej wody. Jego kruche kłaczę mogą być transportowane z prądem po okresowym zalewaniu terenu (Jaca i Mkhize, 2015; Sutherland, 1990). Szczegółowa analiza wykazała jednak,

że skuteczność rozprzestrzeniania się *I. pseudacorus* w dużo większym stopniu wynika z rozmnażania przez nasiona (Gaskin i in., 2016).



Fotografia 1. Charakterystyka roślin *Iris pseudacorus*. **a.** kwiat; **b.** dojrzałe nasiona o owalnym kształcie, średniej wielkości ok. 8 mm; **c.** pokrój liści i łodygi; **d.** łodyga wraz z kłączem i fragmentami korzeni przybyszowych; widoczne liczne, gęste korzenie boczne; **e.** rozbudowany system korzeniowy z uwiecznionymi osadami; **f.** wygląd oczyszczonych kłączy, które pod wpływem dostępu tlenu zmieniają kolor z biało-żółtego na różowo-czerwony.

Kosaciec żółty jest gatunkiem odpornym na niekorzystne warunki środowiskowe. Porasta tereny ubogie w tlen, szczególnie tereny okresowo-zalewowe, a także stale podmokłe. Posiada wysoką wytrzymałość na niedotlenienie (Hetherington i in., 1983) i toleruje szeroki zakres pH gleby od 3,6 do 7,7 (Sutherland, 1990). Pobiera i akumuluje metale ciężkie (Barbolani i in., 1985; Caldelas i in., 2012), zanieczyszczenia fosforanowe i azotanowe (Chang i in., 2010; Yousefi i Mohseni-Bandpei, 2010), czy też zanieczyszczenia farmaceutykami, np. kodeiną (Mackulak i in., 2015). Z tego też względu gatunek ten rozpatrywany jest w licznych pracach naukowych jako organizm o potencjale w bioremediacji wód i gleby m.in. w konstruowanych, sztucznych mokradłach (ang. *constructed wetlands*) (Larue i in., 2010).

Szerokie rozpowszechnienie tego gatunku jest zarówno jego wadą, jak i zaletą. Ze względu na swój agresywny charakter w zasiedlaniu nisz ekologicznych i wypieraniu gatunków rodzimych ze środowiska, jest uważany za gatunek wysoce inwazyjny i niepożądany (Jaca, 2013; Mopper i in., 2016). W takich miejscach często podlega zwalczaniu za pomocą mechanicznego usuwania bądź

stosowania oprysków (Jacobs i in., 2010). Usuwany materiał nie nadaje się jednak do wykorzystania jako pasza dla zwierząt (USDA, 2013), a biomasa roślinna jest niszczone. Zaletą jest niewątpliwie tempo wzrostu, łatwość uprawy oraz szeroka dostępność.

4.5.2. Ekstrakty i metabolity wtórne z tkanek *I. pseudacorus*

Warunki występowania *I. pseudacorus* oraz jego ekspansywna natura sugerują, że gatunek ten jest źródłem różnorodnych związków biologicznie czynnych, zapewniających mu skuteczną adaptację oraz wysoką konkurencyjność w zasiedlanych niszach ekologicznych (Bonfils i in., 1994; Mikhailenko i in., 2017). Dotychczas opublikowane prace naukowe wskazują na mnogość potencjalnie aktywnych metabolitów syntetyzowanych w tkankach *I. pseudacorus*. W żadnej z prac nie skupiono się jednak na sprawdzeniu ich potencjału przeciwbakteryjnego. Kosaciec żółty w swoich tkankach zawierają bowiem metabolity z grup, w których najczęściej odnajdywane są związki o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, m.in. terpeny, związki fenolowe: kwasy fenolowe, flawonoidy i izoflawony (Marner i in., 1990; Hanawa, Tahara i Mizutani, 1991; Bonfils i in., 1994; Kovalev, 2013; Kaššák, 2014; Tarbeeva i in., 2014, 2015; Mykchailenko i Kovalyov, 2016; Rehab, 2017; Mykchailenko i in., 2020).

Jak dotąd wykazano, że ekstrakty z liści *I. pseudacorus* posiadają aktywność estrogenową zarówno w badaniach na liniach ludzkich komórek nowotworowych MCF-7, posiadających aktywne receptory estrogenowe, jak również w badaniach *in vivo* na szczurzym modelu zwierzęcym (Rehab, 2017). Wykazano także, że zastosowanie ekstraktów z kłączy może stymulować działanie osteoblastów i osteoklastów, wpływając na zmniejszenie resorpcji kości (Kim i in., 2009). Związki polifenolowe izolowane z korzeni *I. pseudacorus* wykazywały zdolność do hamowania proliferacji komórek nowotworowych linii HT-29 (okrężnicy) (Tarbeeva i in., 2015). Obecność w tkankach takich związków jak genisteina i daidzeina (Mykchailenko i Kovalyov, 2016; Mykhailenko i in., 2020) sugerują, że ekstrakty z tkanek *I. pseudacorus* mogą także wykazać działanie hamujące proliferację komórek nowotworu piersi z aktywnymi receptorami estrogenowymi, co potwierdzają badania nad tymi związkami izolowanymi z innych gatunków roślin (Hsieh i in., 1998; Ju i in., 2006; Zhu i in., 2018). Ze względu na powszechność, szybki przyrost biomasy i zakres produkowanych związków aktywnych *I. pseudacorus* wydaje się być bardzo dobrym, potencjalnym źródłem związków biologicznie czynnych.

Hipoteza badawcza



5. Hipoteza badawcza i uzasadnienie wyboru problematyki badawczej

Rośliny Iris pseudacorus mogą stanowić nowe, łatwo dostępne źródło metabolitów wtórnych o szerokim spektrum aktywności biologicznej, w tym przeciwbakteryjnej i przeciwnowotworowej.



Globalne zapotrzebowanie na ekstrakty roślinne nieprzerwanie rośnie i jest ściśle związane z rozwojem przemysłu farmaceutycznego, kosmetycznego i spożywczego. Źródłem materiału mogą być zarówno rośliny z hodowli w glebie, jak również kultury tkankowe i komórkowe prowadzone w warunkach *in vitro*. Na szczególną uwagę zasługiwać powinny gatunki powszechnie występujące, o szybkim przyroście biomasy, niebędące jeszcze masowo wykorzystywane w produkcji leków czy kosmetyków oraz nie będące w puli roślin wykorzystywanych jako składniki pokarmowe. Jednym z gatunków, który spełnia te założenia, jest *I. pseudacorus*. Jako gatunek o szybkim przyroście biomasy, łatwo rozmnażający się w warunkach naturalnych, o wysokiej odporności na niekorzystne warunki środowiskowe, może być rozpatrywany jako źródło związków aktywnych. *I. pseudacorus*, ze względu na możliwość intensywnego zarastania zasiedlonego terenu, często wymaga usuwania go mechanicznie z miejsc niepożądanych – cieków wodnych, rowów melioracyjnych czy też zbiorników wodnych. Ponadto, gatunek ten może być wykorzystywany w bioremediacji wód i gleby zanieczyszczonej m.in. materia organiczną. W obu przypadkach materiał taki, zamiast podlegać zniszczeniu, mógłby być przetwarzany do celów pozyskiwania związków aktywnych na potrzeby przemysłu o niższych wymaganiach czystości niż przemysł farmaceutyczny, zwłaszcza w kontekście prowadzenia działań przemysłowych w myśl zrównoważonego rozwoju.

Liczne doniesienia wskazują, że *I. pseudacorus* jest zasobny w szereg związków fenolowych, a jego odporność na obecność metali ciężkich sugeruje, że gatunek ten może być bogatym źródłem tanin. Związki te, ze względu na swój polimerowy charakter, znajdują już zastosowanie w przemyśle np. drzewnym, do produkcji klejów i wyrobów drewnopochodnych. Na szczególną uwagę zasługuje jednak potencjał farmaceutyczny *I. pseudacorus*. Pomimo powszechności tego gatunku, stosunkowo nieliczne publikacje opisują działanie

biologiczne związków syntezowanych w jego tkankach. Irysy są bogatym źródłem izoflawonów i flawonoidów – związków wykorzystywanych już w wyrobach medycznych i lekach objętych badaniami naukowymi, w tym badaniami klinicznymi, czego przykładem mogą być genisteina i daidzeina.

W przypadku zastosowań farmaceutycznych roślin, konieczna staje się również sprawdzenie możliwości pozyskiwania związków aktywnych z kultur tkankowych *in vitro*. Dotychczasowe badania dotyczące kultur rośliny *I. pseudacorus* są ograniczone, co stwarza przestrzeń do nowych odkryć.

W świetle powyższych argumentów, *I. pseudacorus* wydaje się być odpowiednim kandydatem do szeroko zakrojonych badań nad możliwością wykorzystania tego gatunku jako nowego źródła związków biologicznie czynnych o szerokim spektrum zastosowania.

Cele pracy



6. Cele pracy

Celem niniejszej pracy było określenie użyteczności roślin *Iris pseudacorus* jako źródła związków o aktywności biologicznej.



W tym:

- Opracowanie metod hodowli tkankowej i mikorozmnażania w warunkach *in vitro* roślin z gatunku *I. pseudacorus*, w celu pozyskiwania związków o aktywności biologicznej.
- Analiza aktywności biologicznej (przeciwbakteryjnej i cytotoksycznej) ekstraktów z tkanek roślin *I. pseudacorus* hodowanych w glebie.
- Ocena aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów z tkanek i pożywki pochodzącej z kultur *in vitro*.
- Izolacja i identyfikacja związków biologicznie czynnych, o aktywności przeciwbakteryjnej z roślin *I. pseudacorus*.
- Analiza możliwości wykorzystania ekstraktów z *I. pseudacorus* jako czynnika redukującego w ekologicznej syntezie przeciwbakteryjnych nanocząstek srebra.

Materiały i metody



7. Materiały i metody

7.1. Kultury *in vitro* roślin *I. pseudacorus*

7.1.1. Pożywki do hodowli roślin i tkanek *I. pseudacorus*

Kultury *I. pseudacorus* prowadzono na pożywkach Murashige i Skoog (Murashige i Skoog, 1962): płynnej bądź zestalanej agarem (7 g/L) [Sigma]. Skład podstawowej pożywki prezentuje **Tabela 1**. W zależności od prowadzonego eksperymentu, zmianie ulegały: stężenie sacharozy, ilość dostępnego azotu oraz stosowane dodatki i regulatory wzrostu wymienione w **Tabeli 2**. W celu ograniczenia niekorzystnego wpływu związków fenolowych wydzielanych przez eksplantaty, do wszystkich pożywek (z wyjątkiem pożywki do kiełkowania nasion), stosowano dodatek poli(winylopirolidonu) (PVP) [Sigma], w stężeniu 0,3%. Wartość pH pożywki = 5,8, regulowano przy pomocy 2 M wodorotlenku sodu, bądź 1 M kwasu solnego. Pożywki sterylizowano w autoklawie parowym w temperaturze 121°C, ciśnieniu 1 atm przez 25-40 minut. Czas sterylizacji uzależniony był od ilości przygotowywanej pożywki.

7.1.2. Podstawowe warunki hodowli

Rośliny *I. pseudacorus* w kulturach *in vitro* hodowano w klimatyzowanych pomieszczeniach – fitotronach, w temp. 19-21°C, przy sztucznym białym świetle o natężeniu 80 μmol fotonów $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, w trybie 16 godzin dnia i 8 godzin nocy. Rośliny w pożywkach płynnych, hodowano w kolbach typu Erlenmeyer, o pojemności 250 mL, na wytrząsarkach orbitalnych (110 rpm) [New Brunswick Scientific Innova 2350].

7.1.3. Sterylizacja nasion i wprowadzenie roślin *I. pseudacorus* do kultury *in vitro*

Nasiona *I. pseudacorus* pozyskano z Ogrodu Botanicznego Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu. Przed sterylizacją nasiona poddano 24-godzinnej stratyfikacji w 4°C, w roztworze wodnym gibereliny (GA_3) [Sigma], o stężeniu 50 mg/L. Po stratyfikacji nasiona płukano przez 30 sekund w 70% alkoholu etylowym [POCH]. Jako środek sterylizujący zastosowano 5,25% podchloryn sodu [PPM Cerkamed]. Nasiona inkubowano następnie w podchlorynie przez 10 min, w probówkach osłoniętych od światła, mieszając zawartość systematycznie w odstępach ok. 2 min. Po inkubacji i usunięciu podchlorynu nasiona płukano trzykrotnie jałową wodą demineralizowaną przez: 5, 5 i 15 min.

Tabela 1. Skład podstawowej pożywki Murashige i Skoog (mg/L). Składniki rozpuszczano w wodzie demineralizowanej i uzupełniono do 1000 mL.

**Składniki nieorganiczne - Murashige and Skoog basal medium
[Duchefa Biochemie]***

Makroelementy		Mikroelementy	
KNO ₃	1900,00	H ₃ BO ₃	6,200
KH ₂ PO ₄	170,00	MnSO ₄ ·H ₂ O	16,900
NH ₄ NO ₃	1650,00	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
MgSO ₄	180,54	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
CaCl ₂	332,02	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,600
		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,250
		KI	0,830
Źródło żelaza			
	FeNaEDTA	36,7	
Witaminy			
	chlorowodorek tiaminy	0,1	
	chlorowodorek pirydoksyny	0,5	
	kwas nikotynowy	0,5	
Związki organiczne			
	Glicyna	2	
	m-inozytol	100	
	sacharoza [Chempur]	20000 – 40000	

* Wszystkie składniki poza sacharozą pochodzą z firmy Duchefa Biochemie.

Tabela 2. Składniki dodatkowe oraz regulatory wzrostu zastosowane w pożywkach do hodowli roślin *I. pseudacorus* w kulturach *in vitro*.

Nazwa związku	Stężenie w pożywce
poli(winylopirolidon) (PVP) [Sigma]	0,3%
6-benzyloaminopuryna (BAP) [Sigma]	1-2 mg/L
kwas 3-naftylooctowy (NAA) [Sigma]	0,3-1 mg/L
2-izopentyloadenina (2iP) [Sigma]	2 mg/L
tidiazuron (TDZ) [Sigma]	0,22 mg/L
siarczan adeniny dwuwodny (SA) [Sigma]	80 mg/L
cefotaksyna (claforan) [Polpharma]	500 mg/L
karbenicylina [Roth]	500 mg/L

Sterylnie nasiona umieszczano na pożywce agarowej MS + 2% sacharozy, w szklanych słoikach hodowlanych. Nasiona i kiełkujące rośliny utrzymywane były w fitotronie, w podstawowych warunkach hodowlanych (7.1.2). Po skiełkowaniu, rośliny przenoszone były na pożywkę MS z dodatkiem 0,3% PVP i 2% sacharozy. Wybrane rośliny hodowano również w pożywce płynnej MS z PVP i 40 g/L sacharozy, z wytrząsaniem (7.1.2).

7.1.4. Długoterminowa hodowla *I. pseudacorus* w systemie okresowo-zalewowym *Plantform*

Wybrane rośliny *I. pseudacorus* utrzymywane w pożywce płynnej MS z PVP + 4% sacharozy w hodowli z wytrząsaniem zostały przeniesione do pojemników systemu okresowo-zalewowego *Plantform* (Welander i in., 2014). Celem hodowli było przyspieszenie przyrostu biomasy roślin i przeprowadzenie elicytacji biosyntezy związków fenolowych. Pojemniki napełniane były 500 mL pożywki MS (**Tabela 1**). W każdym pojemniku utrzymywano nie więcej niż dwie rośliny. Poziom pożywki oraz napowietrzanie utrzymywane były za pośrednictwem dwóch pomp powietrza [Hailea], z przepływem dostosowywanym do liczby podłączonych pojemników w zakresie: (I) 2-6 L/min, (II) 1-4 L/min oraz zastawki elektromagnetycznej. Wszystkie urządzenia sterowane były za pomocą kontrolerów czasowych AX300 [Clas Ohlson]. Zalewanie pożywką prowadzone było w 20 cyklach obejmujących swym zakresem 24 godz. Schemat cyklu przedstawiono na **Rysunku 1**. Pożywka wymieniana była co 4 tygodnie przez okres ok. 4 miesięcy.

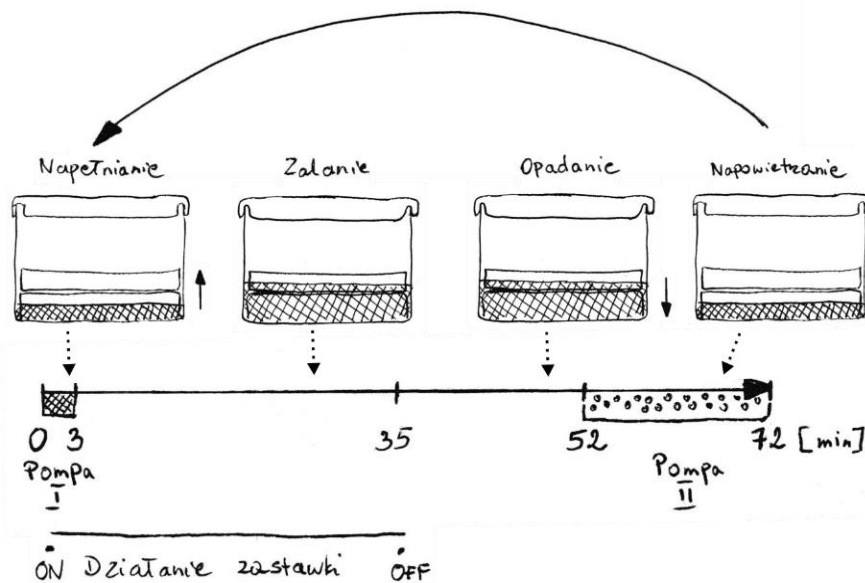
7.1.5. Długoterminowa hodowla roślin w systemie okresowo-zalewowym w kolumnie bioreaktora barbotażowego

System okresowo-zalewowy w kolumnie bioreaktora barbotażowego wykorzystano do prowadzenia hodowli roślin transformowanych oraz nietransformowanych (kontroli). Celem tej hodowli było zapewnienie odpowiedniej przestrzeni wzrostowej do uzyskania biomasy roślin transformowanych pozwalającej na późniejsze wykonanie ekstraktów do analizy całkowitej zawartości związków fenolowych (7.6.1). Szczegóły dotyczące transformacji roślin *I. pseudacorus* bakteriami z gatunku *Rhizobium rhizogenes* przedstawiono w podrozdziale: 7.2.

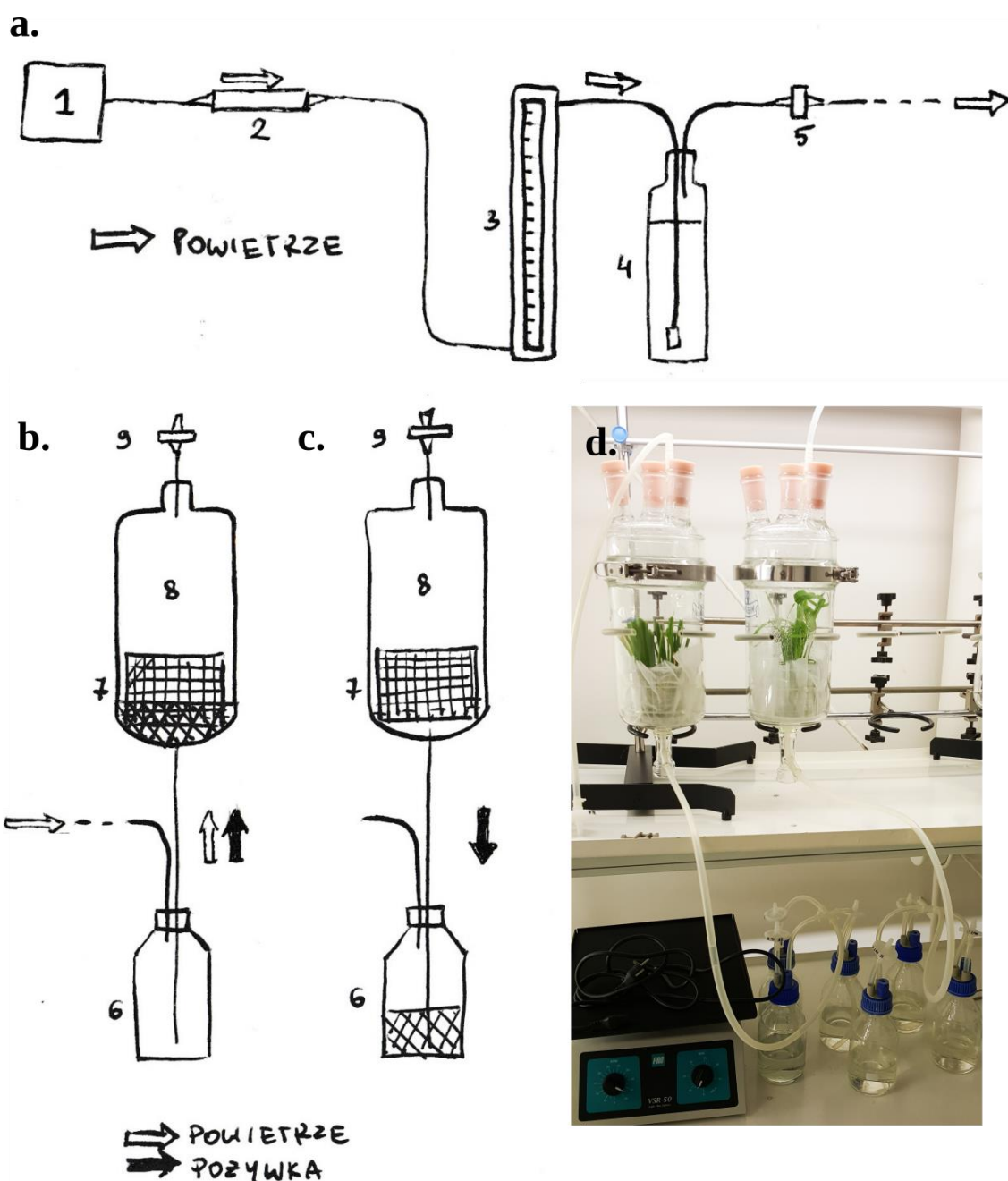
Bioreaktor (**Rysunek 2**) skonstruowany został przez dr Adama Kokotkiewicza z Katedry i Zakładu Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, w oparciu o dwa projekty: przedstawione przez Szopa i in. (2017) oraz Jesionek i in. (2017). Budowę bioreaktora do hodowli

irysów rozszerzono o dodanie nylonowej siatki o otworach wielkości 20 mikronów w celu zapobiegania przerastania korzeni przez oczka stalowego koszyka i zatykania wlotu dla pożywki i powietrza.

System został ustawiony w tryb okresowego zalewania tak, jak zostało to przedstawione przez Jesionek i in. (2017). W oddzielnych, szklanych butelkach umieszczano zapasową pożywkę hodowlaną MS (**Tabela 1**). Bioreaktor pracował w trybie 35 min zalewania i 37 min napowietrzania/osuszania, z przepływem powietrza 0,5 L/min. Do hodowli *I. pseudacorus* wykorzystywano 250 mL porcje pożywki MS z PVP + 4% sacharozy. Rośliny hodowane były w $24 \pm 2^\circ\text{C}$ w trybie ciągłego oświetlenia ($40 \mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$, białe światło fluorescencyjne, TLD 35 W/33 żarówki Philips, Holandia). Eksperyment prowadzony był przez 6 miesięcy. Pożywka wymieniana była co 4-6 tygodni. Materiał roślinny, uzyskany po zakończeniu hodowli, został opłukany wodą demineralizowaną i zamrożony do dalszych analiz.



Rysunek 1. Schemat cyklu zastosowanego w systemie *Plantform*. Pionowe strzałki ciągłe, wskazują kierunek ruchu pożywki (górną-dół), którą zaznaczono kratowanym prostokątem. Niekratowane prostokąty to kosz hodowlany i zbiornik pożywki. Strzałka ciągła (łuk) wskazuje powrót do pierwszego zdarzenia w cyklu. Na każdy cykl trwający 72 min składały się: 3 min podnoszenia poziomu pożywki (włączenie zastawki elektromagnetycznej – zamknięcie obwodu; uruchomienie pompy I); 35 min w zalaniu pożywką; 25 min przerwy (opadanie grawitacyjne pożywki, zastawka wyłączona – otwarcie obwodu w 35 minucie); 20 min napowietrzania (pompa II włączona w 52 minucie).



Rysunek 2. Schemat bioreaktora okresowo-zalewowego, w oparciu o rycinę przestawioną przez Jesionek i in. (2017): **a.** system zaopatrzenia w powietrze, **b.** bioreaktor w trybie zalewania pożywką **c.** bioreaktor w fazie osuszania z pożywki, **d.** zdjęcie rzeczywistego reaktora zbudowanego w oparciu o przedstawione schematy; W skład zestawu wchodzi: 1. pompa powietrza, 2. filtr wstępny, 3. przepływomierz, 4. nawilżacz powietrza, 5. filtr wylotowy PTFE (0,22 μm), 6. zbiornik pożywki, 7. stalowy kosz z siatką nylonową, 8. naczynie hodowlane 9. filtr wylotowy z włókna polipropylenowego. **Czarne** strzałki wskazują kierunek przepływu pożywki, **Białe** strzałki wskazują kierunek przepływu powietrza. **Kratowany prostokąt** nie oznaczony numerem to poziom pożywki.

7.1.6. Elicytacja biosyntezy związków fenolowych w tkankach *I. pseudacorus* w kulturach *in vitro*

Eksperymenty związane z elicytacją zawartości związków fenolowych w tkankach *I. pseudacorus* przeprowadzono na młodych roślinach utrzymywanych w kulturach *in vitro* w płynnych pożywkach MS z 0,3% PVP i 20 g/L sacharozy. Wyjątkiem był eksperyment przeprowadzony dla ekstraktu z mszyc, w którym elicytacji poddano rośliny hodowane w bioreaktorach *Plantform* (7.1.4). W eksperymentach wykorzystano elicytory biotyczne i abiotyczne, których stężenia i czas działania przedstawiono w **Tabeli 3**.

Bakterie z gatunku *Cronobacter sakazakii* przygotowano zgodnie z metodą opisaną przez Staniszweską i in. (2003), z modyfikacjami. Bakterie *C. sakazakii* hodowano w pożywce BHI [BD BBL] (**Tabela 17**) w 37°C przez noc, w kolbach Erlenmeyer, w inkubatorze z wytrząsaniem 150 rpm [New Brunswick Scientific Innova 40]. Zawiesina bakteryjna została następnie poddana działaniu toluenu [POCH] dodanego w proporcji 100:1 (v/v), w celu doprowadzenia do lizy komórek bakteryjnych. Mieszaninę pozostawiono na ok. 1 godz. na wytrząsarce, w celu odparowania rozpuszczalnika organicznego. Po jego odparowaniu, zawiesinę sterylizowano w autoklawie przez 30 min/2 atm. Lizat bakteryjny o OD₆₀₀ ok. 1,2, dodawano do pożywki MS z 0,3% PVP i 4% sacharozą w ilości 25 mL/L. Po ustaleniu pH, pożywkę sterylizowano w autoklawie.

L-alanina oraz kwas jasmonowy zostały zastosowane podobnie jak lizat *C. sakazakii* – jako dodatek do pożywki. L-alaninę dodawano przed sterylizacją tak, aby jej końcowe stężenie wynosiło 0,1 mM. Kwas jasmonowy, którego końcowe stężenie w pożywce wynosiło 2,5 mg/L, dodawano jałowo po sterylizacji. Elicytację powyższymi czynnikami prowadzono przez 1 oraz 2 tygodnie, jako kontrolę stosując pożywkę MS z 0,3% PVP i 20 g/L sacharozy, bez innych dodatków. Elicytację prowadzono w pożywce płynnej na wytrząsarkach orbitalnych w podstawowych warunkach hodowli (7.1.2).

Mszyce (rodzina *Aphididae*), zebrano z roślin *Arctium lappa* (Łopian większy) w lipcu 2017 roku w Przejazdowie, w Polsce. Ekstrakt wykorzystany do elicytacji przygotowano wg. metody opisanej przez Jesionek i in. (2018), z modyfikacjami. Przed elicytacją 1 g mrożonych mszyc zmacerowano w ciekłym azocie i ekstrahowano 10 mL 25% alkoholu etylowego [POCH] w trzech porcjach: 5 mL, 2,5 mL oraz 2,5 mL, każdorazowo ucierając tkankę w rozpuszczalniku przez ok. 5 min. Uzyskany ekstrakt (10 mL) dodano do 500 mL płynnej pożywki MS z 0,3% PVP i 40 g/L sacharozy. Pożywkę z elicytorem dodano do pojemnika z roślinami, zaaklimatyzowanymi wcześniej do wzrostu w systemie *Plantform* przez okres 3 miesięcy. Jako kontrolę zastosowano dwa warianty

pożywki: bez dodatku ekstraktu oraz z dodatkiem 10 mL, 25% alkoholu etylowego. Elicytację prowadzono w systemie *Plantform* przez 7 dni.

Tabela 3. Elicytory zastosowane w celu stymulacji roślin *I. pseudacorus* do zwiększenia biosyntezy i akumulacji związków fenolowych w tkankach hodowanych w warunkach *in vitro*.

Elicytory	Czas elicytacji	Zawartość w pożywce
biotyczne		
lizat <i>Cronobacter sakazakii</i>	1 i 2 tygodnie	2,5%
ekstrakt z mszycy*	1 tydzień	2%
abiotyczne		
kwas jasmonowy	1 i 2 tygodnie	2,5 mg/L
fenyloalanina	1 i 2 tygodnie	0,1 mM
zmniejszenie zawartości azotu w pożywce MS	5 tygodni	Dwa warianty pożywki: - bez NH ₄ NO ₃ - bez KNO ₃ oraz NH ₄ NO ₃

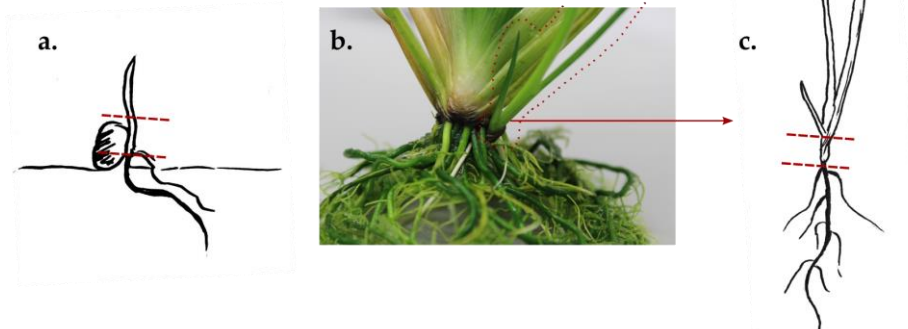
* Elicytacja w bioreaktorze *Plantform*

Elicytację abiotyczną związaną z ograniczoną dostępnością azotu w pożywce przeprowadzono przygotowując dwa rodzaje pożywki MS z dodatkiem 0,3% PVP i 4% sacharozy: (I) bez NH₄NO₃, (II) bez KNO₃ oraz NH₄NO₃. Jako kontrolę zastosowano pełną pożywkę MS z solami NH₄NO₃ i KNO₃. We wszystkich powyższych przypadkach, rośliny hodowane były w kolbach Erlenmeyer 250 mL w 35 mL pożywki na wytrząsarkach w podstawowych warunkach hodowlanych (7.1.2).

7.1.7. Inicjacja kultury pędów

Do zainicjowania kultury pędów zastawano dwa warianty eksplantatów: hipokotyle świeżo skielkowanych irysów utrzymywanych w warunkach *in vitro* (**Rysunek 3a**) oraz łodygi młodych roślin, przyrastających z aktywowanych pączków bocznych od pędu irysów hodowanych w warunkach *in vitro* (**Rysunek 3b, 3c**). W obu przypadkach liście bądź liścień oraz korzenie odcinano, a łodygę bądź hipokotyl umieszczano w jednym z wariantów pożywki MS z 0,3% PVP + 30g/L sacharozy + 80 mg/L siarczanu adeniny (SA) z następującymi kombinacjami regulatorów wzrostu: (**A**) 0,22 mg/L TDZ + 2 mg/L 2iP; (**B**) 0,22 mg/L TDZ + 2 mg/L BAP; (**C**) 0,3 mg/L NAA + 3 mg/L 2iP + 1 mg/L BAP. Zastosowano dwie pożywki kontrolne: MS z 0,3% PVP + 30 g/L sacharozy z dodatkiem oraz bez dodatku SA. Prowadzono regularne obserwacje zmian pojawiających się na eksplantatach. Jeśli korzenie i liście odrastały bez zmian w obrębie łodygi, obcinano je ponownie. W zależności od eksplantatu zabieg obcięcia wykonywano od 1 do 3 razy.

Po zaobserwowaniu zgrubienia na podstawie łodygi lub tworzenie się kalusa, eksplantat przenoszono na pożywkę podstawową z dodatkiem PVP i SA, bez regulatorów wzrostu. Prowadzono obserwację i dokumentację fotograficzną zachodzących zmian



Rysunek 3. Rodzaje eksplantatów wykorzystane do inicjacji kultury pędów *I. pseudacorus*. **a.** Siewka *I. pseudacorus* uzyskana w warunkach *in vitro*. Czerwonymi, przerywanymi liniami zaznaczono miejsce odcięcia liścienia i korzenia celem wyodrębnienia hipokotylu. **b. c.** *I. pseudacorus* hodowany w warunkach *in vitro*. **b.** Kropkowana linia wskazuje klon rośliny przyrastający z aktywowanego pączka bocznego na roślinie macierzystej. **c.** Młoda roślina (klon) wykorzystana została do wyodrębnienia merystemu wierzchołkowego użytego do inicjacji kultury pędów. Czerwone przerywane linie wskazują miejsce odcięcia liści i korzeni.

7.1.8. Inicjacja kultury korzeni anatomicznych. Analiza potencjalnych czynników wpływających na utrzymywanie się korzeni *I. pseudacorus* w kulturze *in vitro*.

Korzenie przybyszowe z cienkimi korzeniami bocznymi odcinano od roślin macierzystych utrzymywanych w warunkach *in vitro*. Następnie dzielono je sterylnie na ok. 5 cm fragmenty. Tak przygotowane korzenie (5 fragmentów na kolbę), umieszczano w 20 mL płynnej pożywki MS z 0,3% PVP oraz dodatkiem 20, 30 bądź 40 g/L sacharozy. Pożywkę zmieniano co 2 tygodnie. Kulturę prowadzono w 250 mL kolbach Erlenmeyer, na wytrząsarce rotacyjnej, w fitotronach w warunkach podstawowych (7.1.2), przez 9 tygodni. Po tym czasie dokonano porównania tempa wzrostu korzeni na podstawie prowadzonej dokumentacji fotograficznej. Do dalszych eksperymentów wybrano kombinację pożywki z 4% dodatkiem sacharozy, ze względu na najszybszy przyrost biomasy.

Nową kulturę korzeni zainicjowano w sposób analogiczny do przedstawionego powyżej. Korzenie utrzymywano w pożywce MS z 0,3% PVP + 4% sacharozy. Eksperyment prowadzono w standardowym fotoperiodzie 16/8 godz. a także w warunkach stałego ograniczenia dostępu światła. Pożywka wymieniana była co 2 tygodnie, a każda porcja wykorzystanej pożywki po hodowli

była mrożona w -20°C jako materiał do dalszej analizy. Różnice we wzroście korzeni w ciemności oraz w standardowych warunkach oświetlenia porównywano na podstawie serii zdjęć wykonywanych cyklicznie po każdym pasażu do świeżej pożywki.

7.2. Transformacja roślin z wykorzystaniem bakterii *Rhizobium rhizogenes* (*Agrobacterium rhizogenes*).

7.2.1. Inokulacja roślin bakteriami niosącymi plazmid Ri

Młode rośliny *I. pseudacorus* (nie starsze niż pół roku od skielkowania w warunkach *in vitro*), inokulowano bakteriami z gatunku *R. rhizogenes*, w celu zainicjowania kultury korzeni włóśnikowatych, bądź transformowanych pędów (teratomów). W procedurze transformacji wykorzystano trzy szczepy agropinowe, których charakterystykę przedstawiono w **Tabeli 4**.

Bakterie hodowane były w ciemności w 26°C na płytkach z pożywką YEB (**Tabela 5**), suplementowaną acetosyringonem w stężeniu 200 µM. Do transformacji wykorzystano 48-godzinne kultury bakterii. Inokulacji poddano młode łodygi *I. pseudacorus* z kultur *in vitro*. Liście i korzenie skrócono tak, aby nie uszkodzić łodygi (**Rysunek 4a**). Za pomocą sterylnej igły, pobierano pojedyncze kolonie bakterii i nanoszono je na łodygę, zadrapując ją kilkakrotnie w jednej, pionowej linii (**Rysunek 4b**). Inokulowane eksplantaty (kokultury) umieszczano na podstawowej pożywce MS (7.1.1) bez antybiotyków i utrzymywano w ciemności przez 3 dni, w celu umożliwienia transferu T-DNA z plazmidu bakterii do genomu rośliny. Następnie eksplantaty przenoszono do pożywki MS z antybiotykami: karbenicyliną oraz claforanem w stężeniu 500 mg/L (**Tabela 2**) każdy i pozostawiano w ciemności w fitotronie. Eksplantaty pasażowano co 30 dni na pożywki z antybiotykami przez okres 6 miesięcy. Po tym czasie rośliny przeniesiono następnie na pożywkę MS z PVP i 20 g/L sacharozy bez dodatku antybiotyków. Prowadzono 3-miesięczną obserwację, w oczekiwaniu na wzrost korzeni włóśnikowatych. Po tym czasie, z powodu braku widocznych objawów transformacji w postaci wzrostu charakterystycznych korzeni, do analizy materiału genetycznego pobrano fragmenty liści i korzeni. Z pobranego materiału wyizolowano DNA genomowy (7.2.3) oraz przeprowadzono izolację DNA plazmidowego z bakterii *R. rhizogenes* (7.2.2), który stanowił kontrolę pozytywną w reakcji PCR (7.2.4). Analizę przeprowadzono w celu sprawdzenia czy bakterie zostały wyeliminowane z kokultury (analiza genu *virG*) oraz czy doszło do wbudowania do genomu roślin fragmentu T-DNA znajdującego się na plazmidzie bakterii (analiza genów *rolB*, *rolC*, *ags* i fragmentu Tr). Szczegółowy protokół opisano w podrozdziale (7.2.4).

Tabela 4. Charakterystyka oraz pochodzenie szczepów agropinowych bakterii *R. rhizogenes* zastosowanych do transformacji roślin *I. pseudacorus*

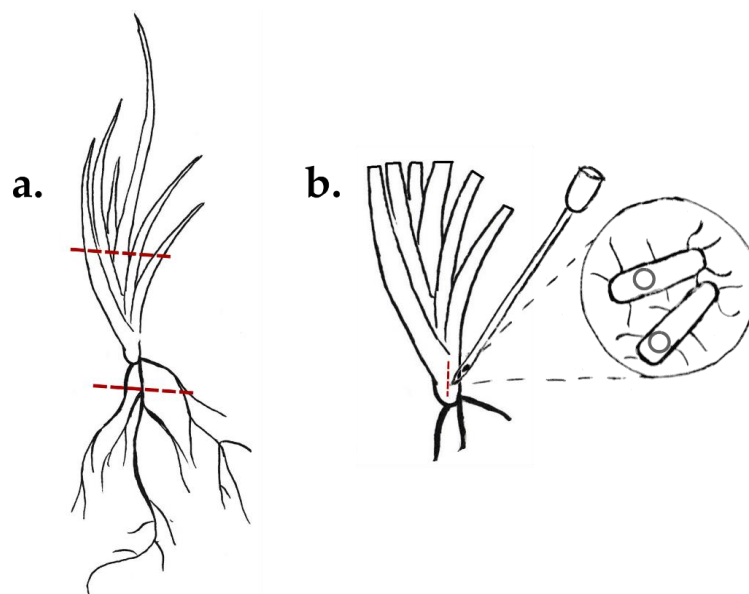
Szczep (typ plazmidu)	Źródło szczepu	Dane literaturowe
LBA 9402 – NCPPB 1855 (PR _i 1885)	Katedra Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Łódź	(Payne i in., 1987)
ATTC 15834	Laboratoire Agronomie et Environnement, Ecole Nationale Supérieure d’Agronomie et des Industries Alimentaires, Nancy, Francja	(Yonemitsu i in., 1990)
A4 – ATTC 31798 (pArA4a, pArA4b=PR _i A4)	Pracownia Kultur <i>in vitro</i> – Ogród Botaniczny, Wrocław	(Moore i in., 1979)

Tabela 5. Skład pożywki YEB (ang. *Yeast Extract Beef*)

Skład podstawowy	g/L
pepton (BTL)	5,0
ekstrakt drożdżowy (BTL)	1,0
ekstrakt wołowy (BTL)	5,0
sacharoza (POCH)	5,0
agar (BTL)	15,0
jałowe MgSO ₄ po sterylizacji pożywki	2,0 mM
acetosyringon (Sigma)	200,0 μM
woda demineralizowana do objętości	1000 mL

Rośliny wolne od bakterii (brak obecności *virG* w analizowanym materiale genetycznym), przenoszono do płynnej pożywki MS z 0,3% PVP z 20 g/L sacharozy bez antybiotyków. Pożywkę zmieniano co 4 tygodnie. Po 3 pasażach, ze względu na szybki wzrost i duży rozmiar roślin przekraczający objętość kolby, przenoszono je do szklanych naczyń hodowlanych o pojemności 900 mL, zawierających stałą pożywkę hodowlaną MS o tym samym składzie, co pożywka płynna stosowana w hodowli z wytrząsaniem. Ograniczone warunki przestrzenne oraz brak możliwości rozmnożenia klonalnie uzyskanych teratomów wymusił konieczność przeniesienia klonu, u którego wykazano obecność obu fragmentów T-DNA, do większej przestrzeni hodowlanej. Transformowaną roślinę oraz roślinę

kontrolną, w podobnym stadium rozwoju, przeniesiono do bioreaktora okresowo-zalewowego, skonstruowanego na potrzeby utrzymania rośliny, do czasu osiągnięcia biomasy niezbędnej do uzyskania ekstraktu do dalszych analiz (7.1.5).



Rysunek 4. Schemat postępowania z *I. pseudacorus* w procedurze inokulacji bakteriami *R. rhizogenes* w celu uzyskania roślin transformowanych; **a.** czerwone linie wskazują miejsca odcięcia liści i korzeni; **b.** miejsce inokulacji (zaznaczone czerwoną linią).

7.2.2. Izolacja DNA plazmidowego z *R. rhizogenes* metodą lizy alkalicznej

Z nocnej hodowli płynnej bakterii *R. rhizogenes* uzyskanej na podłożu YEB (**Tabela 5**) pobrano 2 mL zawiesiny i wirowano przy prędkości 5 tys. rpm (Eppendorf Centrifuge 5418R, rotor: FA-45-18-11). Ten typ wirówki wraz z wymienionym rotorem wykorzystywany był we wszystkich krokach izolacji DNA metodą lizy alkalicznej oraz podczas izolacji DNA genomowego roślin (7.2.3). Uzyskany supernatant wylewano, a pozostały osad zawieszano w 100 μ L **roztworu I** (**Tabela 6**). Zawartość zmieszano na mieszadle typu „worteks”, inkubowano przez 5 minut w lodzie.

Tabela 6. Skład roztworu I do izolacji DNA plazmidowego

Skład	Stężenie [mM]
EDTA	10
glukoza	50
Tris-HCl (pH 8,0)	25

Po inkubacji do mieszaniny dodawano 200 μ L świeżo przygotowanego **roztworu II** – lizującego (**Tabela 7**). Zawartość próbki delikatnie wymieszano, a następnie inkubowano przez 5 min w lodzie.

Tabela 7. Skład roztworu II (lizującego) do izolacji DNA plazmidowego

Skład	Stężenie
NaOH	0,2 M
SDS	1,0%

Do próbki dodawano 150 μ L schłodzonego **roztworu III** (renaturującego) (**Tabela 8**). Zawartość zmieszano przez delikatne, kilkukrotne obrócenie próbki. Mieszaninę inkubowano przez 5 min. w lodzie. Zawartość zwirowano przez 10 min w temp. 4°C przy prędkości 13 tys. rpm.

Tabela 8. Skład roztworu III (renaturującego) do izolacji DNA plazmidowego

Skład	Objętość [mL]
5 M octan sodu	60,0
lodowaty kwas octowy	11,5
woda demineralizowana	28,5

Supernatant przenoszono delikatnie do nowej próbki i dodawano gotową mieszaninę fenol : chloroform : alkohol izoamylowy 25:24:1 (v/v/v) [Sigma] tak, aby stosunek mieszaniny do supernatantu wynosił 1:1 (v/v). Zawartość próbki mieszano delikatnie przez 5 min w temp. 4°C. Następnie mieszaninę wirowano przez 10 min w temp. 4°C przy prędkości 13 tys. rpm. Górną, wodną fazę przenoszono do nowej próbki i powtarzano ekstrakcję mieszaniną ekstrakcyjną. Po powtórny zwirowaniu, do frakcji wodnych dodawano schłodzony, 96% alkohol etylowy [POCh] w stosunku 1:2 (v/v). Zawartość delikatnie mieszano i inkubowano w lodzie przez 15 min. W celu osadzenia DNA plazmidowego próbkę wirowano przez 10 min w temp. 4°C przy prędkości 13 tys. rpm. Supernatant usuwano, a DNA przemywano dwukrotnie 1 mL schłodzonego 70% alkoholu etylowego, każdorazowo wirując próbkę w temp. 4°C przez 5 min przy prędkości 13 tys. rpm. Po usunięciu supernatantu, DNA dosuszano w temperaturze pokojowej do momentu całkowitego odparowania alkoholu. Osuszone DNA zawieszano w 50 μ L wody do analiz molekularnych [Sigma] i poddawano 1 min. inkubacji w 50°C. Po ostygnięciu DNA inkubowano w 4°C przez 24 godz., a następnie umieszczano w -20°C.

7.2.3. Izolacja DNA genomowego z tkanek roślinnych

Izolację DNA genomowego z liści i korzeni roślin transformowanych i nietransformowanej kontroli przeprowadzono w oparciu o metodę przedstawioną przez Bekesiova i in. (1999) z modyfikacjami. Ok. 50 mg każdej z zamrożonych tkanek: liści i korzeni, poddawano homogenizacji w ciekłym azocie w 1,5 mL probówkach typu Eppendorf. Do zmacerowanej tkanki dodawano 294 μ L **buforu I** (**Tabela 9**), 6 μ L 0,02 M NaHSO₄ oraz 300 μ L **buforu II** (**Tabela 9**). Probówki wytrząsano przez kilka sekund w temperaturze pokojowej na mieszadle typu „worteks”. Następnie do mieszaniny dodawano 120 μ L 5% *N*-dodecylosarkozynianu sodu [Fluka Chemie] i mieszano energicznie. Próbkę umieszczano w bloku grzewczym z wytrząsaniem 1000 rpm [TermoMixer C, Eppendorf] i inkubowano przez 15 min w 65°C.

Tabela 9. Skład buforu I oraz II do izolacji DNA genomowego z roślin

Bufor I		Bufor II	
Skład	Stężenie	Skład	Stężenie
sorbitol	0,35 M	Tris-HCl (pH 7,5)	0,2 M
Tris-HCl	0,10 M	EDTA (pH 7,5)	50 mM
EDTA	5,00 mM	NaCl	2 M
Doprowadzono pH do wartości 7,5		CTAB (w/v)	2%

Po schłodzeniu próbek dodawano do nich 700 μ L świeżo przygotowanej mieszaniny ekstrakcyjnej złożonej z chloroformu i alkoholu izoamyłowego [Sigma], 24:1 (v/v) i mieszano przez obracanie probówki na mieszadle [Dyna Sample Mixer] w 4°C. Następnie próbki wirowano przez 10 min w 4°C, 14 tys. rpm. Górną fazę (wodną) przenoszono do nowej probówki i powtarzano poprzedni krok z wykorzystaniem mieszaniny ekstrakcyjnej. DNA precypitowano za pomocą 800 μ L mieszaniny złożonej z 96% alkoholu etylowego i 1 M octanu sodu zmieszanego w stosunku 4:1 (v/v). Zawartość delikatnie mieszano przez kilkukrotne obrócenie probówek. Próbkę pozostawiano w -20°C do następnego dnia.

Po nocnej inkubacji DNA osadzano przez 10 min wirowanie w 4°C, 14 tys. rpm. Supernatant odrzucano a DNA przemywano dwukrotnie 1 mL, 70% schłodzonego alkoholu etylowego, każdorazowo osadzając DNA przez wirowanie w 4°C w 14 tys. rpm. Po zebraniu alkoholu osad z DNA pozostawiano w temp. pokojowej do całkowitego odparowania etanolu. DNA zawieszano w 50 μ L wody do analiz molekularnych [Sigma] i inkubowano 15 min w 50°C. Probówki pozostawiano w 4°C przez 24 godz. Po tym czasie DNA przechowywano w -20°C.

Czystość oraz ilość DNA oceniano z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop 2000 [Thermo Scientific]. Jako próby odpowiedniej jakości wybrano te, których stosunek absorbancji zarejestrowany w świetle o długościach fali w nm: 260/230 (zanieczyszczenia związkami fenolowymi) oraz 260/280 (zanieczyszczenia białkami) był większy bądź równy 1,8.

7.2.4. Analiza PCR genomowego DNA wyizolowanego z roślin transformowanych

W celu potwierdzenia czy bakterie z gatunku *R. rhizogenes* zostały wyeliminowane z kokultury oraz czy T-DNA został zintegrowany z genomem roślin, przeprowadzono reakcję PCR z użyciem DNA wyizolowanego z roślin poddanych transformacji oraz roślin kontrolnych, których nie transformowano. Jako matrycę w kontroli pozytywnej w reakcji zastosowano DNA plazmidowy wyizolowany z *R. rhizogenes*. Analiza prowadzona była w 25 µL standardowej mieszaniny reakcyjnej PCR, uzupełnionej o dodatkowe składniki takie jak PVP oraz BSA [Sigma]. Szczegółowy skład mieszaniny przedstawiono w **Tabeli 10**. Eliminację *R. rhizogenes* z kokultury sprawdzano wykorzystując startery dla genu *virG* (Sidwa-Gorycka i in., 2009) znajdującego się na plazmidzie bakterii w obszarze genów wirulencji poza fragmentem T-DNA. Nie ulegał więc on integracji do genomu rośliny.

Tabela 10. Składniki mieszaniny do reakcji PCR prowadzonej w celu potwierdzenia eliminacji bakterii z kokultury i integracji T-DNA z plazmidu do genomu rośliny.

Składniki mieszaniny reakcyjnej*	Objętość w mieszaninie [µL]
10x stężony Bufor Taq z (NH ₄) ₂ SO ₄	2,50
25 mM MgCl ₂	3,75
Polimeraza DNA Taq	0,20
1 mM mieszanina dCTP, dTTP, dATP, dGTP	5,00
10% PVP [Sigma]	2,50
H ₂ O wolna od nukleaz [Sigma]	5,55
10 mg/mL BSA [Sigma]	2,50
10 pM starter początkowy	1,00
10 pM starter końcowy	1,00
DNA	1,00

* Wszystkie składniki, poza zaznaczonymi, zamówiono z ThermoScientific

Integrację T-DNA potwierdzano poprzez analizę PCR genów obecnych w lewej sekwencji T-DNA: *rolB*, *rolC* (Królicka i in., 2001); genu *ags* znajdującego się w prawej sekwencji T-DNA oraz całej prawej sekwencji T-DNA (Tr) (Bandyopadhyay et al., 2007). Sekwencje starterów i lokalizację genów na plazmidzie oraz rozmiar produktów PCR prezentuje **Tabela 11**. Reakcje PCR prowadzone były w termocyklerze [Biorad T100 Thermal Cycler] w warunkach temperatury, czasu i liczby cykli zależnych od użytych starterów (**Tabela 12**).

Tabela 11. Sekwencje starterów wykorzystanych do potwierdzenia integracji fragmentu T-DNA z plazmidu do genomu rośliny oraz eliminacji *R. rhizogenes* z kokultury

Sekwencje starterów	
<i>virG</i>	5' ACT GAA TAT CAG GCA ACG CC 3'
	5' GCG TCA AAG AAA TAG CCA GC 3'
<i>rolB</i>	5' GCT CTT GCA GTG CTA GAT TT 3'
	5'GAA GGT GCA AGC TAC CTC TC 3'
<i>rolC</i>	5' CTC CTG ACA TCA AAC TCG TC 3'
	5' TGC TTC GAG TTA TGG GTA CA 3'
<i>ags</i>	5' GCG CAT CCC GAG GCG ATG 3'
	5' AGG TCT GGC GAT CGC GAG GGA 3'
Tr	5' CGG AAA TTG TGG CTC GTT GTG GAC 3'
	5' ATT CGT TCA GAG AGC GTC CGA AGT T 3'

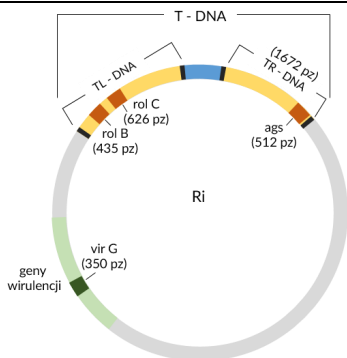


Tabela 12. Warunki reakcji PCR (temperatury, czasu trwania oraz liczby cykli) zastosowane w celu sprawdzenia integracji T-DNA z genomem rośliny oraz wykluczenia obecności bakterii *R. rhizogenes* w tkankach roślin poddanych transformacji.

	<i>virG^a, rolB^b, rolC^b</i>		<i>ags^c</i>		Tr ^c	
	Temp.	Czas	Temp.	Czas	Temp.	Czas
<i>Początkowa denaturacja</i>	94°C	3 min	94°C	5 min	94°C	5 min
<i>Denaturacja</i>	94°C	1 min	94°C	30 s	94°C	30 s
<i>Przyłączanie starterów</i>	65°C	1 min	67,2°C	30 s	65°C	30 s
<i>Wydłużanie</i>	72°C	1 min	72°C	30 s	72°C	90 s
<i>Końcowe wydłużanie</i>	72°C	6 min	72°C	6 min	72°C	6 min

Denaturacja, przyłączanie starterów i wydłużanie powtórzono w cyklach:

^a25 razy, ^b35 razy, ^c30 razy.

Produkty reakcji PCR analizowane były po rozdzieleniu ich elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym [Prona], w 0,5x stężonym buforze TBE (**Tabela 13**), wykorzystując napięcie 90 V. Jako marker wielkości fragmentów DNA wykorzystano GeneRuler 100 - 3000 pz oraz GeneRuler 100 - 1000 pz [Fermentas]. Wizualizację prowadzono w transluminatorze w świetle UV [ChemiDoc BioRad], po uprzedniej 10 min inkubacji żelu w roztworze bromku etydy (0,5 µg/mL) i 5 min płukaniu w wodzie demineralizowanej.

Tabela 13. Skład buforu TBE 10x stężonego

Składniki	Stężenie [mM]
Tris	890
Kwas borowy	890
EDTA	20

Bufor doprowadzono do pH 8,3

7.3. Ekstrakcja roślinnych metabolitów wtórnych

7.3.1. Materiał roślinny

Kłącza *I. pseudacorus* zostały zebrane w Ogrodzie Roślin Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Tkanki oczyszczono pod bieżącą, a następnie demineralizowaną wodą. Osuszone kłącza pocięto na plastry i podzielono na dwie porcje: jedną zamrożono w -80°C , po czym liofilizowano, drugą tylko mrożono w -20°C (zapas materiału do dalszych analiz). Liofilizowane kłącza poddano maceracji w ciekłym azocie celem uzyskania homogennego proszku, który wykorzystano następnie do ekstrakcji metabolitów wtórnych.

Tkanki roślin z hodowli: *in vitro* łodygi, kłącza i korzenie, po opłukaniu bieżącą i demineralizowaną wodą, mrożono -80°C i poddawano liofilizacji, podobnie jak w przypadku tkanek z hodowli w glebie.

7.3.2. Ekstrakcja metabolitów wtórnych z liofilizowanych tkanek

Zliofilizowane i roztarte na proszek homogenne tkanki z roślin z hodowli ogrodowej, jak również z hodowli *in vitro*, macerowano w 90% metanolu [Chempur]. Macerat przenoszono do szklanych butelek ograniczających dostęp światła, po czym poddawano 30 min ekstrakcji w łaźni ultradźwiękowej Sonic 5 [Polsonic] w temperaturze pokojowej. Na każde 500 mg tkanki zastosowano 30 mL 90% metanolu. Uzyskany ekstrakt sączony był przez bibułę filtracyjną Whatman nr 1. Rozpuszczalnik odparowywano w próżniowej wyparce rotacyjnej z łaźnią wodną [IKA] pod chłodnicą zwrotną pozwalającą na odzyskiwanie rozpuszczalnika. Wodną pozostałość usuwano w stacjonarnej suszarce próżniowej [DZ-1BCII Vacuum Drying Oven, ChemLand]. Surowy, lekko lepki ekstrakt zawieszano w 5 mL metanolu na każde 500 mg tkanki użytej do ekstrakcji. Przed dalszymi analizami ekstrakt filtrowany był przez filtr strzykawkowy HPTFE o średnicy porów $0,22\ \mu\text{m}$. W wyniku prowadzonej ekstrakcji uzyskano serię ekstraktów, które poddano analizie aktywności przeciwbakteryjnej. Rodzaje ekstraktów i przeprowadzonych testów wyszczególniono w Tabeli 14 oraz Tabeli 15. Wybrane ekstrakty przeanalizowano także pod kątem całkowitej zawartości związków fenolowych

(7.6.1). Bazowym ekstraktem, dla którego wykonano rozszerzoną analizę aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwnowotworowej, był ekstrakt z kłączy *I. pseudacorus* z hodowli ogrodowej, oznaczony w pracy jako ekstrakt A. Wszystkie ekstrakty przechowywane były w -20°C.

Tabela 14. Ekstrakty z tkanek liofilizowanych z kultur *in vitro* roślin *I. pseudacorus* poddanych elicytacji, roślin kontrolnych i roślin transformowanych dla których wykonano analizę aktywności przeciwbakteryjnej metodą seryjnych mikrorozcieńczeń pożywki.

Charakterystyka źródła metabolitów / elicytor	Rodzaj tkanki
kontrola po 1 tyg.	
kwas jasmonowy po 1 tyg.	korzenie, łodyga
fenyloalanina po 1 tyg.	
lizat <i>Cronobacter sakazakii</i> po 1 tyg.	
kontrola po 2 tyg.	
kwas jasmonowy po 2 tyg.	korzenie, łodyga
fenyloalanina po 2 tyg.	
lizat <i>Cronobacter sakazakii</i> po 2 tyg.	
kontrola mszyce	
ekstrakt z mszycy	kłocze
kontrola z etanolem	
kontrola	
<i>Dickeya dadantii</i>	łodyga
kontrola	
bez NH ₄ NO ₃	łodyga
bez KNO ₃ oraz NH ₄ NO ₃	

7.3.3. Ekstrakcja tanin

Ekstrakcję tanin przeprowadzano z wykorzystaniem 80% acetonu, w oparciu o metodę przedstawioną przez Salminen'a i współpracowników (2018). 20 mg liofilizowanych kłączy macerowano w 1,4 mL acetonu [POCH] i pozostawiano przez noc w ciemności, w zamkniętej butelce. Następnego dnia, rozpuszczalnik przelewano do osobnej butelki, a tkankę poddawano dalszej, 3-godzinnej ekstrakcji świeżą porcją acetonu (dwukrotnie). Następnie wszystkie 3 porcje ekstraktu łączono ze sobą i sączono przez bibułę filtracyjną Whatman nr 1. Aceton odparowywano, a pozostałość wodną liofilizowano. Suchą pozostałość zawieszano w 5 mL czystego acetonu (ekstrakt B). Przed dalszą analizą ekstrakt filtrowano za pomocą filtra strzykawkowego PTFE o średnicy porów 0,22 µm.

Tabela 15. Ekstrakty uzyskane z tkanek lub kultur *in vitro* roślin *I. pseudacorus* poddane analizie aktywności przeciwbakteryjnej

Oznaczenie ekstraktów	Źródło metabolitów	Rozpuszczalnik użyty do ekstrakcji	Analiza aktywności przeciwbakteryjnej
Ekstrakt A	Kłłącze liofilizowane ¹	metanol	SR – Wszystkie gatunki i szczepy bakterii (7.4.4) Biofilm (7.4.5) Bioautografia (7.7.4)
Ekstrakt B	Kłłącze liofilizowane ¹	aceton	Bioautografia (7.7.4)
Fracja A-E	Ekstrakt A	eter dietylowy	Bioautografia (7.7.4)
Fracja A-O	Ekstrakt A	octan etylu	Bioautografia (7.7.4)
Fracja A-W	Ekstrakt A	woda	Bioautografia (7.7.4)
Ekstrakt C	Pożywka po hodowli korzeni ²	eter dietylowy	Bioautografia (7.7.4)
Ekstrakt Ck	Korzenie z kultury korzeni anatomicznych, liofilizowane ²	metanol	SR – <i>S. aureus</i> Newman, <i>P. aeruginosa</i> PAK (7.4.4) Bioautografia (7.7.4)
Ekstrakt D	Kłłącze mrożone ¹	woda	SR – <i>S. aureus</i> i <i>P. aeruginosa</i> wszystkie szczepy (7.4.4)
Ekstrakt E	Korzenie mrożone ¹	woda	SR – <i>S. aureus</i> i <i>P. aeruginosa</i> wszystkie szczepy (7.4.4)
Ekstrakt F	Kłłącze ² - <i>Plantform</i>	metanol	SR – <i>S. aureus</i> Newman, <i>P. aeruginosa</i> PAK (7.4.4)
Ekstrakt G	Łodygi młodych roślin ²	metanol	SR – <i>R. rhizogenes</i>

¹ Ogród Roślin Leczniczych; ² z kultur *in vitro*; SR – seryjne mikrorozcieńczenia

7.3.4. Ekstrakcja metabolitów wtórnych z pożywki MS po hodowli korzeni anatomicznych

Pożywkę po hodowli korzeni anatomicznych (7.1.8) poddawano sukcesywnej ekstrakcji typu ciecz-ciecz z wykorzystaniem eteru dietylowego [Chempur]. Ekstrakcję prowadzono 3-krotnie dla każdej porcji pożywki, za każdym razem mieszając ją z eterem w stosunku objętościowym 1:1 (v/v). Frakcje organiczne łączono ze sobą i odparowywano do sucha. Wysuszoną pozostałość zawieszano w metanolu [Chempur] tak, aby stężenie ekstraktu wynosiło ok. 4,5 mg/mL. Uzyskany ekstrakt (ekstrakt C) analizowano następnie chromatograficznie metodami: TLC (7.7), połączonej z bioautografią metodą agaru górnego (7.7.4) i HPLC (7.7.6), pod kątem zawartości związków biologicznie czynnych, w tym związków o aktywności przeciwbakteryjnej.

7.3.5. Ekstrakcja wodna ze świeżej tkanki – z roślin z hodowli w glebie

Rozmrożone plastry kłączy, korzenie oraz liście macerowano w moździerzu w wodzie demineralizowanej, przenoszono do butelki szklanej, a następnie poddawano działaniu mikrofal do czasu rozpoczęcia wrzenia cieczy. Na każde 2,5 g tkanki używano 50 mL wody. Gotowe ekstrakty sączono przez bibułę filtracyjną Whatman nr 1. Na potrzeby ekologicznej syntezy nanocząstek srebra (7.8), ekstraktów nie liofilizowano. Ekstrakty wykorzystane do analizy aktywności przeciwbakteryjnej poddano liofilizacji po zamrożeniu przesącza w ciekłym azocie w kolbie okrągłodennej o objętości 500 mL. Suche ekstrakty, w postaci jednolitego proszku, przechowywano w temperaturze pokojowej, w zamkniętych pojemnikach ograniczających dostęp światła. Liofilizowane ekstrakty z kłączy (ekstrakt D) oraz z korzeni (ekstrakt E), przeanalizowano pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej względem wybranych patogenów ludzkich (7.4.4).

7.3.6. Frakcjonowanie ekstraktu metanolowego z kłączy *I. pseudacorus*

Ekstrakt metanolowy (10 mL) z liofilizowanych kłączy *I. pseudacorus* z hodowli ogrodowej (ekstrakt A) odparowywano do sucha i zawieszano w 10 mL wody demineralizowanej. Ekstrakt przenoszono do szklanego rozdzielacza, do którego dodawano następnie 10 mL eteru dietylowego [Chempur]. Rozdzielacz umieszczano na mieszadle uchylnym i mieszano delikatnie przez 20 min. Następnie mieszaninę pozostawiano w pozycji pionowej do czasu oddzielenia się fazy organicznej (ok. 30 min). Fazę organiczną pobierano delikatnie tak, aby niewielka warstwa eteru pozostała nadal w rozdzielaczu. Procedurę powtarzano łącznie 10 razy. Ostatnią porcję rozpuszczalnika z ekstraktem pozostawiano na noc.

Wszystkie partie frakcji łączono i odparowywano do sucha w temperaturze pokojowej. Suchą pozostałość zawieszano w metanolu. Pozostałość eteru w fazie wodnej odparowywano, a fazę wodną poddawano dalszej ekstrakcji z octanem etylu (tak jak wykonano to z eterem) [Chempur, POCH]. Po ekstrakcji uzyskiwano trzy frakcje: eterową (ekstrakt A-E), octanową (ekstrakt A-O) i pozostałość wodną (ekstrakt A-W) (**Tabela 15**).

7.4. Analiza aktywności biologicznej ekstraktów – aktywność przeciwbakteryjna

7.4.1. Przygotowanie bakterii – patogenów ludzkich

Właściwości przeciwbakteryjne ekstraktów z tkanek irysów analizowane były z wykorzystaniem bakterii patogennych dla człowieka. Aktywność ekstraktów sprawdzano z wykorzystaniem wybranych szczepów referencyjnych, a w przypadku ekstraktów A i D (**Tabela 15**), również z wykorzystaniem izolatów klinicznych, wykazujących wrażliwość lub oporność na co najmniej dwie różne grupy komercyjnie stosowanych antybiotyków (**Tabela 16**). Izolaty kliniczne pozyskano z Laboratorium Mikrobiologii Wojewódzkiego Szpitala Klinicznego w Gdańsku. Wszystkie wykorzystywane szczepy zostały zdeponowane w Zakładzie Badania Związków Biologicznie Czynnych, Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Szczegółowa charakterystyka wrażliwości poszczególnych izolatów klinicznych przedstawiona została w **Suplemencie 1**.

Tabela 16. Szczepy bakterii wykorzystane w eksperymentach aktywności przeciwdrobnoustrojowej ekstraktów

		Izolaty kliniczne	
Szczepy referencyjne		Wrażliwe	Oporne*
<i>Staphylococcus aureus</i>	Newman	1521	703/k
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAK	3926	2721
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	1077	3896
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	1285	4162
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433	2609	34CRD

*Oporne na co najmniej dwie różne grupy komercyjnie stosowanych antybiotyków

Bakterie hodowano przez noc w 37°C na pożywkę mikrobiologiczną BHI [BD BBL] (**Tabela 17**), zestalonej agarą (15 g/L) [BTL] w inkubatorze stacjonarnym [Binder]. Następnego dnia do zainokulowania pożywki pobierano z płytki kilka kolonii i zawieszano w 3 mL płynnej pożywki BHI. Bakterie hodowano ok. 4-5 godz. w inkubatorze orbitalnym [New Brunswick Scientific Innova 40] w 37°C, przy

prędkości 150 rpm, do czasu osiągnięcia fazy ich logarytmicznego wzrostu. Bakterie rozcieńczano następnie w świeżej porcji pożywki BHI tak, aby uzyskać gęstość optyczną zawiesiny równą 0,5 w skali McFarlanda [DensiMeter II, EMO, Brno]. Następnie bakterie rozcieńczano świeżą porcją pożywki do osiągnięcia stężenia ok. $2,5 - 5 \times 10^5$ CFU/mL.

Tabela 17. Skład pożywki mikrobiologicznej – bulion mózgowo-sercowy (BHI)

Składniki	Stężenie g/L
Pepton	10,0
Wyciąg z mózgu cielęcego	12,5
Wyciąg z serc wołowych	5,0
Glukoza	2,0
Chlorek sodu	5,0
Wodorofosforan disodu	2,5

7.4.2. Przygotowanie bakterii *R. rhizogenes*

Bakterie hodowano przez 24 godz. w 26°C, w całkowitej ciemności na pożywce mikrobiologicznej YEB (**Tabela 5**), zestalonej agarem (15 g/L) [BTL], w inkubatorze stacjonarnym [Binder]. Następnego dnia, do zainokulowania płynnej pożywki, pobierano z płytki 2-3 kolonie i zawieszano w 3 mL pożywki YEB. Bakterie hodowano ok. 4-5 godz., w inkubatorze orbitalnym [New Brunswick Scientific Innova 42] w ciemności w 26°C przy prędkości 120 rpm, do czasu osiągnięcia fazy ich logarytmicznego wzrostu.

7.4.3. Przygotowanie ekstraktów do analizy aktywności przeciwbakteryjnej

Poniższa procedura została zastosowana do wszystkich ekstraktów metanolowych z tkanek liofilizowanych, niezależnie od źródła pochodzenia tkanki (hodowla w glebie / kultura *in vitro*). Od 1 do 2 mL ekstraktu (ekstrakty z tkanek roślin elicytowanych przedstawione w **Tabeli 14** oraz ekstrakt A, Ck F, G przedstawione w **Tabeli 15**) zawieszono w metanolu pozostawiono w sterylnej, szklanej zlewce, w komorze z laminarnym przepływem powietrza, do czasu całkowitego odparowania rozpuszczalnika. Suchy ekstrakt zawieszano następnie porcjami po 250 µL w pożywce BHI. W przypadku ekstraktów z kłączy, kontakt pożywki z ekstraktem powodował wytrącanie się gęstego osadu. Każda porcja przenoszona była do próbówki typu Eppendorf. Łączna objętość zastosowanej pożywki była równa objętości użytego ekstraktu. Ekstrakt w pożywce mieszano intensywnie po czym wirowano przez 5 min w 14 tys. rpm w rotorze GFR-m2.0-12-b [wirówka typu VWR MicroStar 12]. Supernatant delikatnie zbierano znad osadu

i używano do przygotowania seryjnych rozcieńczeń na płytce 96-dołkowej, rozpoczynając od 100 μ L nierozcieńczonego ekstraktu, a następnie mieszając go 1:1 (v/v) z pożywką w dołkach płytki. Całkowita objętość mieszaniny w dołku wynosiła 100 μ L. Ekstrakty testowano w zakresie od 1,25 do 100 mg SM (suchej masy tkanki użytej do przygotowania 1 mL aktywnego ekstraktu)/mL.

Zliofilizowane i homogenne ekstrakty ze świeżych kłączy (ekstrakt D) i korzeni (ekstrakt E), uzyskane w ekstrakcji wodą (7.3.5) rozpuszczano w wodzie uzyskując ekstrakty o stężeniu 50 mg/mL. Stężony ekstrakt wykorzystano do przygotowania seryjnych rozcieńczeń w dołkach płytki, w sposób analogiczny do przedstawionego powyżej dla ekstraktów metanolowych. Ekstrakty przeanalizowano w zakresie od 0,156 mg/mL do 10 mg/mL. Całkowita objętość ekstraktu i pożywki w każdym dołku wynosiła 100 μ L.

7.4.4. Analiza aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów metanolowych i wodnych wobec patogennych bakterii w kulturach planktonicznych

Analizę aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów prowadzono z wykorzystaniem metody seryjnych mikrozcieńczeń pożywki (ang. *broth microdilution method*) w celu oznaczania Minimalnego Stężenia Bakteriobójczego (MBC). Wartość MBC została wyznaczona jako najniższe stężenie substancji przeciwbakteryjnej, które redukuje inokulum bakteryjne o 99,9% (3 logarytmy dziesiętne) w czasie 24 godz. Rozcieńczone bakterie (10 μ L) (7.4.1) dodawano do każdego z dołków płytki z uprzednio przygotowanymi rozcieńczeniami ekstraktów (607.4.3). Następnie płytki inkubowano przez 24 godz. w 37°C. Po tym czasie określano Minimalne Stężenie Hamujące wzrost mikroorganizmów (MIC), czyli najniższe stężenie, przy którym nie obserwuje się już zmętnienia pożywki wywołanego wzrostem mikroorganizmów. Zawartość dołków w których nie obserwowano zmętnienia, rozprowadzano w postaci murawy na płytce z pożywką BHI. Płytki inkubowano przez 24 godz., w 37°C. Po tym czasie liczone kolonie, w celu określenia przy którym stężeniu wystąpił spadek ilości bakterii o 3 logarytmy dziesiętne. Wszystkie eksperymenty zostały wykonane w przynajmniej trzech powtórzeniach biologicznych i trzech powtórzeniach technicznych.

7.4.5. Analiza aktywności przeciwbiofilmowej ekstraktu metanolowego z kłącza *I. pseudacorus*.

Aktywność przeciwbakteryjną ekstraktu z kłączy (ekstrakt A), w stosunku do biofilmu bakteryjnego utworzonego przez *S. aureus* Newman oraz *P. aeruginosa* PAK określano dzięki zastosowaniu komercyjnych płytek 96-bolcowych

[Innovotech] i protokołu MBEC (MBEC protocol, 2017). Eksperymenty rozpoczynano od przygotowania biofilmu. W tym celu bakterie *S. aureus* oraz *P. aeruginosa* hodowano zgodnie z opisem (7.4.1) i rozcieńczano do uzyskania ich gęstości optycznej równej 0,5 McF. Następnie bakterie dodawano do płytek 96-dołkowych (150 μ L/dołek) i umieszczano w nich płytki z bolcami. W celu uformowania na nich biofilmu płytki pozostawiano przez 24 godz. w 37°C w inkubatorze orbitalnym z wytrząsaniem 150 rpm [New Brunswick Scientific Innova 40].

Po inkubacji, bolce z biofilmem płukano dwukrotnie w 0,85% roztworze soli fizjologicznej. Do eksperymentów wykorzystywano ekstrakty z irysów zgodnie z procedurą (7.4.2) i rozcieńczano je seryjnie w pożywce BHI na płytce 96-dołkowej. Całkowita objętość robocza cieczy w dołku wynosiła 200 μ L. Ekstrakty testowano w zakresie stężeń od 0,39 do 50 mg SM/mL w 6 powtórzeniach. W płytce testowej (z gradientem stężeń ekstraktów) umieszczano płytkę z bolcami pokrytymi biofilmem i inkubowano przez 24 godz. w 37°C w inkubatorze stacjonarnym [Binder]. Po tym czasie biofilm przepłukiwano w soli fizjologicznej, po czym bolce umieszczano w płytce 96-dołkowej wypełnionej 200 μ L świeżej pożywki BHI. Płytki poddawano sonikacji w łaźni ultradźwiękowej przez 5 min w celu oderwania biofilmu bakteryjnego. Odzyskany biofilm analizowano pod względem gęstości optycznej w czytniku płytek przy długości fali 600 nm [Wallac 1420 Victor 2, Perkin Elmer]. Minimalne Stężenie Eradykacji Biofilmu (MBEC – ang. *Minimum Biofilm Eradication Concentration*) określano jako najniższe stężenie ekstraktu dla którego $OD_{600} < 0,1$.

7.4.6. Analiza rodzaju interakcji pomiędzy ekstraktami z tkanek *I. pseudacorus* a nanocząstkami srebra w stosunku do wybranych patogenów ludzkich

Aby potwierdzić, czy możliwe jest połączenie ekstraktu z irysa z inną substancją o działaniu przeciwbakteryjnym, w celu obniżenia stężenia dawki ekstraktu w stosunku do bakterii *S. aureus* i *P. aeruginosa*, przeprowadzono analizę interakcji ekstraktu A z nanocząstkami srebra (AgNPs). W eksperymencie wykorzystano komercyjnie dostępne nanocząstki srebra [ProChimia], o wielkości ok. 5,5 nm. AgNPs opłaszczane były ligandem: HS-(CH₂)₁₁N(CH₃)₃, a ich stężenie początkowe wynosiło 481,78 μ g/mL (5,28 x 10¹⁴ NPs/mL). Analizę prowadzono z wykorzystaniem metody tzw. szachownicy (ang. *Checkerboard Titration Method*) (Thornsberry, 1991). Metoda ta pozwala na utworzenie gradientu krzyżowego dwóch czynników w zakresie ich stężeń bakteriobójczych, rozpoczynając od podwojonej wartości MBC a kończąc na 0,03 MBC. Wartości MBC dla obu badanych czynników zostały ustalone wcześniej w niezależnych badaniach. Bakterie zostały przygotowane w sposób analogiczny, jak miało to miejsce podczas

analizy aktywności przeciwbakteryjnej pojedynczych ekstraktów w podrozdziale 7.4.4. Jediną różnicą było przygotowanie seryjnych rozcieńczeń poszczególnych czynników przeciwbakteryjnych, które przygotowano w probówkach typu Eppendorf i nanoszono w malejącym gradiencie stężeń: w rzędach od A do H – ekstrakt z irysa, w kolumnach od 1 do 8 – AgNPs. W ten sposób uzyskano kombinacje wszystkich możliwych wzajemnych stężeń dwóch czynników przeciwbakteryjnych.

Sposób wzajemnej interakcji wyrażano jako FBC_i (ang. *Fractional Bactericidal Concentration index*) będący wynikiem równania:

$$FBC_i = FBC_{ekstraktu} + FBC_{AgNPs} = \frac{FBC_{ekstraktu}}{MBC_{ekstraktu}} + \frac{FBC_{AgNPs}}{MBC_{AgNPs}}$$

Gdzie $FBC_{ekstraktu}$ oraz FBC_{AgNPs} oznaczają najniższe stężenie bakteriobójcze ekstraktu i nanocząstek srebra, gdy użyte są razem. Jeśli $FBC_i \leq 0,5$ obserwujemy oddziaływanie synergistyczne. W sytuacji, w której $0,5 < FBC_i \leq 1$, obserwujemy oddziaływanie addytywne. Wartość $FBC_i > 1$ wskazuje na oddziaływanie antagonistyczne. Rodzaj oddziaływań został zwizualizowany zgodnie z metodą izoboli (Berenbaum, 1978).

7.5. Analiza aktywności biologicznej ekstraktów – aktywność cytotoksyczna

Analizę aktywności cytotoksycznej ekstraktu A oraz wzorca – galokatechiny (związek 4.) którego obecność potwierdzono w ekstrakcie A w eksperymentach związanych z identyfikacją związków aktywnych (7.7.7), wykonała dr Anna Kawiak z MWB UG i GUMed, na liniach ludzkich komórek nowotworowych (American Type Cell Collection, LGC Standards) [CLS, Germany]: MCF-7 (nowotwór piersi), HeLa (nowotwór macicy), HCT-116 (nowotwór okrężnicy) oraz linii kontrolnej, nienowotworowej MCF-10A (unieśmiertelnione komórki nabłonka gruczołu piersiowego). Linia MCF-7 hodowana była w pożywce RPMI [Sigma-Aldrich], HeLa i HCT-116 w pożywce DMEM [Sigma], natomiast linia MCF-10A w pożywce DMEM/F12 [Sigma] (Kawiak i in., 2019). Kultury prowadzono w naczyniach hodowlanych w inkubatorze w 37°C z 5% nasyceniem CO₂ [Heraceus, HERAcell].

Aktywność cytotoksyczna została określona za pomocą testu MTT. Komórki o zagęszczeniu 5×10^3 komórek/dołek umieszczono na płytce 96-dołkowej, gdzie pozostawiano je na noc w celu ich przyłgnięcia do dna i proliferacji. Następnie komórki traktowano ekstraktem w zakresie stężeń od 1 do 100 µg/mL przez 72 godz. Po tym czasie zawartość dołków traktowano 1,2 mM roztworem soli MTT (bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazoliowego) [Sigma] i inkubowano przez

3 godz. w 37°C. Następnie komórki poddawano lizie przy użyciu DMSO [Sigma] i mierzono absorbancję przy długości fali równej 570 nm w czytniku płytek wielodołkowych [Wallac 1420 Victor 2, Perkin Elmer]. Przeżywalność komórek określano w odniesieniu do komórek nie traktowanych ekstraktem. Dla każdej z linii wyznaczono wartość IC_{50} (ang. *the half maximal inhibitory concentration*), czyli stężenie badanego związku powodujące zahamowanie proliferacji 50% komórek.

7.6. Analiza składu metabolicznego ekstraktów

7.6.1. Pomiar całkowitej zawartości związków fenolowych i tanin w kłączach *I. pseudacorus*

Całkowitą zawartość tanin i związków fenolowych w suchej masie kłączy określano za pomocą metody proszku skórzanego zgodnie z protokołem przedstawionym w VIII edycji Farmakopei Europejskiej (2014). Analizę wykonano we współpracy z dr Adamem Kokotkiewiczem z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Wydziału Farmaceutycznego w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji. W metodzie tej, opartej o reakcję związków fenolowych z odczynnikiem Folin–Ciocalteu [Sigma] i wykorzystaniu zdolności tanin do wiązania się z proszkiem skórzanym, możliwe jest ilościowe określenie zarówno zawartości wszystkich reagujących z odczynnikiem związków fenolowych, jak również wyodrębnienie z nich udziału tanin. Pomiar spektrofotometryczny przed i po zastosowaniu proszku skórzanego, w oparciu o krzywą kalibracyjną wykonaną dla gradientu stężeń wzorca – pirogallolu [Sigma], pozwolił na ilościowe określenie całkowitej zawartości tanin i związków fenolowych w badanej tkance.

7.6.2. Hydroliza ekstraktów w środowisku kwasowym – określenie charakteru tanin

Analizę jakościową tanin rozpoczęto od przeprowadzenia kwasowej hydrolizy ekstraktów A i B (7.3.2). Hydrolizę wykonał dr Piotr Migas z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Wydziału Farmaceutycznego w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji. Do ekstraktów dodawano 1 M HCl. Mieszaninę podgrzewano w kąpielii wodnej pod chłodnicą zwrotną przez 2 godz. Hydrolizat ekstrahowano trzykrotnie octanem etylu, a uzyskany ekstrakt odparowywano do sucha. Suchą pozostałość rozpuszczano w metanolu i analizowano za pomocą metod chromatograficznych: TLC (7.7.2) i HPLC–DAD–ESI–MS (7.7.6).

7.6.3. Pomiar całkowitej zawartości związków fenolowych w ekstraktach z tkanek roślin elicytowanych i roślin poddanych transformacji

Całkowita zawartość związków fenolowych w ekstrakcie z tkanek roślin poddanych elicytacji, tkanek roślin kontrolnych i z rośliny transformowanej, oznaczono zgodnie z metodą Folin–Ciocalteu opisaną przez (Singh i in., 2015) z modyfikacjami. Ekstrakty metanolowe (**Tabela 14**) rozcieńczono w wodzie destylowanej: 8-krotnie w przypadku ekstraktów z korzeni (z powodu intensywnego, zielonego koloru) i 3-krotnie w przypadku ekstraktów z łodyg. Następnie 25 μL rozcieńczonego ekstraktu łączono z 125 μL odczynnika Folin–Ciocalteu [Sigma], uprzednio rozcieńczonego w wodzie, w stosunku 1:10 (v/v). Ekstrakt z odczynnikiem inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej. Po tym czasie do mieszaniny dodawano 100 μL 7,5% roztworu węgla sodu [Sigma]. Po dokładnym zmieszaniu, próbki inkubowano przez 15 min w 40°C. Po inkubacji całkowitą objętość mieszaniny (250 μL) przenoszono do dołka płytki 96-dołkowej celem dokonania pomiaru absorbancji przy długości fali 760 nm, w czytniku płytek [EPOCH 2, BioTek]. Całkowitą zawartość związków fenolowych wyrażono jako ekwiwalent kwasu galusowego, w oparciu o krzywą kalibracyjną dla serii rozcieńczeń przygotowaną wcześniej w identycznych warunkach eksperymentalnych. Pomiaru dokonano w trzech powtórzeniach.

7.6.4. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną różnic w zawartości związków fenolowych w tkankach roślin po elicytacji wykonała dr Anna Gwizdek-Wiśniewska (Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, Olsztyn). Wykonano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA. Dla istotnych różnic pomiędzy średnimi zastosowano test post-hoc – rozsądniej istotnej różnicy Tukeya (RIR). Analizę wykonano przy pomocy oprogramowania STATISTICA.

7.7. Analiza chromatograficzna ekstraktów – chromatografia cienkowsarstwowa, bioautografia metodą agaru górnego oraz wysokosprawna chromatografia cieczowa

7.7.1. Wzorce

W analizie chromatograficznej TLC/HPTLC oraz HPLC wykorzystano następujące związki wzorcowe: genisteinę, daidzeinę, galusan epikatechiny, epigalokatechinę, galusan katechiny, gallusan epigalokatechiny kwas elagowy, kwas galusowy [Extrasynthese, Francja].

7.7.2. Jednokierunkowa chromatografia TLC

Szklane płytki HPTLC Si₆₀ F₂₅₄ [Merck] wykorzystywano do analizy ekstraktów: metanolowego (A) oraz acetonowego (B) z liofilizowanych kłączy irysów hodowanych w glebie, a także frakcji A-E, A-O, A-W uzyskanych z ekstraktu A. W eksperymentach wykorzystano fazy ruchome: (I) kwas octowy–eter dietylowy–n-heksan–octan etylu, (20:20:20:40, v/v/v/v) (*Farmakopea Polska, edycja XI*, 2017); oraz (II) n-butanol–kwas octowy–woda (30:15:15, v/v/v) (Muller-Harvey, 2001). Rozwinięte chromatogramy oglądano w świetle UV λ - 366 nm oraz w świetle widzialnym, przed oraz po derywatywacji: 1% chlorkiem żelaza w metanolu, odczynnikiem wanilinowym w kwasie siarkowym po podgrzaniu płytki do temp. 105°C przez 10 min oraz 2% kwasem solnym w metanolu i ogrzaniu do 105°C przez 10 min. Wszystkie rozpuszczalniki zakupiono z firmy Chempur.

7.7.3. Dwukierunkowa chromatografia TLC

Frakcje A-E (50 μ L), A-O (50 μ L) oraz A-W (36 μ L) uzyskane z ekstraktu A, analizowano techniką chromatografii dwukierunkowej (2D-TLC) z użyciem płytek 10 \times 10 cm pokrytych celulozą [Merck]. Jako fazy ruchome zastosowano: w pierwszym kierunku: (III) n-butanol–kwas octowy–woda (5:1:4, v/v/v), a w drugim kierunku: (IV) 5% kwas octowy.

Ekstrakt C uzyskany w ekstrakcji z pożywki po hodowli korzeni (kolejno 60 μ L oraz 40 μ L), analizowano w dwóch systemach TLC:

1. na szklanych płytkach HPTLC Si₆₀ F₂₅₄ 5 \times 5 cm w fazach mobilnych, w pierwszym kierunku: (V) octan etylu–chloroform–kwas mrówkowy, (45:45:10, v/v/v), a w drugim: (VI) octan etylu;
2. na szklanych płytkach HPTLC Si₆₀ F₂₅₄ 10 \times 10 cm w fazach mobilnych, w pierwszym kierunku: (VII) chloroform–metanol–kwas mrówkowy (93:2:5, v/v/v), a w drugim kierunku: (VIII) eter naftowy–octan etylu–kwas mrówkowy (60:30:5, v/v/v). Chromatografie prowadzone były w komorach typu *Twin Trough Chamber* [Camag] wysyconych przez 10 min oparami fazy mobilnej. Rozwinięte chromatogramy analizowano w świetle UV o długości fali 366 nm oraz 254 nm przed oraz po derywatywacji z odczynnikiem NP PEG (ang. *natural products and polyethylenglycol*) (*Farmakopea Europejska wydanie 8*, 2014). Zestawienie wszystkich układów chromatograficznych wykorzystanych w analizach przedstawiono w **Tabeli 18**.

Tabela 18. Układy faz ruchomych wykorzystane w cienkowarstwowej chromatografii TLC

Numer fazy	Skład
(I)	kwas octowy–eter dietylowy–n-heksan–octan etylu, (20:20:20:40, v/v/v/v)
(II)	n-butanol–kwas octowy–woda (30:15:15, v/v/v)
(III)	n-butanol–kwas octowy–woda (5:1:4, v/v/v)
(IV)	5% kwas octowy
(V)	octan etylu–chloroform–kwasy mrówkowy (45:45:10, v/v/v)
(VI)	octan etylu
(VII)	chloroform–metanol–kwasy mrówkowy (93:2:5, v/v/v)
(VIII)	eter naftowy–octan etylu–kwasy mrówkowy (60:30:5, v/v/v)

7.7.4. Bioautografia metodą agaru górnego

Bioautografię metodą agaru górnego prowadzono bezpośrednio na chromatogramach uzyskanych dla frakcji A-E, A-O, A-W oraz dla ekstraktu C. W eksperymentach wykorzystano bakterie *S. aureus* Newman. Bakterie, podobnie jak miało to miejsce w eksperymentach opisanych w podrozdziale (7.4.1), hodowano przez ok. 5 godz. w pożywce BHI (**Tabela 17**). Bakterie w fazie logarytmicznego wzrostu rozcieńczano do 10^6 CFU/mL. Następnie 5 mL rozcieńczonej zawiesiny bakteryjnej mieszano z 45 mL pożywki BHI zawierającej 6 g/L agaru do hodowli roślin [Duchefa Biochemie] (pożywkę ostudzono do temp. 40°C). Tak przygotowany agar górny rozprowadzano na powierzchni chromatogramów celem uzyskania jednolitej warstwy nie przekraczającej 2 mm grubości. Chromatogramy z bakteriami inkubowano w 37°C przez 24 godz. Po tym czasie sprawdzano, czy na chromatogramach widoczne są strefy zahamowania wzrostu świadczące o obecności związków o aktywności przeciwbakteryjnej. W celu uwidocznienia stref zahamowania, po inkubacji płytki spryskiwano wodnym roztworem MTT [Sigma] o stężeniu 1 mg/mL. Po 30 min inkubacji w 37°C płytki poddawano obserwacji. Strefy, w których dochodziło do zahamowania wzrostu bakterii pozostawały żółte bądź bezbarwne. Tylko żywe i aktywne metabolicznie bakterie są w stanie przekształcać żółtą sól tetrazolową (MTT) do fioletowego formazanu.

7.7.5. Warunki wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją diodową w świetle UV-VIS oraz detekcją masową (ESI-MS)

Analizy HPLC wykonano na Wydziale Farmaceutycznym w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji GUMed. Przeprowadzono je z wykorzystaniem systemu LC (ang. *Liquid Chromatography*) [Shimadzu Kyoto, Japan] złożonego z dwóch pomp LC-20AD, pół-mikro mieszalnika, systemu kontroli CBM-20A, termostatu kolumny CT0-20A, podajnika automatycznego SIL 20AC_{XR}, detektora diodowego

UV-VIS SPD-M20A, detektora masowego LCMS-2020 z jonizacją ESI (ang. *Electrospray Ionization*). Dane zebrano i opracowano przy pomocy oprogramowania LabSolution. Chromatografię prowadzono z wykorzystaniem kolumny Kinetex C18 (100 × 4.6 mm) [Phenomenex, USA] w układzie faz ruchomych, w programie elucji gradientowej: I (% B w A): 0 min. - 12% B, 10 min. - 20% B, 35 min. - 43% B, 60 min. - 100%, 62 min. - 12% B, 72 min. - 12% B oraz II, który stanowił modyfikację programu I poprzez dodanie izokratycznej elucji z wykorzystaniem 100% B od 60 do 64 minuty, a następnie kondycjonowanie kolumny przez następne 12 minut. A: H₂O-HCOOH (100:0,1; v/v), B: ACN-H₂O-HCOOH (50:50:0,1; v/v/v): temp. kolumny 20°C, przepływ fazy mobilnej 0,8 mL/min, objętość nastrzykiwanej próbki: 1 µL, detekcja UV przy λ – 266 nm.

Widma masowe ESI uzyskano w trybie jonów pozytywnych (PI) oraz negatywnych (NI) z przepływem gazu rozpylającego (azotu) 1,5 L/min, w temperaturze linii desolwatacyjnej 250 °C i bloku 200 °C, napięciem interfejsu 4,5 kV, napięciem detektora 1,8 kV i przepływie gazu suszącego (azotu) 16 L/min. Do monitorowania specyficznych sygnałów wybranych jonów wykorzystano metodę SIM (ang. *Selected Ion Monitoring*).

7.7.6. Analiza chromatograficzna ekstraktów i frakcji z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Analizie chromatograficznej poddano frakcję A-O, ekstrakt C oraz ekstrakt E (**Tabela 15**), a także ekstrakty z korzeni dobrze i słabo rosnących z kultur korzeni anatomicznych *in vitro* i pożywki po hodowli tych korzeni (ekstrakt C). Analizę przeprowadzono we współpracy z zespołem prof. dr hab. Mirosławy Krauze-Baranowskiej z Katedry i Zakładu Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. W analizie wykorzystano technikę HPLC-DAD-ESI-MS [Shimadzu] zgodnie z metodą przedstawioną w podrozdziale (7.7.5).

7.7.7. Izolacja i identyfikacja związków aktywnych, w tym związków przeciwbakteryjnych, w ekstrakcie z pożywki po hodowli korzeni *I. pseudacorus* (ekstrakt C)

W celu izolacji i identyfikacji związków przeciwbakteryjnych wykrytych w ekstrakcie C (7.3.4) za pomocą bioautografii metodą agaru górnego (7.7.4), przeprowadzono półpreparatywną chromatografię TLC (Si₆₀ F₂₅₄). Na szklane płytki TLC o wymiarach 10 × 20 cm nałożono ekstrakt C. Ekstrakt nakładano w postaci 18 cm paska, o łącznej objętości 400 µL. Pasma nanoszono za pomocą automatycznego aplikatora do TLC [Desaga AS30]. Rozdzielanie prowadzono na drodze 8 cm, w komorze chromatograficznej z przegrodą (*Twin Trough*

Chamber) [Camag] nasycanej parami fazy ruchomej (VIII) (7.7.3), w czasie 10 min. Chromatogramy analizowano w świetle UV (λ – 366 nm). Rozdzielone strefy zawierające związki (1) oraz (3) zdejmowano z płytki wraz ze złożem i ekstrahowano za pomocą 1,5 mL metanolu, inkubując mieszaninę w łaźni ultradźwiękowej przez 10 min. Osad z krzemionki oddzielano przez 10 minutowe wirowanie. Następnie 1 mL supernatantu odparowywano w strumieniu azotu. Suchą pozostałość rozpuszczono w 100 μ L metanolu. Wyizolowane związki (1) oraz (3) identyfikowano z wykorzystaniem metody HPLC-DAD-ESI-MS (7.7.6). Podczas analizy, na podstawie posiadanych wzorców oznaczono również zawartość genisteiny i daidzeiny.

7.7.8. Izolacja i identyfikacja związku przeciwbakteryjnego z ekstraktu z kłączy *I. pseudacorus* (frakcji A-O).

Izolację związku (4), dla którego w czasie analizy bioautograficznej (7.7.4) wykazano aktywność przeciwbakteryjną, przeprowadzono z użyciem półpreparatywnej chromatografii TLC. Frakcję A-O nakładano automatycznie na płytkę TLC Si₆₀ F₂₅₄ (20 × 10 cm) [Merck]. Chromatogramy rozwijano w komorze wysyczonej parami fazy ruchomej (I) (7.7.2). Plamka odpowiadająca związkowi (4), została zdjęta z płytki ze złożem, z którego ekstrahowano go poprzez 3-krotne mieszanie z acetonem w czasie 10 min inkubacji w łaźni ultradźwiękowej. W celu oddzielenia złoża krzemionkowego, próbki wirowano przez 10 min. Uzyskane ekstrakty łączono ze sobą i odparowywano do sucha. Pozostałość zawieszano w 2 mL metanolu. Identyfikację wyizolowanego związku (4) prowadzono z wykorzystaniem metody HPLC-DAD-ESI-MS (7.7.6).

7.8. Synteza nanocząstek srebra z wykorzystaniem ekstraktów z tkanek *I. pseudacorus*. Charakterystyka uzyskanych struktur.

7.8.1. Ekologiczna synteza nanocząstek srebra z wykorzystaniem ekstraktów z tkanek *I. pseudacorus*

Do syntezy biologicznie czynnych nanocząstek srebra (AgNPs) wykorzystano wodne ekstrakty ze świeżych tkanek: liści, kłączy (ekstrakt D) bądź korzeni (ekstrakt E) *I. pseudacorus*, przygotowanych zgodnie z opisem (7.3.5). Ekstrakcję przeprowadzono w oparciu o procedurę przedstawioną przez Banasiuka i współpracowników (2020). Przed syntezą ekstrakty rozcieńczano wodą demineralizowaną w stosunku 1:4 (v/v). Mieszaninę reakcyjną sporządzono z 2 mL PVP o stężeniu 100 mg/mL [Sigma], 0,5 mL wodnego roztworu azotanu(V) srebra [Merck] o stężeniu 120 mg/mL oraz 47,5 mL wody demineralizowanej. Uzyskaną

mieszaninę łączono następnie z 50 mL rozcieńczonego ekstraktu i poddawano działaniu mikrofal przez ok. 2 min. Po ostygnięciu, mieszaninę zawierającą AgNPs przechowywano w zaciemnionym miejscu. Po ok. dwóch tygodniach, na podstawie obserwacji powstającego osadu świadczącego o wytrącaniu się nanocząstek z roztworu, do dalszych analiz wytypowano próbę charakteryzującą się najmniejszym strąceniem, tę wykonaną na bazie ekstraktu z korzeni. Roztwór nanocząstek z ekstraktu z korzeni poddano liofilizacji. Do dalszych analiz przechowywano je w probówce typu Eppendorf, w ciemności.

7.8.2. Analiza wielkości i kształtu nanocząstek z wykorzystaniem Transmisyjnego Mikroskopu Elektronowego (TEM)

Nanocząstki srebra uzyskane w wyniku syntezy z wykorzystaniem ekstraktu wodnego z korzeni (ekstrakt E) *I. pseudacorus* poddano analizie obrazowej (TEM). Analizę wykonała dr hab. Magdalena Narajczyk w Laboratorium Mikroskopii Elektronowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. Nanocząstki nanoszono na siatkę mikroskopu i poddawano analizie bezpośrednio po wyschnięciu, bez napyłania dodatkowych powłok. Zarejestrowany obraz posłużył do określenia kształtu i rozmiaru uzyskanych nanostruktur

7.8.3. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR)

Analizę FT-IR przeprowadziła dr hab. Agnieszka Chylewska z Uniwersytetu Gdańskiego, Wydziału Chemicznego, Katedry Chemii Bionieorganicznej w Zespole Oddziaływań Międzycząsteczkowych. Widma w podczerwieni (FT-IR) dla uzyskanych nanocząstek oraz substratów wykorzystanych do ich syntezy: PVP oraz ekstrakt E, zarejestrowano za pomocą spektrometru Brüker Infrared Spectrometer w zakresie $399-4433\text{ cm}^{-1}$, zarówno przed liofilizacją, jak i po liofilizacji uzyskanych nanocząstek srebra.

7.8.4. Spektroskopia UV-VIS

Widma tworzenia się nanocząstek w czasie reakcji ekstraktu z korzeni z irysa (ekstraktu E) z AgNO_3 , zarejestrowano za pomocą spektrofotometru Evolution 300 [Thermo Scientific] na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Widma rejestrowano w zakresie od 200 do 800 nm w temperaturze pokojowej, na drodze optycznej równej 1 cm. Pomiary prowadzono od 4 minuty syntezy do 24 godziny, w odstępach 3 godzin. Jako kontrolę zarejestrowano widma dla wszystkich substratów wykorzystanych w reakcji: PVP, ekstrakt E, oraz azotan (V) srebra.

7.8.5. Analiza dynamicznego rozpraszania światła (DLS)

W celu określenia rozkładu wielkości uzyskanych nanocząstek srebra przeprowadzono pomiar dynamicznego rozproszenia światła (DLS) z wykorzystaniem urządzenia Zetasizer Nano ZS [Malvern Panalytical]. W tym celu 2 mL podwójnie demineralizowanej wody dodawano do kuwety wraz z 5 mL badanych AgNPs. Następnie mieszano próbkę i w temp. 25°C dokonywano pomiaru z wykorzystaniem lasera He-Ne (633 nm, 4 mW) i kącie odbicia 173°. Dane zostały opracowane przy użyciu oprogramowania Malvern Zetasizer Software w oparciu o równanie Smoluchowskiego.

7.8.6. Analiza aktywności przeciwbakteryjnej nanocząstek srebra uzyskanych z wodnego ekstraktu z korzeni *I. pseudacorus* (ekstrakt E)

Zliofilizowane AgNPs uzyskane w wyniku ekologicznej syntezy z wykorzystaniem wodnego ekstraktu z korzeni *I. pseudacorus* zawieszano w wodzie demineralizowanej uzyskując stężenie 2 mg/mL. Następnie analizowano je pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej wykorzystując metodę seryjnych mikrorozcieńczeń, analogicznie jak w stosunku do komercyjnie dostępnych nanocząstek (7.4.6). Nanocząstki testowano w zakresie stężeń od 1,56 do 200 µg/mL w stosunku do bakterii *S. aureus* (szczypty: Newman, 1521 oraz 703/k) oraz *P. aeruginosa* (PAK, 3926 oraz 2721).

Wyniki i dyskusja



8. Wyniki i dyskusja

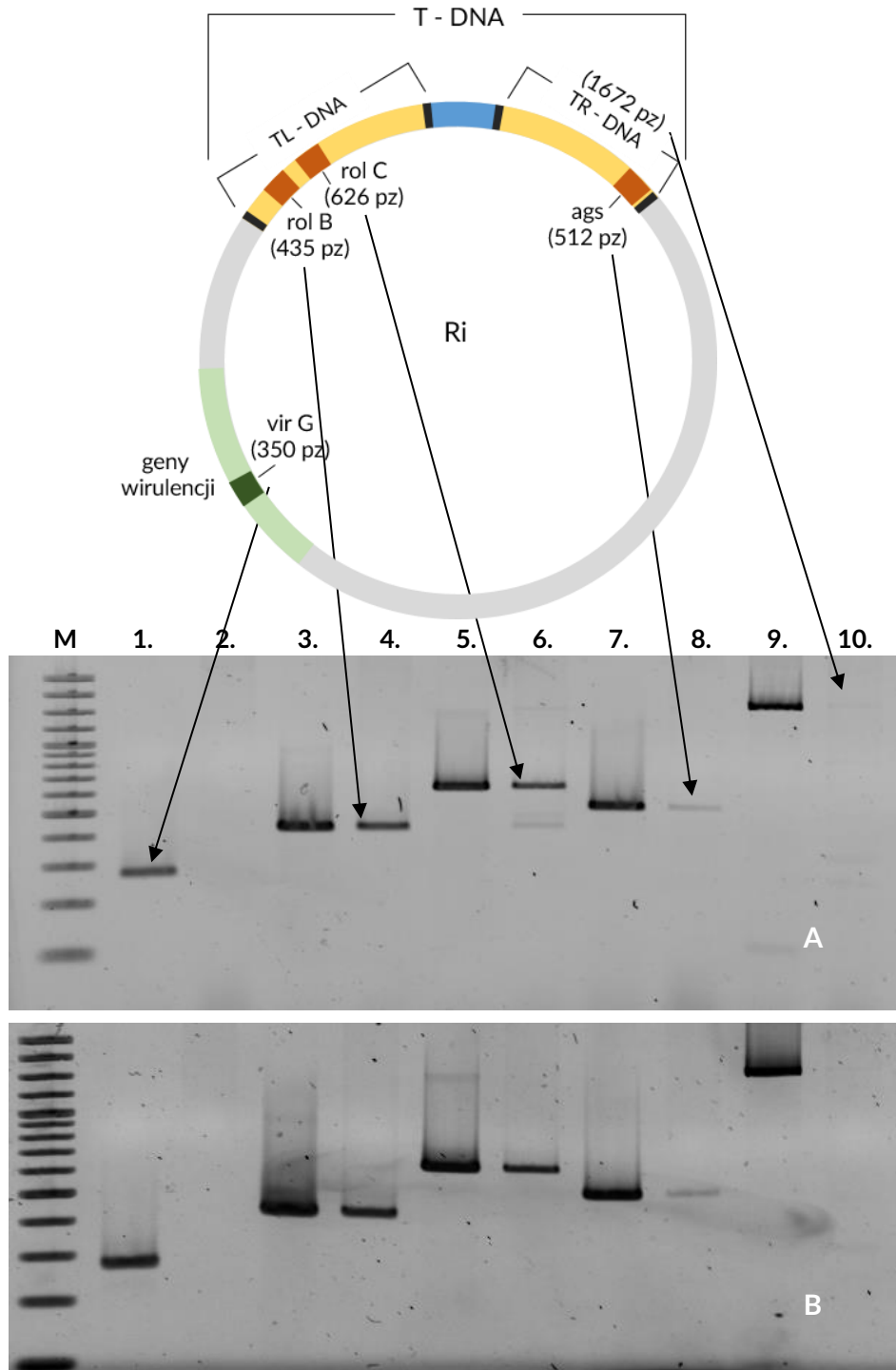
8.1. Wprowadzenie roślin *I. pseudacorus* do kultury *in vitro*. Transformacja, inicjacja kultury pędów i kultury korzeni anatomicznych.

8.1.1. Wprowadzenie roślin *I. pseudacorus* do kultury *in vitro*

Kultury *in vitro* roślin *I. pseudacorus* zainicjowano z nasion. Świeże nasiona, przechowywane nie dłużej niż pół roku od zbioru, rozpoczynały kiełkowanie już po 9 dniach od przeprowadzenia sterylizacji. Siewki, po przeniesieniu ich na agarowe podłoże podstawowe MS z 0,3% PVP i 20 g/L sacharozy, rozwijały się prawidłowo formując rozległy system korzeniowy w podłożu. Po ok. 10-12 tygodniach rośliny posiadające przynajmniej 6 liści oraz liczne, zielone korzenie przybyszowe pasażowane były zarówno na podłoża agarowe, jak również do pożywki płynnej z podwyższoną zawartością sacharozy (40 g/L) – warunków preferowanych przez *I. pseudacorus*. Uzyskane siewki posłużyły do inicjacji kultury pędów (8.1.3), a młode rośliny do inicjacji kultury korzeni anatomicznych (8.1.4) oraz przeprowadzenia transformacji z wykorzystaniem bakterii z gatunku *R. rhizogenes* (8.1.2).

8.1.2. Transformacja roślin *I. pseudacorus* za pomocą bakterii *R. rhizogenes*

Transformację roślin *I. pseudacorus* przeprowadzono z wykorzystaniem 3 szczepów agropinowych bakterii *R. rhizogenes* posiadających plazmid infekcyjny Ri (7.2). W wyniku przeprowadzonej transformacji roślin, nie uzyskano wzrostu typowych korzeni włósnikowatych, mogących świadczyć o integracji T-DNA z plazmidu bakterii do genomu rośliny. Analizie poddano więc materiał genetyczny wyizolowany z liści i korzeni anatomicznych roślin poddanych procedurze transformacji. Analiza PCR genu *virG* obecnego jedynie na plazmidzie bakterii wykazała całkowitą eliminację bakterii z kokultury we wszystkich 21 inokulowanych roślinach. Analiza przeprowadzona dla sekwencji *rolB* i *rolC* z lewej sekwencji T-DNA (T_L-DNA) wykazała obecność co najmniej jednej z analizowanych sekwencji w genomie 8 z 21 roślin, potwierdzając tym samym uzyskanie teratomów – transformowanych pędów. W celu potwierdzenia, czy do genomu roślin wbudował się również prawy region T-DNA (T_R-DNA), przeprowadzono analizę z wykorzystaniem genu *ags* oraz starterów komplementarnych do całej sekwencji T_R. Obecność fragmentu *ags* i T_R potwierdzono tylko dla jednej transformowanej rośliny w jej korzeniach (**Rysunek 5a**), i rejonu *ags* w liściach (**Rysunek 5b**).



Rysunek 5. Analiza PCR DNA wyizolowanego z: **A.** korzeni, **B.** liści rośliny *I. pseudacorus* transformowanej za pomocą *R. rhizogenes* szczepu A4. **M.** Marker wielkości fragmentów DNA GeneRuler™ 100-3000 par zasad [pz]. DNA plazmidowe *R. rhizogenes* – kontrola pozytywna – linie: **1.** *virG*, **3.** *rolB* **5.** *rolC* **7.** *ags* **9.** Tr; DNA wyizolowane z transformowanej rośliny - linie: **2.** *virG*, **4.** *rolB* **6.** *rolC* **8.** *ags* **10.** Tr.

Transformowaną roślinę uzyskano w wyniku inokulacji szczepem A4. Pomimo obecności obu fragmentów T-DNA, nie zaobserwowano jednak wzrostu korzeni włóśnikowatych. Z powodu braku możliwości skutecznego mikrorozmnażania tego gatunku bez ryzyka utraty jedynej, w pełni transformowanego osobnika, roślinę utrzymywano w warunkach *in vitro* do momentu wyczerpania możliwości hodowlanych wynikających z rozmiaru tej rośliny (7.1.5).

Niniejsza praca jest pierwszym doniesieniem wskazującym na możliwość integracji T-DNA z plazmidu bakterii *R. rhizogenes* do genomu rośliny z rodzaju *Iris*. Dotychczas opisano tylko jeden przykład transformacji irysów przeprowadzony na komórkach *Iris germanica*, ale z wykorzystaniem bakterii *Rhizobium radiobacter* (dawniej *Agrobacterium tumefaciens*) (Jeknic i in., 1999). W literaturze naukowej nie znaleziono natomiast doniesień na temat kultury korzeni włóśnikowatych ani teratomów irysów uzyskanych w wyniku inokulacji rośliny bakteriami *Rhizobium rhizogenes*

I. pseudacorus jest rośliną jednoliścienną. Rośliny te charakteryzują się niższą wrażliwością lub całkowitą niewrażliwością na transformację za pośrednictwem bakterii *Rhizobium (Agrobacterium)*, w przeciwieństwie do roślin dwuliściennych (Cleene i Ley, 1981; Porter i Flores, 1991; Tepfer, 1984). Mechanizm stojący za wyższą opornością roślin jednoliściennych na transformację nie został do końca poznany. Wskazuje się, że może ona wynikać z różnic: w strukturach komórkowych roślin; chemoatraktantach uwalnianych z tkanek roślinnych stymulujących wirulencję; w receptorach umożliwiających przyleganie bakterii; w odpowiedzi roślin na zranienie, w tym wydzielanie związków przeciwbakteryjnych (Sood i in., 2011). Skuteczność transformacji w warunkach laboratoryjnych może być jednak zwiększana poprzez zastosowanie odpowiednich szczepów bakterii, dobór tkanki inicjalnej poddawanej transformacji, dobór metody inokulacji czy warunków hodowli (Cheng i in., 2004; Wasilewska i Królicka, 2005).

W eksperymencie prowadzonym na roślinach *I. pseudacorus* wykluczono wpływ związków przeciwbakteryjnych zawartych w ich tkankach, mogących wyeliminować bakterie przed transformacją. Ekstrakty przygotowane z pędów młodych irysów (ekstrakt G) z kultury *in vitro*, nie wykazały aktywności przeciwbakteryjnej w stosunku do bakterii z gatunku *R. rhizogenes* w zakresie od 1,25 do 100 mg SM/mL. Do inokulacji roślin *I. pseudacorus* wybrano wysoko wirulentne szczepy agropinowe o szerokim zakresie gospodarzy (Cleene i Ley, 1981; Porter i Flores, 1991; Tepfer, 1984). Dodatkowo przed transformacją bakterie hodowano z dodatkiem acetosyringonu, który miał za zadanie doprowadzić do aktywacji ekspresji genów wirulencji (Marimuthu i in., 2014), zwiększając tym

samym szansę na skuteczną transformację. Szczepy agropinowe posiadają plazmid Ri z dwiema sekwencjami T-DNA: T_L-DNA i T_R-DNA. Sekwencje te wycinane są, transportowane i integrowane do genomu rośliny w sposób niezależny, przy czym to T_L-DNA z genami *rol* wskazywany jest jako kluczowy dla indukcji wzrostu korzeni włośnikowatych (Nilsson i Olsson 1997; Sevón i Oksman-Caldentey 2002; Phelep i in. 1991). W swoich badaniach Vilaine i Casse-Delbart (1987) wykazali, że obie sekwencje niezależnie są w stanie wywołać wzrost korzeni włośnikowatych w testowanych przez nich modelach roślinnych, choć kluczową rolę nadal przypisywano rejonowi T_L-DNA. W przytoczonych badaniach, obecność T_R-DNA wzmacniała skuteczność transformacji. W badaniach nad transformantami *I. pseudacorus* integracja samego T_L-DNA (potwierdzona obecnością genów *rolB/rolC* w 8 roślinach), oraz integracja obu fragmentów T-DNA (potwierdzona dodatkowo analizą *ags* i T_R, wykazane u jednego osobnika), nie zakończyły się wzrostem korzeni włośnikowatych. Analiza danych literaturowych wskazuje jednak, że brak wzrostu korzeni po skutecznej integracji T-DNA do genomu roślin jednoliściennych, najprawdopodobniej nie jest zjawiskiem rzadkim lecz niedoszacowanym, ze względu na rzadko podejmowaną analizę genetyczną w przypadku nieobecności typowych zmian w fenotypie roślin (Porter i Flores, 1991). Pomimo szerokiej wiedzy na temat mechanizmów wycinania, transferu i integracji T-DNA, sam mechanizm indukcji wzrostu korzeni nie jest w pełni wyjaśniony. Dotychczas wykazano, że kluczowy wpływ ma ekspresja genów *rol: rolA, rolB, rolC* (Christey, 2001; Nilsson i Olsson, 1997; Veena i Taylor, 2007). Jednakże efekt fenotypowy może zależeć od liczby zintegrowanych kopii T-DNA, poziomu ekspresji, stopnia metylacji, czy ekspresji innych genów spoza ramek odczytu genów *rol* (Christey, 2001; Veena i Taylor, 2007). Każda nierównowaga w poziomie ekspresji któregośkolwiek z genów może prowadzić do zahamowania wzrostu korzeni, czego przykładem może być ekspresja genu *rolB*. Zbyt wysoki lub zbyt niski jej poziom upośledza wzrost korzeni włośnikowatych (Tanaka i in., 2001).

Nie bez znaczenia dla zatrzymania wzrostu korzeni włośnikowatych może mieć też odpowiedź rośliny na stres jakim było uszkodzenie mechaniczne podczas inokulacji oraz regularne przycinanie liści (ze względu na ograniczoną przestrzeń hodowlaną). Rośliny do jej regulacji najczęściej wykorzystują hormony, co może wpływać na ekspresję wprowadzonych genów lub kompensować ich wpływ innymi regulatorami, w celu przywrócenia równowagi w organizmie (Bari i Jones, 2009; Tognetti i in., 2012; Verma i in., 2016).

Pomimo braku wzrostu korzeni włośnikowatych niewykluczone jest wykorzystanie transformacji za pośrednictwem bakterii z gatunku *R. rhizogenes*

do uzyskania kultury korzeni transformowanych *I. pseudacorus*, dedykowanych do pozyskiwania związków biologicznie czynnych. Jak pokazują wyniki uzyskane w dalszej części pracy, możliwe jest bowiem uzyskanie kultury korzeni anatomicznych *I. pseudacorus*, które podobnie jak korzenie włośnikowate, nie wymagają stosowania zewnętrznych regulatorów wzrostu do ich utrzymania w kulturze *in vitro* (8.1.4). Pozwalają one również na pozyskiwanie związków aktywnych (8.2). Ze względu na fakt, że kultury korzeni anatomicznych irysa udało się zainicjować po zakończeniu prac eksperymentalnych związanych z transformacją, już po terminacji hodowli jedynej transformowanej rośliny, nie było możliwe potwierdzenie zasadności tej hipotezy.

Wartym zaznaczenia jest fakt, że w tkankach roślin transformowanych potwierdzono obecność licznych związków fenolowych. Pomiar i obliczenia przeprowadzone w oparciu o metodę z odczynnikiem Folin–Ciocalteu (7.6.3) wykazały, że kłącze rośliny transformowanej zawiera ok. 5,57 mg/g tkanki związków fenolowych, co stanowi około 1,8 razy wyższą zawartość niż w kłączu rośliny nietransformowanej, hodowanej w podobnych warunkach eksperymentalnych.

8.1.3. Inicjacja kultury pędów

Eksperyment związany z inicjacją kultury pędów *I. pseudacorus* przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch typów eksplantatów znajdujących się w warunkach *in vitro* hipokotyli oraz merystemów wierzchołkowych młodych klonów roślin (7.1.7). Izolowane hipokotyle oraz merystemy wierzchołkowe irysów poddano działaniu regulatorów wzrostu, aż do momentu zaobserwowania fenotypowych zmian u podstawy łodygi. Eksplantaty, u których zaobserwowano zmiany, przenoszono na pożywkę bez regulatorów wzrostu, w celu umożliwienia regeneracji pędów. Zmiany dokumentowano fotograficznie.

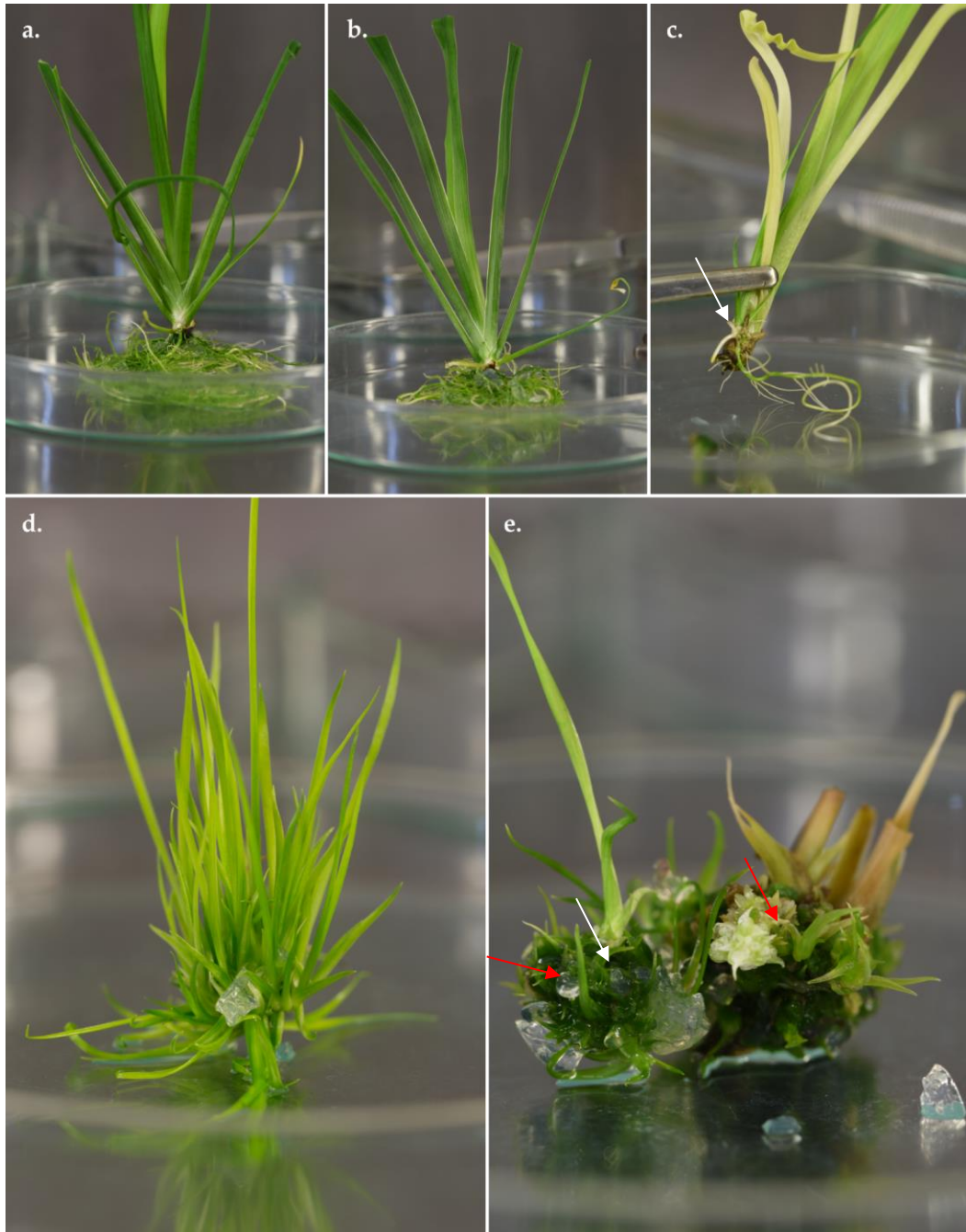
Na podstawie prowadzonych obserwacji ustalono, że spośród dwóch wybranych do eksperymentu typów eksplantatów, najlepszym materiałem inicjalnym do uzyskania kultury pędów *I. pseudacorus* są hipokotyle (**Fotografia 2**). Kulturę zainicjowano za pomocą dwóch z trzech testowanych kombinacji regulatorów wzrostu: (**A**) 0,22 mg/L TDZ + 2 mg/L BAP oraz (**B**) 0,22 mg/L TDZ + 2 mg/L 2iP. Wśród nich wariant (**A**) pozwalał na uzyskanie kultury pędów z najmniejszym udziałem kalusa (**Fotografia 2d, 3a, 3b**), w czasie krótszym o ok. miesiąc niż w przypadku zastosowania kombinacji (**B**). W analogicznym czasie stosując kombinację (**B**) uzyskano jedynie gęstą masę komórek kalusa z widocznymi, różnicującymi się młodymi pędami (**Fotografia 2e, 3c, 3d**). Zarówno cięcie, jak i zastosowanie siarczanu adeniny nie miały samodzielnego

wpływu na inicjację kultury pędów (**Fotografia 2a, 2b**). W przypadku kombinacji (C) 0,3 mg/L NAA + 3 mg/L 2iP + 1 mg/L BAP zaobserwowano pojawienie się niewielkiej, zbitej masy kalusa i 1-2 roślin potomnych przyrastających z aktywowanych pączków bocznych. W czasie prowadzenia eksperymentu nie zaobserwowano jednak dalszych zmian prowadzących w kierunku wzrostu nowych pędów (**Fotografia 2c**), jak miało to miejsce w przypadku zastosowania kombinacji (A).

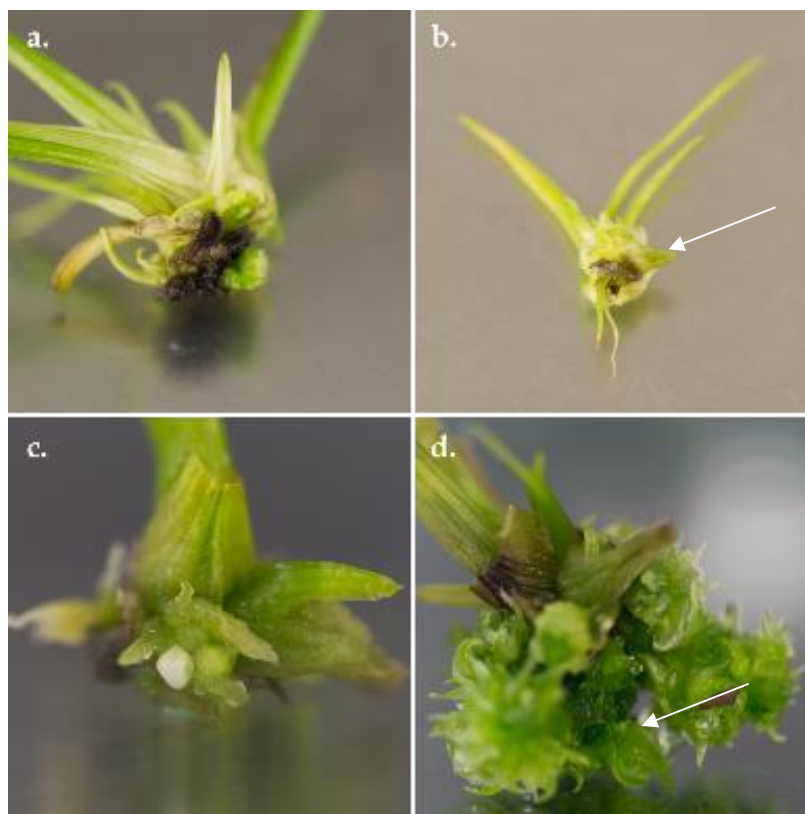
Bliższa obserwacja hipokotyli stymulowanych kombinacją (A) oraz (B) wskazuje na dwie możliwości inicjacji kultury pędów *I. pseudacorus*: bezpośrednio na wzrastającej łodydze, z minimalnym udziałem kalusa (**Fotografia 3a, 3b**) oraz poprzez wytworzenie masy organogennej kalusa (**Fotografia 3c, 3d**). Ograniczenie udziału kalusa w procesie organogenezy i uzyskiwania roślin potomnych ma znaczenie w zapewnieniu możliwie najwyższej stabilności genetycznej kultury i ograniczenia występowania zmienności somaklonalnej (Bairu i in., 2011).

Drugim typem eksplantatu wykorzystanym w eksperymencie inicjacji kultury pędów były merystemy wierzchołkowe młodych klonów wzrastających z aktywowanych pączków bocznych roślin utrzymywanych w warunkach *in vitro*. Zaobserwowano, że stymulacja hormonalna połączona z odcięciem liści i korzeni, w widoczny sposób wpłynęła na morfologię eksplantatów. W przypadku zastosowania kombinacji (A) oraz (B) (**Fotografia 4d i 4e**), widoczne było formowanie się zbitej, kilkumilimetrowej masy kalusa. Obserwowano także ograniczony (od 1 do 3 sztuk), przyrost nowych pędów, lecz jedynie z aktywowanych pączków bocznych, intensywniejszy w przypadku zastosowania kombinacji (B). Po przeniesieniu eksplantatów na pożywkę bez regulatorów wzrostu, innych zmian nie obserwowano. W przypadku kombinacji (C), podobnie jak miało to miejsce podczas eksperymentu z użyciem hipokotyli, obserwowano jedynie aktywację pączków bocznych skutkującą przyrostem od 2 do 4 klonów potomnych (**Fotografia 4c**). Nie obserwowano natomiast tworzenia się kalusa. Obserwacja roślin kontrolnych wskazuje, że cięcie rośliny nie miało samodzielnego wpływu na morfologiczne zmiany w obrębie łodygi (**Fotografia 4a, 4b**). Zaobserwowano jednak, że dodatek siarczanu adeniny może powodować intensyfikację wzrostu korzeni (**Fotografia 4b**).

Analiza dotychczas opublikowanych badań wskazuje, że zastosowanie hipokotyli w połączeniu ze stymulacją regulatorami wzrostu nie była dotąd stosowana do uzyskiwania kultury pędów roślin z rodzaju *Iris*. Najczęściej wybieranym do tego typu kultury eksplantatem były izolowane zarodki zygotyczne oraz podstawy liści (Ascough i in., 2009; Jeveremovic i in., 2013).

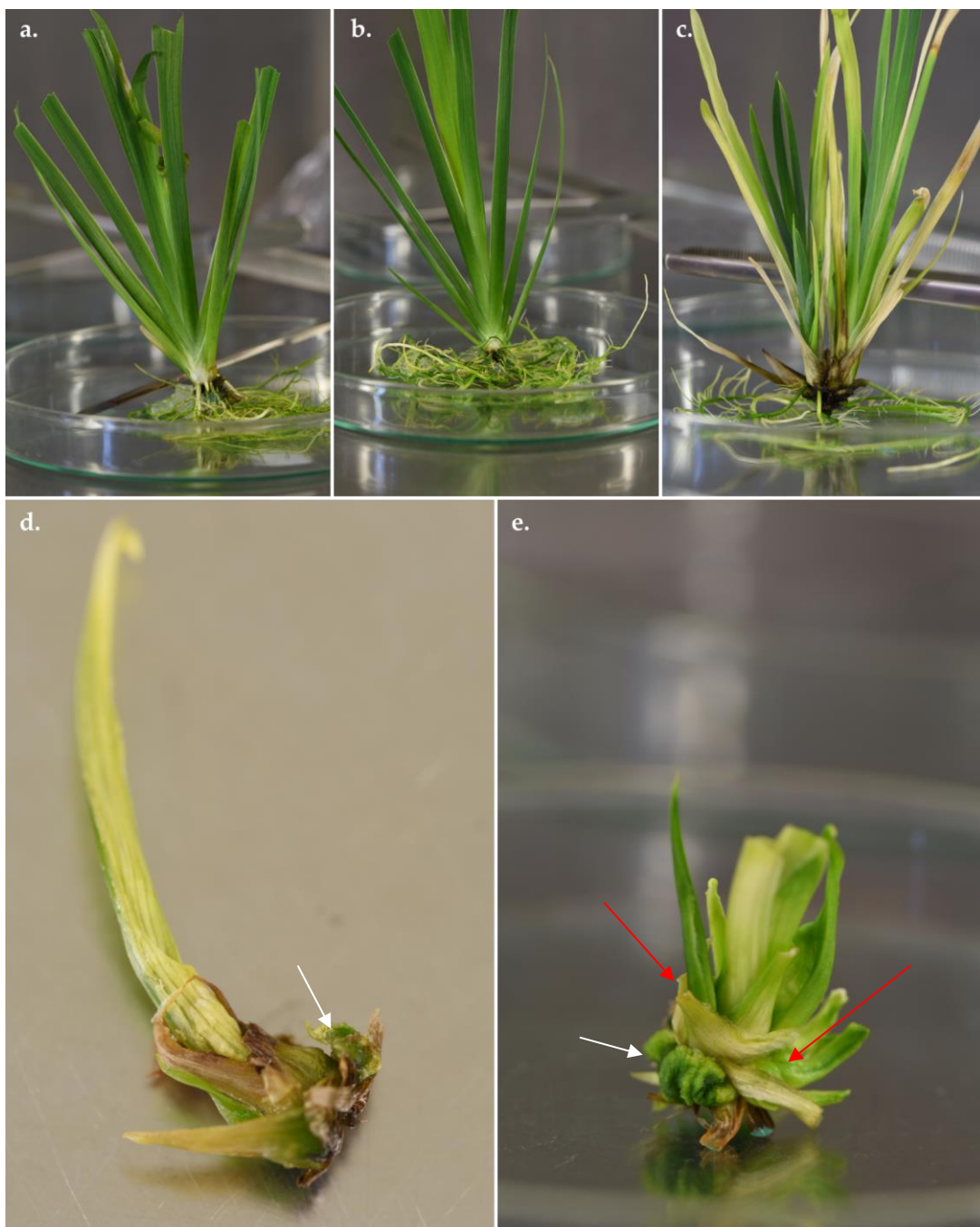


Fotografia 2. Inicjacja kultury pędów *I. pseudacorus* z hipokotyli siewek skielkowanych w warunkach *in vitro*. Rośliny hodowano na pożywkach stałych z 30 g/L sacharozy. **a.** z pożywką MS oraz **b.** z pożywką MS + 80 mg/L SA, stanowiące kontrolę; **c.** MS + 80 mg/L SA + 0,3 mg/L NAA +3 mg/L 2iP + 1 mg/L BAP. Biała strzałka wskazuje przyrost pojedynczych pędów z aktywowanych pączków bocznych. **d.** MS + 80 mg/L SA + 0,2 mg/L TDZ + 2 mg/L BAP. Widoczna jest wzrastająca kultura pędów; **e.** MS + 80 mg/L SA + 0,22 mg/L TDZ+2 mg/L 2iP. Biała strzałka wskazuje miejsce formowania luźnej, zielonej masy kalusa. Czerwone strzałki wskazują na obszary aktywnej organogenezy.



Fotografia 3. Zmiany morfologiczne w obrębie łodyg wykształconych z hipokotyli stymulowanych regulatorami wzrostu **a. b.** kombinacją MS + 80 mg/L SA + 0,22 mg/L TDZ + 2 mg/L BAP. Przyrost kalusa jest ograniczony. Białe strzałki wskazują nowe tworzące się pędy; **c. d.** kombinacją MS + 80 mg/L SA + 0,22 mg/L TDZ+2 mg/L 2iP.

Wcześniejsze doświadczenia z kulturami *in vitro* roślin *I. pseudacorus* wynikające z prowadzonych badań w ramach pracy magisterskiej (Michalak, 2016) wykazały, że możliwa jest inicjacja kultury pędów bezpośrednio na eksplantacie. W wyniku spontanicznej aktywacji, w dwóch niezależnych przypadkach, doszło do inicjacji kultury pędów bez wytworzenia kalusa. W pierwszym przypadku do inicjacji doszło na krótko po skiełkowaniu rośliny z nasiona (po ok. miesiącu). W drugim kultura powstała na młodym klonie *I. pseudacorus* oderwanym od rośliny macierzystej utrzymywanej wcześniej w pożywce płynnej MS z 0,3% PVP i 2% sacharozy, z dodatkiem 0,5 mg/L NAA + 0,5 mg/L BAP, przeniesionym na podłoże stałe (**Fotografia 5**). W obu przypadkach do inicjacji doszło na młodej, szybko dzielącej się części łodygi. O ile w przypadku łodygi znaczenie może mieć wcześniejszy wpływ regulatorów wzrostu (szczególnie BAP), o tyle czynniki wpływające na inicjację kultury z siewki były niemożliwe do ustalenia.



Fotografia 4. Inicjacja kultury pędów *I. pseudacorus* z merystemów wierzchołkowych uzyskanych z młodych klonów roślin *I. pseudacorus* hodowanych w warunkach *in vitro*. Rośliny utrzymywano na pożywkach stałych z 30 g/L sacharozy. Zdjęcia **a.** na pożywce MS oraz **b.** na pożywce MS + 80 mg/L SA, stanowią kontrolę w eksperymencie. Zdjęcie **c.** przedstawia kombinację MS + 80 mg/L SA + 0,3 mg/L NAA + 3 mg/L 2iP + 1 mg/L BAP. Widoczny jest przyrost roślin potomnych z aktywowanych pączków bocznych. Zdjęcie **d.** przedstawia wpływ kombinacji MS + 80 mg/L SA + 0,22 mg/L TDZ + 2 mg/L BAP. Widoczne jest formowanie się zbitego kalusa (biała strzałka), ale bez widocznej organogenezy i formowania nowych pędów. Zdjęcie **e.** przedstawia kombinację MS + 80 mg/L SA + 0,22 mg/L TDZ + 2 mg/L 2iP. Widoczne jest formowanie kalusa (biała strzałka) oraz aktywację pączków bocznych (czerwone strzałki).

W obu przypadkach znaczenie mogło mieć jednak uszkodzenie mechaniczne: w przypadku nasion – podczas skaryfikacji w czasie wprowadzania roślin z nasion do hodowli *in vitro*, a w przypadku młodego klonu – podczas odrywania od rośliny macierzystej. Obserwacje te stały się podstawą do zaprojektowania eksperymentu związanego z inicjacją kultury pędów, zaprezentowanego powyżej w niniejszej pracy doktorskiej.

Wiodącym regulatorem wzrostu wybranym do eksperymentu był tidiazuron (TDZ). Jest on skutecznym związkiem regulującym, o aktywności podobnej do naturalnych cytokinin. Jest najczęściej wykorzystywany do inicjacji kultury pędów u wielu gatunków roślin (Lu, 1993). Był również z powodzeniem stosowany u roślin z gatunku *Iris* (Jeveremovic i in., 2013). TDZ jest regulatorem wykazującym silniejszą aktywność biologiczną niż BAP czy zeatyna, co w przypadku jego nadmiaru może prowadzić do zaburzeń rozwojowych tkanek (Lu, 1993). Wymusza to jednak stosowanie go w możliwie najniższych skutecznych stężeniach i czasie działania, co w rezultacie może wpływać na skrócenie czasu uzyskiwania pędów. Regulator ten może wykazywać również działanie synergistyczne z BAP (Nielsen i in., 1995), co może tłumaczyć dlaczego ta właśnie kombinacja była najskuteczniejszą z testowanych w czasie inicjacji kultury pędów z hipokotyli *I. pseudacorus*.

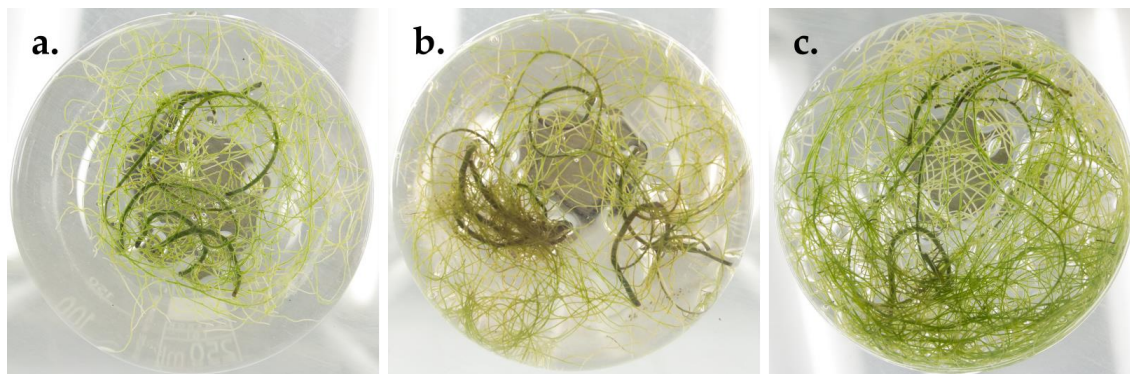


Fotografia 5. Kultura pędów zainicjowana spontanicznie z młodego klonu *I. pseudacorus* oddzielonego od rośliny macierzystej utrzymywanej w pożywce płynnej MS + 2% sach + 0,3% PVP z dodatkiem 0,5 mg/L NAA i 0,5 mg/L BAP

8.1.4. Autonomiczna kultura *in vitro* korzeni anatomicznych *I. pseudacorus*.

Kulturę nietransformowanych korzeni anatomicznych zainicjowano z odciętych korzeni przybyszowych roślin *I. pseudacorus* utrzymywanych w warunkach *in vitro* (7.1.8). Na początkowym etapie prowadzenia badań określono optymalne stężenia sacharozy w pożywce hodowlanej pozwalające na uzyskanie stabilnego przyrostu biomasy korzeni. Na podstawie 3-miesięcznej obserwacji korzeni hodowanych w pożywce płynnej MS z 0,3% PVP, w trzech różnych

wariantach stężenia sacharozy: 20, 30 bądź 40 g/L, ustalono, że największy przyrost biomasy uzyskano w pożywce z 4% dodatkiem cukru (**Fotografia 6**).



Fotografia 6. Wpływ sacharozy na intensywność wzrostu korzeni anatomicznych *I. pseudacorus* po 3 miesiącach hodowli w płynnej pożywce MS z 0,3% PVP. Zawartość sacharozy a. 20 g/L; b. 30 g/L; c. 40 g/L.

W drugiej części eksperymentu korzenie odcięte od roślin macierzystych, umieszczano w płynnej pożywce MS z 0,3% PVP i 4% sacharozy, w dwóch wariantach oświetlenia: standardowym 16/8 godz. dnia oraz w ciemności. Po 4 tygodniach hodowli obserwowano widoczne różnice w tempie wzrostu korzeni utrzymywanych na świetle, w porównaniu do korzeni rosnących w ciemności (**Fotografia 7**). W żadnej z hodowli nie stosowano regulatorów wzrostu. Analiza porównawcza wykonana na bazie dokumentacji fotograficznej przygotowywanej co 2 tygodnie wykazała, że po 10 tygodniach hodowli, w 13 z 20 kolb z korzeniami utrzymywanymi z dostępem światła, widoczny był wyraźny przyrost korzeni na długość oraz wydłużanie licznych, cienkich korzeni bocznych. Dwie kolby wyeliminowano z eksperymentu z powodu kontaminacji mikrobiologicznej. Po 12 tygodniach hodowli, w 7 z 18 kolb z korzeniami obserwowano kompletne pokrycie dna gęstą siecią korzeni. W pozostałych, obserwowany wzrost był minimalny, widoczny jako kilkucentymetrowy przyrost, bez dodatkowego rozgałęziania się. Korzenie z kolb w których zajęły one całą powierzchnię dna, rozdzielono delikatnie na 2-3 części, w zależności od zagęszczenia kultury. Utrzymywano je w hodowli do 22. tygodnia, kiedy to zakończono cały eksperyment. Korzenie hodowane w ciemności nie wykazywały przyrostu w żadnej z kolb. Utrzymywały się one jednak bez objawów zamierania tkanek przez cały czas prowadzenia eksperymentu. Korzenie uzyskane w kulturze płynnej w standardowym oświetleniu charakteryzowały się, szybkim wzrostem, zachowaniem koloru wynikającego z obecności chlorofilu oraz nie wykazywały przyrostu wtórnego na grubość.

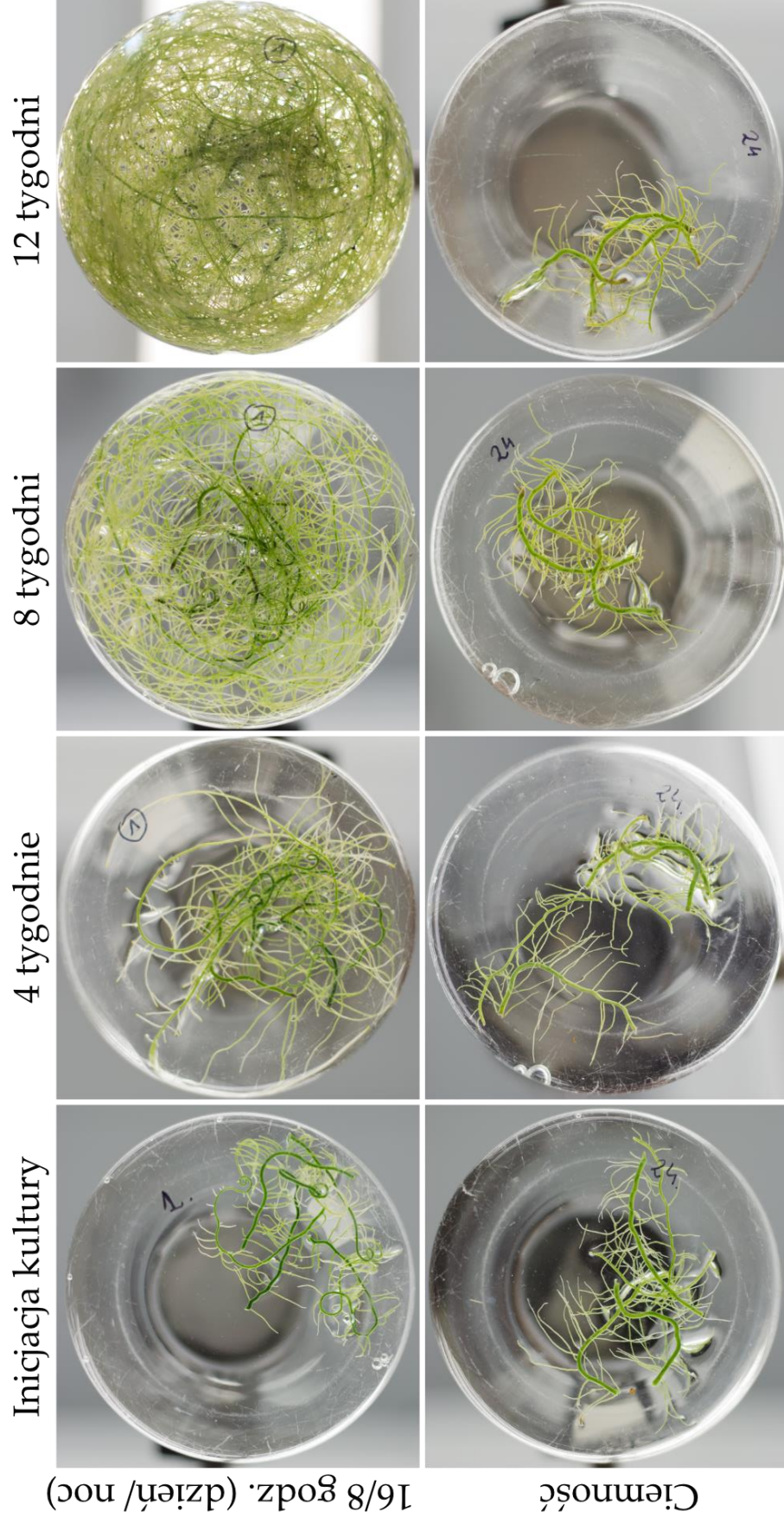
Eksperyment związany z inicjacją kultury korzeni stanowił kontynuację badań prowadzonych wcześniej w ramach pracy magisterskiej (Michalak, 2016)

oraz próbę rozwiązania problemów z uzyskaniem kultury korzeni po transformacji z wykorzystaniem bakterii z gatunku *R. rhizogenes* (8.1.2). W czasie prowadzenia wcześniejszych badań zaobserwowano, że *I. pseudacorus* utrzymywany w kulturach *in vitro*, w standardowym oświetleniu 16/8 godz., po uszkodzeniu mechanicznym merystemu wierzchołkowego, inicjuje wydłużanie korzeni przybyszowych i intensyfikuje wzrostu cienkich korzeni bocznych (**Fotografia 8**). Korzenie te, po odcięciu od łodygi, utrzymywały się i wzrastały w pożywce płynnej MS, bez udziału zewnętrznie dodawanych regulatorów wzrostu.

Eksperyment przedstawiony w niniejszej 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*.

Zjawisko samodzielnego utrzymywania się korzeni, ich wzrostu, bez udziału regulacji hormonalnej, ani bez uprzedniej transformacji z wykorzystaniem bakterii z gatunku *R. rhizogenes*, jest nie do końca poznane. Z przeprowadzonego eksperymentu można wnioskować, że jednym z kluczowych czynników mających wpływ na wzrost korzeni może być światło, do którego w warunkach naturalnych, korzenie nie mają dostępu. Wzrost korzeni anatomicznych jest zależny od syntezy roślinnego hormonu – auksyny, który najczęściej transportowany jest z liści do korzeni. Dotychczas wykazano, że synteza i dystrybucja auksyn jest zależna od światła (Halliday i in., 2009). W sytuacji, w której brak jest jednak liści, synteza auksyn, niezbędnych do wzrostu korzeni musi zachodzić w innej tkance, w tym przypadku w korzeniach. Badania przeprowadzone m.in. z wykorzystaniem roślinnego organizmu modelowego *Arabidopsis thaliana* wskazują, że korzenie mają możliwość syntezy auksyn *de novo* (np. IAA) w merystemie wierzchołkowym korzenia (Ljung i in., 2005). Może to tłumaczyć, dlaczego wzrost korzeni *I. pseudacorus* obserwowano tylko w warunkach standardowego oświetlenia, a nie w ciemności.

Dysproporcja we wzroście korzeni w poszczególnych kolbach początkowo przypisywana była nierównomiernej dystrybucji nieuszkodzonych wierzchołkowych stożków wzrostu korzeni przybyszowych. W celu sprawdzenia tej hipotezy przeprowadzono powtórnie eksperyment związany z inicjacją kultury korzeni. Tym razem jednak do kolb rozdzielono albo same końcowe części korzeni ze stożkiem wzrostu albo fragmenty „środkowe” pozbawione stożka wierzchołkowego ale posiadające liczne korzenie boczne.

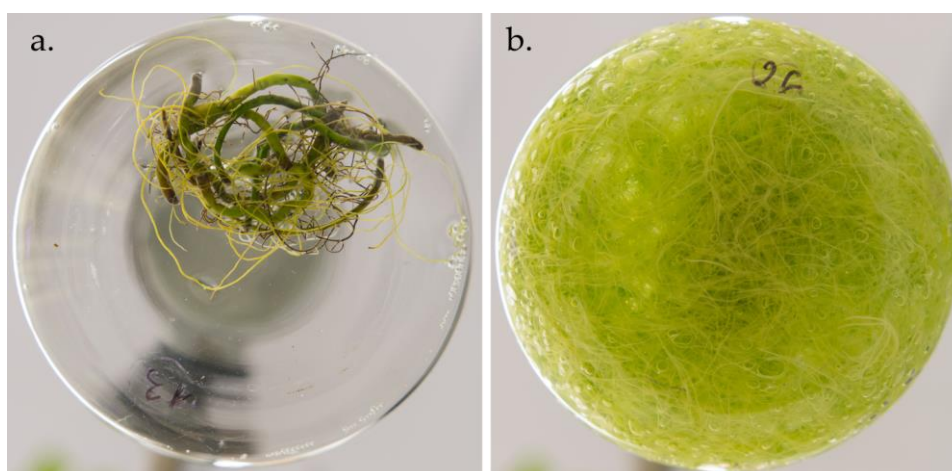


Fotografia 7. Kultura korzeni anatomicznych prowadzona w dwóch wariantach oświetlenia. Górny rząd przedstawia korzenie hodowane w standardowym fotoperiodzie 16 godz. dnia i 8 godz. nocy. Dolny rząd przedstawia korzenie hodowane w warunkach izolacji od światła przez 24 godz. (Michalak i in. 2021).



Fotografia 8. Wzrost korzeni przybyszowych i bocznych w pożywce MS bez dodatku egzogennych regulatorów wzrostu, po uszkodzeniu merystemu wierzchołkowego i zatrzymaniu wzrostu łodygi. Strzałka wskazuje łodygę.

Prowadzone obserwacje wykluczają jednak, że był to czynnik wiodący. Niezależnie bowiem od tego, które części korzeni umieszczono w pożywce, możliwe było uzyskanie kultury cienkich korzeni bocznych. Zaobserwowano natomiast, że na ograniczenie wzrostu korzeni w kulturze mogą mieć wpływ związki fenolowe uwalniane z uszkodzonych tkanek, które po ich naturalnym utlenieniu się w pożywce mogą powodować zatrucie eksplantatów i inhibicję wzrostu tkanki (Ahmad i in., 2013; Bhat i Chandel, 1991). Kultury, w których nie obserwowano ciemnienia pożywki wykazywały stały przyrost i pozostawały zielone (**Fotografia 9**). W warunkach *in vitro*, w których można wykluczyć inne zmienne mające wpływ na intensywność syntezy i uwalniania związków fenolowych, takich jak infekcje bakteryjne lub wirusowe, czy ochronę przed roślinożercami, najbardziej prawdopodobnym czynnikiem wpływającym na ich biosyntezę może być wiek tkanki inicjalnej.



Fotografia 9. Korzenie *I. pseudacorus* po 18 tygodniach hodowli. Zdjęcie **a.** przedstawia korzenie, które nie podjęły wzrostu przez cały czas hodowli (korzenie słabo rosnące); Zdjęcie **b.** przedstawia korzenie intensywnie wzrastające w hodowli (korzenie dobrze rosnące).

W dotychczas publikowanych badaniach wykazano pozytywną korelację pomiędzy wiekiem tkanki inicjalnej, a ilością wydzielanych związków fenolowych. Irysy, z których pobierano korzenie do inicjacji kultury, były w różnym wieku liczonym od czasu skiełkowania. Nie było jednak możliwe porównanie wieku roślin pomiędzy poszczególnymi próbami korzeni.

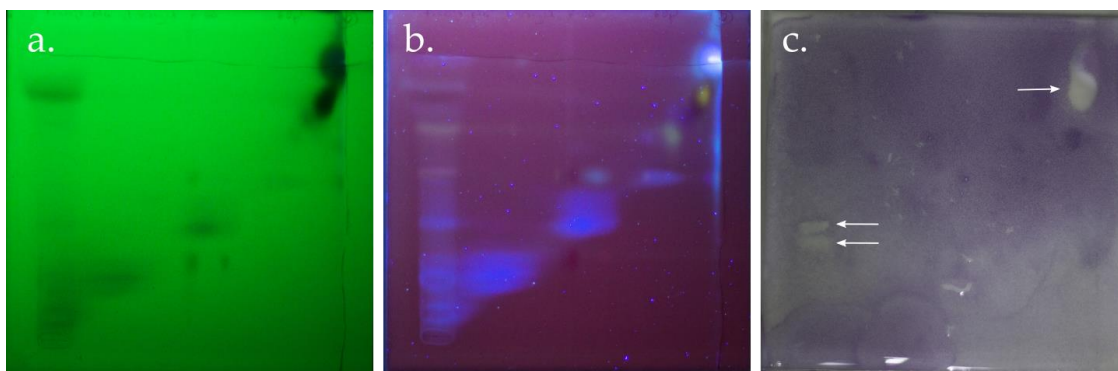
Kultury korzeni, pomimo uzyskania niskiej biomasy tkanki zostały wykorzystane w dalszej części pracy związanej z analizą związków syntetyzowanych w uzyskanej kulturze. Szczegółowy opis wyników znajduje się w podrozdziale (8.2).

8.2. Biosynteza związków biologicznie czynnych w kulturze korzeni anatomicznych *I. pseudacorus*

W związku z niską biomasa korzeni anatomicznych *I. pseudacorus* uzyskanych w kulturach *in vitro* (8.1.4), ekstrakcję i izolację związków aktywnych przeprowadzono z pożywki po hodowli wszystkich korzeni. Uzyskany ekstrakt C (7.3.4) poddano dwukierunkowej analizie chromatograficznej TLC (7.7.3), oraz bioautografii metodą agaru górnego (7.7.4), celem sprawdzenia obecności związków aktywnych przeciwbakteryjnie.

We wstępnej analizie obecności związków przeciwbakteryjnych w ekstrakcie C, do rozdzielania ekstraktu wykorzystano dwukierunkowy układ 1. z fazami ruchomymi (V) oraz (VI) (7.7.3). Obserwacja uzyskanych chromatogramów prowadzona w świetle UV $\lambda - 254$ nm wykazała obecność licznych związków wygaszających fluorescencję płytki, zwłaszcza w obszarze czoła obu zastosowanych faz ruchomych (**Fotografia 10a**). Analiza w świetle UV $\lambda - 366$ nm pozwoliła uwidocznić liczne związki o niebieskiej i fioletowej fluorescencji, a także pojedyncze związki o seledynowej, żółtej oraz pomarańczowej fluorescencji (**Fotografia 10b**). Bioautografia z bakteriami *S. aureus* Newman, przeprowadzona bezpośrednio na płytce z uzyskanym chromatogramem (**Fotografia 10b**), uwidoczniała obecność związków przeciwbakteryjnych. Na płytce, po 24 godz. inkubacji z bakteriami i późniejszej 30 min inkubacji po spryskaniu roztworem MTT, obserwowano żółte strefy zahamowania wzrostu (**Fotografia 10c**), wskazujące na obecność związków o aktywności przeciwbakteryjnej.

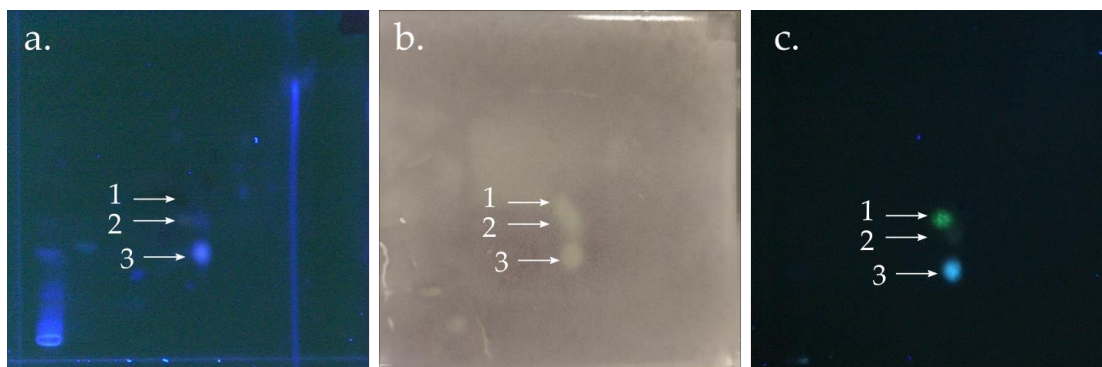
W celu izolacji i identyfikacji obserwowanych związków aktywnych, we współpracy z dr Piotrem Migasem oraz prof. dr hab. Mirosławą Krauze-Baranowską z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Wydziału Farmaceutycznego, w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji, wykonano dodatkową serię chromatografii dwukierunkowych w układzie 2. w fazach ruchomych (VII) oraz (VIII) (7.7.3). Zastosowanie układu 2. miało na celu poprawę separacji oraz



Fotografia 10. Dwukierunkowa analiza chromatograficzna TLC ekstraktu C z pożywki po hodowli korzeni anatomicznych. Analiza wykonana na płytce szklanej pokrytej złożem Si_{60} F_{254} w układzie faz ruchomych, w pierwszym kierunku: (V) octan etylu–chloroform–kwas mrówkowy, (45:45:10, v/v/v), w drugim: (VI) octan etylu. **a.** Chromatogram analizowany w świetle UV λ -254 nm, **b.** Chromatogram analizowany w świetle UV λ -366 nm, **c.** Bioautografia bezpośrednia wykonana na uzyskanym chromatogramie. Białymi strzałkami zaznaczono strefy zahamowania wzrostu bakterii *S. aureus*.

zagęszczenia obserwowanych związków aktywnych. Obserwacja uzyskanych chromatogramów w świetle UV λ – 366 nm potwierdziła obecność licznych związków wykazujących niebieską, fioletową i brunatną fluorescencję (**Fotografia 11a**). Powtórna bioautografia pozwoliła określić aktualne położenie związków przeciwbakteryjnych (**Fotografia 11b**). Związki oznaczone kolejno (1), (2) oraz (3) posiadały wartości R_F (VII/VIII) 0,43/0,61; 0,36/0,62 oraz 0,26/0,61. Związki (2) i (3) w świetle UV λ – 366 nm wykazywały jasno-niebieską fluorescencję, a związek (1) ciemno-fioletową fluorescencję (**Fotografia 11a**). Po derywatywacji z wykorzystaniem odczynnika NP PEG (*European Pharmacopoeia, Wydanie 8, 2014*) tylko związek (1) zmienił swoją fluorescencję z ciemno-fioletowej na żółtą (**Fotografia 11c**). Fluorescencja oraz zmiana zabarwienia sugerują, że analizowane związki mogą przynależeć do grupy izoflawonów.

Związki (1) i (3), jako dominujące w ekstrakcie, zostały wyizolowane metodą półpreparatywnej TLC, po rozdzieleniu w fazie mobilnej VIII (7.7). Identyfikację związków przeprowadzono wykorzystując wysokosprawną chromatografię cieczową, sprzężoną ze spektrometrią mas (HPLC-DAD-ESI-MS) (7.7.5). Widma UV (**Suplement 2**) oraz widma masowe (**Suplement 3 i 4**) porównano z danymi literaturowymi związków opisanych dotychczas w irysach (Mabry i in., 1970). Na podstawie analizy porównawczej ustalono, że badane metabolity przynależą do grupy izoflawonów. Widma masowe (m/z) dla jonów $[M+H]^+/[M-H]^-$ 331⁺/329⁻ oraz 307⁺/305⁻ odpowiadają kolejno związkom: (1) rozpoznanego jako dimetoksy-trihydroksy-izoflawon oraz (3) rozpoznanego jako dimetoksy-dihydroksy-izoflawon (**Tabela 19**).



Fotografia 11. Chromatogramy uzyskane w wyniku rozdzielania ekstraktu C za pomocą dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej na złożu krzemionkowym (HPTLC Si₆₀ F₂₅₄) u układzie VII/VIII. Na zdjęciu widoczne są związki aktywne (1), (2), (3). **a.** 366 nm przed derywatyzacją, **b.** bioautogramia bezpośrednia na chromatogramie. Widoczne strefy zahamowania wzrostu bakterii *S. aureus* Newman; **c.** λ – 366 nm po derywatyzacji z NP. PEG.

Biorąc pod uwagę różnice we fluorescencji związku (1) oraz (3) widoczną na chromatogramach TLC (**Fotografia 11**), w oparciu o dane literaturowe (Mabry i in., 1970), można przypuszczać, że związek (1) posiada grupę hydroksylową w pozycji C-5, w przeciwieństwie do związku (3), który takiej substytucji nie posiada.

Dane literaturowe wskazują, że wśród izoflawonów dotychczas izolowanych z tkanek irysów z grupami 2-metoksy oraz 3-hydroksy tylko jeden posiada grupę hydroksylową w pozycji C-5 (Mykhailenko i in., 2020). Na podstawie analizy porównawczej związek (1) zidentyfikowano jako iristektorigeninę B (5,7,4'-trihydroksy-6,3'-dimetoksy-izoflawon) (Michalak i in., 2021).

Dodatkowa analiza HPLC ekstraktu C w oparciu o porównanie z substancjami wzorcowymi (**Suplement 5**), potwierdziła również obecność innych izoflawonów o aktywności biologicznej: genisteiny i daidzeiny (**Tabela 19**). W przypadku pozostałych związków obserwowanych na chromatogramach, ze względu na brak literaturowych danych porównawczych oraz niewystarczającą ilość i czystość materiału (ekstraktu C), do przeprowadzenia zaawansowanej analizy, m.in. z wykorzystaniem metod spektroskopowych, w tym spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego NMR (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*), dalszej identyfikacji nie prowadzono.

Powtórna inicjacja kultury korzeni anatomicznych, którą przeprowadzono w celu ustalenia potencjalnych czynników wpływających na autonomiczny wzrost korzeni w warunkach *in vitro*, pozwoliła dodatkowo na zaobserwowanie kluczowych różnic w biosyntezie związków aktywnych w kulturach słabo rosnących (**Fotografia 12a**) i dobrze rosnących (**Fotografia 12b**).

Tabela 19. Związki aktywne zidentyfikowane w ekstrakcie z pożywki po hodowli korzeni anatomicznych *I. pseudacorus* (ekstrakt C)

Numer związku /wzorzec	t_R (min)		UV λ_{max} nm	ESI-MS m/z [M+H] ⁺ / [M-H] ⁻	Zidentyfikowany związek
	I	II			
Związek 1	18,8	45,6	263, 290sh, 339sh	331 ⁺ /329 ⁻	Iristektorigenina B (5,7,4'- trihydroksy-6,3'-dimetoksy-izoflawon)
Związek 3	22,1	48,2	255, 282sh, 335sh	315 ⁺ /313 ⁻	nienznany dimetoksy-dihydroksy-izoflawon
Daidzeina	12,5	36,4	248, 256sh, 300sh	255 ⁺ /253 ⁻	+
Genisteina	17,5	44,2	259, 286sh, 332sh	271 ⁺ /269 ⁻	+

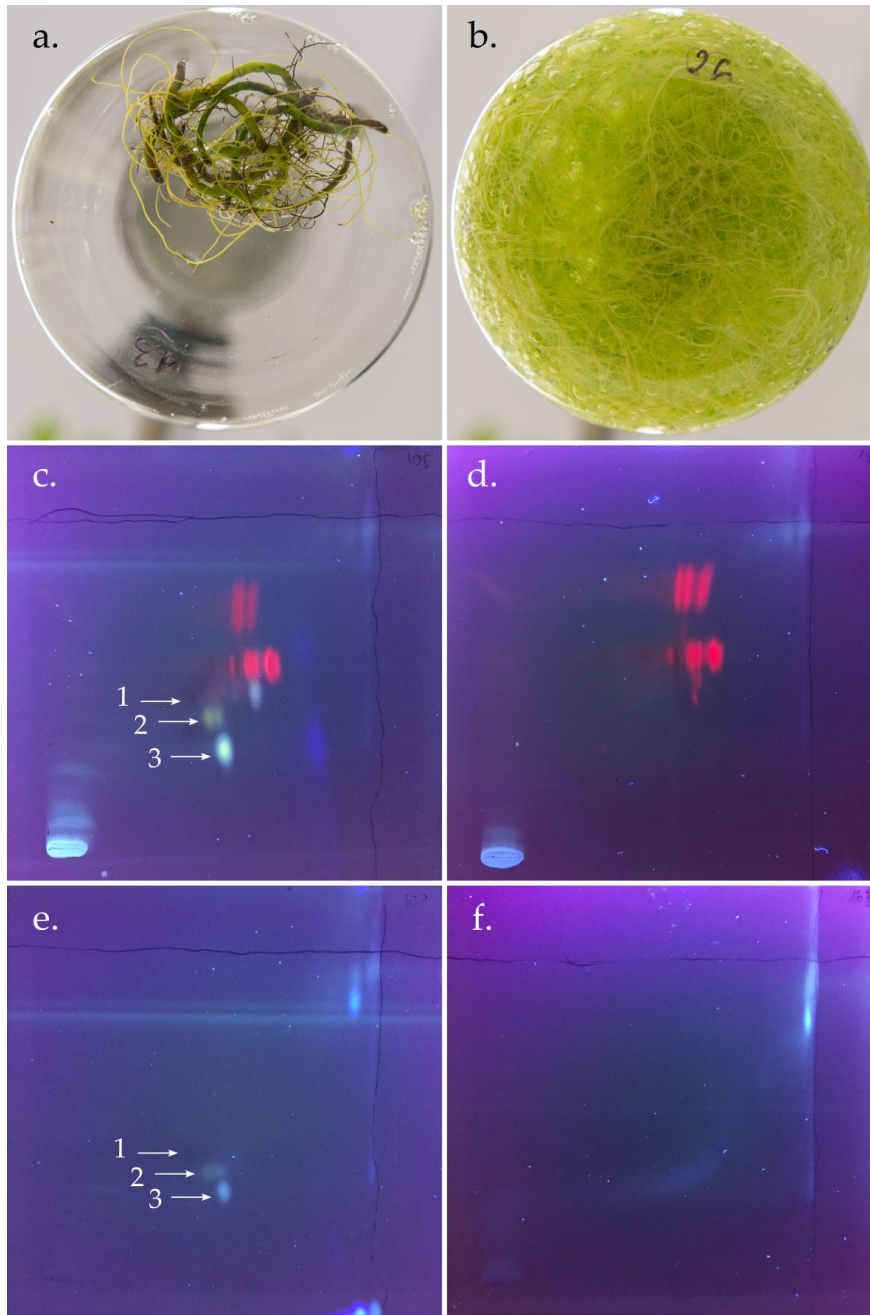
I, II fazy ruchome (7.7.5); t_R – czas retencji, + wykazana obecność w oparciu o substancje wzorcowe; λ_{max} – maksimum absorpcji

Dzięki dodatkowej porcji materiału podjęto działania zmierzające do sprawdzenia, czy obserwowane wcześniej związki przeciwbakteryjne, zidentyfikowane w pożywce po hodowli wszystkich korzeni (ekstrakt C), są syntetyzowane zarówno przez korzenie dobrze rosnące, jak i te, które nie podjęły intensywnego wzrostu. Z materiału zebranego po 18 tygodniach prowadzenia kultury przygotowano ekstrakty: z pożywek po hodowli korzeni (7.3.4) oraz z samych korzeni (7.3.2). Uzyskane ekstrakty przeanalizowano za pomocą chromatografii HPTLC w układzie (VII)/(VIII) (7.7.3). Obserwacja chromatogramów prowadzona w świetle UV λ – 254 nm oraz UV λ – 366 nm wykazała obecność związków o analogicznej fluorescencji i wartości R_F , jak dla związków (1), (2) i (3) jedynie w ekstrakcie z korzeni słabo rosnących (**Fotografia 12c**), oraz w pożywce po ich hodowli (**Fotografia 12d**). W ekstrakcie z korzeni dobrze rosnących (**Fotografia 12e**) ani w pożywce po ich hodowli (**Fotografia 12f**) wskazanych związków nie obserwowano.

W celu potwierdzenia zaobserwowanych różnic w biosyntezie związków przeciwbakteryjnych w korzeniach dobrze i słabo rosnących przeprowadzono dodatkową analizę ekstraktów z tkanek oraz pożywek po wskazanych wyżej korzeniach, z wykorzystaniem metody HPLC-DAD-ESI-MS (7.7.6). Analiza wykazała, że związki (1) oraz (3), oznaczone wcześniej w ekstrakcie C, nie są obecne w ekstrakcie z pożywki po korzeniach dobrze rosnących, a ich obecność w ekstrakcie z tkanki korzeni dobrze rosnących jest niska. Stąd też nie było

możliwe wykrycie ich na chromatogramach HPTLC (**Fotografia 12d**). Wyższe stężenia tych związków zaobserwowano w ekstrakcie z korzeni słabo rosnących i w pożywce po ich hodowli, z czego w korzeniach dominował związek (3), a w pożywce związek (1). Co więcej, analiza ekstraktu z korzeni słabo rosnących pozwoliła zaobserwować liczne, dodatkowe związki, należące najprawdopodobniej do grupy izoflawonów, oznaczone w **Tabeli 20** jako związek **a, b, c** i **d**. Ich stężenia były wyższe niż w ekstrakcie z korzeni dobrze rosnących (**Suplement 2**). Niepełne dane z detektora masowego, niewielka objętość posiadanego ekstraktu oraz niewystarczające literaturowe dane porównawcze, nie pozwoliły na przeprowadzenie pełnej identyfikacji zaobserwowanych związków. Należy jednak zaznaczyć, że uzyskane dane stanowią ważny wkład i wyznaczają możliwe kierunki dalszych badań nad biosyntezą związków biologicznie czynnych w uzyskanym modelu tkankowym roślin *I. pseudacorus*.

Prawdopodobną przyczyną niskiego stężenia związków przeciwbakteryjnych w tkankach korzeni dobrze rosnących oraz ich nieobecność w pożywce po ich hodowli może być ukierunkowanie metabolizmu w tkankach na ich intensywny wzrost. Metabolizm pierwotny i wtórny są bowiem ściśle ze sobą powiązane, zarówno na poziomie enzymatycznym, jak i substratowym (Wink, 2010). Wiele metabolitów wtórnych powstaje na bazie produktów lub prekursorów powstałych z metabolitów pierwotnych (Aharoni i Galili, 2011). Produkcja substancji obronnych jest kosztochłonna pod względem energii i zasobów. Jeśli więc roślina wydatkuje je na produkcję substancji obronnych może to wpływać na ograniczenie jej wzrostu. Dlatego też najczęściej związki takie syntetyzowane są w wyniku odpowiedzi na czynnik stresowy (Lattanzio i in., 2012). Na podstawie prowadzonych obserwacji można podejrzewać, że w przypadku słabo rosnących korzeni *I. pseudacorus* utrzymywanych w kulturach *in vitro*, wytworzyło się sprzężenie zwrotne blokujące wzrost korzeni, jednocześnie stymulujące je do dalszej syntezy związków aktywnych. Uszkodzenie tkanki podczas inicjacji kultury prowadziło do wydzielania związków biologicznie czynnych do pożywki, co mogło z kolei prowadzić do zahamowania dalszego wzrostu tkanki i stymulacji biosyntezy substancji obronnych. Ich obecność w pożywce nie doprowadzała jednak do śmierci tkanek, ponieważ pożywka wymieniana była regularnie, co dwa tygodnie. Stężenie związków fenolowych nie wzrastało więc do wartości granicznej, mogącej doprowadzić do śmierci tkanki. Przy każdorazowej zmianie pożywki, w kolbach, na tkance, pozostawały jednak śladowe ilości pożywki, które wciąż zawierały związki aktywne. Te z kolei mogły być czynnikiem stymulującym do dalszej ich biosyntezy i wydzielania ich do świeżej pożywki.



Fotografia 12. Analiza porównawcza składu metabolicznego ekstraktów z korzeni słabo i dobrze rosnących w kulturach *in vitro* oraz z pożywek po ich hodowli. **a.** korzenie słabo rosnące; **b.** korzenie dobrze rosnące; **c. d. e. f.** chromatogramy dwukierunkowe w układzie (2.), Fazach mobilnych VII/VIII wizualizowane w świetle UV-366 nm. **c.** ekstrakt z korzeni słabo rosnących, **e.** ekstrakt z pożywki po tych korzeniach, strzałkami zaznaczono zidentyfikowane związki aktywne; **d.** ekstrakt z korzeni dobrze rosnących, **f.** ekstrakt z pożywki po korzeniach dobrze rosnących. Brak widocznych związków aktywnych.

Tabela 20. Metabolity wtórne zidentyfikowane w ekstrakcie z korzeni słabo rosnących

Oznaczenie związku	t_R (min) II	UV λ_{max} nm	ESI-MS m/z [M+H] ⁺ / [M-H] ⁻	Zidentyfikowany związek
Związek a	44,29	261, 339sh	271 ⁺ /269 ⁻	przypuszczalnie trihydroksy izoflawon, m.cz. 270
Związek b	44,72	264, 288sh, 343sh	331 ⁺ /329 ⁻	przypuszczalnie trihydroksy-dimetoksy izoflawon, m.cz. 330
Związek 1	45,64	263, 292sh, 339sh	331 ⁺ /329 ⁻	Iristektorigenina B (5,7,4'-trihydroksy-6,3'-dimetoksyisoflawon)
Związek 3	48,22	256, 283sh, 331sh	315 ⁺ /313 ⁻	nieznany dimetoksy-dihydroksy-izoflawon
Związek c	49,00	255, 332sh	285 ⁺ /283 ⁻	przypuszczalnie nieznany mono-metoksy-trihydroksy-izoflawon
Związek d	49,26	258, 332	315 ⁺ /313 ⁻	przypuszczalnie nieznany dimetoksy-dihydroksy izoflawon

I, II fazy ruchome (7.7.5); m.cz – masa cząsteczkowa; t_R – czas retencji; UV λ_{max} – maksimum absorpcji

Wiele mono-, di- i tri- metoksy izoflawonów wykryto dotychczas w korzeniach różnych gatunków irysów (Wang i in., 2010), a wśród nich znalazły się związki wykazujące aktywność przeciwbakteryjną, w tym przeciw bakteriom z gatunku *S. aureus* (Hummelova i in., 2015; Mukne i in., 2011). 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 literaturze nie znaleziono jednak doniesień na temat jego aktywności przeciwbakteryjnej ani możliwości pozyskiwania tego związku z kultur *in vitro* roślin z rodzaju *Iris*. Iristektorigenina B, poza zidentyfikowaną aktywnością przeciwbakteryjną, posiada również udokumentowaną aktywność hipocholesterolemiczną, czyli zmniejszającą

wchłanianie cholesterolu. Badania *in vitro* wykazały, że związek ten poprzez oddziaływanie z wątrobowym receptorem X, będącym czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym za metabolizm lipidów i węglowodanów, prowadzi do regulacji ekspresji kluczowych genów odpowiedzialnych za równowagę cholesterolową w makrofagach, bez indukowania akumulacji tłuszczu w wątrobie (Jun i in., 2012). Badania wskazują również, że iristektorigenina B może hamować działanie SASP (ang. *senescence-associated secretory phenotype*), starzejących się komórek o charakterze wydzielniczym. Ich obecność i związki wydzielane przez nie do otoczenia, m.in. czynniki prozapalne, mogą prowadzić do mikrozapaleń w tkankach, a w rezultacie m.in. do zwiększania szansy rozwoju nowotworów lub chorób degeneracyjnych związanych z wiekiem m.in. reumatyzmu czy cukrzycy (Lim i in., 2017). Iriskektorigenina B w teście Ames wykazała również aktywność przeciwmutagenną poprzez supresję ekspresji genu *umu* systemu SOS bakterii *Salmonella thypimurium* TA1535/pSK1002 aktywowanego po traktowaniu bakterii mutagennym furylfuramidem (Miyazawa i in., 2001). Zważywszy na mnogość potencjalnych zastosowań tego związku, kultury *in vitro* korzeni *I. pseudacorus* mogą stanowić dodatkowe, nowe źródło tego metabolitu do badań i zastosowań komercyjnych.

Na dodatkowe podkreślenie zasługuje fakt wykrycia w kulturze korzeni irysa obecności dwóch znanych związków biologicznie czynnych z grupy izoflawonów: daidzeiny i genisteiny. Są to związki o aktywności estrogenowej, przeciwutleniającej, modulującej, a także przeciwnowotworowej (Ganai i Farooqi, 2015; Vitale i in., 2013), będące przedmiotem licznych badań podstawowych i aplikacyjnych. Genisteina, ze względu na swoje szerokie spektrum aktywności, stała się m.in. przedmiotem zgłoszenia patentowego, w którym wskazuje się możliwość jej zastosowania w leczeniu choroby Alzheimera (Węgrzyn i in., 2018). Nowe, źródło roślinne tego związku, podobnie jak w przypadku iriskektorigeniny B, stanowi ważny kierunek w dalszych badaniach nad pozyskiwaniem substancji aktywnych do zastosowań leczniczych.

8.3. Kłącza *I. pseudacorus* są źródłem związków o aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwbiofilmowej

Ekstrakt A (7.3.2) poddano analizie przeciwbakteryjnej, zarówno przeciw bakteriom wzrastającym w kulturze planktonicznej (7.4.4), jak również przeciw bakteriom zdolnym do wytwarzania biofilmu (7.4.5). Analiza z wykorzystaniem seryjnych mikrorozcieńczeń pożywki wykazała aktywność przeciwbakteryjną ekstraktu w stosunku do wszystkich analizowanych bakterii Gram (+) i Gram (-). Minimalne Stężenie Bakteriobójcze (MBC), wyrażone w mg suchej masy tkanki

potrzebnej do przygotowania 1 mL aktywnego ekstraktu, zostały przedstawione w **Tabela 21**. Najwyższą wrażliwość na ekstrakt A zaobserwowano dla bakterii z gatunku *S. aureus*, zarówno szczepu referencyjnego Newman, jak i izolatów klinicznych: wrażliwego oraz opornego na co najmniej dwie różne grupy komercyjnie stosowanych antybiotyków. Wartości MBC wynosiły kolejno: 1,25 mg SM/mL dla szczepu referencyjnego i izolatu opornego 703/k; 2,50 mg SM/mL dla izolatu wrażliwego 1521 (Michalak i in., 2021). Wśród bakterii Gram (-) najwyższą wrażliwość na ekstrakt wykazał szczep referencyjny bakterii *P. aeruginosa* PAK, dla którego wartość MBC wyniosła 10 mg SM/mL (Michalak i in., 2021).

Aktywność przeciwbakteryjna ekstraktów z tkanek *I. pseudacorus* nie była jak dotąd przedmiotem wnikliwej analizy naukowej. Dotychczasowe doniesienia sugerowały jednak, że tkanki *I. pseudacorus* mogą zawierać związki o aktywności przeciwbakteryjnej. W pracy przedstawionej przez Ramtin i współpracowników (2014), wykazano bowiem, że olejek eteryczny uzyskany z kłącza kosańca żółtego może działać hamująco na wzrost wybranych bakteryjnych patogenów ludzkich, w tym *S. aureus* oraz *P. aeruginosa*. Olejki, ze względu na metodę ich uzyskiwania, stanowią jedynie wycinek z puli związków jakie obecne są w tkankach roślin, a ich hydrofobowy charakter oraz obecność często lotnych i niestabilnych związków, może utrudniać zarówno ich analizę, jak i późniejsze zastosowanie.

Analiza aktywności przeciwbakteryjnej wodnych ekstraktów z mrożonych, nieliofilizowanych kłączy, potwierdziła, że w tkance obecne są związki hydrofilowe wykazujące aktywność przeciwbakteryjną. W analizie z wykorzystaniem seryjnych mikrorozcieńczeń wyznaczono bowiem wartości MBC, zarówno w stosunku do Gram (+) szczepów *S. aureus*, jak i Gram (-) szczepów bakterii *P. aeruginosa* (**Tabela 22**). Podobnie jak w przypadku ekstraktu metanolowego, bakterie Gram (+) były bardziej wrażliwe na działanie ekstraktu z irysa.

Analiza składu metabolicznego tkanek *I. pseudacorus* przedstawiona w dotychczas opublikowanych pracach naukowych wskazuje, że roślina ta syntetyzuje związki, których obecność może być odpowiedzialna za obserwowaną aktywność przeciwbakteryjną. Wykazano obecność zarówno kwasu ferulowego, iriliny A i B, kwasu szikimowego, genisteiny czy tektorigeniny (Hanawa i in., 1991; Kim i in., 2012; Kovalev i in., 2013; Mykchailenko i Kovalyov, 2016; Sary i in., 2004; Tarbeeva i in., 2013). Co ciekawe, jak dotąd w pracach badawczych nie podkreślano, że tkanki *I. pseudacorus* zawierają wysokie stężenie tanin. Ich dominację wykazano wśród związków fenolowych w niniejszej pracy doktorskiej (8.4). W świetle tych danych *I. pseudacorus* może być dodatkowym źródłem tych związków do różnorodnych celów przemysłowych.

Tabela 21. Minimalne Stężenie Bakteriobójcze ekstraktów metanolowych z liofilizowanych kłączy *I. pseudacorus* (ekstrakt A) przeciw ludzkim patogenom bakteryjnym: szczepem referencyjnym i izolatom klinicznym.

Gatunek	Szczep	MBC (mg SM*/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Newman	1,25
	1521 (w)	2,50
	703/k (o)	1,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAK	10,00
	3926 (w)	25,00
	2721 (o)	25,00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	50,00
	1071 (w)	25,00
	3896 (o)	25,00
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	50,00
	1285 (w)	50,00
	4162 (o)	50,00

* SM – sucha masa tkanki potrzebna do przygotowania 1 mL aktywnego ekstraktu; (w) – szczep wrażliwy; (o) – szczep oporny na przynajmniej dwie różne grupy komercyjnie stosowanych antybiotyków

Obecność tanin została zauważona w czasie przygotowywania ekstraktu A do analizy aktywności przeciwbakteryjnej metodą seryjnych mikrorozcieńczeń. Po odparowaniu rozpuszczalnika i zawieszeniu ekstraktu w pożywce BHI obserwowano nagłą, intensywną interakcję ekstraktu z pożywką, skutkującą wytrąceniem się nierozpuszczalnego osadu oraz utratą różowo-czerwonego koloru ekstraktu. Interakcja z białkami powodująca ich precypitację z roztworu jest cechą charakterystyczną dla tanin skondensowanych (Hagerman i Butler, 1981). Obecność tanin może mieć kluczowe znaczenie w aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów z kłączy *I. pseudacorus*. Są to bowiem związki o udokumentowanej aktywności biologicznej (Kolodziej i in., 1999; Serrano i in., 2009; Sieniawska i Baj, 2017), i działają przeciwdrobnoustrojowo w stosunku do bakterii *S. aureus* (Akiyama i in., 2001; Chung i in., 1993).

Tabela 22. Minimalne Stężenie Bakteriobójcze ekstraktów wodnych ze świeżych kłączy *I. pseudacorus* przeciw wybranym ludzkim patogenom bakteryjnym.

Gatunek	Szczep	MBC (mg*/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Newman	0,156
	1521 (w)	0,312
	703/k (o)	0,156
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAK	1,250
	3926 (w)	5,000
	2721 (o)	5,000

*mg liofilizowanego ekstraktu; (w) – szczep wrażliwy; (o) – szczep oporny na przynajmniej dwie różne grupy komercyjnie stosowanych antybiotyków

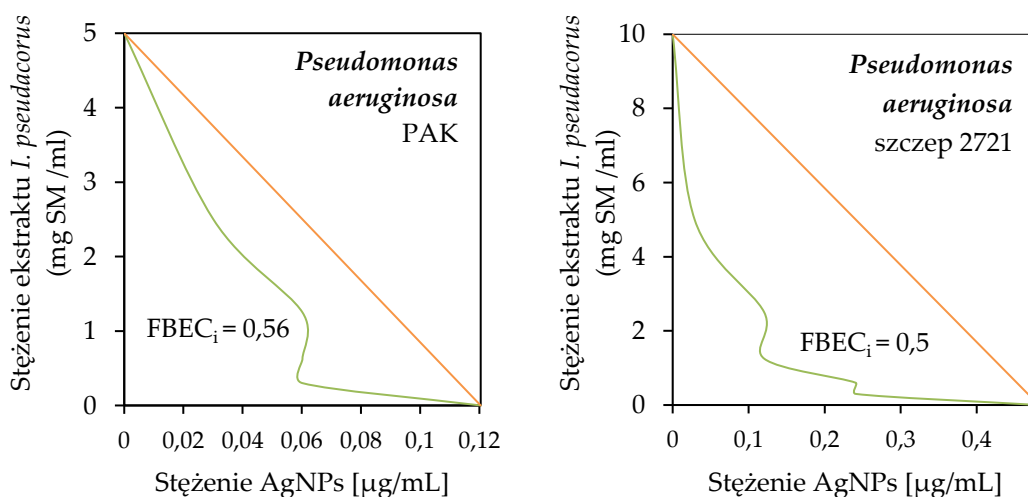
Bakterie, których wrażliwość na ekstrakt A przeanalizowano w niniejszej dysertacji, zostały wybrane z grupy ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, i *Enterobacter* spp.), charakteryzującej się wyższą od innych patogenów opornością na powszechnie stosowane i dostępne grupy antybiotyków, w tym penicyliny, wankomycynę czy karbapenemy. Stanowią one realne zagrożenie dla skuteczności terapii przeciwbakteryjnych, zważywszy na niskie tempo opracowywania nowych metod zwalczania infekcji bakteryjnych (Pendleton i in., 2013). We wszystkich analizowanych w pracy doktorskiej przypadkach, wartość MBC ekstraktu nie przekraczała 50 mg SM/mL, zarówno dla szczepów referencyjnych, jak i izolatów klinicznych, w tym szczepów opornych na antybiotyki. Różnica w aktywności ekstraktu w stosunku do bakterii Gram (+) i Gram (-) może wynikać z budowy powłok zewnętrznych tych bakterii i obecności dodatkowej błony komórkowej u bakterii Gram (-), co zapewnia im mniejszą przepuszczalność dla wielu związków aktywnych.

Bakterie *S. aureus* oraz *P. aeruginosa* to mikroorganizmy zdolne do tworzenia trudnego do zwalczania biofilmu. Oba gatunki w testach aktywności przeciwbakteryjnej dla bakterii rosnących w formie planktonu wykazały najwyższą wrażliwość na działanie ekstraktu A. Podjęto więc analizę aktywności ekstraktu również w stosunku do wytwarzanego przez nie biofilmu. Analizę prowadzono z wykorzystaniem seryjnych mikrorozcieńczeń w zakresie od 1,25 do 100 mg SM/mL (7.4.5). Przeprowadzone badania wykazały aktywność ekstraktu A przeciwko biofilmowi uformowanemu przez bakterie *S. aureus* Newman, a Minimalne Stężenie Eradykujące Biofilm wyniosło 3,125 mg SM/mL.

Biofilm to konsorcjum złożone z bakterii osadzonych w matrycy polisacharydowej, o zmienionym fenotypie i charakterystyce wzrostu. Często, w wyniku niskiej aktywności metabolicznej bakterii w biofilmie, mikroorganizmy te są bardzo trudne do zwalczania standardowymi związkami przeciwbakteryjnymi, które stosuje się w przypadku zwalczania bakterii w hodowli planktonicznej. Jak wskazują badania (Wolcott i Ehrlich, 2008), biofilm może być trudny do zwalczenia nawet po zastosowaniu 100-1000 razy wyższego stężenia związku przeciwbakteryjnego, pomimo tego, że kultura planktoniczna tego gatunku była hamowana przez stosowany czynnik aktywny. Stężenie ekstraktu A potrzebne do eradykacji biofilmu *S. aureus* było tylko 2,5-krotnie wyższe niż to zastosowane przeciw *S. aureus* z kultury planktonicznej. Jest to pierwsze doniesienie wskazujące na możliwość zastosowania ekstraktu z tego gatunku roślin w walce z gronkowcowym biofilmem bakteryjnym.

8.3.1. Analiza rodzaju interakcji pomiędzy ekstraktami z tkanek *I. pseudacorus* a nanocząstkami srebra w stosunku do wybranych patogenów ludzkich

Poza analizą aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktu A, podjęto również działania zmierzające do sprawdzenia, czy biologicznie czynny ekstrakt z kłączy irysa, po połączeniu z inną substancją przeciwbakteryjną, pozwoli na obniżenie efektywnych dawek obu substancji, przy jednoczesnym zachowaniu bądź wzroście ich aktywności biologicznej. Do analizy interakcji między komercyjnie dostępnymi nanocząstkami srebra (AgNPs) (Prochimia) i metanolem ekstraktem z kłączy *I. pseudacorus* (ekstrakt A), wykorzystano tzw. metodę szachownicy (ang. *Checkerboard Titration Method*) (7.4.6). Analiza wykazała, że zastosowanie AgNPs wraz z ekstraktem A, obniża aktywność przeciwdrobnoustrojową obu czynników, w stosunku do bakterii *S. aureus* Newman, tym samym wykazując działanie antagonistyczne ($FBC_i = 2,125$). W przypadku bakterii z gatunku *P. aeruginosa*, zastosowanie ekstraktu A i AgNPs umożliwiło podwyższenie aktywności czynników i obniżenie dawek obu substancji ok. 4-krotnie ($FBC_i = 0,56$) w stosunku do szczepu referencyjnego PAK oraz ok. 16-krotnie dla ekstraktu i 2-krotnie dla AgNPs ($FBC_i = 0,5$) w stosunku do opornego izolatu klinicznego *P. aeruginosa*. Uzyskano więc kolejno, oddziaływanie bliskie synergii oraz oddziaływanie synergistyczne (**Wykres 1**).



Wykres 1. Izobologramy obrazujące oddziaływania przeciwbakteryjne między dwoma czynnikami bakteriobójczymi: ekstraktem z kłączy *I. pseudacorus* (ekstrakt A) oraz nanocząstkami srebra (AgNPs), w stosunku do dwóch szczepów bakterii *P. aeruginosa*. Pomarańczowa linia wyznacza granicę interakcji pomiędzy dwiema substancjami. Zielona linia reprezentuje dane eksperymentalne wskazujące minimalne stężenia bakteriobójcze obu substancji w stosunku do badanych szczepów *P. aeruginosa*.

Zmniejszenie dawek obu czynników może mieć kluczowe znaczenie dla uniknięcia ewentualnego wpływu cytotoksycznego ekstraktu A oraz AgNPs na komórki ludzkie, przy jednoczesnym zwiększeniu ich skuteczności przeciwbakteryjnej w stosunku do bakterii z gatunku *P. aeruginosa*.

Wielotorowe działanie w zwalczaniu bakteryjnych patogenów ludzkich jest jedną ze strategii w terapiach zakażeń wywołanych szczepami opornymi (Brooks i Brooks, 2014). Zastosowanie dodatkowego czynnika takiego jak ekstrakty roślinne może bowiem uwrażliwiać bakterie na substancje przeciwbakteryjne, w tym antybiotyki, na które nabyły już oporność (Abreu i in., 2012).

Nanocząstki srebra wykazują wyższą skuteczność przeciwbakteryjną w stosunku do bakterii Gram (-), niż Gram (+) (Banasiuk i in., 2020). Przyczyna antagonizmu ekstraktu A i nanocząstek jest jednak trudna do ustalenia i wymaga dodatkowych, wielopoziomowych badań, które nie wchodziły w zakres niniejszej rozprawy doktorskiej. W oparciu o wyniki uzyskane w dalszej części pracy związanej z analizą składu ekstraktu A (8.4) oraz eksperymentów dotyczących ekologicznej syntezy nanocząstek srebra z wykorzystaniem ekstraktów z tkanek *I. pseudacorus* (8.8), można przypuszczać, że znaczącą rolę w obserwowanym antagonizmie mogły odegrać taniny i flawonoidy.

Taniny to związki, które ze względu na liczne grupy hydroksylowe mogą wchodzić w interakcję zarówno z elementami znajdującymi się na powierzchni bakterii, jak również z nanocząstkami srebra. Jedną z charakterystycznych dla tanin cech jest ich wiązanie się z białkami powodujące ich precypitację z roztworu (Asquith i Butler, 1986). Wiązanie tanin z białkami i wywoływanie zmian w ich strukturze i właściwościach wykorzystywane było między innymi w procesie garbowania skór zwierzęcych (Raji i in., 2019). Proantocyjanidyny (taniny skondensowane) mogą, między innymi, wiązać się z polimerami na powierzchni komórek bakterii powodując rozległe formowanie łańcuchów i flokulację, co miało miejsce, np. w kulturze Gram (+) bakterii *Streptococcus bovis* (Jones i in., 1994). Taniny skondensowane, dzięki posiadaniu licznych ugrupowań di-orto-fenolowych, mogą również kompleksować metale (Dixon i in., 2005), co w sytuacji związania tanin na powierzchni komórek bakterii może być pułapką dla nanocząstek. Wzajemna interakcja na powierzchni bakterii mogła więc doprowadzić do unieczynnienia obu czynników przeciwbakteryjnych.

O ile w przypadku bakterii Gram (+), kluczową aktywność przeciwbakteryjną można przypisać katechinom i taninom skondensowanym (8.4.2), a w przypadku analizowanych szczepów *S. aureus*, zidentyfikowanej w ekstrakcie galokatechinie (Michalak i in. 2021), o tyle w przypadku bakterii Gram (-), rolę w aktywności i interakcji z AgNPs, mogą odgrywać obecne w *I. pseudacorus* flawonoidy

(Mykchailenko i Kovalyov 2016; Hanawa, Tahara, i Mizutani 1991; Bate-Smith i Harborne 1963; Mykhailenko i in. 2020). Katechiny wykazują bowiem mniejszą skuteczność w stosunku do bakterii Gram (-), których powierzchnia naładowana jest ujemnie z powodu obecności licznych lipopolisacharydów (Ikigai i in., 1993). Blokuje to ich oddziaływanie z katechiną. Z kolei brak na powierzchni peptydoglikanu najprawdopodobniej zapobiega agregacji tanin skondensowanych. W przypadku flawonoidów, badania wskazują, że mogą one wchodzić w interakcję z dwuwarstwą lipidową bakterii za pośrednictwem dwóch mechanizmów (Tsuchiya, 2015). Jeden z nich zakłada udział większej liczby niepolarnych związków w hydrofobowym wnętrzu błony komórkowej, podczas gdy drugi bierze pod uwagę tworzenie się wiązań hydroksylowych pomiędzy polarnymi głowami lipidów i bardziej hydrofilowymi flawonoidami na styku błony. Niespecyficzne wiązanie flawonoidów z fosfolipidami może wywoływać zmiany we właściwościach błony, takich jak fluktuacje w błonie czy zmiany grubości ściany. Pośrednio moduluje to funkcję i dystrybucję białek błonowych i wpływa na właściwości farmakologiczne samych flawonoidów (Arora i in., 2000). Destabilizacja błony może być drogą do wnikania nanocząstek srebra do wnętrza komórek, zwłaszcza jeśli nie zostały schwytane wcześniej na powierzchni komórki, jak mogło to mieć miejsce w przypadku działania ekstraktu i nanocząstek w stosunku do bakterii *S. aureus*.

8.4. Analiza składu ekstraktów

8.4.1. Całkowita zawartość związków fenolowych i tanin. Określenie charakteru tanin występujących w kłęczu *I. pseudacorus*.

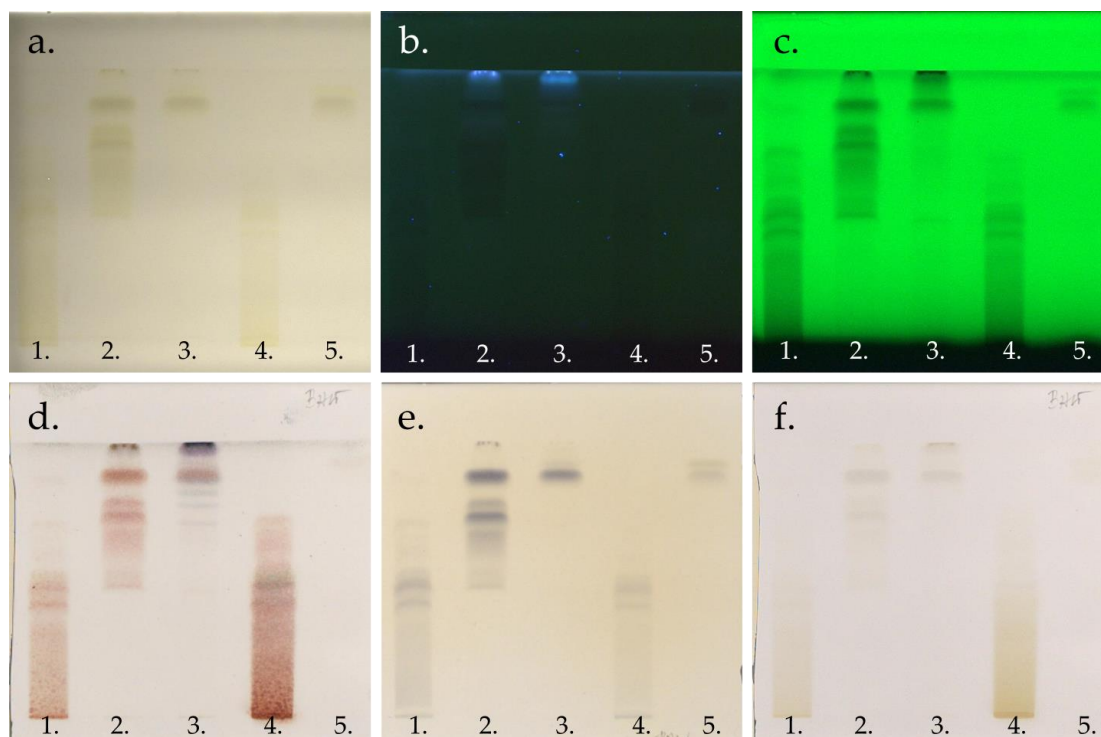
Całkowita zawartość związków fenolowych i tanin w liofilizowanych kłęczach *I. pseudacorus* została określona z wykorzystaniem metody proszku skórzanego i pomiaru spektrofotometrycznego (7.6). Metoda ta wykorzystuje fakt interakcji tanin z białkami w proszku skórzanym i ich precypitacji. Różnica w absorbancji przed i po zastosowaniu proszku skórzanego, w oparciu o krzywą kalibracyjną dla pirogalolu, pozwala oszacować i wyróżnić, jaką część wszystkich związków fenolowych stanowią taniny. W wyniku przeprowadzonych pomiarów ustalono, że całkowita zawartość związków fenolowych, wyrażona jako ekwiwalent pirogalolu, wynosi $6,63 \pm 0,31\%$ (w/w), przy czym $5,38 \pm 0,19\%$ (w/w) stanowią taniny. Analiza wykazała, że taniny stanowią ponad 80% związków fenolowych w kłęczu *I. pseudacorus*.

W celu potwierdzenia charakteru zidentyfikowanych tanin przeprowadzono analizę chromatograficzną TLC oraz hydrolizę w środowisku kwasowym. Analizie poddano ekstrakt A (7.3.3), B (7.3.2) oraz frakcje ekstraktu A

(7.3.6), kolejno A-O (octan etylu), A-E (eter dietylowy) i A-W (woda). Analizę TLC kompleksów tanin przeprowadzono na płytkach HPTLC ze złożem krzemionkowym z wykorzystaniem układu ruchomego (I) kwas octowy–eter dietylowy–n-heksan–octan etylu, (20:20:20:40, v/v/v/v) oraz (II) n-butanol–kwas octowy–woda (30:15:15, v/v/v). Obserwacja rozwiniętych chromatogramów w świetle widzialnym (**Fotografia 13a**) pozwoliła wykryć liczne pasma brunatnych związków, ciemniejących po odparowaniu fazy ruchomej ze złoża. Obserwacja w świetle UV $\lambda - 366$ nm (**Fotografia 13b**), pozwoliła zaobserwować obecność serii pasm o brunatnej fluorescencji w zakresie R_F 0,30-0,50 oraz fioletowej fluorescencji w zakresie R_F 0,65-0,9, co odpowiada kolejno: taninom hydrolizującym i skondensowanym – pochodnym katechiny. Ponadto, na obecność tanin skondensowanych wskazuje czerwono-brunatne zabarwienie pasm po spryskaniu chromatogramów odczynnikami wanilinowym (**Fotografia 13d**), podczas gdy taniny hydrolizujące zmieniały swoje zabarwienie na kolor ciemnoniebieski (Muller-Harvey, 2001). Obecność tanin jako związków polifenolowych w obu ekstraktach potwierdziła także zmiana zabarwienia pasm po spryskaniu chromatogramów roztworem $FeCl_3$. Wszystkie rozdzielone pasma zmieniły zabarwienie na kolor ciemno-niebieski (Muller-Harvey, 2001) (**Fotografia 13e**).

W celu potwierdzenia charakteru zidentyfikowanych związków przeprowadzono hydrolizę kwasową ekstraktu A oraz B. Produkty hydrolizy analizowane były w ko-chromatografii TLC ze związkiem wzorcowym, kwasem galusowym, w układzie (II) oraz w analizie HPLC-DAD-ESI-MS (7.7.5). W obu przypadkach analizy wykazały obecność kwasu galusowego w hydrolizatach (**Tabela 23**). Obecność kwasu galusowego wskazuje, że analizowane taniny hydrolizujące przynależą do grupy galotanin. Zmiana zabarwienia ekstraktu z różowego na czerwony była dodatkowym potwierdzeniem obecności tanin hydrolizujących w kłączach *I. pseudacorus* (Schofield i in., 2001).

W odróżnieniu od ekstraktu B, uzyskanego w ekstrakcji 80% acetonem, jako bardziej selektywnej metody ekstrakcji tanin (Salminen, 2018), na chromatogramach TLC uzyskanych dla ekstraktu A oraz jego frakcji obserwowano liczne pasma odpowiadające oligomerycznym oraz monomerycznym pochodnym katechiny (R_F 0,3-0,8). Pasma tych związków widoczne były także na chromatogramach uzyskanych dla tych ekstraktów w czasie chromatografii HPTLC z wykorzystaniem złoża krzemionkowego w układzie faz ruchomych (I): kwas octowy–eter dietylowy–n-heksan–octan etylu (20:20:20:40, v/v/v/v). Kompleksy tanin obecne w ekstraktach A, B i frakcji A-A pozostawały na linii startu tych chromatogramów (R_F 0,0).



Fotografia 13. Chromatogramy HPTLC SiO₂ F₂₅₄ rozwinięte w układzie faz ruchomych (II): n-butanol-kwas octowy-woda (30:15:15, v/v/v). Ścieżki: **1.** Ekstrakt **B** (acetonowy); **2.** Frakcja A-O (octan etylu); **3.** Frakcja A-E (eterowa); **4.** Frakcja A-W (wodna); **5.** Wzorzec – katechyna. **a.** światło dzienne; **b.** UV-366 nm; **c.** UV-254nm; **d.** po derywatywacji waniliną w kwasie siarkowym i octowym po ogrzaniu do 105°C przez 10 min; **e.** derywatywacja 1% roztworem chlorku żelaza (III) w metanolu; **f.** derywatywacja 2% kwasem solnym w metanolu i ogrzaniu do 105°C przez 10 min.

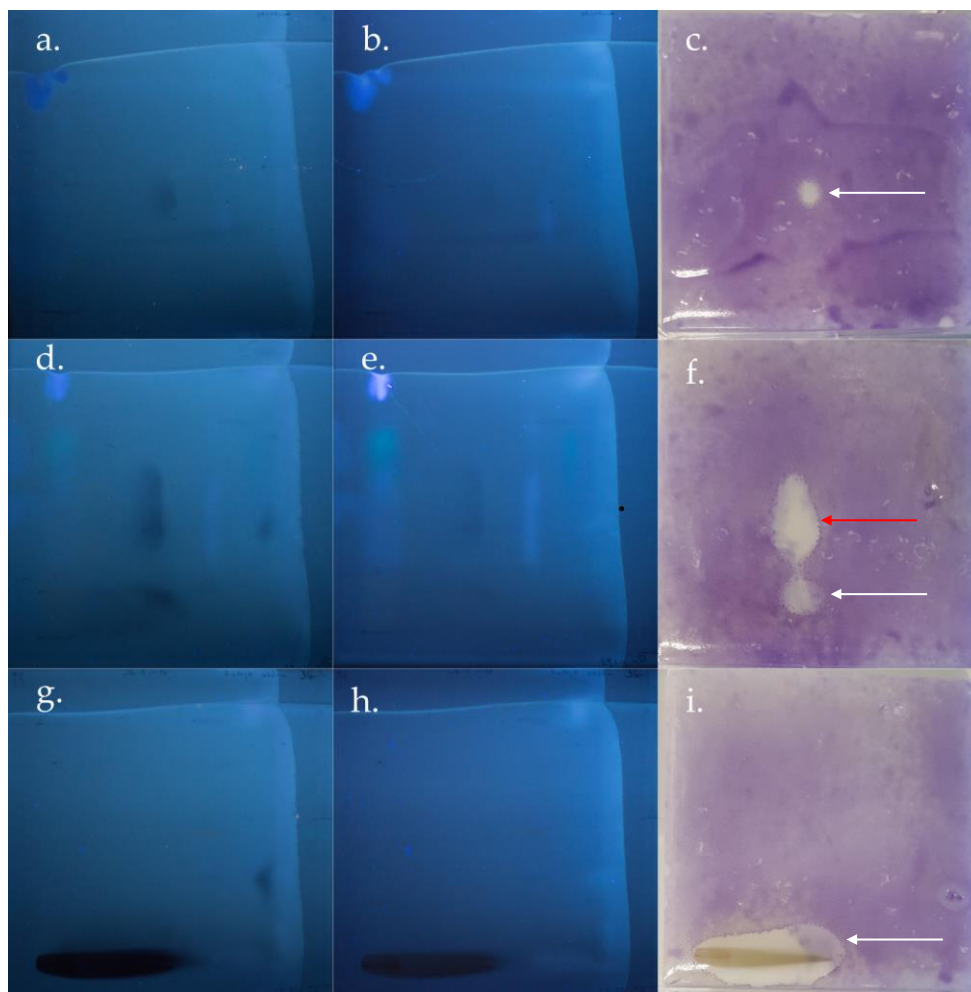
Frakcjonowanie ekstraktu A zostało wprowadzone w odpowiedzi na problem z separacją związków ekstraktu, zarówno w chromatografii TLC/HPTLC jak i HPLC. Problemy z separacją wywołane były złożonością ekstraktu i obecnością tanin skondensowanych, wiążących się silnie ze złożami chromatograficznymi, prowadząc do maskowania i zaburzenia migracji innych związków zawartych w ekstraktach.

Taniny reprezentują grupę metabolitów wtórnych roślin o szerokim spektrum aktywności biologicznych, m.in. przeciwutleniających, przeciwbakteryjnych czy ochronnych dla lipidów przed ich utlenianiem (Sieniawska i Baj, 2017). Taniny rozpuszczalne w wodzie znajdują zastosowanie w przemyśle skórzanym do garbowania skór zwierzęcych oraz w produkcji klejów do drewna i materiałów drewnopochodnych (Pizzi, 2019), ale potencjał ich zastosowania jest znacznie szerszy. Możliwość chemicznej modyfikacji oraz kopolimeryzacja z innymi związkami mogą nadawać nowych, unikalnych cech taninom, co jest już przedmiotem testów. Modyfikowane taniny mogą bowiem posłużyć m.in. do produkcji pianek, żywic, powłok wykończeniowych do drewna czy też plastyfikatorów (Pizzi, 2019).

8.4.2. Identyfikacja związków przeciwbakteryjnych z wykorzystaniem bioautografii oraz izolacja związku aktywnego z ekstraktu z kłączy *I. pseudacorus* (ekstrakt A).

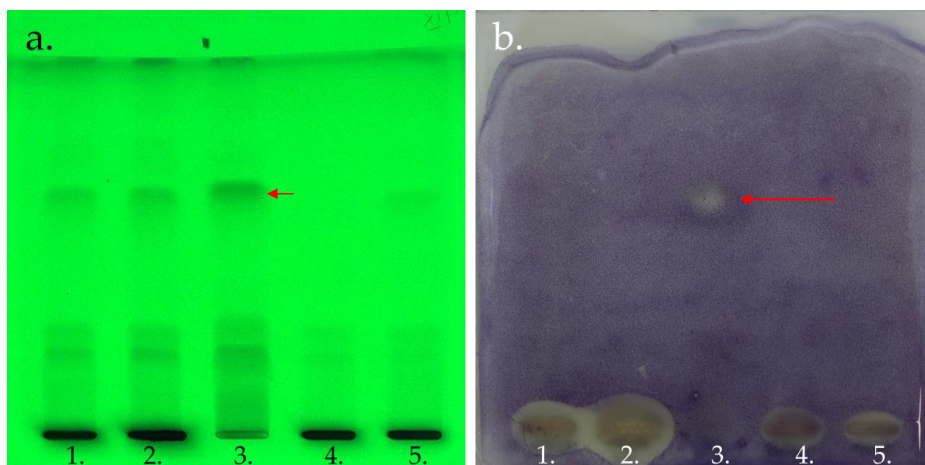
Analizy przeprowadzone za pomocą dwukierunkowej chromatografii TLC dla frakcji eter dietylowy (A-E) oraz octan etylu (A-O), a także frakcji wodnej (A-W) z ekstraktu A, prowadzone na płytkach celulozowych w układzie faz ruchomych (III) n-butanol–kwas octowy – woda oraz (IV) 5% kwas octowy, wykazały, w świetle UV λ – 254 oraz λ – 366 nm, obecność wielu pasm związków wykazujących jasnoniebieską, ciemnofioletową oraz brunatną fluorescencję (**Fotografia 14**). Brunatna fluorescencja była intensywniejsza w przypadku obserwacji chromatogramów w świetle UV λ – 254 nm (**Fotografia 14 a, d, g**). Uzyskane chromatogramy wykorzystano do przeprowadzenia bioautografii metodą agaru górnego z bakteriami *S. aureus* Newman (7.7.4). 24-godzinna inkubacja płytek pokrytych bakteriami, a następnie spryskanie ich wodnym roztworem MTT, pozwoliła uwidocznić strefy zahamowania wzrostu bakterii (**Fotografia 14c, f, i**). Najlepiej wyodrębnioną strefę zahamowania obserwowano dla frakcji octan etylu (**Fotografia 14f**). W celu uzyskania lepszej separacji związku odpowiedzialnego za obserwowaną aktywność przeciwbakteryjną, zastosowano dodatkowy jednokierunkowy układ chromatograficzny HPTLC ze złożem krzemionkowym w mieszaninie faz ruchomych (I) (7.7.2). Najlepiej wydzieloną strefę zahamowania wzrostu bakterii z gatunku *S. aureus* obserwowano dla frakcji octan etylu (frakcja A-O) przy wartości R_F (III/IV) 0,53/0,46 (**Fotografia 14f**) oraz R_F (I) 0,80 (związek 4) (**Fotografia 14b**). Związek ten był także widoczny na chromatogramach ekstraktu A oraz B (**Fotografia 15a**) jednak jego stężenie było za niskie, aby zaobserwować dla niego strefę zahamowania wzrostu bakterii (**Fotografia 15b**).

Złożoność ekstraktów A i B oraz obecność w nich związków balastowych, pozostających na starcie chromatogramów uniemożliwiła zwiększenie stężenia związku na płytce TLC. Do izolacji związku aktywnego (związek 4) wybrano więc frakcję A-O, zawierającą jego najwyższe stężenie oraz najniższe stężenie substancji balastowych. Związek (4) został wyizolowany za pomocą pół-preparatywnej TLC, prowadzonej na złożu krzemionkowym w układzie faz ruchomych: n-butanol–kwas octowy–woda (30:15:15, v/v/v) (II) (Muller-Harvey, 2001) (7.7.3). Ko-chromatografia TLC z wzorcami, prowadzona na płytkach HPTLC ze złożem krzemionkowym w układzie mobilnym (II) wykazała, że związek (4) posiada wartość R_F (0,80) zgodną ze wzorcami: epigalokatechiną oraz galusanem epigalokatechiny. Derywatywacja z użyciem 1% roztworu chlorku żelaza(III) spowodowała zmianę zabarwienia związków na kolor niebieski, co sugeruje, że



Fotografia 14. Chromatogramy uzyskane w wyniku dwukierunkowej chromatografia TLC na płytkach ze złożem celulozowym bez barwnika fluorescencyjnego, dla frakcji eter dietylowy (a-c) octan etylu (d-f), oraz wodnej pozostałości (g-i), uzyskanych w wyniku frakcjonowania ekstraktu A. Chromatogramy wizualizowano w świetle UV λ – 254 nm zdjęcia: a, d, g oraz UV λ – 366 nm, zdjęcia: b, e, h. Wyniki bioautografii z bakteriami *S. aureus* Newman po wybarwieniu wodnym roztworem MTT przedstawiają zdjęcia c, f, i. Strzałkami zaznaczono strefy zahamowania wzrostu bakterii. Czerwona strzałka wskazuje lokalizację analizowanego związku aktywnego.

związek (4) przynależy do grupy polifenoli. Wyizolowany związek (4) poddano analizie HPLC-DAD-ESI-MS (7.7.5). Uzyskane widmo UV (λ_{\max} 231sh, 268 nm) oraz wartość m/z jonów $[M+H]^+/[M-H]^-$ 307⁺/305⁻ w analizie ESI-MS wykazała, że analizowany związek jest pochodną katechiny. W oparciu o czas retencji związku i porównanie go z czasami retencji i kolejnością wymywania z kolumny wzorców: epigalokatechiny, epikatechiny, katechiny, galusanu epigalokatechiny (Muller-Harvey, 2001) (Tabela 23), związek (4) zidentyfikowano jako galokatechinę. Dane widm UV oraz dane z detektora masowego uzyskane dla wyizolowanego związku były zgodne z dostępną literaturą (Salminen, 2018; Schofield i in., 2001).



Fotografia 15. Chromatogram uzyskany w wyniku rozdzielania związków na płytce HPTLC Si₆₀ w układzie mobilnym (II) n-butanol-kwas octowy-woda (30:15:15, v/v/v). **a.** obserwacja w świetle UV λ – 254nm; **b.** bioautografia metodą agaru górnego z bakteriami *S. aureus* Newman po wybarwieniu roztworem MTT. Czerwoną strzałką zaznaczono związek (4). **1.** Ekstrakt B 10 μ l **2.** Ekstrakt B 20 μ l **3.** frakcja A-O 10 μ l, **4.** Frakcja A-W 10 μ l, **5.** Ekstrakt A. 10 μ l

W celu potwierdzenia czy uzyskany związek (4) odpowiada za obserwowaną aktywność przeciw *S. aureus*, wykonano analizę aktywności z wykorzystaniem seryjnych mikrorozcieńczeń (7.4.5). Analiza potwierdziła, że galokatechina wykazuje działanie przeciwbakteryjne w stosunku do szczepu bakterii *S. aureus* Newman: MBC = 1,9 μ g/mL oraz *P. aeruginosa* ATCC 27853: MBC = 6,1 μ g/mL. Oba wyniki zbliżone są do uzyskanych przez Zang i współpracowników (2013) dla innych szczepów tych gatunków bakterii. Galokatechina może więc być jednym z głównych związków odpowiedzialnych za aktywność przeciwbakteryjną ekstraktu metanolowego z kłączy *I. pseudacorus* (8.3).

Nie jest to jednak jedyny związek, który może być odpowiedzialny za aktywność ekstraktu A. Jak wskazują wyniki bioautografii, w mieszaninie znajdują się również inne związki hamujące wzrostu bakterii. Są to najprawdopodobniej taniny skondensowane, pozostające na starcie chromatogramów (**Fotografia 14i**). Nie wykluczona jest także obecność w ekstraktach przeciwbakteryjnych izoflawonów, zidentyfikowanych dotychczas w kłączach i korzeniach irysów (Hanawa i in., 1991; Michalak i in., 2021; Mykchailenko i Kovalyov, 2016; Tarbeeva i in., 2013b) jednak ze względu na ich niższe stężenie w tkankach, niż stężenie tanin, mogą być one maskowane na chromatogramach oraz w bioautografii.

W czasie analizy HPLC-DAD-ESI-MS ekstraktu A oraz frakcji A-O wykryto obecność 5 sygnałów (t_R 1,27; 2,38; 3,37; 5,55; 8,23 min.) o tej samej wartości m/z dla jonów $[M+H]^+$ / $[M-H]^-$ 611/609 oraz tych samych widmach UV (λ_{max} 230sh, 271, 280sh nm). Porównanie danych z informacjami dostępnymi w literaturze (Salminen, 2018; Schofield i in., 2001) wskazuje, że obserwowane związki

reprezentują prodelfinidyny typu B – izomery bądź formy dimeryczne galokatechiny (związki 5-9, **Tabela 23**). Uzyskane dane sugerują obecność różnych form flawan-3-oli w kłączach *I. pseudacorus* – związków o udokumentowanej aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwwirusowej (Daglia, 2012). Obecność prodelfinidyn typu B może mieć znaczenie dla aktywności cytotoksycznej ekstraktu A, którą wykazano w niniejszej pracy (0). Badania wskazują, że wśród prodelfinidyn typu B występują związki mogące indukować apoptozę komórek nowotworu piersi linii MCF-7 (Lin i in., 2004).

Tabela 23. Dane uzyskane w wyniku analizy HPLC–DAD–ESI–MS dla związków wzorcowych oraz zidentyfikowanych w ekstrakcie z kłączy *I. pseudacorus*

Numer związku /wzorzec	t_R (min)*		UV λ_{max} nm	ESI-MS m/z [M+H] ⁺ / [M-H] ⁻	Zidentyfikowany związek
	I	II			
Związek 4	4,6	-	268	307 ⁺ /305 ⁻	Galokatechina
Związek 5	-	1,27	230sh, 271, 280sh	611 ⁺ /609 ⁻	Prodelfinidyna B izomer
Związek 6	-	2,38	230sh, 271, 280sh	611 ⁺ /609 ⁻	Prodelfinidyna B izomer
Związek 7	-	3,37	230sh, 271, 280sh	611 ⁺ /609 ⁻	Prodelfinidyna B izomer
Związek 8	-	5,55	230sh, 271, 280sh	611 ⁺ /609 ⁻	Prodelfinidyna B izomer
Związek 9	-	8,23	230sh, 271, 280sh	611 ⁺ /609 ⁻	Prodelfinidyna B izomer
Kwas galusowy	2,5	-	269	171 ⁺ /169 ⁻	+
Daidzeina	12,5	36,4	248, 256sh, 300sh	255 ⁺ /253 ⁻	+
Genisteina	17,5	44,2	259, 286sh, 332sh	271 ⁺ /269 ⁻	+
Epigalokatechina	8,1	-	269	307 ⁺ /305 ⁻	-
Katechina	9,8	-	278	291 ⁺ /289 ⁻	-
Epikatechina	14,3	-	278	291 ⁺ /289 ⁻	-
Galusan epigalokatechiny	16,8	-	275, 301sh	459 ⁺ /457 ⁻	-
Kwas elagowy	24,8	-	252, 300sh, 365	303 ⁺ /301 ⁻	-

t_R – czas retencji; I oraz II – programy elucji z kolumny Kinetex C-18; + związek potwierdzony w ekstrakcie, – związek nie potwierdzony w ekstrakcie.

8.5. Aktywność cytotoksyczna ekstraktów z kłączy *I. pseudacorus* na ludzkich liniach komórkowych

Aktywność cytotoksyczną ekstraktu A z kłączy *I. pseudacorus* (7.3.2), określono 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 aktywność cytotoksyczną ekstraktów zaobserwowano w stosunku do komórek linii MCF-7, uzyskując wartość $IC_{50} = 11,75 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$. Dwu i czterokrotnie niższą aktywność zaobserwowano kolejno dla HCT-116 oraz HeLa. Wartość IC_{50} dla wszystkich przebadanych linii komórkowych przedstawiono w **Tabeli 24**.

Wykazanie najwyższej aktywności ekstraktu A w stosunku do komórek linii MCF-7 stało się powodem, dla którego jako linię kontrolną, nienowotworową, wybrano komórki nabłonkowe gruczołu piersiowego: MCF-10A. Wartość IC_{50} dla badanej linii wyniosła $44 \pm 1 \mu\text{g/mL}$. Wykazano więc ok. 3,7-krotnie niższą wrażliwość komórek nienowotworowych na działanie ekstraktu w porównaniu do efektu jaki obserwowano dla komórek nowotworowych linii MCF-7.

Tabela 24. Aktywność cytotoksyczna ekstraktów metanolowych z kłączy *I. pseudacorus* na nowotworowe i nienowotworową linię komórek ludzkich.

Linia komórkowa	Wartość IC_{50} * $\mu\text{g/mL}$
MCF-7	$11,75 \pm 0,7$
HeLa	$47,5 \pm 0,5$
HCT-116	24 ± 1
MCF-10A	44 ± 1

*połowa maksymalnego stężenia hamującego
(ang. *half maximal inhibitory concentration*)

Wyniki testów aktywności cytotoksycznej uzyskane dla ekstraktu A wykazują selektywność działania w stosunku do komórek linii MCF-7. Linia ta charakteryzuje się obecnością receptorów estrogenowych, z którymi oddziaływać może nie tylko estrogen, ale również związki o zbliżonej do niego strukturze, m.in. metabolity pochodzenia roślinnego, które ze względu na swoje właściwości, nazywane są fitoestrogenami (Martin i in., 1978). Komórki linii MCF-10A nie posiadają receptorów estrogenowych, a znacząca różnica w aktywności obserwowanej pomiędzy badanymi liniami komórek gruczołu piersiowego sugeruje, że oddziaływanie składników ekstraktu z tymi receptorami może mieć kluczowe znaczenie w poszukiwaniu odpowiedzi na pytanie o potencjalny mechanizm aktywności i przyczyny selektywności ekstraktu z kłączy *I. pseudacorus*.

Analiza dostępnej literatury naukowej wskazuje, że rośliny z rodzaju *Iris* są źródłem związków fenolowych z grupy izoflawonów, w tym genisteiny i daidzeiny, o udokumentowanej aktywności estrogenowej (Choudhary i Alam, 2017; Kukula-Koch i in., 2015). Obecność genisteiny i daidzeiny została również potwierdzona w tkankach *I. pseudacorus*, zarówno w ekstraktach z liści (Ali, 2016), kłączy (Mykchailenko i Kovalyov, 2016), jak i korzeni (Michalak i in. 2021). Genisteina i daidzeina to związki wykazują powinowactwo do receptorów estrogenowych, w tym α -estrogenowych obecnych w komórkach linii MCF-7. Poprzez wiązanie z receptorami mogą wpływać one na ścieżki sygnalizacyjne normalnie regulowane estrogenem. Ich działanie jest jednak dwubiegunowe. Z jednej strony, w niskich stężeniach, poniżej 10 μ M, stymulują proliferację komórek nowotworowych, takich jak komórki linii MCF-7. W stężeniach powyżej 10 μ M prowadzą natomiast do jej zahamowania (Hsieh i in., 1998).

Dotychczasowe analizy ekstraktów z *I. pseudacorus* przeprowadzone na tej samej linii komórkowej wykonane zostały jedynie dla ekstraktów z liści. Wyniki uzyskane w pracy przedstawionej przez Ali (2016), wskazują na odwrotny efekt działania ekstraktów z *I. pseudacorus* niż ten obserwowany dla wyciągów z kłączy. Ekstrakt polarny z liści stymulował proliferację komórek MCF-7. Ich liczebność wzrosła nawet o 38% w stosunku do liczebności początkowej przy zastosowaniu ekstraktu w stężeniach od 0,01 do 100 μ g. Ali (2016), pomimo potwierdzenia w tkance obecności genisteiny i daidzeiny, nie uwzględniła jednak ich potencjalnego wpływu na obserwowany efekt zależny od stężenia. Różnice w odpowiedzi komórek linii MCF-7 na ekstrakty z tkanek *I. pseudacorus* mogą również wynikać z różnic w profilach metabolicznych tych tkanek, jak również z różnic w stężeniach związków aktywnych, w tym genisteiny i daidzeiny, co nie zostało uwzględnione w badaniach. Nie wyklucza się także udziału innych związków, które podwyższają efekt cytotoksyczny ekstraktu z kłączy w stosunku do komórek linii MCF-7. Ekstrakty to wysoko złożone mieszaniny, w których liczne związki biologicznie czynne mogą oddziaływać ze sobą synergistycznie. W rezultacie może to prowadzić do intensyfikacji działania cytotoksycznego. Wskazują na to, między innymi, badania prowadzone przez Zu i współpracowników (2018), w których wykazano, że genisteina i daidzeina w połączeniu indukują efekt synergistyczny w stosunku do linii MCF-7, wykazując istotnie wyższą aktywność, niż użyte osobno. Equol, bioaktywny metabolit daidzeiny, istotnie zwiększał cytotoksyczność i aktywność apoptotyczną genisteiny, gdy używano ich w razem. Co ciekawe, efekt ten nie był obserwowany w przypadku zastosowania genisteiny i equolu w stosunku do linii komórek nowotworowych piersi nie posiadających receptora estrogenowego (Ono i in., 2017).

Na selektywność działania ekstraktu z kłączy na komórki z receptorami estrogenowymi może mieć również wpływ obecność tanin (8.4.1). Jak pokazują badania prowadzone z wykorzystaniem kwasu taninowego, skuteczniej oddziałuje on na komórki nowotworowe estrogenozależne (posiadające aktywne receptory dla estrogenu), niż na estrogenoniezależne (Booth i in., 2013). Obecność tanin w ekstrakcie z *I. pseudacorus* może więc być kolejnym czynnikiem wnoszącym wkład w selektywną aktywność w stosunku do linii MCF-7.

Tkanki *I. pseudacorus* zawierają liczne metabolity wtórne o potwierdzonej aktywności cytotoksycznej na innych typach linii ludzkich komórek nowotworowych. W badaniach przeprowadzonych przez Tarbeeva i współpracowników (2014, 2015), wykazano, że obecny w tkankach *I. pseudacorus* 5,7-dimetoksy-trans-3-hydroksyflawon może hamować proliferację komórek nowotworowych jelita grubego linii HT-29. Nie bez znaczenia dla cytotoksycznej aktywności ekstraktów pozostaje również obecność iridali. Jak wskazują badania Chen i współpracowników (2017), izoiridogermanal oraz iridobelamal A, izolowane z kłączy *I. pseudacorus*, wykazują aktywność cytotoksyczną w stosunku do pięciu różnych linii komórek nowotworowych, w tym linii MCF-7. Izoiridogermanal wykazywał zahamowanie proliferacji komórek nowotworu piersi na poziomie $IC_{50} = 18,95 \mu M$. Wynik ten wskazuje, że nie tylko genisteina i daidzeina, ale również izoiridogermanal może mieć wpływ na obserwowaną wysoką aktywność w stosunku do tej linii komórkowej. Nie wyklucza się więc wspomnianych wyżej potencjalnych oddziaływań synergistycznych.

Jednym ze związków biologicznie czynnych z grupy tanin, zidentyfikowanym w niniejszej pracy doktorskiej w czasie analizy ekstraktu A, jest galokatechina. Jej potencjalne właściwości cytotoksyczne na nowotworowe komórki ludzkie, została sprawdzona z wykorzystaniem linii MCF-7. Przeprowadzona analiza cytotoksyczności prowadzona z wykorzystaniem testu MTT (7.5) nie wykazała jej aktywności w stosunku do komórek nowotworu piersi. W jej najwyższym testowanym stężeniu wynoszącym $100 \mu g/mL$, przeżywalność komórek wynosiła ok. 80%. Wyniki wskazują, że nie była ona związkiem bezpośrednio odpowiedzialnym za obserwowaną aktywność cytotoksyczną na komórki linii MCF-7.

8.6. Analiza aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów z tkanek *I. pseudacorus* uzyskanych z kultur *in vitro*

Analizę aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów z tkanek *I. pseudacorus* z kultur *in vitro* rozpoczęto od analizy ekstraktów z tkanek roślin poddanych elicytacji oraz nieelicytowanych kontroli. Na początkowym etapie, ze względu na

brak kłączy u tak młodych roślin, ekstrakty przygotowywano z korzeni. Za pomocą metody seryjnych mikrorozcieńczeń (7.4.3), w zakresie od 1,56 do 100 mg SM/mL, ustalono, że ekstrakty uzyskane z korzeni roślin poddanych jedno- i dwutygodniowej elicytacji z wykorzystaniem kwasu jasmonowego, fenyloalaniny lub lizatu bakteryjnego *C. sakazakii* (7.1.6), nie wykazują aktywności przeciwbakteryjnej przeciw bakteriom *S. aureus* Newman oraz *P. aeruginosa* PAK. Podjęto więc decyzję o wykorzystaniu do ekstrakcji niewielkich jeszcze podstaw łodyg, z których na późniejszym etapie rozwoju rośliny powstaje kłącze. Analiza ekstraktów z łodyg wykazała ich aktywność hamującą wzrost *S. aureus* na poziomie: MIC = 50 mg SM/mL. Porównanie wartości MBC dla ekstraktu z łodyg roślin kontrolnych z MBC dla ekstraktów z roślin elicytowanych wykazała brak różnic w poziomie aktywności. Elicytacja nie wpłynęła na podwyższenie aktywności ekstraktów uzyskanych z łodyg roślin elicytowanych przez 1 oraz 2 tygodnie z wykorzystaniem fenyloalaniny, kwasu jasmonowego i lizatu bakterii *C. sakazakii*. Ze względu na ograniczoną ilość ekstraktu nie podjęto analizy aktywności ekstraktów z łodyg przeciw bakteriom Gram (-) z gatunku *P. aeruginosa*.

Ekstrakty z łodyg roślin elicytowanych lizatem bakteryjnym *D. dadantii* nie wykazały aktywności przeciw bakteriom *S. aureus* Newman w zakresie analizy od 1,56 do 100 mg SM/mL. Z kolei elicytacja prowadzona ze zmianą zawartości azotu w pożywce hodowlanej spowodowała obniżenie aktywności ekstraktu z łodyg roślin utrzymywanych w pożywce bez obu źródeł azotu (7.1.6) z MBC = 50 mg SM/mL do MBC = 100 mg SM/mL. Zmiany nie obserwowano, gdy w pożywce znajdowało się chociaż jedno ze źródeł azotu.

Ekstrakty z łodyg roślin utrzymywanych w hodowli w bioreaktorach okresowo-zalewowych *Plantform* (7.1.4), poddanych elicytacji z wykorzystaniem ekstraktu etanolowego z mszyc, również nie wykazały podwyższonej aktywności przeciwbakteryjnej. Zarówno dla kontroli jak i ekstraktów z tkanek po elicytacji, wartość MBC wynosiła 50 mg SM/mL.

Podsumowując, żaden z zastosowanych elicytorów nie spowodował podniesienia stężenia związków o aktywności przeciwbakteryjnej, w tkankach *I. pseudacorus* utrzymywanych w kulturach *in vitro*, w sposób umożliwiający wykrycie zmiany zastosowaną metodą badawczą.

Analizie przeciwdrobnoustrojowej poddano także ekstrakty z kłączy roślin z hodowli w bioreaktorze okresowo-zalewowym *Plantform*. Kłącze uzyskane po 17-tygodniowej hodowli poddano liofilizacji i ekstrakcji. Analiza aktywności przeciwbakteryjnej wykazała, że ekstrakty metanolowe są aktywne przeciwbakteryjnie w stosunku do *S. aureus* Newman osiągając wartość MBC

równą 10 mg SM/mL. W przypadku *P. aeruginosa* PAK wartość MBC wynosiła 25 mg SM/mL. Warto zaznaczyć, że suchy ekstrakt podczas zawieszania go w pożywce zachowywał się podobnie jak ekstrakt z kłącza z hodowli w glebie – powodował strącanie się osadu, co może sugerować obecność związków fenolowych z grupy tanin.

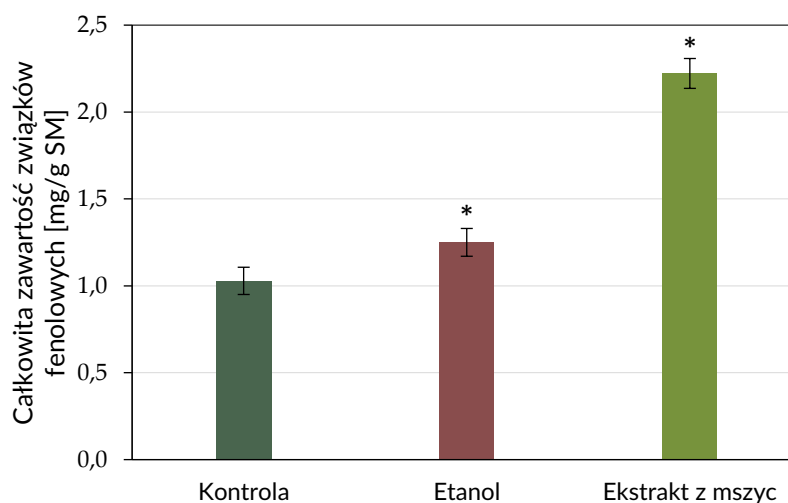
Wyniki testów aktywności ekstraktu uzyskanego z tkanki hodowanej w systemie okresowo-zalewowym, w porównaniu do tkanek roślin hodowanych w kolbach (na potrzeby eksperymentów związanych z elicytacją), sugerują, że wiek tkanki oraz warunki hodowli roślin mogą mieć kluczowe znaczenie dla biosyntezy związków przeciwbakteryjnych w kulturach *in vitro* roślin *I. pseudacorus*. Tak jak już wspomniano w rozdziale dotyczącym kultury korzeni anatomicznych *I. pseudacorus* (8.1.4), metabolizm oraz wydatkowanie energii w młodych, szybko rosnących tkankach wydają się być ukierunkowywane na intensywny wzrost i rozwój rośliny. Metabolizm pierwotny jest ściśle powiązany z metabolizmem wtórnym i na początkowych etapach prowadzenia kultury, metabolity wtórne mogą nie być obecne w tkankach w ilościach umożliwiających ich detekcję poprzez analizę aktywności ekstraktów. Nie oznacza to jednak, że związki o aktywności przeciwbakteryjnej nie są obecne w tkankach w kulturach *in vitro*. W celu potwierdzenia ich obecności oraz zarejestrowania, jak czas hodowli wpływa na ich stężenie, wymagane jest podjęcie dodatkowych analiz i zastosowanie czułych metod detekcji w oparciu, m.in. o wysokosprawną chromatografię cieczową.

8.7. Wpływ elicytacji na zawartość związków fenolowych w tkankach roślin *I. pseudacorus* z kultur *in vitro*

Całkowitą zawartość związków fenolowych w łodygach i korzeniach roślin poddanych elicytacji oraz roślin kontrolnych określono na podstawie pomiaru absorbancji po zastosowaniu odczynnika Folin–Ciocalteu (7.6.3). Zawartość związków fenolowych w ekstraktach wyrażono jako ekwiwalent kwasu galusowego, w oparciu o pomiary dla gradientu stężeń tego kwasu. Stężenia związków fenolowych wyrażono w miligramach ekwiwalentu kwasu galusowego na gram suchej masy tkanki.

Porównanie zawartości związków fenolowych pomiędzy ekstraktami z roślin kontrolnych, nie poddanych elicytacji, a ekstraktami z roślin elicytowanych przez tydzień, pozwoliło zaobserwować istotne różnice w średniej zawartości tych związków w ekstraktach z łodyg, po zastosowaniu: lizatu *C. sakazakii* (wzrost o 0,354 mg/g), kwasu jasmonowego (wzrost o 0,678 mg/g) oraz fenyloalaniny (spadek o 0,2 mg/g). W przypadku ekstraktu z korzeni istotną różnicę ($p < 0,05$) zaobserwowano jedynie dla fenyloalaniny (spadek o 0,491 mg/g). Dla roślin

poddanych dwutygodniowej elicytacji, istotne różnice w zawartości związków fenolowych w ekstraktach z łodyg zanotowano dla lizatu *C. sakazakii* (spadek o 0,57 mg/g) oraz fenyloalaniny (spadek o 0,34 mg/g). Zmiana zawartości azotu w pożywce hodowlanej pozwoliła na zwiększenie zawartości związków fenolowych jedynie w łodygach roślin utrzymywanych na pożywkach bez obu źródeł azotu (wzrost o 0,213 mg/g). Istotne różnice w zawartości związków fenolowych zaobserwowano również w korzeniach roślin utrzymywanych w pożywce bez jednego ze źródeł azotu: KNO_3 (spadek 0,53 mg/g). W przypadku elicytacji z wykorzystaniem lizatu bakterii *D. dadantii* nie zaobserwowano żadnych istotnych zmian.



Wykres 2. Całkowita zawartość związków fenolowych w ekstraktach z kłączy uzyskanych z roślin *I. pseudacorus* hodowanych w bioreaktorze *Plantform*. Wykres przedstawia wpływ elicytacji na zawartość związków fenolowych po zastosowaniu etanolowego ekstraktu z mszycy. Zastosowanie etanolu oraz etanolowego ekstraktu z mszycy istotnie wpływa na zawartość związków fenolowych w ekstrakcie z kłączy nie poddanych elicytacji.

Zastosowanie ekstraktu z mszycy w hodowli prowadzonej w bioreaktorach okresowo-zalewowych *Plantform* doprowadziło do istotnego wzrost zawartości związków fenolowych w kłączy roślin poddanych tygodniowej elicytacji (**Wykres 2**). Istotne różnice zaobserwowano zarówno w kontroli traktowanej etanolem (wzrost o 0,222 mg/g w kłączy), jak i próbie badawczej z wykorzystaniem ekstraktu z mszyc (wzrost o 1,194 mg/g w kłączy). W przypadku zastosowania etanolu wzrost był jednak istotnie mniejszy niż w przypadku zastosowania etanolowego ekstraktu z mszyc. W przypadku korzeni, istotne różnice w zawartości związków fenolowych zaobserwowano między

kontrolą a kontrolą z etanolem (wzrost o 0,342 mg/g) oraz kontrolą, a ekstraktem z mszyc (wzrost o 0,363 mg/g). W tym jednak przypadku to sam etanol mógł mieć wpływ na zwiększenie ilości fenoli w analizowanej tkance.

Obserwowane różnice w zawartości związków fenolowych w młodych roślinach hodowanych w kolbach i poddanych elicytacji (pomimo istotności statystycznej), są zmianami, które ze względu na niską masę tkanki i ograniczoną ilość materiału roślinnego, mogą wynikać z błędów w pomiarach. Niskie zmiany w stężeniach związków, po uwzględnieniu nakładu zasobów i pracy, nie wnoszą znaczącej wartości praktycznej do zastosowania analizowanych elicytorów na tym etapie rozwoju roślin. Wątpliwość w uzyskanych wynikach wzbudza przede wszystkim obniżenie zawartości związków fenolowych w tkankach po zastosowaniu fenyloalaniny – związku podstawowego w szlaku biosyntezy fenoli (Osborn i Lanzotti, 2009). Z przeprowadzonej analizy dostępnej literatury wynika, że jej dodanie powinno wpływać na podwyższenie zawartości związków fenolowych w tkankach, a nie ich obniżenie. Związek ten jest ważnym prekursorem w szlaku szikimowym prowadzącym do biosyntezy szerokiego spektrum związków fenolowych (Davies i Schwinn, 2003; Osborn i Lanzotti, 2009; Skrzypczak-Pietraszek i in., 2019). Nie należy wykluczać jednak, że zaobserwowane obniżenie zawartości związków fenolowych pod wpływem fenyloalaniny, jest możliwe z powodu wykorzystania tego związku w szlakach metabolizmu podstawowego, ukierunkowanego na intensywny wzrost.

Dłuższy czas hodowli roślin *I. pseudacorus* w warunkach *in vitro*, np. w bioreaktorze *Plantform* (17 tyg. hodowli) pozwolił na uzyskanie w ekstrakcie z łodyg związków wykazujących aktywność przeciwbakteryjną (badania nie zawarte w niniejszej pracy), a całkowita zawartość związków fenolowych w kłęczu wynosiła 5,148 mg/g. Obserwacje te sugerują, że wzrost zawartości związków fenolowych oraz związków o aktywności przeciwbakteryjnej jest ściśle powiązany ze stadium rozwojowym *I. pseudacorus*. Elicytacja powinna więc być przeprowadzona na późniejszym etapie, niż miało to miejsce w zaprezentowanych wyżej eksperymentach. Kluczowym jednak problemem jest rozmiar *I. pseudacorus* i utrzymanie całych, w pełni rozwiniętych roślin w kulturach *in vitro*. Uzyskane kultury pędów (8.1.3) oraz kultura korzeni anatomicznych (8.1.4) mogą jednak stanowić podstawę do projektowania dalszych badań w tym zakresie.

8.8. Wykorzystanie ekstraktów wodnych z tkanek *I. pseudacorus* do ekologicznej syntezy przeciwbakteryjnych nanocząstek srebra

8.8.1. Synteza, analiza mikroskopowa (TEM) oraz obserwacja stabilności w roztworze nanocząstek srebra

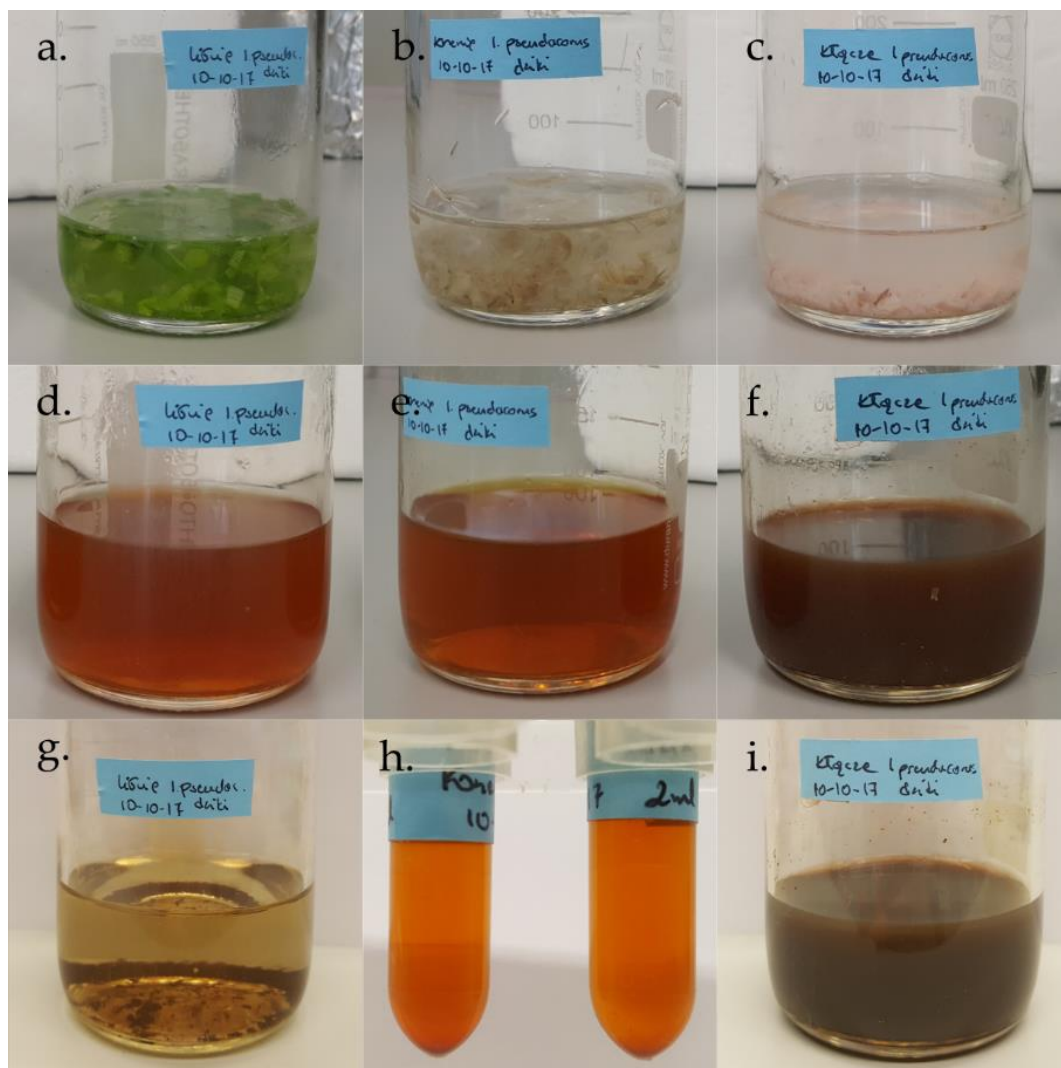
Do syntezy nanocząstek srebra wykorzystano trzy różne ekstrakty wodne: z liści, kłączy i korzeni *I. pseudacorus*, pochodzących z hodowli ogrodowej (7.3.5). Substratami w syntezie były: wodny ekstrakt roślinny, azotan(V) srebra oraz PVP (7.8.1). Po zainicjowaniu mikrofalami reakcji pomiędzy azotanem(V) srebra a składnikami ekstraktów w obecności PVP obserwowano zmianę zabarwienia mieszanin reakcyjnych, których początkowy kolor związany był z barwą ekstraktów roślinnych zastosowanych do reakcji (**Fotografia 16a, b, c**). Po zakończeniu reakcji mieszaniny z ekstraktem z liści oraz z korzeni zabarwiły się na kolor pomarańczowo-brunatny (**Fotografia 16d, e**), a mieszanina z ekstraktem z kłączy na kolor ciemnobrązowy (**Fotografia 16f**). Wszystkie trzy roztwory miały charakterystyczną, metaliczną poświatę sugerującą obecność metalicznego srebra. Po zakończeniu syntezy, nanocząstki pozostawiono w ciemności. Po ok. 14 dniach zaobserwowano, że we wszystkich trzech próbach doszło do sedymentacji nanocząstek, a jej stopień zależny jest od ekstraktu, który został wykorzystany do syntezy oraz czasu, jaki upłynął od ich syntezy.

Po ok. dwóch miesiącach zaobserwowano całkowite wytrącenie się nanocząstek z roztworu koloidalnego dla próby uzyskanej z wykorzystaniem ekstraktu z liści (**Fotografia 16g**). Nanocząstki uzyskane z wykorzystaniem ekstraktu z kłączy również ulegały intensywnej sedymentacji (**Fotografia 16i**), choć w tym przypadku, AgNPs pozostawały również w roztworze. Najwyższą stabilność w roztworze wykazały nanocząstki uzyskane z wykorzystaniem ekstraktu z korzeni (**Fotografia 16h**). Z tego też powodu AgNPs z ekstraktu z korzeni zostały wybrane do dalszej, szczegółowej analizy.

Obecność metalicznych struktur srebra w mieszaninie poreakcyjnej, potwierdzono z wykorzystaniem Transmisyjnej Mikroskopii Elektronowej (7.8.2). W uzyskanym obrazie zaobserwowano obecność nanostruktur heterogennych pod względem kształtu i rozmiaru. Na zarejestrowanym obrazie mikroskopowym (**Fotografia 17**) obserwowano owalne i okrągłe struktury o rozmiarach od 0,5 do ok. 30 nm, z przeważającą frakcją o rozmiarach od 2,5 do 10 nm.

Wykorzystanie ekstraktów roślinnych w „zielonej syntezie” nanocząstek srebra było już z powodzeniem stosowane przez innych badaczy. AgNPs były syntetyzowane z wykorzystaniem ekstraktów z zielonej herbaty (Rónavári i in., 2017), magnolii wielkokwiatowej, aloesu, eukaliptusa, geranium (Okafor i in., 2013),

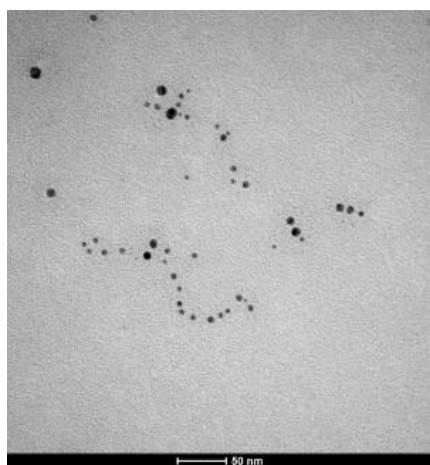
herbaty chińskiej (Loo i in., 2012), roślin owadożernych (Banasiuk i in., 2020) i wielu innych gatunków. W reakcjach z azotanem(V) srebra, ekstrakty roślinne pełnią głównie funkcję reduktora. Samo zastosowanie PVP nie jest w stanie wywołać reakcji redukcji jonów srebra (Banasiuk i in., 2020). Powstanie nanocząstek srebra po zastosowaniu ekstraktu z korzeni *I. pseudacorus* sugeruje więc obecność w tkance związków o wysokim potencjale redukcyjnym.



Fotografia 16. „Zielona synteza” nanocząstek srebra z wykorzystaniem wodnych ekstraktów z tkanek *I. pseudacorus*. **a, b, c**, ekstrakty wodne z liści, korzeni i kłączy uzyskane w czasie ekstrakcji wspomagananej mikrofalami, substrat w reakcji syntezy; **d, e, f**, mieszanina reakcyjna po syntezie, widoczna zmiana barwy oraz metaliczny połysk, sugerują obecność nanocząstek srebra; **g, h, i**, mieszaniny poreakcyjne po ok. 2 miesiącach przechowywania. W mieszaninie z liści **g** oraz kłączy **i** widoczne intensywne wtrącenie nanocząstek z roztworu.

Stabilność AgNPs w roztworze, w widoczny sposób zależy od rodzaju zastosowanej tkanki, a co za tym idzie, od składu metabolicznego ekstraktu. Nie bez znaczenia dla zachodzenia reakcji i stabilizacji nanocząstek może mieć obecność tanin. Mogą one pełnić zarówno funkcję reduktora, jak i stabilizatora nanocząstek

(Raja i in., 2014). Kluczowy wpływ na stabilność uzyskanych nanocząstek może mieć jednak obecność flawonoidów. Jest to grupa związków fenolowych, których udział w tworzeniu nanostruktur wskazuje się w największej liczbie badań (Marstin i in., 2018). Kłącza i korzenie *I. pseudacorus* są ich bogatym źródłem (Bate-Smith i Harborne, 1963; Mykchailenko i Kovalyov, 2016; Mykhailenko i in., 2020; Tarbeeva i in., 2015, 2014). Wstępne analizy chromatograficzne TLC dla ekstraktów z kłączy i korzeni sugerują, że to korzenie są ich bogatszym źródłem. Informacje te wymagają jednak potwierdzenia po wyeliminowaniu kluczowego problemu z rozdzielaniem składników ekstraktu z kłączy, jakim jest wysokie stężenie tanin. Związki te, we wszystkich prowadzonych analizach chromatograficznych, utrudniały migrację innych metabolitów w kolumnie lub na złożu cienkowarstwowym, uniemożliwiając detekcję związków znajdujących się w mieszaninie (8.4.2).

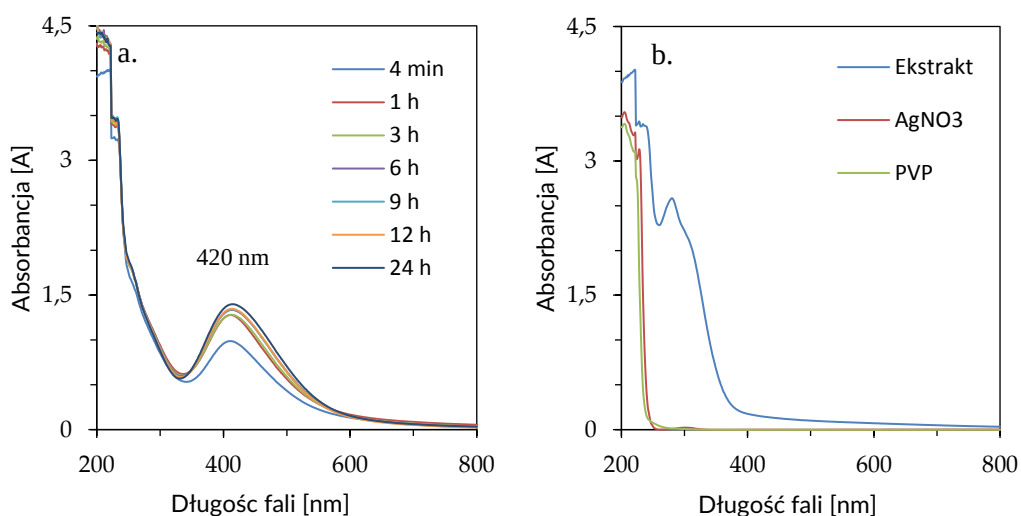


Fotografia 17. Kształt i rozmiar nanocząstek zarejestrowany za pomocą Transmisyjnego Mikroskopu Elektronowego po ekologicznej syntezie z wykorzystaniem ekstraktu wodnego z korzeni *I. pseudacorus*. Skala 50 nm.

8.8.2. Analiza UV-VIS nanocząstek srebra

Widmo UV-VIS zarejestrowano w czasie rzeczywistym tworzenia się nanocząstek srebra w reakcji z wykorzystaniem ekstraktu z korzeni irysa, po: 4 min, 1, 3, 6, 9, 12 i 24 godz. Widmo reakcji przedstawiono na **Wykresie 3**. Od momentu inicjacji syntezy obserwowano zmianę zabarwienia próbki. Zmieniała się ona z jasnych odcieni pomarańczy do intensywnej pomarańczowo-brunatnej. Rejestracja widma w czasie pozwoliła zaobserwować tworzenie się produktu o maksimum absorbancji przy 420 nm (**Wykres 3a**) oraz stopniową redukcję substratów (**Wykres 3b**). Widmo UV-VIS zarejestrowane dla nanocząstek srebra po 24-godzinach syntezy nie różniło się znacząco pod względem maksimum absorbancji od widma po 12 godzinach. Wynik ten sugeruje, że równowaga reakcji osiągnięta jest w ciągu 24 godzin od inicjacji syntezy. Szczyt absorbancji przy

długości fali 420 nm jest charakterystyczny dla nanocząstek srebra (Banasiuk i in., 2020).



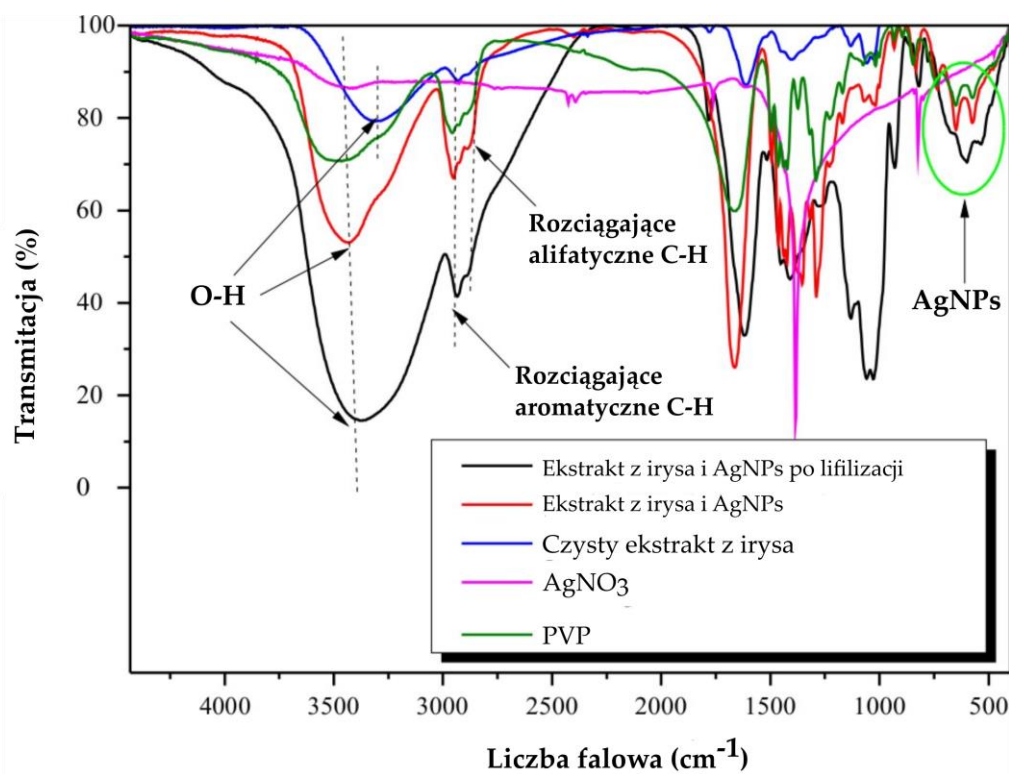
Wykres 3. Widmo UV-VIS: a. formujących się nanocząstek srebra oraz b. substratów wykorzystanych w reakcji ich syntezy. Maksimum absorbancji dla nanocząstek obserwowano przy długości 420 nm.

8.8.3. Analiza FT-IR i DLS

Widma FT-IR analizowanych nanocząstek srebra uzyskanych w reakcji z wodnym ekstraktem z korzeni irysa wraz z widmami czystych substratów (ekstraktu, AgNO₃, PVP), prezentuje **Wykres 4**. Widma FT-IR uzyskane dla zsyntetyzowanych nanocząstek jednoznacznie potwierdzają ich obecność w mieszaninie reakcyjnej i widoczne są jako specyficzne przesunięcie w stosunku do widm obserwowanych dla substratów użytych do syntezy. Co więcej, w niskich zakresach liczby falowej (550 i 640 cm⁻¹) obserwowany jest charakterystyczny sygnał dla nieopłaszczonych AgNPs.

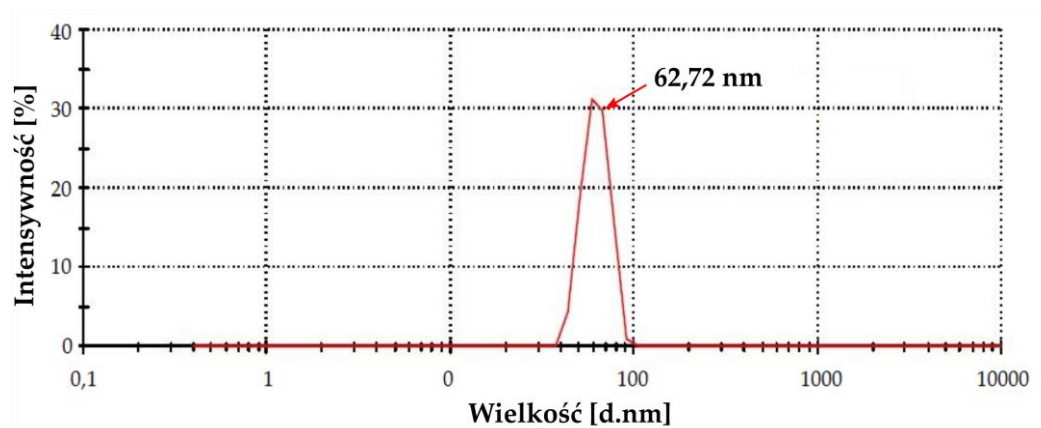
Analiza FT-IR wykazała również, że po utworzeniu się AgNPs, możliwe jest ich wiązanie się z nadmiarem ekstraktu (opłaszczanie nanocząstek) przez składniki ekstraktu, za pośrednictwem oddziaływania pomiędzy grupami -OH i C=O. Świadczyć może o tym przesunięcia widm dla -OH i C=O wynoszące kolejno 145 i 83 cm⁻¹, podczas gdy inne, głównie odpowiadające drganiom rozciągającym alifatycznym i aromatycznym grupom C-H, pozostały niezmienione.

Szczegółowa analiza FT-IR potwierdziła obecność nieopłaszczonych nanocząstek srebra i jednoznacznie wskazuje na sposób wiązania między nanocząstkami a nadmiarem ekstraktu. Podobne zachowanie składników ekstraktu i nanocząstek obserwowano m.in. w syntezie AgNPs z wykorzystaniem ekstraktów z roślin owadożernych (Banasiuk i in., 2020).



Wykres 4. Widma FT-IR IR (zależność transmitancji [%] od liczby falowej [cm^{-1}]) dwóch otrzymanych systemów ekstrakt-nanocząstki srebra (liofilizowanych i niepoddanych liofilizacji), uzyskanych metodą syntezy z użyciem mikrofal, dodatkowo widmo podczerwone po transformacji Fouriera dla ekstraktu z korzeni *I. pseudacorus*, AgNO_3 oraz PVP jako substraty.

Analiza Dynamicznego Rozproszenia Światła, pozwoliła zaobserwować, że dominującą frakcją w mieszaninie stanowią struktury o promieniu hydrodynamicznym równym 62,72 nm (**Wykres 5**).



Wykres 5. Analiza dynamicznego rozpraszania światła (DLS – ang. *Dynamic Light Scattering*) uzyskanych struktur srebra obrazująca rozkład wielkości hydrodynamicznej nanocząstek.

8.8.4. Aktywność przeciwbakteryjna nanocząstek srebra uzyskanych w syntezie z ekstraktem z korzeni *I. pseudacorus* (ekstrakt E)

W celu sprawdzenia aktywności przeciwbakteryjnej nanocząstek srebra uzyskanych w wyniku syntezy z wykorzystaniem ekstraktu wodnego z korzeni (ekstrakt E), przeprowadzono analizę z wykorzystaniem seryjnych mikrorozcieńczeń pożywki (7.8.6). Analizę prowadzono z wykorzystaniem dwóch gatunków bakterii *S. aureus* oraz *P. aeruginosa*, szczepów referencyjnych oraz izolatów klinicznych. Badania wykazały, że nanocząstki srebra uzyskane w reakcji ekologicznej syntezy z ekstraktem z korzeni *I. pseudacorus* wykazują właściwości przeciwbakteryjne w stosunku do wszystkich analizowanych szczepów. Wyższą aktywność wykazano w stosunku do bakterii Gram (-) *P. aeruginosa* niż Gram (+) *S. aureus* (Tabela 25).

W celu potwierdzenia czy sam ekstrakt, z którego zsyntetyzowano nanocząstki może mieć wpływ na obserwowaną aktywność przeciwbakteryjną, przeprowadzono analizę aktywności przeciwbakteryjnej wodnego ekstraktu E, poddanego wcześniej liofilizacji. Analiza wykazała, że ekstrakt jest aktywny przeciwbakteryjnie w stosunku do *S. aureus* i *P. aeruginosa*. W przeciwieństwie jednak do AgNPs, aktywność ekstraktu była wyższa w stosunku do szczepów *S. aureus* (Tabela 26) niż *P. aeruginosa*. Uzyskane wyniki wskazują, że w przypadku aktywności *P. aeruginosa* znaczący wpływ na aktywność miały same AgNPs, których stężenie potrzebne do eliminacji bakterii było 400-krotnie niższe, niż samego ekstraktu potrzebnego do eliminacji tych bakterii. W odniesieniu do *S. aureus* różnica ta była tylko 1,56-krotna.

Tabela 25. Aktywność przeciwbakteryjna nanocząstek srebra uzyskanych w syntezie z wykorzystaniem wodnego ekstraktu z korzeni *I. pseudacorus*

Gatunek	Szczep	MBC (µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Newman	200
	1521 (w)	200
	703/k (o)	200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAK	12,5
	3926 (w)	25
	2721 (o)	25/12,5

(w) – szczep wrażliwy; (o) – szczep oporny na przynajmniej dwie różne grupy komercyjnie stosowanych antybiotyków.

Kluczowe w tym eksperymencie może okazać się uzyskanie odpowiedzi na dwa pytania: jaka ilość ekstraktu pozostaje w mieszaninie poreakcyjnej oraz czy w przypadku aktywności uzyskanych nanocząstek nie obserwuje się działania synergistycznego pomiędzy ekstraktem a AgNPs.

Bazując na obserwacjach poczynionych w trakcie prowadzenia eksperymentu z komercyjnymi nanocząstkami srebra oraz ekstraktem metanolowym z kłączy *I. pseudacorus* (ekstrakt A), można przypuszczać, że obserwowana wysoka aktywność AgNPs w stosunku do *P. aeruginosa* może wynikać z oddziaływania synergistycznego pomiędzy powstałymi AgNPs a składnikami ekstraktu (7.4.6). Jak wskazują wyniki uzyskane w czasie analizy FT-IR oraz DLS (8.8.3), uzyskane nanocząstki są częściowo opłaszczane przez składniki ekstraktu, co może pozytywnie wpływać na ich wysoką aktywność przeciwbakteryjną

Tabela 26. Aktywność przeciwbakteryjna ekstraktu wodnego z korzeni *I. pseudacorus*

Gatunek	Szczep	MBC ($\mu\text{g}^*/\text{mL}$)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Newman	312,5
	1521 (w)	312,5
	703/k (o)	312,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAK	5 000
	3926 (w)	10 000
	2721 (o)	10 000

* μg liofilizowanego ekstraktu; (w) – szczep wrażliwy; (o) – szczep oporny na przynajmniej dwie różne grupy komercyjnie stosowanych antybiotyków.

Wnioski



9. Wnioski

Analiza wyników uzyskanych w trakcie realizacji pracy doktorskiej pozwoliła na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Kłącza roślin *Iris pseudacorus* są źródłem cennych związków biologicznie czynnych o aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwnowotworowej.
 - a. Ekstrakty metanolowe z kłączy *I. pseudacorus* hodowanych w glebie wykazują aktywność przeciwbakteryjną wobec szczepów referencyjnych i wybranych izolatów klinicznych bakterii z gatunku: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli*. Najwyższą skuteczność ekstraktów uzyskano względem *S. aureus*, gdzie minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) wynosiło 1,25 mg suchej masy tkanki (SM)/mL, a minimalne stężenie eliminujące biofilm MBEC = 3,125 mg SM/mL.
 - b. Ekstrakt metanolowy z kłączy w połączeniu z komercyjnie dostępnymi nanocząstkami srebra opłaszczonymi ligandem HS-(CH₂)₁₁N(CH₃)₃ działają synergistycznie w zwalczaniu bakterii *P. aeruginosa*.
 - c. Ekstrakt metanolowy z kłączy irysa hamuje proliferację komórek nowotworu szyjki macicy (HeLa), nowotworu okrężnicy (HCT-116) oraz nowotworu piersi (MCF-7). Najwyższą cytotoksyczność uzyskano wobec komórek linii MCF-7 (IC₅₀ = 11,75 ± 0,7 µg/mL), w porównaniu do 3,7-krotnej niższej wrażliwości uniesmiertelnionych komórek nabłonka gruczołu piersiowego (MCF-10A), gdzie IC₅₀ = 44 ± 1 µg/mL.
 - d. Ekstrakt metanolowy z kłączy zawiera ponad 80% tanin wśród wszystkich związków fenolowych, w tym tanin hydrolizujących, pochodnych katechiny. W kłączy obecne są taniny skondensowane, a wśród nich liczne izomery prodelfinidyny typu B.
 - e. Tanina – galokatechina zawarta w ekstrakcie metanolowym z *I. pseudacorus* wykazuje aktywność przeciwbakteryjną wobec *S. aureus* (MBC = 1,9 µg/mL) oraz *P. aeruginosa* (MBC = 6,1 µg/mL).
2. Kultury *in vitro* roślin i tkanek *I. pseudacorus* są źródłem związków biologicznie czynnych.
 - a. Stymulacja hipokotyli irysa dodatkiem 80 mg/L siarczanu adeniny, 0,2 mg/L tidiazuronu i 2 mg/L benzyloaminopuryny inicjuje powstawanie kultury pędowej.
 - b. Transformacja *I. pseudacorus* za pomocą *Rhizobium rhizogenes* pozwala na uzyskanie transformowanych pędów irysa – teratomów.
 - c. Kultury korzeni anatomicznych irysa do wzrostu nie wymagają dodatku egzogennych regulatorów wzrostu i są stymulowane światłem.

- d. Kultury korzeni anatomicznych irysa oraz pożywka po ich hodowli stanowi źródło związków biologicznie czynnych: genisteiny, daidzeiny, niezidentyfikowanych izoflawonów oraz przeciwbakteryjnej iristektorigeniny B.
 - e. Aktywność biologiczna ekstraktów uzyskanych z kultur *in vitro* irysa jest ściśle skorelowana z czasem hodowli i wiekiem kultury roślinnej.
3. Ekstrakty wodne z korzeni *I. pseudacorus* są czynnikiem redukującym i stabilizującym w ekologicznej syntezie nanocząstek srebra wykazujących aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do szczepów referencyjnych i izolatów klinicznych bakterii *P. aeruginosa* (MBC = 12,5 – 25 µg/mL) oraz *S. aureus* (MBC = 200 µg/mL).

Bibliografia



10. Bibliografia

- Abreu, A. C., McBain, A. J. i Simoes, M. (2012). Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Natural Product Reports*, 29, 1007–1021.
- Aharoni, A. i Galili, G. (2011). Metabolic engineering of the plant primary – secondary metabolism interface *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 239–244.
- Ahmad, I., Tanveer, H., Ashraf, I., Nafees, M., Rafay, M. i Iqbal, M. (2013). Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 13(4), 539–547.
- Ahmad, S., Hameed, A., Khan, K., Tauseef, I., Ali, M., Sultan, F. i Shahzad, M. (2020). Evaluation of synergistic effect of nanoparticles with antibiotics against enteric pathogens. *Applied Nanoscience*, 10(8), 3337–3340.
- Akashi, T., Ishizaki, M., Aoki, T. i Ayabe, S. I. (2005). Isoflavonoid production by adventitious-root cultures of *Iris germanica* (Iridaceae). *Plant Biotechnology*, 22(3), 207–215.
- Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, T. i Iwatsuki, K. (2001). Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 487–491.
- Altpeter, F., Springer, N. M., Bartley, L. E., Blechl, A. E., Brutnell, T. P., Citovsky, V., (...) Stewart, C. N. (2016). Advancing crop transformation in the era of genome editing. *The Plant Cell*, 28, 1510–1520.
- Amin, A., Gali-Muhtasib, H., Ocker, M. i Schneider-Stock, R. (2009). Overview of major classes of plant-derived anticancer drugs. *International Journal of Biomedical Science*, 5(1) 1–11.
- Arora, A., Byrem, T. M., Nair, M. G. i Strasburg, G. M. (2000). Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373(1), 102–109.
- Ascough, G. D., Erwin, J. E. i Van Staden, J. (2009). Micropropagation of *Iridaceae* – a review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 97(1), 1–19.
- Asquith, T. N. i Butler, L. G. (1986). Interactions of condensed tannins with selected protein. *Phytochemistry*, 25(7), 1591–1593.
- Bairu, M. W., Aremu, A. O. i Van Staden, J. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63, 147–173.
- Bais, H. P., Loyola-Vargas, V. M., Flores, H. E. i Vivanco, J. M. (2001). Root-Specific Metabolism: The biology and biochemistry of underground organs. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 37, 730–741.

Notatka prasowa Komisji Europejskiej pt. Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect. (Bruksela, 2005). Publikacja online: https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_05_1687 Dostęp: 8-08-2020.

Banasiuk, R., Krychowiak, M., Swigon, D., Tomaszewicz, W., Michalak, A., Chylewska, A., (...) Krolicka, A. (2020). Carnivorous plants used for green synthesis of silver nanoparticles with broad-spectrum antimicrobial activity. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 1415–1428.

Baque, M. A., Moh, S. H., Lee, E. J., Zhong, J. J. i Paek, K. Y. (2012). Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. *Biotechnology Advances*, 30, 1255–1267.

Barbolani, E., Clauser, M., Pantani, F. i Gellini, R. (1985). Residual heavy metal (Cu and Cd) removal by *Iris pseudacorus*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 28(3–4), 277–282.

Barbulova, A., Colucci, G. i Apone, F. (2015). New trends in cosmetics: By-products of plant origin and their potential use as cosmetic active ingredients. *Cosmetics*, 2, 82–92.

Bari, R. i Jones, J. D. G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69, 473–488.

Başer, K. H. C., Demirci, B., Orhan, I. E., Kartal, M., Sekeroglu, N. i Sener, B. (2011). Composition of volatiles from three *Iris* species of Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 23(4), 66–71.

Basgedik, B., Ugur, A. i Sarac, N. (2014). Antimicrobial, antioxidant, antimutagenic activities, and phenolic compounds of *Iris germanica*. *Industrial Crops and Products*, 61, 526–530.

Bate-Smith, E. C. i Harborne, J. B. (1963). Mangiferin and other glycophenolics in *Iris* species. *Nature*, 198(4887), 1307–1308.

Bekesiova, I., Nap, J. P. i Mlynarova, L. (1999). Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 17, 269–277.

Berenbaum, M. C. (1978). A method for testing for synergy with any number of agents. *The Journal of Infectious Diseases*, 137(2), 122–130.

Bernardini, S., Tiezzi, A., Masci, V. L. i Ovidi, E. (2018). Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. *Natural Product Research*, 32(16), 1926–1950.

Bhat, S. R. i Chandel, K. P. S. (1991). A novel technique to overcome browning in tissue culture. *Plant Cell Reports*, 10, 358–361.

Bonfils, J. P., Sauvaire, Y., Baissac, Y. i Marner, F. J. (1994). Iridal levels in *Iris* rhizomes-effects of wounding and dehydration. *Phytochemistry*, 37(3), 701–705.

- Booth, B. W., Inskeep, B. D., Shah, H., Park, J. P., Hay, E. J. i Burg, K. J. L. (2013). Tannic acid preferentially target estrogen receptor-positive breast cancer. *International Journal of Breast Cancer*, 2013 (Czasopismo online, ID 369609).
- Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J. i Simões, M. (2013). Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 19(4), 256–265.
- Bray, F., Ferlay, J., i Soerjomataram, I. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68, 394–424.
- Breton, L., Martin, R. i De Lacharriere, O. (2002). *Iridaceae* extract and compositions containing it. *United States Patent*.
- Brooks, B. D. i Brooks, A. E. (2014). Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 78, 14–27.
- Butcher, D. N. i Street, H. E. (1964). Excised root culture. *The Botanical Review*, 30(4), 513–586.
- Caldelas, C., Bort, J. i Febrero, A. (2012). Ultrastructure and subcellular distribution of Cr in *Iris pseudacorus* L. using TEM and X-ray microanalysis. *Cell Biology and Toxicology*, 28, 57–68.
- Cancer Research UK. Treatment for cancer. Publikacja online: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/treatment>. Dostęp: 27-04-2020.
- Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., (...) Hopkins, S. (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 19, 56–66.
- Chang, J., Liu, D., Cao, H., Chang, S. X., Wang, X., Huang, C. i Ge, Y. (2010). NO₃⁻/NH₄⁺ ratios affect the growth and N removal ability of *Acorus calamus* and *Iris pseudacorus* in a hydroponic system. *Aquatic Botany*, 93(4), 216–220.
- Cheesman, M., Ilanko, A., Blonk, B. i Cock, I. E. (2017). Developing new antimicrobial therapies: Are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? *Pharmacognosy Reviews*, 11, 57–72.
- Chen, X., Zhang, X., Geng, C., Li, T. i Chen, J. (2018). New C16-noriridals and formyl-monocycloiridals from the rhizomes of *Iris pseudoacorus*. *Fitoterapia*, 124(132), 160–166.
- Cheng, M., Lowe, B. A., Spencer, T. M., Ye, X. i Armstrong, C. L. (2004). Invited review: Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 40, 31–45.

- Chibane, L. B., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J. i Oulahal, N. (2018). Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 1457–1474.
- Choudhary, D. i Alam, A. (2017). Pharmacology and phytochemistry of isoflavonoids from *Iris* Species. *Journal of Pharmacology & Clinical Research*, 3(2), 555609.
- Christey, M. C. (2001). Use of Ri-Mediated Transformation for Production of Transgenic Plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37, 687–700.
- Chung, K. -T, Jr, S. E. S., Lin, W. -F i Wei, C. I. (1993). Growth inhibition of selected food-borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds. *Letters in Applied Microbiology*, 17(1), 29–32.
- Cleene, M. i Ley, J. (1981). The host range of infectious hairy root. *The Botanical Review*, 47(2), 147–194.
- Cowan, M., (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564–582.
- Crişan, I. i Cantor, M. (2016). New perspectives on medicinal properties and uses of *Iris* sp. *Hop and Medicinal Plants*, 24(1–2), 24–36.
- Cui, H. Y., Abdullahil Baque, M., Lee, E. J. i Paek, K. Y. (2013). Scale-up of adventitious root cultures of *Echinacea angustifolia* in a pilot-scale bioreactor for the production of biomass and caffeic acid derivatives. *Plant Biotechnology Reports*, 7(3), 297–308.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 174–181.
- Dai, S. X., Li, W. X., Han, F. F., Guo, Y. C., Zheng, J. J., Liu, J. Q., (...) Huang, J. F. (2016). *In silico* identification of anti-cancer compounds and plants from traditional Chinese medicine database. *Scientific Reports*, 6, 1–11.
- Davies, K. M. i Schwinn, K. E. (2003). Transcriptional regulation of secondary metabolism. *Functional Plant Biology*, 30(9), 913–925.
- Debnath, M., Malik, C. P. i Bisen, P. S. (2006). Micropropagation: A tool for the production of high quality plant-based medicines. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7, 33–49.
- Deno, H., Suga, C., Morimoto, T. i Fujita, Y. (1987). Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Reports*, 6, 197–199.
- Devillard, E., Tourel, C. i Chalmeton, G. (2014). Cosmetic or dermatological composition made of *Iris* extracts and use thereof. Franccja: WO 2014/102483 A2.
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach 3rd Edition* (3. wyd.).

- Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, *411*, 843–847.
- Dixon, R. A., Xie, D. Y. i Sharma, S. B. (2005). Proanthocyanidins - A final frontier in flavonoid research? *New Phytologist*, *165*, 9–28.
- Durán, N., Durán, M., de Jesus, M. B., Seabra, A. B., Fávaro, W. J. i Nakazato, G. (2016). Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *12*(3), 789–799.
- Eibl, R., Stutz, I., Hühn, T., Eibl, D., Schildberger, D. i Meier, P. (2018). Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(20), 8661–8675.
- European Pharmacopoeia, Wydanie 8.* (2014).
- Fang, R., Houghton, P. J. i Hylands, P. J. (2008). Cytotoxic effects of compounds from *Iris tectorum* on human cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, *118*, 257–263.
- Farag, S. F., Backheet, E. Y., El-Emary, N. A. i Niwa, M. (1999). Isoflavonoids and flavone glycosides from rhizomes of *Iris cartholiniae*. *Phytochemistry*, *50*, 1407–1410.
- Farag, S. F., Kimura, Y., Ito, H., Takayasu, J., Tokuda, H. i Hatano, T. (2009). New isoflavone glycosides from *Iris spuria* L. (Calizona) cultivated in Egypt. *Journal of Natural Medicines*, *63*(1), 91–95.
- Farmakopea Polska edycja XI.* (2017).
- Farombi, E. O. i Owoeye, O. (2011). Antioxidative and chemopreventive properties of *Vernonia amygdalina* and *Garcinia biflavonoid*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *8*, 2533–2555.
- Fitzmaurice, C., Allen, C., Barber, R., Barregard, L., Bhutta, Z., Brenner, H., (...) Hancock, J. (2017). Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability- adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015. A systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncology*, *3*(4), 524–548.
- Fonseca-Santos, B., Antonio Corrêa, M. i Chorilli, M. (2015). Sustainability, natural and organic cosmetics: consumer, products, efficacy, toxicological and regulatory considerations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *51*(1), 17–26.
- Fu, T.-J., Singh, G. i Curtis, W. R. (1999). *Plant Cell and Tissue Culture for the Production of Food Ingredients*. (T.-J. Fu, G. Singh, & W. R. Curtis, Red.). Boston, MA: Springer US.
- Ganai, A. A. i Farooqi, H. (2015). Bioactivity of genistein: A review of *in vitro* and *in vivo* studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *76*, 30–38.
- Gaskin, J. F., Pokorny, M. L. i Mangold, J. M. (2016). An unusual case of seed dispersal in an invasive aquatic; yellow flag iris (*Iris pseudacorus*). *Biological Invasions*, *18*(7), 2067–2075.

- Geiss, G., Gutierrez, L. i Bellini, C. (2009). Adventitious root formation : new insights and perspectives, W: Annual Plant Reviews Volume 37: Root Development, 127–156.
- Georgiev, V., Slavov, A., Vasileva, I. i Pavlov, A. (2018). Plant cell culture as emerging technology for production of active cosmetic ingredients. *Engineering in Life Sciences*, 18(11), 779–798.
- Giri, A. i Narasu, M. L. (2000). Transgenic hairy roots: Recent trends and applications. *Biotechnology Advances*, 18, 1–22.
- Gupta, A., Singh, P. P., Singh, P., Singh, K., Singh, A. V., Singh, S. K. i Kumar, A. (2019). Medicinal plants under climate change: Impacts on pharmaceutical properties of plants. W *Climate Change and Agricultural Ecosystems: Current Challenges and Adaptation* (ss. 181–209). Elsevier Inc.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 1–93.
- Haberlandt, G. (1943). Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Planta*, 33(4), 576–588.
- Hagerman, A. E. i Butler, L. G. (1981). The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 256(9), 4494–4497.
- Häkkinen, S. T., Moyano, E., Cusidó, R. M. i Oksman-Caldentey, K. -M. (2016). Exploring the metabolic stability of engineered hairy roots after 16 years maintenance. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–9.
- Halliday, K. J., Martínez-García, J. F. i Josse, E. M. (2009). Integration of light and auxin signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*.
- Hanawa, F., Tahara, S. i Mizutani, J. (1991). Flavonoids produced by *Iris pseudacorus* leaves treated with cupric chloride. *Phytochemistry*, 30(1), 157–163.
- Heinrich, E. M., Barnes, M., Gibbons, J. (2004). *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Edinbrugh.
- Hetherington, A. M., Hunter, M. I. S. i Crawford, R. M. M. (1983). Survival of *Iris* species under anoxic conditions. *Annals of Botany*, 51(1), 131–133.
- Hida, A., Shimizu, K., Nagata, R., Yabuya, T. i Adachi, T. (1999). Plant regeneration from protoplasts of *Iris hollandica* Hort. *Euphytica*, 105, 99–102.
- Horwitz, S. B. (1994). How to make taxol from scratch. *Nature*, 367, 593–594.
- Hsieh, C. Y., Santell, R. C., Haslam, S. Z. i Helferich, W. G. (1998). Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor- positive human breast cancer (MCF-7) cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Research*, 58(17), 3833–3838.
- Hummelova, J., Rondevaldova, J., Balastikova, A., Lapcik, O., i Kokoska, L. (2015). The relationship between structure and *in vitro* antibacterial activity of selected isoflavones and their metabolites with special focus on antistaphylococcal effect of demethyltaxasin. *Letters in Applied Microbiology*, 60, 242–247.

- Hunter, P. (2008). Harnessing Nature's wisdom. *EMBO Reports*, 9(9), 838–840.
- Hussain, M. S., Fareed, S., Ansari, S., Rahman, M. A., Ahmad, I. Z. i Saeed, M. (2012). Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 4, 10–20.
- Ibrahim, S. R. M., Mohamed, G. A. i Al-Musayeib, N. M. (2012). New constituents from the rhizomes of Egyptian *Iris germanica* L. *Molecules*, 17, 2587–2598.
- Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y. i Shimamura, T. (1993). Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *BBA - Biomembranes*, 1147, 132–136.
- Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance. (2019). No time to wait: securing the future from drug-resistant infections- Report to the Secretary-General of the United Nations. *World Health Organisation*.
- Iqbal, J., Abbasi, B. A., Mahmood, T., Kanwal, S., Ali, B., Shah, S. A. i Khalil, A. T. (2017). Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(12), 1129–1150.
- Jaca, T. i Mkhize, V. (2015). Distribution of *Iris pseudacorus* (Linnaeus, 1753) in South Africa. *BioInvasions Records*, 4(4), 249–253.
- Jaca, T. P. (2013). *Iris pseudacorus* L.: An ornamental aquatic with invasive potential in South Africa. *South African Journal of Botany*, 86, 174.
- Jacobs, J., Graves, M. i Mangold, J. (2010). Plant guide for paleyellow iris (*Iris pseudacorus*). *USDA-Natural Resources Conservation Service, Montana State Office*. Bozeman, Montana 59715.
- Jeknic, Z., Lee, S. P., Davis, J., Ernst, R. C. i Chen, T. H. H. (1999). Genetic transformation of *Iris germanica* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124(6), 575–580.
- Jesionek, A., Kokotkiewicz, A., Krolicka, A., Zabiegala, B. i Luczkiewicz, M. (2018). Elicitation strategies for the improvement of essential oil content in *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*) bioreactor-grown microshoots. *Industrial Crops and Products*, 123, 461–469.
- Jesionek, A., Kokotkiewicz, A., Wlodarska, P., Zabiegala, B., Bucinski, A. i Luczkiewicz, M. (2017). Bioreactor shoot cultures of *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*) for a large-scale production of bioactive volatile compounds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 131, 51–64.
- Jeveremovic, S., Jeknic, Z. i Subotic, A. (2013). Micropropagation of *Iris* sp. W M. Lambardi (Red.), *Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants, Methods in Molecular Biology* (T. 994, ss. 291–303). New York: Springer Science+Business Media.
- Jeziorek, M., Damianakos, H., Kawiak, A., Laudy, A. E., Zakrzewska, K., Syk, K., (...) Pietrosiuk, A. (2019). Bioactive rinderol and cynoglosol isolated from *Cynoglossum columnae* Ten. *in vitro* root culture. *Industrial Crops and Products*, 137, 446–452.

- Jones, G. A., McAllister, T. A., Muir, A. D. i Cheng, K. J. (1994). Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(4), 1374–1378.
- Ju, Y. H., Fultz, J., Allred, K. F., Doerge, D. R. i Helferich, W. G. (2006). Effects of dietary daidzein and its metabolite, equol, at physiological concentrations on the growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in ovariectomized athymic mice. *Carcinogenesis*, *27*(4), 856–863.
- Jun, H. jin, Hoang, M. H., Lee, J. W., Yaoyao, J., Lee, J. H., Lee, D. H., (...) Lee, S. J. (2012). Iristectorigenin B isolated from *Belamcanda chinensis* is a liver X receptor modulator that increases ABCA1 and ABCG1 expression in macrophage RAW 264.7 cells. *Biotechnology Letters*, *34*(12), 2213–2221.
- Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, *3*(13), 1222–1239.
- Kaššák, I. P. (2014). Screening of the chemical content of several *Limniris* group Irises. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *3*(2), 11–14.
- Kaššák, P. (2012). Secondary metabolites of the choosen genus *Iris* species. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, *60*(8), 269–280.
- Kaur, R., Kapoor, K. i Kaur, H. (2011). Himalayan plants as a source of anti-cancer agents: A review. *The Natural Products Journal*, *1*(1), 119–124.
- Kawiak, A., Domachowska, A., Krolicka, A., Smolarska, M. i Lojkowska, E. (2019). 3-Chloroplumbagin induces cell death in breast cancer cells through MAPK-mediated MCL-1 inhibition. *Frontiers in Pharmacology*, *10*, 1–12.
- Kim, J.-L., Li, H. M., Kim, Y.-H., Lee, Y.-J., Shim, J.-H., Lim, S. S. i Kang, Y.-H. (2012). Osteogenic activity of yellow flag fris (*Iris pseudacorus*) extract modulating differentiation of osteoblasts and osteoclasts. *The American Journal of Chinese Medicine*, *40*(6), 1289–1305.
- Kim, T. D., Ahn, C. H., Bae, K. H. i Choi, Y. E. (2009). The embryogenic competency and morphological changes during somatic embryogenesis in *Iris pseudacorus*. *Plant Biotechnology Reports*, *3*, 251–257.
- Kinghorn, A. D., Pan, L., Fletcher, J. N. i Chai, H. (2011). The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. *Journal of Natural Products*, *74*, 1539–1555.
- Kolodziej, H., Kayser, O., Latté, K. P. i Ferreira, D. (1999). Evaluation of the antimicrobial potency of tannins and related compounds using the microdilution broth method. *Planta Medica*, *65*(5), 444–446.
- Kovalev, V. N., Zatylnikova, O. A. i Kovalev, S. V. (2013). A new isoflavone from *Iris pseudacorus*. *Chemistry of Natural Compounds*, *49*(1), 34–35.
- Kratz, F., Müller, I. A., Ryppa, C. i Warnecke, A. (2008). Prodrug strategies in anticancer chemotherapy. *ChemMedChem*, *3*, 20–53.

- Krolicka, A., Staniszevska, I., Bielawski, K., Malinski, E., Szafranek, J. i Łojkowska, E. (2001). Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*. *Plant Science*, *160* (2), 259–264.
- Krolicka, A., Szpitter, A., Stawujak, K., Baranski, R., Gwizdek-Wisniewska, A., Skrzypczak, A., (...) Łojkowska, E. (2010). Teratomas of *Drosera capensis* var. *alba* as a source of naphthoquinone: Ramentaceone. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *103*(3), 285–292.
- Krychowiak, M., Grinholc, M., Banasiuk, R., Krauze-Baranowska, M., Głód, D., Kawiak, A. i Krolicka, A. (2014). Combination of silver nanoparticles and *Drosera binata* extract as a possible alternative for antibiotic treatment of burn wound infections caused by resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE*, *9*(12), 1–20.
- Krychowiak, M., Kawiak, A., Narajczyk, M., Borowik, A. i Krolicka, A. (2018). Silver nanoparticles combined with naphthoquinones as an effective synergistic strategy against *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Pharmacology*, *9*, 1–11.
- Kukula-Koch, W., Sieniawska, E., Widelski, J., Urjin, O., Glowniak, P. i Skalicka-Wozniak, K. (2015). Major secondary metabolites of *Iris* spp. *Phytochemistry Reviews*, *14*, 51–80.
- Kuo, P.-L., Hsu, Y.-L., Lin, T.-C., Lin, L.-T. i Lin, C.-C. (2004). Induction of apoptosis in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells by prodelpinidin B-2 3,3'-di- O -gallate from *Myrica rubra* via Fas-mediated pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *56* (11), 1399–1406.
- Larue, C., Korboulewsky, N., Wang, R. i Mévy, J.-P. (2010). Depollution potential of three macrophytes: Exudated, wall-bound and intracellular peroxidase activities plus intracellular phenol concentrations. *Bioresource Technology*, *101*(20), 7951–7957.
- Lattanzio, V., Cardinali, A. i Vito, L. (2012). Chapter 1 Plant phenolics: A biochemical and physiological perspective. W *Recent Advances in Polyphenol* (T. 1, ss. 1–39).
- Laublin, G., Saini, H. S. i Cappadocia, M. (1991). *In vitro* plant regeneration via somatic embryogenesis from root culture of some rhizomatous irises. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *27*, 15–21.
- Lee, S. H. i Jun, B. H. (2019). Silver nanoparticles: Synthesis and application for nanomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(4), 1–23.
- Li, J., Li, W. Z. M., Huang, W., Cheung, A. W. H., Bi, C. W. C., Duan, R., (...) Tsim, K. W. K. (2009). Quality evaluation of rhizoma *Belamcandae* (*Belamcanda chinensis* (L.) DC.) by using high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1216*(11), 2071–2078.
- Lichota, A. i Gwozdziński, K. (2018). Anticancer activity of natural compounds from plant and marine environment. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(11), 1–38.

- Lim, H., Park, B. K., Shin, S. Y., Kwon, Y. S. i Kim, H. P. (2017). Methyl caffeate and some plant constituents inhibit age-related inflammation: effects on senescence-associated secretory phenotype (SASP) formation. *Archives of Pharmacal Research*, 40(4), 524–535.
- Ljung, K., Hull, A. K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J. i Sandberg, G. (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in arabidopsis roots. *The Plant Cell*, 17(4), 1090–1104.
- Llor, C. i Bjerrum, L. (2014). Antimicrobial resistance: Risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 5(6), 229–241.
- Loo, Y. Y., Chieng, B. W., Nishibuchi, M. i Radu, S. (2012). Synthesis of silver nanoparticles by using tea leaf extract from *Camellia sinensis*. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 4263–4267.
- Loyola-Vargas, V. M. i Miranda-Ham, M. L. (1995). Root Culture as a source of secondary metabolites of economic importance. *Phytochemistry of Medicinal Plants* (217–248). Springer Science+Business Media.
- Lu, C. Y. (1993). The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 29(2), 92–96.
- Mabry, T. J., Markham, K. R. i Thomas, M. B. (1970). *The Systematic Identification of Flavonoids*. Berlin: Springer Verlag.
- Mackulák, T., Mosný, M., Škubák, J., Grabic, R. i Birošová, L. (2015). Fate of psychoactive compounds in wastewater treatment plant and the possibility of their degradation using aquatic plants. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(2), 969–973.
- Marimuthu, S., Krishnamurthy, K., Karunanandham, K. i Ponnusamy, M. (2014). Influence of acetosyringone concentration on induction of carrot hairy root by *Agrobacterium rhizogenes*. *African Journal of Microbiology Research*, 8(26), 2486–2491.
- Marín, M. L. i Marin, J. A. (1998). Excised rootstock roots cultured *in vitro*. *Plant Cell Reports*, 18(3–4), 350–355.
- Marner, F. -J, Littek, A., Arold, R., Seferiadis, K. i Jaenicke, L. (1990). Isolation and structure determination of new spiro-bicyclic triterpenoids from *Iris pseudacorus*. *Liebigs Annalen der Chemie*, 1990(6), 563–567.
- Marslin, G., Siram, K., Id, Q. M., Selvakesavan, R. K., Kruszka, D., Kachlicki, P. i Franklin, G. (2018). Secondary Metabolites in the Green Synthesis of silver nanoparticles *Materials*, 11(940), 1–25.
- Martin, P. M., Horwitz, K. B., Ryan, D. S. i William, L. (1978). Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology*, 103(5), 1860–1867.
- Maule, M. i Merletti, F. (2012). Cancer transition and priorities for cancer control. *The Lancet Oncology*. Elsevier Ltd.

MBEC™ Assay for high-throughput antimicrobial susceptibility testing of biofilms. Procedural manual.

Michael, W. (2010). Introduction: Biochemistry, Physiology and Ecological Functions of Secondary Metabolites. W *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism: Second Edition* (T. 40, 1–19).

Michalak, A. (2016). *Rośliny z rodzaju Iris jako potencjalne źródło związków biologicznie czynnych*. Praca magisterska, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Michalak, A., Krauze-Baranowska, M., Migas, P., Kawiak, A., Kokotkiewicz, A. i Królicka, A. (2021). *Iris pseudacorus* as an easily accessible source of antibacterial and cytotoxic compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 195, 1–11.

Miyazawa, M., Sakano, K., Nakamura, S. I., Shimamura, H. i Kosaka, H. (2001). Antimutagenic activity of isoflavone from *Belamcanda chinensis*. *Journal of Oleo Science*, 50(7), 545–554.

Mohamed, G. A., Ibrahim, S. R. M. i Ross, S. A. (2013). New ceramides and isoflavone from the Egyptian *Iris germanica* L. rhizomes. *Phytochemistry Letters*, 6(3), 340–344.

Moore, L., Warren, G. i Strobel, G. (1979). Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plasmid*, 2(4), 617–626.

Mopper, S., Wiens, K. C. i Goranova, G. A. (2016). Competition, salinity, and clonal growth in native and introduced irises. *American Journal of Botany*, 103(9), 1575–1581.

Mukne, A. P., Viswanathan, V. i Phadatare, A. G. (2011). Structure pre-requisites for isoflavones as effective antibacterial agents. *Pharmacognosy Reviews*, 5(9), 13-18

Muller-Harvey, I. (2001). Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 91, 3–20.

Murashige, T. i Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.

Murthy, H N., Dijkstra, C., Anthony, P., White, D. A., Davey, M. R., Power, J. B., (...) Paek, K. Y. (2008a). Establishment of *Withania somnifera* hairy root cultures for the production of withanolide A. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(8), 975–981.

Murthy, H N, Hahn, E. J. i Paek, K. Y. (2008b). Adventitious roots and secondary metabolism. *Chinese Journal of Biotechnology*, 24(5), 711-716.

Murthy, H.N., Lee, E. J. i Paek, K. Y. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: Strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 118, 1–16

- Mykchailenko, O. O. i Kovalyov, M. V. (2016). Phenolic compounds of the genus *Iris* plants (*Iridaceae*). *Ceska a Slovenska Farmacie Casopis Ceske Farmaceuticke Spolecnosti a Slovenske Farmaceuticke Spolecnosti*, 65(2), 70–77.
- Mykhailenko, O. A., Kovalyov, M. V. i Kovalyov, V. S. (2017). Chromatography-mass spectrometric study of bioactive substances of rhizomes with roots of *I. pseudacorus* F. Alba. *Pharmacy of Kazakhstan* 3, 38–41.
- Mykchailenko, O., Gud, Z., Kovalyov, V. i Bezruk, I. (2020). Effect of ecological factors on the accumulation of phenolic compounds in *Iris* species from Latvia, Lithuania and Ukraine. *Phytochemical Analysis*, 1–19.
- Nahin, R. L., Barnes, P. M., Stussman, B. J. i Bloom, B. (2009). *Costs of complementary and alternative medicine (CAM) and frequency of visits to CAM practitioners: United States, 2007. National Health Statistics Reports*. United States.
- Newman, D. J. i Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75(3), 311–335.
- Ni, F., Huang, X., Chen, Z., Qian, W. i Tong, X. (2018). Shikonin exerts antitumor activity in Burkitt's lymphoma by inhibiting C-MYC and PI3K/AKT/mTOR pathway and acts synergistically with doxorubicin. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10.
- Nielsen, J. M., Hansen, J. i Brandt, K. (1995). Synergism of thidiazuron and benzyladenine in axillary shoot formation depends on sequence of application in *Miscanthus X ogiformis* „Giganteus”. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 41(2), 165–170.
- Nilsson, O. i Olsson, O. (1997). Getting to the root: The role of the *Agrobacterium rhizogenes rol* genes in the formation of hairy roots. *Physiologia Plantarum*, 100(3), 463–473.
- Okafor, F., Janen, A., Kukhtareva, T. i Edwards, V. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles, their characterization, application and antibacterial activity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, 5221–5238.
- Ono, M., Ejima, K., Higuchi, T., Takeshima, M., Wakimoto, R. i Nakano, S. (2017). Equol enhances apoptosis-inducing activity of genistein by increasing Bax/Bcl-xL expression ratio in MCF-7 human breast cancer cells. *Nutrition and Cancer*, 69(8), 1300–1307.
- Orhan, I., Nasim, S., Şener, B., Ayanoglu, F., Özgüven, M., Iqbal Choudhary, M. i Attar-Rahman. (2003). Two isoflavones and bioactivity spectrum of the crude extracts of *Iris germanica* rhizomes. *Phytotherapy Research*, 17(5), 575–577.
- Osborn, A. i Lanzotti, V. (2009). *Plant-derived natural products. Synthesis, function, and application. Journal of Chemical Information and Modeling* (T. 53). New York: Springer Science+Business Media.
- Paek, K.-Y., Murthy, H. N. i Zhong, J.-J. (2014). *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology. Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology* (T. 9789401792).

- Panáček, A., Smékalová, M., Večeřová, R., Bogdanová, K., Röderová, M., Kolář, M., (...) Kvítek, L. (2016). Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 142, 392–399.
- Payne, J., Hamill, J. D., Robins, R. J. i Rhodes, M. J. C. (1987). Production of hyoscyamine by „hairy root” cultures of *Datura stramonium*. *Planta Medica*, 53(5), 474–478.
- Payyappallimana, U. Subramanian, S. M. (2015). *Traditional medicine in connecting global priorities: biodiversity and human health: a state of knowledge review*. In: C. Romanelli, et al. (Eds.) *World Health Organisation/Secretariat of the UN Convention on Biological Diversity: Geneva. 180–199*; Geneva.
- Peebles, C. A. M., Sander, G. W., Li, M., Shanks, J. V. i San, K. Y. (2009). Five year maintenance of the inducible expression of anthranilate synthase in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(5), 1521–1525.
- Pendleton, J. N., Gorman, S. P. i Gilmore, B. F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 11(3), 297–308.
- Phelep, M., Petit, A., Martin, L., Duhoux, E. i Tempé, J. (1991). Transformation and regeneration of a nitrogen-fixing tree, *Allocasuarina verticillata* Lam. *Biotechnology*, 9(5), 461–466.
- Phitaktim, S., Chomnawang, M., Sirichaiwetchakoon, K., Dunkhunthod, B., Hobbs, G. i Eumkeb, G. (2016). Synergism and the mechanism of action of the combination of α -mangostin isolated from *Garcinia mangostana* L. and oxacillin against an oxacillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus*. *BMC Microbiology*, 16(1), 1–14.
- Pistelli, L., Giovannini, A., Ruffoni, B., Bertoli, A. i Pistelli, L. (2010). Hairy root cultures for secondary metabolites production. *W Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors* (ss. 167–184).
- Pizzi, A. (2019). Tannins: perspectives and actual industrial applications. *Biomolecules*, 9(344).
- Plant Extracts Market by Type - Global Forecast to 2025. (2019). Raport.
- Porter, J. R. i Flores, H. (1991). Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10(4), 387–421.
- Prassas, I. i Diamandis, E. P. (2008). Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(11), 926–935.
- Prestinaci, F., Pezzotti, P. i Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*, 109(7), 309–318.
- Raja, P. B., Rahim, A. A., Qureshi, A. K. i Awang, K. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles using tannins. *Materials Science-Poland*, 32(3), 408–413.

- Raji, P., Samrot, A. V., Bhavya, K. S., Sharan, M., Priya, S. i Paulraj, P. (2019). Greener approach for leather tanning using less chrome with plant tannins and tannins mediated nanoparticles. *Journal of Cluster Science*, 30(6), 1533–1543.
- Rao, S. R. i Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2), 101–153.
- Ramawat, K. G. i Goyal, S. (2009). Natural Products in cancer chemoprevention. W K. . Ramawat (Red.), *Herbal drugs: Ethnomedicine to modern medicine* (s. 153). Heidelberg: Springer-Verlag Berlin.
- Ramtin, M., Massiha, A., Khoshkholgh-Pahlaviani, M. R. M., Issazadeh, K., Assmar, M. i Zarrabi, S. (2014). *In vitro* antimicrobial activity of *Iris pseudacorus* and *Urtica dioica*. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 16(3), 35–39.
- Rates, S. M. K. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39(5), 603–613.
- Rehab, A. H. (2017). Phytochemical and biological studies of *Iris pseudacorus* L. and *Trifolium alexandrinum* L. cultivated in Egypt. Lap Lambert Academic Publishing
- Rigano, D., Conforti, F., Formisano, C., Menichini, F. i Senatore, F. (2009). Comparative free radical scavenging potential and cytotoxicity of different extracts from *Iris pseudopumila* Tineo flowers and rhizomes. *Natural Product Research*, 23(1), 17–25.
- Rigano, D., Grassia, A., Formisano, C., Basile, A., Sorbo, S. i Senatore, F. (2006). Antibacterial and allelopathic activity of methanolic extract from *Iris pseudopumila* rhizomes, 77, 460–462.
- Rios, J. L. i Recio, M. C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 80–84.
- Ritchie, H. i Roser, M. (2020). Causes of death. 2018. Publikacja online: <https://ourworldindata.org/causes-of-death>. Dostęp: 12-04-2020.
- Rónavári, A., Kovács, D., Igaz, N., Vágvölgyi, C., Boros, I., Kónya, Z., (...) Kiricsi, M. (2017). Biological activity of green-synthesized silver nanoparticles depends on the applied natural extracts: a comprehensive study. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 871–883.
- Roser, M. i Ritchie, H. (2015). Cancer. Publikacja online: <https://ourworldindata.org/cancer>. Dostęp: 12-04-2020.
- Roser, M. i Ritchie, H. (2020). Burden of disease. Publikacja online: <https://ourworldindata.org/burden-of-disease>. Dostęp: 12-04-2020.
- Sakagami, Y., Iinuma, M., Piyasena, K. G. N. P. i Dharmaratne, H. R. W. (2005). Antibacterial activity of α -mangostin against vancomycin resistant *Enterococci* (VRE) and synergism with antibiotics, *Phytomedicine* 12(3), 203–208.

- Salminen, J. P. (2018). Two-dimensional tannin fingerprints by liquid chromatography tandem Mass Spectrometry offer a new dimension to plant tannin analyses and help to visualize the tannin diversity in plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(35).
- Sary, H. G., Ayoub, N. A., Singab, A. B. i Ahmed, A. H. (2004). Chemical constituents and molluscicidal activity of *Iris pseudacorus* cultivated in Egypt. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences (Assiut University)*, 27, 161–169.
- Sato, F. i Yamada, Y. (1984). High berberine-producing cultures of *Coptis japonica* cells. *Phytochemistry*, 23(2), 281–285.
- Savoia, D. (2012). Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiology*, 7(8), 979–990.
- Schofield, P., Mbugua, D. M. i Pell, A. N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*.
- Serrano, J., Puupponen-pimiä, R., Dauer, A. i Aura, A. (2009). Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, 310–329.
- Sevón, N. i Oksman-Caldentey, K. M. (2002). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: Root cultures as a source of alkaloids. *Planta Medica*, 68(10), 859–868.
- Shao, H., Jing, K., Mahmoud, E., Huang, H., Fang, X. i Yu, C. (2013). Apigenin sensitizes colon cancer cells to antitumor activity of ABT-263. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(12), 2640–2650.
- Shu, P., Hong, J. L., Wu, G., Yu, B. Y. i Qin, M. J. (2010). Analysis of Flavonoids and Phenolic Acids in *Iris tectorum* by HPLC-DAD-ESI-MSn. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 8(3), 202–207.
- Sidwa-Gorycka, M., Krolicka, A., Orlita, A., Malinski, E., Golebiowski, M., Kumirska, J., (...) Lojkowska, E. (2009). Genetic transformation of *Ruta graveolens* L. by *Agrobacterium rhizogenes*. Hairy root cultures a promising approach for production of coumarins and furanocoumarins. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 97(1), 59–69.
- Sieniawska, E. i Baj, T. (2017). *Chapter 10. Tannins. Pharmacognosy*. Elsevier Inc.
- Singer, A. C., Shaw, H., Rhodes, V. i Hart, A. (2016). Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–22.
- Singh, C. B., Devi, M. C., Thokchom, D. S., Sengupta, M. i Singh, A. K. (2015). Phytochemical screening, estimation of total phenols, total flavonoids and determination of antioxidant activity in the methanol extract of *Dendrobium denudans* D. Don stems. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4(4), 6–11.

- Siriwong, S., Teethaisong, Y., Thumanu, K., Dunkhunthod, B. i Eumkeb, G. (2016). The synergy and mode of action of quercetin plus amoxicillin against amoxicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *BMC Pharmacology and Toxicology*, *17*(1), 1–14.
- Skrzypczak-Pietraszek, E., Urbańska, A., Żmudzki, P. i Pietraszek, J. (2019). Elicitation with methyl jasmonate combined with cultivation in the Plantform™ temporary immersion bioreactor highly increases the accumulation of selected centellosides and phenolics in *Centella asiatica* (L.) Urban shoot culture. *Engineering in Life Sciences*, *19*(12), 931–943.
- Sneader, W. (2005). *Drug Discovery. A history.* (W. Sneader, Red.).
- Solowey, E., Lichtenstein, M., Sallon, S., Paavilainen, H., Solowey, E. i Lorberboum-Galski, H. (2014). Evaluating medicinal plants for anticancer activity. *Scientific World Journal*, 2014 (ID 721402).
- Sood, P., Bhattacharya, A. i Sood, A. (2011). Problems and possibilities of monocot transformation. *Biologia Plantarum*, *55*(1), 1–15.
- Sporn, M. B. i Liby, K. T. (2005). Cancer chemoprevention: Scientific promise, clinical uncertainty. *Nature Clinical Practice Oncology*, *2*(10), 518–525.
- Srinivasan, D., Nathan, S., Suresh, T. i Lakshmana P., P. (2001). Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, *74*(3), 217–220.
- Stanišić, M., Raspor, M., Ninković, S., Milošević, S., Čalić, D., Bohanec, B., (...) Jevremović, S. (2015). Clonal fidelity of *Iris sibirica* plants regenerated by somatic embryogenesis and organogenesis in leaf-base culture - RAPD and flow cytometer analyses. *South African Journal of Botany*, *96*, 42–52.
- Staniszewska, I., Krolicka, A., Malinski, E., Lojkowska, E. i Szafranek, J. (2003). Elicitation of secondary metabolites in *in vitro* cultures of *Ammi majus* L. *Enzyme and Microbial Technology*, *33*(5), 565–568.
- Stiles, A. R. i Liu, C. Z. (2013). Hairy Root Culture: Bioreactor design and process intensification. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, *134*(April), 91–114.
- Sugimoto, Y. i Ueyama, T. (2008). Production of (+)-5-deoxystrigol by *Lotus japonicus* root culture. *Phytochemistry*, *69*(1), 212–217.
- Sutherland, W. J. (1990). Biological flora of the British Isles. *The Journal of Animal Ecology*, *11*(2), 288.
- Szopa, A., Kokotkiewicz, A., Luczkiewicz, M. i Ekiert, H. (2017). *Schisandra lignans* production regulated by different bioreactor type. *Journal of Biotechnology*, *247*, 11–17.
- Tabata, H. (2004). Paclitaxel production by plant-cell-culture technology. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, *87*, 1–23.

- Tanaka, N., Fujikawa, Y., Aly, M. A. M., Saneoka, H., Fujita, K. i Yamashita, I. (2001). Proliferation and rol gene expression in hairy root lines of Egyptian clover. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66(3), 175–182.
- Tarbeeva, D. V., Fedoreev, S. A., Veselova, M. V., Kalinovskii, A. I. i Gorovoi, P. G. (2014). Polyphenolic metabolites from *Iris pseudacorus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 50(2), 363–365.
- Tarbeeva, D. V., Fedoreev, S. A., Veselova, M. V., Kalinovskii, A. I., Gorovoi, P. G., Vishchuk, O. S., (...) Zadorozhnyi, P. A. (2015). Polyphenolic metabolites from *Iris pseudacorus* roots. *Chemistry of Natural Compounds*, 51(3), 451–455.
- Tarbeeva, Darya V, Fedoreyev, S. A., Veselova, M. V, Kalinovskiy, A. I., Seletskaya, L. D., Mazurok, T. I. i Bulgakov, V. P. (2013a). Polyphenolic compounds from callus cultures of *Iris pseudacorus*. *Natural Product Communications*, 8(10), 1419–20.
- Telang, M., Dhulap, S., Mandhare, A. i Hirwani, R. (2013). Therapeutic and cosmetic applications of mangiferin: A patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*.
- Tepfer, D. (1984). Transformation of Several Species of Higher Plants by *Agrobacterium rhizogenes*. Sexual Transmission of the Transformed Genotype and Phenotype. *Cell*, 37, 959–967.
- Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P. K. i Puri, S. (2019). Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 12, 1–12.
- Thornsberry, C. (1991). State of knowledge antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: review, comments and opinions. *Annals of Otolaryngology & Laryngology*, 154, 7–10.
- Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37(2), 169–180.
- Tognetti, V. B., Mühlenbock, P. i van Breusegem, F. (2012). Stress homeostasis - the redox and auxin perspective. *Plant, Cell and Environment*, 35(2), 321–333.
- Tsuchiya, H. (2015). Membrane interactions of phytochemicals as their molecular mechanism applicable to the discovery of drug leads from plants. *Molecules*, 20(10), 18923–18966.
- Tzfira, T., Li, J., Lacroix, B. i Citovsky, V. (2004). *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends in Genetics*, 20(8), 375–383.
- United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service. (2013). Weed risk assessment for *Iris pseudacorus* L. (*Iridaceae*): Yellow flag iris. Raport. Publikacja online: aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/weeds/downloads/wra/Iris_pseudacorus_WRA.pdf Dostęp: 23-03-2020.

- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., (...) Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(18), 5649–5654.
- Veena, V. i Taylor, C. G. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 43(5), 383–403.
- Verma, V., Ravindran, P. i Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology*, 16(1), 1–10.
- Verpoorte, R. i Alfermann, A. W. (2000). *Secondary Metabolism. Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*.
- Verpoorte, R., Contin, A. i Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 1(1), 13–25.
- Vilaine, F. i Casse-Delbart, F. (1987). Independent induction of transformed roots by the TL and TR regions of the Ri plasmid of agropine type *Agrobacterium rhizogenes*. *MGG Molecular & General Genetics*, 206(1), 17–23.
- Vitale, D. C., Piazza, C., Melilli, B., Drago, F. i Salomone, S. (2013). Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 38(1), 15–25.
- Wang, H., Cui, Y. i Zhao, C. (2010). Flavonoids of the genus *Iris* (*Iridaceae*). *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 10(7), 643–661.
- Wang, Y., Jeknić, Z., Ernst, R. C. i Chen, T. H. H. (1999). Efficient plant regeneration from suspension-cultured cells of tall bearded iris. *HortScience*, 34(4), 730–735.
- Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P. i Mcphail, A. T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93(9), 2325–2327.
- Wasilewska, A. i Królicka, A. (2005). Otrzymywanie i charakterystyka kultur korzeni włośnikowatych. *Biotechnologia*, 4(71), 173–188.
- Węgrzyn, G., Pierzynowska, K., Podlacha, M., Myślińska, D., Majkutewicz, I. i Gaffke, L. (2018). Genisteina do zastosowania do leczenia choroby Alzheimerera. Polska.
- Welander, M., Persson, J., Asp, H. i Zhu, L. H. (2014). Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. *Scientia Horticulturae*, 179, 227–232.
- White, P. R. (1934). Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiology*, 585–600.
- WHO. (2002). *WHO traditional medicine strategy 2002–2005*. Geneva.

- WHO (2020). The top 10 causes of death. Publikacja online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Dostęp 24-05-2020.
- Willis, K. J. (2017). *State of the World's Plants 2017. Report. Royal Botanical Gardens, Kew.* (K. Willis, Red.).
- Wink, M. (2010). *Introduction. Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites: Second Edition Annual Plant Reviews* (39). Blackwell Publishing Ltd
- Wolcott, R. D. i Ehrlich, G. D. (2008). Biofilms and chronic infections. *Journal of the American Medical Association*. 299 (22)2682–2684.
- Wollenweber, E., Stevens, J. F., Klimo, K., Knauft, J., Frank, N. i Gerhäuser, C. (2003). Cancer chemopreventive *in vitro* activities of isoflavones isolated from *Iris germanica*. *Planta Medica*, 69(1), 15–20.
- World Health Organisation. (2013). Traditional medicine fact sheet No. 134.
- Wuttke, W., Jarry, H., Popp, M., Christoffel, V. i Spengler, B. (2002). Use of extracts and preparation from iris plants and tectorigenin as medicaments. Patent nr PCT/EP2002/005370 Data publikacji: 15-05-2002.
- Yang, L., Wen, K. S., Ruan, X., Zhao, Y. X., Wei, F. i Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*. 23 (4), 762
- Yonemitsu, H., Shimomura, K., Satake, M., Mochida, S., Tanaka, M., Endo, T. i Kaji, A. (1990). Lobeline production by hairy root culture of *Lobelia inflata* L. *Plant Cell Reports*, 9(6), 307–310.
- Yousefi, Z., i Mohseni-Bandpei, A. (2010). Nitrogen and phosphorus removal from wastewater by subsurface wetlands planted with *Iris pseudacorus*. *Ecological Engineering*, 36(6), 777–782.
- Zang, X., Shang, M., Xu, F., Liang, J., Wang, X., Mikage, M. i Cai, S. (2013). A-type proanthocyanidins from the stems of *Ephedra sinica* (*Ephedraceae*) and their antimicrobial activities. *Molecules*, 18(5), 5172–5189.
- Zhu, Y., Yao, Y., Shi, Z., Everaert, N. i Ren, G. (2018). Synergistic Effect of Bioactive Anticarcinogens from Soybean on Anti-Proliferative Activity in MDA-MB-231 and MCF-7 Human Breast Cancer Cells *In Vitro*. *Molecules*, 23(7), 1–16.

Supplement



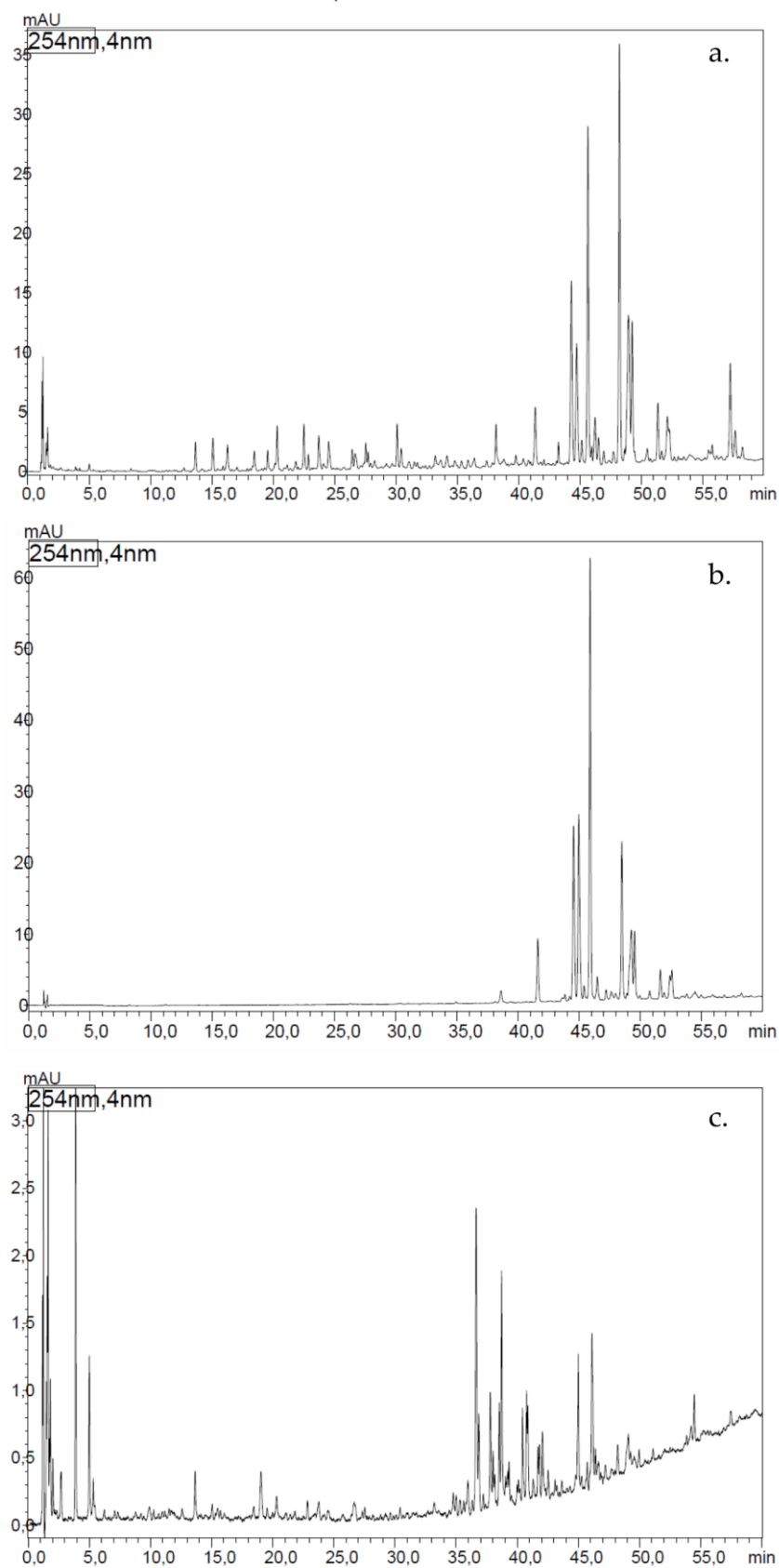
11. Supplement

Suplement 1. Profile antybiotykooporności izolatów klinicznych wykorzystanych w doktoracie

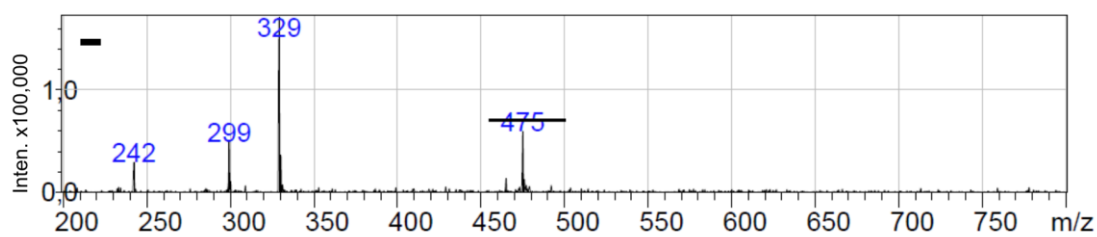
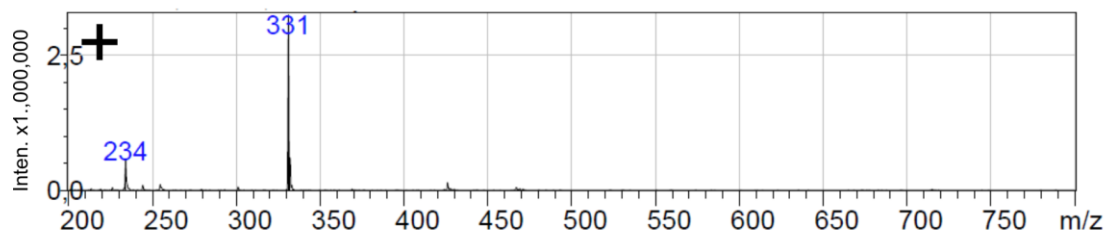
Nr szczepu i pochodzenie	<i>Escherichia coli</i> Gram (-)												
	AMP	AMC	KZ	CXM	CTX	CAZ	PIP	TZP	AK	GN	SXT	CIP	IPM
1285 (mocz)	19 w	20 w	18 w	18 w	28 w	26 w	23 w	23 w	20 w	19 w	25 w	27 w	28 w
4162 (płyn m-r) ESBL(+)	6 o	20 w	15 sw	17 sw	22 sw	17 sw	14 o	25 w	6 o	6 o	6 o	28 w	27 w
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Gram (-)												
	NN	CFP	CTX	CAZ	PIP	TZP	AK	GN	IPM	CIP			
3926 (krew)	23 w	22 w	20 sw	26 w	25 w	26 w	25 w	19 w	28 w	33 w			
2721 (krew)	14 sw	6 o	6 o	12 o	6 o	6 o	8 o	10 o	28 w	6 o			
	<i>Staphylococcus aureus</i> Gram (+)												
	CIP	OX	GN	Va	SXT	E	L	P	TEC	AMC			
1521 (krew)	25 w	19 w	20 w	16 w	29 w	26 w	26 w	13 w	15 w	21 w			
703/k (rana)	21 w	6 o	20 w	17 w	27 w	6 o	6 o	6 o	16 w	6 o			
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Gram (-)												
	AMP	AMC	KZ	CXM	CTX	CAZ	PIP	TZP	AK	GN	SXT	CIP	IPM
1077 (rana)	-	24 w	24 w	23 w	31 w	27 w	25 w	25 w	20 w	18 w	29 w	29 w	26 w
3896 (krew), ESBL(+)	6 o	12 o	6 o	6 o	6 o	14 o	6 o	17 o	6 o	6 o	6 o	20 sw	24 w
	<i>Enterococcus faecalis</i> Gram (+)												
	AMP	IPM	CIP	GN ₁₂₀	Va	TEC							
2609 (rana)	24 w	25 w	24 w	20 w	18 w	17 w							
34 CRD (rana)	22 w	21 w	6 o	6 o	18 w	16 w							

w – wrażliwy, sw – średniowrażliwy, o – oporny; m-r – płyn mózgowo-rdzeniowy, ESBL(+) – szczepy wytwarzające β-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym AK – Amikacyna, AMC – Amoxicylina z kwasem klawulanowym, AMP – Ampicylina, CAZ – Ceftazydym, CFP – Cefoperazon, CIP – Ciprofloksacin, CTX – Cefotaksim, CXM – Cefuroksym sodowy, E – Erytromycyna, GN – Gentamycyna, IPM – Imipenem, KZ – Cefazolina, L – Linkomycyna, NN – Tobramycyna, OX – Oksacylina, P – Penicylina, PIP – Piperacylina, SXT – Sulfamethoksazol/Trimethoprim, TEC – Teikoplanina, TZP – Piperacylina/Tazobaktam, Va – Wankomycyna,

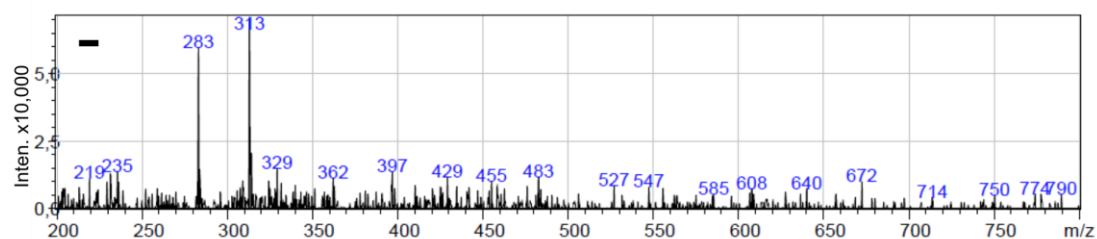
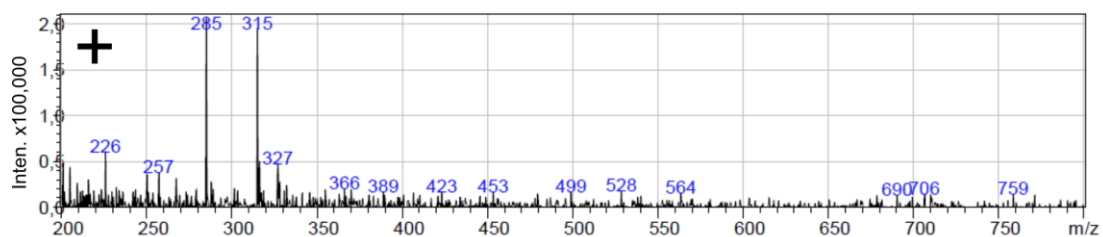
Suplement 2. Chromatogramy ekstraktów uzyskanych z **a.** korzeni słabo rosnących; **b.** pożywki po korzeniach słabo rosnących; **c.** korzeni dobrze rosnących. Związek **(1)** 45,64 min, związek **(3)** 48,22 min, genisteina 44,2 min, daidzeina 36,4 min.



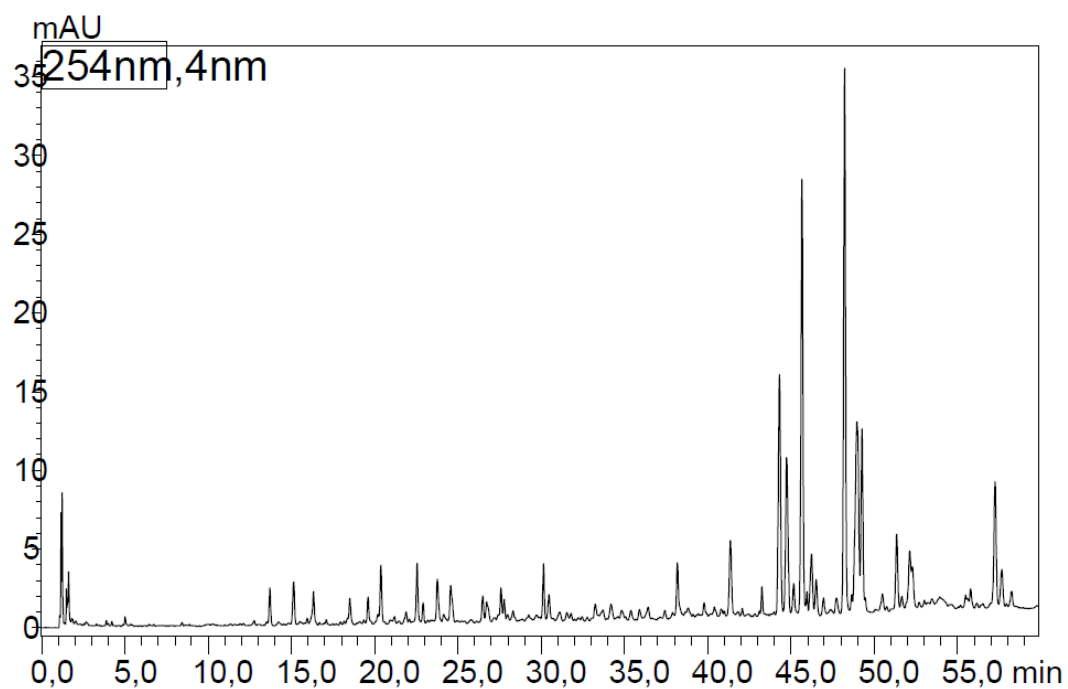
Suplement 3. Widma masowe związku (1) w trybie jonów dodatnich oraz ujemnych. (Przekreślone 475 to artefakt.)



Suplement 4. Widma masowe związku (3) w trybie jonów dodatnich oraz ujemnych.



Suplement 5. Chromatogram ekstraktu C z pożywki po korzeniach anatomicznych *I. pseudacorus*. Związek (1) 45,64 min, związek (3) 48,22 min, genisteina 44,2 min, daidzeina 36,4 min.



Wykaz tabel, fotografii, rysunków i wykresów



12. Wykaz tabel

Tabela 1. Skład podstawowej pożywki Murashige i Skoog (mg/L).....	41
Tabela 2. Składniki dodatkowe oraz regulatory wzrostu zastosowane w pożywkach do hodowli roślin <i>I. pseudacorus</i> w kulturach <i>in vitro</i>	41
Tabela 3. Elicytory zastosowane w celu stymulacji roślin <i>I. pseudacorus</i> do zwiększenia biosyntezy i akumulacji związków fenolowych w tkankach hodowanych w warunkach <i>in vitro</i>	46
Tabela 4. Charakterystyka oraz pochodzenie szczepów agropinowych bakterii <i>Rhizobium rhizogenes</i> zastosowanych do transformacji roślin <i>I. pseudacorus</i>	49
Tabela 5. Skład pożywki YEB (ang. <i>Yeast Extract Beef</i>).....	49
Tabela 6. Skład roztworu I do izolacji DNA plazmidowego.....	50
Tabela 7. Skład roztworu II (lizującego) do izolacji DNA plazmidowego.....	51
Tabela 8. Skład roztworu III (renaturującego) do izolacji DNA plazmidowego.....	51
Tabela 9. Skład buforu I oraz II do izolacji DNA genomowego z roślin.....	52
Tabela 10. Składniki mieszaniny reakcyjnej wykorzystane do przeprowadzenia reakcji PCR w celu potwierdzenia eliminacji bakterii z kokultury i potwierdzenia integracji T-DNA z plazmidu bakterii do genomu rośliny.....	53
Tabela 11. Sekwencje starterów wykorzystanych do weryfikacji integracji fragmentu T-DNA z plazmidu do genomu rośliny oraz eliminacji <i>R. rhizogenes</i> z kokultury.....	54
Tabela 12. Warunki reakcji PCR zastosowane w celu weryfikacji integracji T-DNA z genomem rośliny oraz wykluczenia obecności bakterii <i>R. rhizogenes</i> w tkankach roślin poddanych transformacji.....	54
Tabela 13. Skład buforu TBE 10x stężonego.....	55
Tabela 14. Ekstrakty z tkanek liofilizowanych z kultur <i>in vitro</i> roślin <i>I. pseudacorus</i> poddanych elicytacji, roślin kontrolnych i roślin transformowanych dla których wykonano analizę aktywności przeciwbakteryjnej metodą seryjnych mikrorozcieńczeń pożywki.....	56
Tabela 15. Ekstrakty uzyskane z tkanek lub kultur <i>in vitro</i> roślin <i>I. pseudacorus</i> poddane analizie aktywności przeciwbakteryjnej.....	57
Tabela 16. Szczepy bakterii wykorzystane w eksperymentach aktywności przeciwdrobnoustrojowej ekstraktów.....	59
Tabela 17. Skład pożywki mikrobiologicznej – bulion mózgowo-sercowy (BHI).....	60
Tabela 18. Układy faz ruchomych wykorzystanych w chromatografii cienkowarstwowej TLC.....	67
Tabela 19. Związki aktywne zidentyfikowane w ekstrakcie z pożywki po hodowli korzeni anatomicznych <i>I. pseudacorus</i>	90

Tabela 20. Metabolity wtórne zidentyfikowane w ekstrakcie z korzeni słabo rosnących	93
Tabela 21. Minimalne Stężenie Bakteriobójcze ekstraktów metanolowych z liofilizowanych kłączy <i>I. pseudacorus</i> przeciw ludzkim patogenom bakteryjnym: szczepom referencyjnym i izolatom klinicznym.	96
Tabela 22. Minimalne Stężenie Bakteriobójcze ekstraktów wodnych ze świeżych kłączy <i>I. pseudacorus</i> przeciw wybranym ludzkim patogenom bakteryjnym.	96
Tabela 23. Dane uzyskane w wyniku analizy HPLC-DAD-ESI-MS dla związków wzorcowych oraz związków zidentyfikowanych w ekstrakcie z kłączy <i>I. pseudacorus</i> ..	106
Tabela 24. Aktywność cytotoksyczna ekstraktów metanolowych z kłączy <i>I. pseudacorus</i>	107
Tabela 25. Aktywność przeciwbakteryjna nanocząstek srebra uzyskanych w syntezie z wykorzystaniem wodnego ekstraktu z korzeni <i>I. pseudacorus</i>	119
Tabela 26. Aktywność przeciwbakteryjna ekstraktu wodnego z korzeni <i>I. pseudacorus</i> ...	120

13. Wykaz fotografii

Fotografia 1. Charakterystyka roślin <i>Iris pseudacorus</i>	32
Fotografia 2. Inicjacja kultury pędów <i>I. pseudacorus</i> z hipokotyli siewek skielkowanych w warunkach <i>in vitro</i>	79
Fotografia 3. Zmiany morfologiczne w obrębie łodyg wykształconych z hipokotyli stymulowanych regulatorami wzrostu.	80
Fotografia 4. Inicjacja kultury pędów <i>I. pseudacorus</i> z merystemów wierzchołkowych uzyskanych z młodych klonów roślin <i>I. pseudacorus</i> hodowanych w warunkach <i>in vitro</i>	81
Fotografia 5. Kultura pędów zainicjowana spontanicznie z młodego klonu <i>I. pseudacorus</i> oddzielonego od rośliny macierzystej.	82
Fotografia 6. Wpływ sacharozy na intensywność wzrostu korzeni anatomicznych <i>I. pseudacorus</i> po 3 miesiącach hodowli w płynnej pożywce.	83
Fotografia 7. Kultura korzeni anatomicznych prowadzona w dwóch wariantach oświetlenia.	85
Fotografia 8. Wzrost korzeni przybyszowych i bocznych w pożywce MS bez dodatku egzogennych regulatorów wzrostu, po uszkodzeniu merystemu wierzchołkowego i zatrzymaniu wzrostu łodygi.	86
Fotografia 9. Korzenie <i>I. pseudacorus</i> po 18 tygodniach hodowli.	86
Fotografia 10. Dwukierunkowa analiza chromatograficzna TLC ekstraktu C z pożywki po hodowli korzeni anatomicznych.	88

Fotografia 11. Chromatogramy uzyskane w wyniku rozdzielania ekstraktu C za pomocą dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej na złożu krzemionkowym (HPTLC Si ₆₀ F ₂₅₄).....	89
Fotografia 12. Analiza porównawcza składu metabolicznego ekstraktów z korzeni słabo i dobrze rosnących w kulturach <i>in vitro</i> oraz z pożywek po ich hodowli.	92
Fotografia 13. Chromatogramy HPTLC SiO ₂ F254s rozwinięte w układzie faz ruchomych (II): n-butanol-kwas octowy-woda (30:15:15, v/v/v)..	102
Fotografia 14. Chromatogramy uzyskane w wyniku dwukierunkowej chromatografii TLC dla frakcji eter dietylowy, octan etylu oraz wodnej pozostałości, uzyskanych w wyniku frakcjonowania ekstraktu A.	104
Fotografia 15. Chromatogram uzyskany w wyniku rozdzielania związków na płytce HPTLC Si ₆₀ w układzie mobilnym (II) n-butanol-kwas octowy-woda (30:15:15, v/v/v).....	105
Fotografia 16. „Zielona synteza” nanocząstek srebra z wykorzystaniem wodnych ekstraktów z tkanek <i>I. pseudacorus</i>	115
Fotografia 17. Kształt i rozmiar nanocząstek zarejestrowany za pomocą Transmisyjnego Mikroskopu Elektronowego (TEM) po syntezie z wykorzystaniem ekstraktu z liści, korzeni i kłączy.	116

14. Wykaz rysunków

Rysunek 1. Schemat cyklu zastosowanego w systemie <i>Plantform</i>	43
Rysunek 2. Schemat personalizowanego bioreaktora okresowo-zalewowego.	44
Rysunek 3. Rodzaje eksplantatów wykorzystane do inicjacji kultury pędów <i>I. pseudacorus</i>	47
Rysunek 4. Schemat postępowania z <i>I. pseudacorus</i> w procesie inokulacji bakteriami <i>Rhizobium rhizogenes</i> w celu uzyskania roślin transformowanych	50
Rysunek 5. Analiza PCR dla DNA wyizolowanego z: rośliny <i>I. pseudacorus</i> transformowanej za pomocą <i>R. rhizogenes</i> (szczep A4).....	74

15. Wykaz wykresów

- Wykres 1.** Izobologramy obrazujące oddziaływania przeciwbakteryjne między dwoma czynnikami bakteriobójczymi: ekstraktem z kłączy *I. pseudacorus* oraz nanocząstkami srebra, w stosunku do dwóch szczepów bakterii *P. aeruginosa*.....98
- Wzkres 2.** Całkowita zawartość związków fenolowych w ekstraktach z kłączy uzyskanych z roślin *I. pseudacorus* hodowanych w bioreaktorze *Plantform*.112
- Wzkres 3.** Widmo UV-VIS formujących się nanocząstek srebra oraz substratów otrzymanych w wyniku zielonej syntezy z ekstraktem z korzeni *I. pseudacorus*.....117
- Wykres 4.** Widma FT-IR nanocząstek srebra otrzymanych w wyniku zielonej syntezy z ekstraktem z korzeni *I. pseudacorus*118
- Wykres 5.** Analiza DLS nanocząstek srebra otrzymanych w wyniku zielonej syntezy z ekstraktem z korzeni *I. pseudacorus*118

Upowrzednianie wyników oraz dorobek naukowy



16. Upowszechnianie wyników oraz dorobek naukowy

Patenty

Banasiuk R., [Michalak A.](#), Krychowiak M., Królicka A.

Sposób oczyszczania z chlorofili ekstraktów roślinnych zawierających metabolity wtórne.

Patent nr 226117, data ogłoszenia: 30.06.2017

Publikacje naukowe

Banasiuk, R., Krychowiak, M., Swigon, D., Tomaszewicz, W., [Michalak, A.](#), Chylewska, A., (...) Krolicka, A. (2020).

Carnivorous plants used for green synthesis of silver nanoparticles with broad-spectrum antimicrobial activity. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 1415–1428.

[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.

Wystąpienia konferencyjne:

[Michalak A.](#), Świgoń D., Królicka A.

Poster: *In vitro micropropagation of Iris pseudacorus*

Biotech Solution for Health and Environment MOBI4HEALTH Conference and New IFB Building Opening, 12-15 maja 2016, Gdańsk, Polska.

[Michalak A.](#), Krychowiak M., Królicka A.

Poster: *In vitro micropropagation of Iris pseudacorus and antimicrobial activity of secondary metabolites from underground parts of Iris species.*

Międzyuczelniane Sympozjum Biotechnologiczne - Symbioza, 22-24 kwietnia 2016, Warszawa, Polska.

[Michalak A.](#), Świgoń D., Królicka A.

Poster: *In vitro culture of lateral roots of Iris pseudacorus and influence of sucrose concentration on root growth.*

X Conference *In Vitro* Cultures In Plant Physiology

7-9 grudnia 2016, Kraków, Polska.

Michalak A.

Prezentacja ustna: *Screening for biologically active compounds in Iris genus.*

Seminarium wydziałowe 24.02.2017r. Gdańsk, Polska.

Michalak A., Krychowiak M., Banasiuk R., Królicka A.

Poster: *Silver nanoparticles and yellow flag iris as antimicrobial agents* 5th

Reporting Session, 15 grudnia 2017, Gdańsk, Polska.

Michalak A., Krychowiak M., Królicka A.

Prezentacja ustna: *Szlachetne i piękne. Rośliny z gatunku Iris jako źródło substancji do walki z opornymi szczepami patogennych bakterii.*

Międzyuczelniane Sympozjum Biotechnologiczne - Symbioza,
26–28 maja 2017, Warszawa.

Michalak A., Królicka A.

Poster: *Rhizobium rhizogenes transformation of monocotyledons Iris pseudacorus plants.*

6th Central European Congress of Life Science , Eurobiotech
11–14 września 2017, Kraków.

Michalak A., Krychowiak M., Królicka A.

Poster: *Antimicrobial activity of extracts from Iris pseudacorus plants on biofilm forming Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa.* 4th edition of

scientific conference Microbiology in Health Care and Environmental Protection -
MIKROBIOT 2017, 19–21 września 2017, Łódź.

Michalak A., Królicka A.

Poster: *Antimicrobial potential of secondary metabolites from Iris pseudacorus plants and their cross-activity with silver nanoparticles.*

SEB Annual Meeting - Masters of Biology, 3–6 lipca 2018, Florencja, Włochy.

Michalak A., Królicka A.

Poster: *Better together. Silvernanoparticles, Iris pseudacorus extracts and their synergistic interaction acts against human pathogens.*

8th Intercollegiate Biotechnology Symposium – Symbioza
17-19 maja 2019, Warszawa.

Współautorstwa wystąpień konferencyjnych

Królicka A., Krychowiak M., **Michalak A.**, Świgoń D., Gidzinska W., Banasiuk R., Chylewska A., Ziábka M., Narajczyk M.

Prezentacja ustna (współautorstwo): *Plants and nanoparticles of metals – perspectives and challenges.*

XV Overall Polish *In vitro* Culture and Plant Biotechnology Conference.

Biotechnological utilization of *in vitro* culture variability.

17-20 września 2018, Rogów, Polska.

Królicka A., Banasiuk R., Świgoń D., Tomaszewicz W., **Michalak A.**, Krychowiak M., Ziábka M., Narajczyk M.

Prezentacja ustna (współautorstwo): *Rośliny – ekologiczna synteza nanocząstek srebra o aktywności biologicznej.*

XXIII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego,

19-21 września 2017, Kraków, Polska.

Krychowiak M., Chmielewska K., Grzegorzczak N., **Michalak A.**, Banasiuk R., Królicka A.

Prezentacja ustna (współautorstwo): *Antimicrobial potential of in vitro cultured carnivorous plants combined with silver nanoparticles.*

Międzyuczelniane Sympozjum Biotechnologiczne – Symbioza

22-24 kwietnia 2016, Warszawa, Polska.

Granty

„**Diamentowy Grant**” - Ministerstwo 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.*

Grant uzyskany w wyniku Konkursu dla Młodych Pracowników Nauki 2017 – kierownik projektu, pt. *Opracowanie metod syntezy nanocząstek srebra o działaniu biologicznie czynnym przy użyciu Iris pseudacorus jako czynnika redukującego.*

Inne osiągnięcia naukowe

Udział jako ekspert i członek grupy roboczej „media” oraz ambasador ds. promocji i edukacji w zakresie odpowiedzialnych badań i innowacji (ang. *Responsible Research and Innovation*) w międzynarodowym projekcie EuroScitizen, COST Action 17127 *Building on scientific literacy in evolution towards scientifically responsible Europeans* (2019-2022).

Publikacja w materiałach pokonferencyjnych

Michalak A., Świgoń D., Królicka A.

In vitro culture of lateral roots of Iris pseudacorus and influence of sucrose concentration on root growth. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica Tom 58 supplement 2, 2016, str. 68.

Michalak A., Krychowiak M., Królicka A.

Antimicrobial activity of extracts from Iris pseudacorus plants on biofilm forming Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. Postępy Mikrobiologii (Advances in Microbiology) Tom 56, supplement 1, 2017, str. 74-75,

Królicka A., Krychowiak M., **Michalak A.**, Świgoń D., Gidzinska W., Banasiuk R., Chylewska A., Ziabka M., Narajczyk M. 2018.

Plants and nanoparticles of metals - perspectives and challenges. BioTechnologia 99(3): 227.

Podziękowania



17. Podziękowania

Mam w sobie ocean wdzięczności, którą tak trudno mi ubrać w słowa. Doktorat był dla mnie nie tylko lekcją, w jaki sposób powinna wyglądać praca naukowa. Stał się podróżą, w której odkrywałam siebie, swoje granice i możliwości. Przede wszystkim poznałam jednak dogłębnie wartość pracy zespołowej i prawdziwej przyjaźni. Niniejsza praca to zasługa wielu osób. Bez nich, w pojedynkę, po tylu sztormach, nigdy nie dopłynęłabym do brzegu.

Z głębi mojego serca dziękuję najważniejszej mojej nauczycielce, „mamie” dorosłego i naukowego życia, **Oli Królickiej**, mojej mentorce, promotorce, orędownicze, pięknej kobiecie, która wierzy we mnie, podnosiła w kryzysach, była obok, gdy tylko jej potrzebowałam, towarzyszyła od początku naukowej drogi aż do ostatniej kropki w niniejszej pracy. Nie ma takich słów, które wyraziłyby w pełni jak bardzo jestem Ci za wszystko wdzięczna. Dziękuję!

Moim współpracownikom: **Marcie, Kubie, Weronice, Michałowi, Gusi, Rafałowi** i wszystkim dobrym duszom z naukowego świata, które wspierały mnie w tej podróży, zarówno merytorycznie, technicznie jak i psychicznie. Szczególne podziękowania dla **prof. Marii Łuczkiewicz, prof. Mirosławy Krauze-Baranowskiej, dr Piotra Migasa i dr Adama Kokotkiweicza** za wiedzę, wsparcie i pomoc w znalezieniu odpowiedzi dotyczących najważniejszych odkryć w pracach związanych z identyfikacją związków aktywnych. Dziękuję!

Moim najwspanialszym **rodzicom** i **siostrze**. Kocham Was najmocniej i przepełnia mnie wdzięczność za każdą minutę, w której możemy oddychać tym samym powietrzem. Za każdą otartą mi łzę i uśmiech radości, za wspólne świętowanie sukcesów i wstawanie z porażek. Za to, że tak otwarcie mnie wspieracie w każdej decyzji i pokazujecie całemu światu jak bardzo jesteście ze mnie dumni. Sama sobie zazdroszczę tego, jakie mam szczęście mieć taką rodzinę. Dziękuję!

Mojej rodzinie z wyboru: moim przyjaciółom i partnerowi. Najmilszym mi Łosiom: **Annie, Marcie i Mikołajowi**. Kiedyś postawię Wam pomnik za to, ile dobra i motywacji wnosicie każdego dnia do mojego życia. Daliście mi siłę, okryliście troską, jak najcieplejszym kocem w chłodne dni, dodaliście otuchy, byliście i jesteście mi motywacją i najlepszym zespołem wspierającym w każdym aspekcie naukowym i życiowym, o jakim nawet nie byłam w stanie marzyć. **Trzebunowi, Natalii, Igorkowi, Darii** za wszystkie wspólne wyjazdy, ogrom wiedzy i wsparcie merytoryczne, setki poprawek, pyszne jedzenie, za ciepło, dobro, troskę i zainteresowanie, za pomoc, otwartość i wyrozumiałość dla mnie, za każde dobre słowo. **Kamilowi**, bratu z wyboru, za to bycie obok mnie, przygarnięcie mnie pod

swój dach, rozmowy, pilnowanie, żebym nie umarła z głodu i chodziła na spacer, za wiarę we mnie i kopniaki do działania. [Bartkowi](#), za wsparcie mnie w najgorszych momentach pracy oraz pisania, za każde dobre słowo i gest. Dziękuję Wam najpiękniej!

Mojemu [Maćkowi](#), za wywrócenie mojego świata do góry nogami, więcej niż raz. Za rozświetlenie mojego życia i przywrócenie mi sensu we właściwym czasie i miejscu, wsparciu zwłaszcza na tym najtrudniejszym, ostatnim etapie pisania. Za otuchę, wiarę, troskę, obecność i walkę, za bycie „moim człowiekiem”. Dziękuję!

Wszystkim tym nie wymienionym z imienia, którzy dołożyli choćby najmniejsze ziarnko wiedzy, żeby ta praca powstała. Dziękuję z całego serca! Jestem wdzięczna Wam wszystkim za to, że nasze drogi spotkały się w czasie mojej doktoranckiej przygody i patrzę z nadzieją, że przetną się jeszcze nie raz.

Thank you [Alexandra Elbakyan](#) for making science free for everyone. Thank you so much for your work and for Sci-Hub.