

# Rozprawa doktorska

mgr Angelika Małgorzata Michalak

*Kultury in vitro i in vivo roślin z gatunku Iris pseudacorus*  
źródłem związków biologicznie czynnych.

## 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 kosańca 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 kosańca 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 dimetoksy-dihydroksy-izoflawon. Ponadto, dzięki zastosowaniu chromatografii cienkowarstwowej (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.