



Izabela Grzegorzczak-Karolak

Autoreferat

Załącznik numer 2

Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej

Wydział Farmaceutyczny

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź 2017

1. Izabela Grzegorzczak-Karolak (do 17.09.2011 roku Izabela Grzegorzczak)
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- **Dyplom magistra farmacji** uzyskany 8 września 2000 roku na podstawie pracy magisterskiej pt.: „Badanie receptora dla kwasu rodotorulowego u gronkowców” wykonanej w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Łodzi. Promotorem pracy był prof. dr hab. Jerzy Mikucki, a opiekunem mgr Piotr Wysocki.
- **Stopień doktora nauk farmaceutycznych** nadany 15 grudnia 2006 roku uchwałą Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej pt. „Metabolity wtórne o właściwościach przeciwutleniających w kulturach *in vitro* *Salvia officinalis* L.” wykonanej w Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej. Promotor: Prof. dr hab. Halina Wysokińska, recenzenci: Prof. dr hab. Ewa Łojkowska, Prof. dr hab. Olga Olszowska. Praca doktorska została wyróżniona przez Radę Wydziału Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Zajęła również w roku 2007 trzecie miejsce w kategorii rozprawy doktorskiej w organizowanym przez Fundację Hasco-Lek konkursie na najlepsze prace doktorskie z zakresu farmacji przemysłowej.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

od 26.08.2008 do chwili obecnej: na stanowisku adiunkta w Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego

„Wykorzystanie kultur *in vitro* oraz roślin *Scutellaria alpina* i *S. altissima* do pozyskiwania związków polifenolowych; ocena aktywności antyoksydacyjnej i antyglukacyjnej *in vitro*.”

Zgłoszona do postępowania tematyka obejmuje cykl ośmiu publikacji.

b) autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

H1. Grzegorzczak-Karolak I.*, Kuźma Ł., Wysokińska H. The use of long-term *Scutellaria altissima* callus cultures for shoot regeneration, production of bioactive metabolites and micropropagation. Journal of Medicinal Plants Research. 2013, 7: 3003-3313.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części eksperymentalnej (zapoczątkowanie kultur kalusa organogennego, hodowla kultur, aklimatyzacja uzyskanych roślin, izolacja DNA z uzyskanych pędów, określenie stabilności genetycznej uzyskanego materiału roślinnego przy udziale metody ISSR-PCR, przygotowanie ekstraktów do analizy ilościowej), na zebraniu i opracowaniu wyników oraz na udziale w przygotowaniu manuskryptu opisującego uzyskane wyniki. Mój udział procentowy szacuję na 75%.

H2. Grzegorzczak-Karolak I.*, Kuźma Ł., Wysokińska H. Study on the chemical composition and antioxidant activity of extracts from shoot culture and regenerated plants of *Scutellaria altissima* L. Acta Physiol. Plant. 2015, 37: 1736-1744. **(IF-1,563, 25 pkt MNiSW)**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu doświadczeń, wykonaniu części eksperymentalnej (zapoczątkowanie kultury pędów, hodowla kultur, mikrorozmnażanie z użyciem wierzchołków pędów, przygotowanie ekstraktów do analiz fitochemicznych i biologicznych, oznaczenie całkowitej zawartości polifenoli i flawonoidów w uzyskanych ekstraktach, wykonanie testów oceniających aktywność antyoksydacyjną badanych ekstraktów), na zebraniu i opracowaniu wyników oraz na udziale w przygotowaniu manuskryptu opisującego uzyskane wyniki. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

H3. Grzegorzczak-Karolak I.*, Wysokińska H., Olas B. Studies on the antioxidant properties of extracts from the roots and shoots of two *Scutellaria* species in human blood plasma. Acta Biochimica Polonica. 2015, 62:253-258. **(IF- 1,187, 15 pkt MNiSW)**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu części doświadczalnej, hodowli i zbiorze materiału roślinnego, przygotowaniu ekstraktów do analizy fitochemicznej i badań biologicznych, wykonaniu oznaczeń ilościowych, zebraniu, analizie i opracowaniu wyników oraz na udziale w przygotowaniu manuskryptu opisującego uzyskane wyniki. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

H4. Grzegorzczuk-Karolak I.*, Kuźma Ł., Wysokińska H. The effect of cytokinins on shoot proliferation, secondary metabolite production and antioxidant potential in shoot cultures of *Scutellaria alpina* Plant Cell Tissue and Organ Culture PCTOC 2015, 122:699-708. (IF-2,39 30 pkt MNiSW)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu koncepcji pracy i wykonaniu części eksperymentalnej (zapoczątkowanie kultury pędów, hodowla kultur, przygotowanie ekstraktów do analiz fitochemicznych i biologicznych, wykonanie badań określających aktywność przeciwutleniającą ekstraktów), na zebraniu i analizie wyników oraz na udziale w przygotowaniu manuskryptu opisującego uzyskane wyniki. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

H5. Grzegorzczuk-Karolak I.*, Kuźma Ł., Wysokińska H. *In vitro* cultures of *Scutellaria alpina* as a source of pharmacologically active metabolites. Acta Physiol. Plant. 2016, 38: 7-15. (IF-1,563 25 pkt MNiSW)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu doświadczeń i wykonaniu części eksperymentalnej (zapoczątkowanie kultur kalusowej i zawiesinowej, hodowla kultur zróżnicowanych i niezróżnicowanych, określenie kinetyki wzrostu kalusa i zawiesiny, regeneracja roślin z kultury pędów, przygotowanie ekstraktów do badań fitochemicznych), na zebraniu i analizie wyników oraz na udziale w przygotowaniu manuskryptu opisującego uzyskane wyniki. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

H6. Grzegorzczuk-Karolak I.*, Gołąb K., Gburek J., Wysokińska H., Matkowski A. Inhibition of advanced glycation end-product formation and antioxidant activity by extracts and polyphenols from *Scutellaria alpina* L. and *S. altissima* L. Molecules. 2016, 21: 739-748. (IF 2,465, 30 pkt MNiSW)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wyznaczeniu koncepcji badań i wykonaniu części eksperymentalnej (hodowla i zbiór materiału roślinnego, przygotowanie ekstraktów do badań biologicznych, wykonanie badań biologicznych określających aktywność antyoksydacyjną badanych ekstraktów, oznaczanie całkowitej zawartości flawonoidów w ekstraktach), na zebraniu i interpretacji wyników oraz na udziale w przygotowaniu manuskryptu opisującego uzyskane wyniki. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

H7. Grzegorzycy-Karolak I*, Rytczak P, Bielecki S, Wysokińska H. The influence of liquid systems for shoot multiplication, secondary metabolite production and plant regeneration of *Scutellaria alpina*. Plant Cell Tissue and Organ Culture PCTOC 2017, 128: 479-486 (IF- 2,39 30 pkt MNiSW)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wyznaczeniu koncepcji badań i wykonaniu części eksperymentalnej (hodowla kultury pędów na stałych, półstałych, płynnych podłożach oraz w bioreaktorze, ocena wzrostu kultur, analiza fitochemiczna), na zebraniu i interpretacji wyników oraz na udziale w przygotowaniu manuskryptu opisującego uzyskane wyniki. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

H8. Grzegorzycy-Karolak I.*, Kuźma Ł., Wysokińska H. The influence of cytokinins on proliferation and polyphenol accumulation in shoot cultures of *Scutellaria altissima* L. Phytochem. Lett. 2017, doi: 10.1016/j.phytol.2016.12.029. (IF-1,353 20 pkt MNiSW)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu koncepcji pracy i wykonaniu części eksperymentalnej (hodowla kultur, ocena wzrostu kultur, przygotowanie ekstraktów do analiz fitochemicznych), na zebraniu i analizie wyników oraz na udziale w przygotowaniu manuskryptu opisującego uzyskane wyniki. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

* - prace w których występowałam w roli autora korespondencyjnego

Sumaryczny współczynnik oddziaływania Impact Factor (IF) publikacji wytypowanych do cyklu w postępowaniu habilitacyjnym wynosi 12,911, punkty MNiSW

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

W ciągu ostatnich dwudziestu lat obserwujemy wyraźny wzrost zainteresowania surowcami roślinnymi i powrót do ich szerokiego stosowania w farmacji, dietetyce i kosmetologii. Szacuje się, że ponad 30000, czyli około 80% obecnych na rynku surowców naturalnych jest pochodzenia roślinnego (Rao i Ravishankar 2002). Jest to spowodowane łatwą dostępnością szeroko pojętych leków roślinnych, przekonaniem pacjentów o ich bezpieczeństwie i skuteczności. Coraz mniej roślin funkcjonuje na rynku na zasadzie tradycyjnego stosowania, a coraz częściej mamy do czynienia z popartą licznymi badaniami wiedzą o surowcach roślinnych – ich właściwościach i mechanizmach działania. Dzisiejsze standardy narzucają wykorzystywanie w leczeniu surowców zwalidowanych, wysokiej jakości, o jak najprecyzyjniej określonym składzie i potwierdzonych właściwościach biologicznych. Argumenty naukowe w coraz większym zakresie przekonują także sceptycznie nastawione do leków roślinnych środowisko lekarskie. Dodatkowo wraz z zainteresowaniem surowcami pochodzenia roślinnego rośnie dążenie do pozyskiwania materiału roślinnego produkującego bioaktywne metabolity z wysoką wydajnością. Są to wymagania jak najbardziej uzasadnione pod względem ekonomicznym, bo naturalna biosynteza metabolitów wtórnych niejednokrotnie zachodzi w roślinach na niskim poziomie. Jednocześnie ze względu na duże zapotrzebowanie wiele jest gatunków, których populacje na skutek intensywnej eksploatacji zostały silnie zredukowane i grozi im wyginięcie. Innym czynnikiem silnie wpływającym na plonowanie jest podatność roślin na choroby infekcyjne i pasożytnicze, a także niekorzystne warunki środowiska. Otrzymanie w tradycyjny sposób bardziej produktywnych, odpornych na patogeny odmian wymaga kilku lub nawet kilkunastu lat. Z drugiej jednak strony synteza chemiczna substancji aktywnych o skomplikowanej strukturze, która mogłaby być rozpatrywana jako ich alternatywa, jest procesem bardzo złożonym i kosztownym. W świetle tych problemów uzasadnionym okazało się sięgnięcie po osiągnięcia z zakresu biotechnologii roślin, czyli roślinnych kultur *in vitro* obejmujących hodowle protoplastów, komórek, tkanek czy organów prowadzonych na podłożach o ściśle określonym składzie w sterylnych dokładnie zdefiniowanych i kontrolowanych warunkach. Jedną z ich zalet jest możliwość pozyskania materiału roślinnego w znacznie krótszym czasie niż jest to

możliwe w warunkach naturalnych. Jednocześnie metoda pozwala uniezależnić się od warunków środowiskowych, klimatycznych i geograficznych czy czynników wynikających z wieku oraz fazy wzrostu rośliny (Zhou i Wu 2006). Regulując warunki fizyczne i chemiczne kultury oraz wykorzystując selekcje linii wysokoproduktywnych można zwiększać produkcję metabolitów roślinnych (Fett-Neto i wsp. 1994; Collin 2001; Rao i Ravishankar 2002). Wzrost wydajności produkcji można także osiągnąć stosując kultury dwufazowe, immobilizację komórek, elicytację czy transformację genetyczną (Collin 2001; Rao i Ravishankar 2002; Shilpa i wsp. 2010). Ścisłe kontrolując warunki hodowli otrzymujemy surowiec o określonej jakości ze stałą wydajnością (Hussain i wsp. 2012). Znane są liczne przypadki, kiedy zróżnicowane i niezróżnicowane kultury oraz zregenerowane *in vitro* rośliny produkowały nie tylko podobne, ale niejednokrotnie nawet dużo wyższe ilości związków aktywnych w porównaniu do hodowli prowadzonych metodami tradycyjnymi (Ulbrich i wsp. 1985; Fujita 1988; Hippolyte i wsp. 1992; Döring i Petersen, 2014). Opisywane są także przypadki biosyntezy w kulturach nowych produktów, nie stwierdzonych wcześniej w roślinach gruntowych danego gatunku (Vijaya i wsp. 2010).

Poza kontrolowaną produkcją aktywnych farmakologicznie metabolitów, stosując metody biotechnologiczne można uzyskać całe rośliny (proces mikrorozmnażania). Jest to możliwe dzięki zdolności roślin do regeneracji z obecnych na eksplantatach merystemów oraz przez wytwarzanie merystemów przybyszowych. Indukcję tworzenia nowych pędów wzbudza się poprzez uzupełnianie roślinnych podłoży wzrostowych odpowiednimi regulatorami wzrostu (cytokininy, auksyny) (Collin 2001). Procedura mikrorozmnażania obejmuje etap mnożenia pąków/pędów, a następnie ich ukorzeniania i aklimatyzację uzyskanych roślin. Jest to metoda chętnie wykorzystywana w ogrodnictwie, ale mająca zastosowanie także w innych gałęziach bazujących na surowcach roślinnych i ich produktach. Daje możliwość otrzymania dużej liczby roślin w krótkim czasie i ma szczególne znaczenie w przypadku gatunków chronionych, trudnodostępnych, niewytwarzających nasion lub wymagających specyficznych warunków klimatycznych oraz środowiskowych.

Ważnymi gatunkami w lecznictwie tradycyjnym, zwłaszcza dalekowschodnim są rośliny należące do rodzaju *Scutellaria* (rodzina Lamiaceae). Jednym z bardzo szczegółowo przebadanych zwłaszcza w okresie ostatnich dwudziestu lat pod względem składu i właściwości jest *Scutellaria baicalensis* – tarczycza bajkalska, występująca w okolicach jeziora Bajkał, ale także na terenie Chin, Japonii i Korei. W tradycyjnej

chińskiej i japońskiej medycynie korzenie rośliny są przede wszystkim wykorzystywane jako środek przeciwzapalny i przeciwalergiczny (Koda 1982). Surowiec poprawia krążenie i jest stosowany w chorobach sercowo-naczyniowych (Huang i wsp. 2005). Na zachodzie inny gatunek *S. lateriflora*, tarczycę bocznokwiatową, zwaną też tarczycą amerykańską wykorzystuje się jako lek w dysfunkcjach ze strony układu nerwowego: lękach, nadpobudliwości, bezsenności czy stresie (Award i wsp. 2003). Do rodzaju *Scutellaria* przynależy jednak dużo więcej, bo ponad 300 gatunków. Badania ostatnich lat wykazują, że wiele z nich produkuje te same metabolity, co tarczycza bajkalska i posiada szerokie spektrum aktywności farmakologicznych. Niektóre były i są stosowane lokalnie w medycynie ludowej na terenach ich występowania. Gatunki należące do rodzaju *Scutellaria* to zazwyczaj rośliny wieloletnie występujące w Azji, Europie i Stanach Zjednoczonych Ameryki (Joshee et al. 2002). Bogata i urozmaicona aktywność biologiczna tarczycy związana jest z ogromną liczbą syntetyzowanych przez nie aktywnych metabolitów. Już w 2002 roku Malikov i Yuldashev opisali ponad 200 związków fenolowych wyizolowanych z roślin należących do tego rodzaju. Jednak bardzo intensywnie prowadzone badania fitochemiczne doprowadziły do identyfikacji w krótkim czasie wielu kolejnych składników. Murch i wsp. (2004) szacują, że obecnie z tarczycy wyizolowano już ponad 2000 metabolitów. Można tu wymienić związki zaliczane do flawonoidów, fenyloetanoidów, irydoidów, diterpenów, tritepenów, alkaloidów, składniki olejów eterycznych (Sheng i wsp. 2010). Najliczniej reprezentowaną grupą, której przypisuje się największy udział w aktywności terapeutycznej surowców są flawonoidy. Tylko z podziemnych i nadziemnych części tarczycy bajkalskiej wyizolowano ich ponad 100. Najbardziej charakterystyczne dla rodzaju *Scutellaria* są bajkaleina, wogonina, skutelareina, oroksylina A oraz ich cukrowe pochodne: bajkalina, wogonozyd, skutelaryna i oroksylozyd. Liczne badania dokumentują farmakologiczną aktywność tych związków, daleko wykraczającą ponad tradycyjne zastosowanie surowców je zawierających.

Stwierdzono działanie przeciwnowotworowe bajkaliny i jej aglikonu oparte na indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych oraz hamowaniu ich cyklu komórkowego. Udowodniono, że przez obniżenie pod wpływem bajkaliny poziomu kinaz i cyklin regulujących cykl komórkowy dochodziło do jego blokowania na etapie fazy syntezy DNA (faza S) w linii komórkowej ludzkiego nowotworu płuc. Jednocześnie flawon ten zaburzał syntezę białek antyapoptotycznych Bcl-2 i tym samym indukował apoptozę (Leung i wsp. 2007). Ekstrakty zawierające około 20% bajkaliny hamowały rozrost komórek białaczki limfatycznej, szpiczaka i chłoniaka, a także inicjowały

programowaną śmierć wszystkich badanych linii komórkowych. Mechanizm tego działania opierał się na obniżeniu aktywności białek cyklu komórkowego takich jak Bcl czy p27 oraz uszkodzeniu mitochondriów (Kumagai i wsp. 2007). Zarówno bajkalina jak i bajkaleina indukowały programowaną śmierć komórek ludzkiego nowotworu prostaty, choć efekt działania tego drugiego związku był dwukrotnie silniejszy (Chen i wsp. 2001). Shieh i wsp. (2006) udokumentowali indukcję apoptozy różnych białaczkowych linii komórkowych bazującą na zahamowaniu przez bajkalinę produkcji białka Bcl-2, ale bez widocznego wpływu tego flawonoidu na syntezę białek proapoptotycznych – p 53 i Bax. Badania wskazują, że również w przypadku wogoniny jedną z dróg aktywności przeciwnowotworowej tego związku jest pobudzenie komórek do ich programowanej śmierci. Flawon ten działa między innymi na zasadzie hamowania jądrowego czynnika transkrypcji (NF- κ B), który odpowiada za regulację genów kodujących białka blokujące apoptozę (Baumann i wsp. 2008). Jednocześnie w badaniach na liniach komórkowych ludzkiego raka prostaty i okrężnicy stwierdzono, że wogonina pobudza ekspresję nowotworowego białka supresorowego p53, które reguluje transkrypcję genów odpowiedzialnych za blokadę cyklu komórkowego oraz inicjuje apoptozę (Lee i wsp. 2008). Dodatkowo Baumann i wsp. (2008) dowodzą, że wogonina stosowana w zaburzeniach hematologicznych o podłożu nowotworowym powodowała selektywną indukcję śmierci patologicznych komórek T, bez wpływu na normalne limfocyty T. Było to najprawdopodobniej wynikiem aktywacji fosfolipazy tylko w komórkach zmienionych nowotworowo, które charakteryzowały się intensywną produkcją rodnika $O_2^{\cdot-}$. Trwają badania dotyczące wpływu wogoniny na cykl komórkowy. Efektem ekspozycji linii komórkowych ludzkiego nowotworu piersi na ten związek było zablokowanie cyklu komórkowego na przełomie faz G_0/G_1 (Li-Weber 2009). Większość prac porównawczych wskazuje jednak na silniejszą indukcję apoptozy w badanych nowotworowych liniach komórkowych przez bajkaleinę oraz bajkalinę niż wogoninę (Parajuli i wsp. 2009). Z drugiej strony ten ostatni flawonoid charakteryzuje się najprawdopodobniej wyższą aktywnością antyproliferacyjną.

W licznych doświadczeniach *in vitro* i *in vivo* udokumentowano działanie przeciwzapalne bajkaliny i jej aglikonu. Obydwa związki hamowały ekspresję genów kodujących enzymy nadaktywne w stanach zapalnych. Poprzez wpływ na cyklooksygenazę i lipooksygenazę bajkaleina blokowała biosyntezę prostaglandyny E_2 (PGE_2) i leukotrienu (Schapoval i wsp. 1998). Warto w tym miejscu zauważyć, że nadekspresja COX-2 w tkankach jest związana nie tylko z rozwijającym się stanem

zapalnym, ale i z rozwojem chorób nowotworowych. Ponadto oba flawonoidy hamowały indukowaną lipopolisacharydem (LPS) ekspresję białek i produkcję tlenu azotu w makrofagach (Woo i wsp. 2006). Zależne od dawki hamowanie produkcji prostaglandyny E₂ stwierdzono także w przypadku wogoniny (Wakabayashi i wsp. 2000). Ponadto odnotowano zmniejszenie pod wpływem tego związku poziomu metabolitów prozapalnego szlaku lipooksygenazy i wzrost poziomu biosyntezy prostaglandyny D₂ będącej mediatorem przeciwzapalnym (Park i wsp. 2004).

Działanie hepatoprotective preparatów z korzeni tarczyc było wykorzystywane już od wieków w medycynie ludowej w Chinach. Dziś wiadomo iż jest to przede wszystkim efekt działania przeciwzapalnego i przeciwrodnikowego. Według Wan i wsp. (2008) ma tu znaczenie aktywność bajkaliny wynikająca z hamowania produkcji induktora apoptozy hepatocytów we wczesnej fazie zapalenia oraz czynnika prowadzącego do nekrozy hepatocytów i uszkodzenia tkanki wątrobowej. Tymczasem w zatruciach wysokimi dawkami paracetamolu u myszy, bajkalina hamowała aktywności cytochromu P450 CYP2E1 przez, co blokowała powstawanie hepatotoksycznego metabolitu tego związku (Jang i wsp. 2003). Wogonina okazała się być inhibitorem innej odmiany cytochromu P 450 - CYP1A2 odpowiedzialnej za metabolizm wątrobowy wielu leków (Kim i wsp. 2002). Budowa chemiczna flawonów obecnych w tarczycach sprawia, że są one silnymi przeciwutleniaczami. Wolne protony w grupach fenolowych wiążą i usuwają metale ciężkie oraz wchodzą w reakcje z wolnymi rodnikami. Wytworzone w warunkach stresu reaktywne rodniki tlenowe wywołują szereg patologicznych zmian w organizmie człowieka. Reagują one między innymi z produkowanym w *endothelium* tlenkiem azotu, co skutkuje zaburzeniem jego funkcji i prowadzi do zwężenia naczyń, zwiększonej agregacji płytek krwi, powstawania zakrzepów oraz zmian morfologicznych w naczyniach krwionośnych w wyniku proliferacji komórek. Wykazują też działanie utleniające w stosunku do DNA, lipidów i białek. Antyoksydacyjne właściwości bajkaleiny i bajkaliny mają więc odniesienie nie tylko do komórek wątroby, ale także do funkcjonowania układu krążenia. Skutkiem ich działania jest obniżanie ciśnienia krwi, hamowanie wapnienia tętnic, zapobieganie agregacji płytek krwi, profilaktyka miażdżycy, hamowanie procesów zapalnych w ścianach naczyń krwionośnych (Machha 2007). Z prac opublikowanych w ciągu ostatnich kilkunastu lat wynika, że flawonoidy tarczycy mają działanie ochronne na komórki nerwowe i skutecznie ograniczają powstawanie chorób neurodegeneracyjnych, co może mieć potencjalne znaczenie terapeutyczne w przypadku leczenia demencji starczej spowodowanej chronicznym zaburzeniem krążenia mózgowego (Choi i wsp. 2002; Zhang

i wsp. 2006; He i wsp. 2009). Bajkalina wykazuje także charakter neuroprotekcyny przeciwko czynnikowi MPTP powodującemu zmiany w neuronach dopaminergicznych, które mogą się przekładać na zaistnienie choroby Parkinsona (Cheng i wsp. 2008). Dodatkowo, bajkaleina, bajkalina i wogonina poprzez wpływ na receptor GABA-ergiczny wywołują efekt anksjolityczny. Badania przeprowadzone przez Wang i wsp. (2008) oraz Hui i wsp. (2002) dowiodły, że wpływ ten ogranicza się do działania przeciwlękowego pozbawionego efektów miorelaksacji i sedacji.

Kolejna grupa badań związana jest z aktywnością przeciwwirusową metabolitów tarczyc. Stwierdzono, że bajkaleina i jej glukuronoid poprzez inhibicję aktywności odwrotnej transkryptazy hamują replikację wirusa HIV-1. Ponadto poprzez wpływ na interakcję między receptorami komórkowymi i białkami otoczki wirusowej, bajkalina wykazuje zdolność do hamowania wnikania wirusa HIV-1 do komórek gospodarza (Li i wsp. 2000). Właściwości przeciwwirusowe bajkaliny stwierdzono również w stosunku do wirusa HTLV-1 (*human T-cell leukemia virus*) odpowiedzialnego za rozwój swoistej białaczki (Li-Weber 2009). Poprzez hamowanie odwrotnej transkryptazy tego retrowirusa bajkalina hamowała replikację wirusa HTLV-1 w zakażonych limfocytach B i T. Bajkalina i bajkaleina wykazują również aktywność przeciwko wirusowi HBV (wirusowi zapalenia wątroby typu B). Jednakże w tym wypadku siła ich działania jest słabsza w porównaniu z wogoniną. W badaniach zaobserwowano, iż ten ostatni flawon skutecznie obniżał poziom wirusa HBV we krwi oraz wątrobie myszy i kaczek nim zainfekowanych zależnie od zastosowanej dawki (Guo i wsp. 2007). Potwierdzono także działanie przeciwwirusowe wogoniny i występującego w tarczycach innego flawonoidu - oroksyliny A wobec wirusa RSV odpowiedzialnego za ostre stany zakaźne dróg oddechowych u noworodków i dzieci (Ma i wsp. 2002).

Tarczycy mogą być stosowane jako surowce przeciwbakteryjne. Potwierdzono zahamowanie wzrostu *Vibrio coma* oraz *Staphylococcus aureus* pod wpływem flawonoidów, zwłaszcza wogoniny. Wyciągi z gatunków rodzaju *Scutellaria* działają też przeciwbakteryjnie wobec bakterii dyfterytu, paciorkowca hemolitycznego, pneumokoków, tyfusu i paratyfusu, *Escherichia coli* oraz spirochetów i leptospirozy (Hsu 1954). Ponadto zaobserwowano hamowanie przez wyciągi z tarczyc wzrostu niektórych bakterii patogennych rozwijających się w jamie ustnej, co może mieć znaczenie w leczeniu chorób przyzębia (Tsao i wsp. 1982). Błaszczyk i wsp. (2000) potwierdzili aktywność przeciwgrzybiczną ekstraktów z tarczycy wobec takich gatunków jak *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Geotrichum candidum* czy *Rhodotorula rubra*.

Jednym z flawonoidów powszechnie występującym u roślin jest luteolina. Nie jest więc zaskakujące iż została ona wyizolowana również z niektórych gatunków z rodzaju *Scutellaria* (Zgórka 2006). Związek występuje w postaci aglikonu lub połączeń z cukrami, zwłaszcza glukozą. Jednym z nich jest 7-*O*-glukozyd luteoliny. Mimo wysokiej częstości występowania luteolina od lat jest w kręgu zainteresowania badaczy ze względu na jej stosunkowo niską zawartość w roślinach przy jednoczesnym szerokim spektrum aktywności biologicznej. Badania wykazały, że dieta zawierająca luteolinę zmniejsza ryzyko schorzeń związanych z układem naczyniowo-sercowym (Marniemi i wsp. 2005), obniża ciśnienie (Ichimura i wsp. 2006), poziom cholesterolu (Andrikopoulos i wsp. 2002) i poziom cukru we krwi (Zarzuelo i wsp. 1996). Dobrze udokumentowana aktywność przeciwutleniająca luteoliny oraz jej glikozydów związana jest z ich zdolnością „wymiatania” wolnych rodników (Cai i wsp. 1997), chelatowaniem jonów metali (Mira i wsp. 2002), hamowaniem aktywności enzymów prooksydacyjnych (Hu i Kitts 2004) i pobudzaniem szlaków antyoksydacyjnych w organizmie (Wruck i wsp. 2007). Stwierdzono, że luteolina hamuje czynnik transkrypcyjny NF-kB, który pobudza powstawanie cytokin, chemokin i enzymów prozapalnych przez co działa przeciwzapalnie (Kim i Jobin 2005). Dodatkowo kilka raportów potwierdziło inhibicję lipooksygenaz (LOX) i cyklooksygenazy-2 (COX-2) przez luteolinę (Gutierrez-Venegas i wsp. 2006; Harris i wsp. 2006). Flawon ten ma też właściwości antyalergiczne wpływając na zahamowanie produkcji histaminy (Kimata i wsp. 2000). Bardzo liczne badania donoszą o aktywności przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybiczej, przeciwwirusowej i przeciwprzewodniakowej luteoliny i jej glikozydów (Mittra i wsp. 2000; Xu i Lee 2001; Sartori i wsp. 2003; Liu i wsp. 2008). W doświadczeniach *in vitro* i *in vivo* potwierdzono ochronne działanie luteoliny w przypadku schorzeń nowotworowych (Ueda i wsp. 2003; Manju i Nalini 2007; Gates i wsp. 2007), jak i cytotoksyczny efekt tego flawonoidu w stosunku do licznych linii komórek nowotworowych takich jak ludzki nowotwór prostaty (Chiu i Lin 2001), nowotwór piersi (Du i wsp. 2008), rak szyjki macicy (Horinaka i wsp. 2005) czy nowotwór trzustki (Lee i wsp. 2002). W powyższych badaniach stwierdzono, że mechanizm działania luteoliny ma wiele punktów uchwytu takich jak ochrona przed stresem oksydacyjnym, indukcja apoptozy, inhibicja topoizomeraz. Flawon ten uwrażliwia komórki nowotworowe na mediatory związane z programowaną śmiercią komórki i zwiększa efektywność chemioterapeutyków takich jak cisplatyna czy bleomycyna (Shi i wsp. 2007).

Jednym ze związków wyizolowanych z kilku gatunków tarczyc, nie będącym flawonoidem, jest werbaskozyd zwany też akteozydem. Ten należący do glikozydów fenylopropanoidowych związek charakteryzuje się szerokim spektrum aktywności biologicznych. Surowce bogate w werbaskozyd w medycynie ludowej były przede wszystkim stosowane jako środki przeciwzapalne oraz przeciwbakteryjne. Właściwości przeciwzapalne związku opierają się na selektywnym hamowaniu enzymów kaskady kwasu arachidonowego takich jak COX-2 i 5-lipooksygenaza, co skutkuje hamowaniem tworzenia prozapalnych prostaglandyn (Lee i wsp. 2006a). Efekt przeciwbólowy werbaskozydu jest silniejszy niż podanego w podobnej dawce ibuprofenu (Backhouse i wsp. 2008). Właściwości przeciwzapalne związku związane są też z jego aktywnością antyoksydacyjną. Raporty podają, że werbaskozyd hamował peroksydację lipidów w komórkach wątroby szczurów (Quanbo i wsp. 1998), chronił przed uszkodzeniami DNA (Zhao i wsp. 2005) czy powstawaniem w mózgu zmian neurodegeneracyjnych (Lee i wsp. 2006b). Mechanizm tej aktywności związany jest zarówno z „wiązaniami” wolnych rodników, zdolnością chelatowania jonów metali, jak i naprawą uszkodzonych struktur, w tym DNA (Zhao i wsp. 2005). Zaobserwowano również aktywność przeciwnowotworową werbaskozydu. Związek ten hamował proliferację linii komórkowych w przypadku ludzkich komórek gruczołka żołądka czy ludzkich komórek nowotworowych szyjki macicy (Abe i wsp. 2002) oraz indukował apoptozę komórek nowotworowych, co miało miejsce w przypadku linii HL-60 białaczki promielocytarnej (Lee i wsp. 2007). Przypuszcza się, że aktywność akteozydu może też być związana z jego wpływem na szlak telomerazy (Zhang 2002). Liczne badania potwierdzają aktywność przeciwdrobnoustrojową werbaskozydu. Przykładowo, hamuje on aktywność HIV-1 integrazy, enzymu odpowiedzialnego za replikację wirusa w komórkach gospodarza (Kim i wsp. 2001). Stwierdzono jego działanie bakteriobójcze wobec takich bakterii jak *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterobacter* ssp., *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris* czy *Pseudomonas aeruginosa* związane najprawdopodobniej z zahamowaniem biosyntezy bakteryjnych białek (Senatore i wsp. 2007).

Ta krótka charakterystyka kluczowych metabolitów obecnych w gatunkach rodzaju *Scutellaria* pozwala zauważyć, że w wielu aspektach działania biologiczne flawonoidów takich jak bajkaleina, wogonina, luteolina i ich cukrowych pochodnych oraz werbaskozydu pokrywają się, co może skutkować synergizmem i silnym działaniem surowców je zawierających.

Główne założenia przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego:

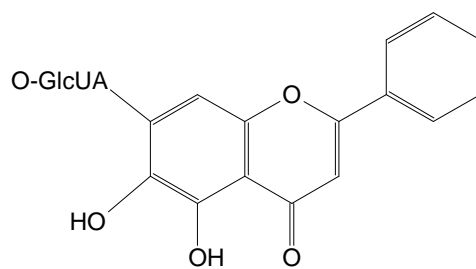
Celem badań opisanych w pracach zgłoszonych w postępowaniu habilitacyjnym była ocena możliwości wykorzystania metod biotechnologicznych do wytwarzania farmakologicznie aktywnych związków polifenolowych o wielokierunkowej aktywności biologicznej takich jak bajkalina, wogonozyd czy werbaskozyd w dwóch gatunkach z rodzaju *Scutellaria*: *S. alpina* (tarczycza alpejska) i *S. altissima* (tarczycza wyniosła). Materiał do badań stanowiły tkanka kalusowa, komórki z hodowli zawiesinowej, kultury pędów i zregenerowane *in vitro* rośliny tarczyc.

Przeprowadzone przez mnie badania obejmowały:

- otrzymanie kultur *in vitro* i opracowanie metod mikrorozmnażania *S. alpina* i *S. altissima*, aby otrzymać rośliny zdolne do wzrostu w warunkach polowych
- identyfikację biologicznie czynnych związków polifenolowych i określenie ich zawartości w pozyskanym metodami biotechnologicznymi materiale. Metabolitami, na których skupiłam się w badaniach były: bajkalina, wogonozyd, luteolina, 7-O-glukozyd luteoliny oraz werbaskozyd (Ryc. 1-4).
- ocenę aktywności biologicznej (właściwości antyoksydacyjne i antyglukacyjne) ekstraktów pozyskanych z gatunków *S. alpina* i *S. altissima*

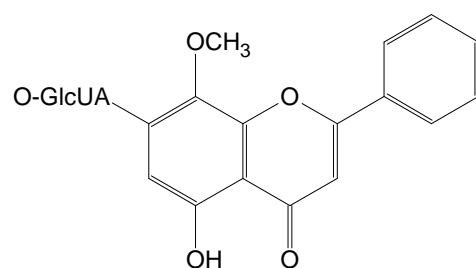
Wybrane do badań biotechnologicznych gatunki są obce polskiej florz. Obie rośliny były wykorzystywane w medycynie ludowej na przykład w Turcji (Davis 1982). W obu tych gatunkach stwierdzono obecność flawonoidów takich jak bajkalina, bajkaleina, wogonozyd, wogonina, skutelaryna czy skutelareina (Sheng i wsp. 2010). Zarówno tarczycę alpejską jak i wyniosłą można spotkać w południowej Europie, ale ich dostępność jest ograniczona. W piśmiennictwie nie ma danych na temat hodowli *in vitro* oraz właściwości biologicznych tych gatunków.

Ryc. 1. Wzór strukturalny bajkaliny



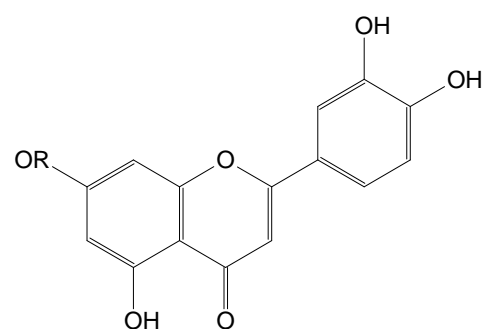
-OGlcUA –glukuronian

Ryc. 2 Wzór strukturalny wogonozydu



-OGlcUA –glukuronian

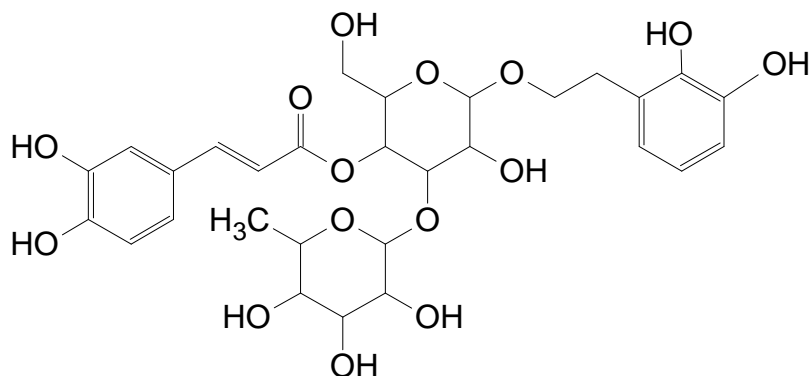
Ryc. 3 Wzór strukturalny luteoliny i jej 7-O-glukozydu



R –H: luteolina

R –glukoza:7-O-glukozyd luteoliny

Ryc 4. Wzór strukturalny werbaskozydu



Otrzymanie kultur *in vitro* i zregenerowanych roślin *S. alpina* i *S. altissima*

Kultury niezróżnicowane

Kultury kalusowe *S. alpina* zapoczątkowałam z fragmentów (liścienie, hypokotyle, korzenie) 3-tygodniowych aseptycznie wyhodowanych siewek (**publikacja H5**). Spośród kilku podłoży zastosowanych w badaniach wstępnych dla indukcji i wzrostu tkanki kalusowej tarczycy alpejskiej najkorzystniejszym okazało się podłoże MS zawierające 0,54 μM NAA i 0,9 μM TDZ, a najlepszymi eksplantatami - hypokotyle. Po kilku pasażach pochodząca z hypokotyli tkanka kalusowa rosła bardzo intensywnie i w ciągu 2 tygodni stwierdzałam około 17 –krotny przyrost świeżej masy (3,6 g na probówkę; 25 ml podłoża). Z tkanki kalusowej tarczycy alpejskiej zapoczątkowałam kulturę zawiesinową. Zawiesina rosła w płynnym podłożu MS z tymi samymi regulatorami wzrostu co kalus i była pasażowana co 2 tygodnie. Po ustabilizowaniu kultury wyznaczałam jej dynamikę wzrostu podczas 24-dniowego cyklu. Maksymalną świeżą masę kultura osiągnęła w 18 dniu hodowli (16,2 g/kolbę; 50 ml podłoża), zaś suchą w dniu 15 (0,7 g/kolbę), co odpowiadało, 17-krotnemu i 13-krotnemu przyrostowi, odpowiednio, świeżej i suchej masy (**publikacja H5**).

W toku eksperymentów nie udało mi się otrzymać niezróżnicowanych kultur kalusowych *S. altissima*. Kalusy tego gatunku charakteryzowały się zdolnością do różnicowania pąków, która utrzymywała się przez ponad 4 lata przebywania w warunkach *in vitro*.

Kultury pędów i mikrorozmnażanie

W publikacjach H4, H5, H7 opisałam procedurę mikrorozmnażania *S. alpina* z pąków szczytowych poprzez indukcję pąków i pędów bocznych. Kulturę pędów tarczycy alpejskiej otrzymałam z wierzchołkowych części siewek, które wykiełkowały z wysterylizowanych nasion na podłożu agarowym (0,7%) MS uzupełnionym kinetyną (0,1 μM) i kwasem giberelinowym (2,9 μM). Początkowo hodowlę pędów prowadziłam na stałym podłożu MS uzupełnionym IAA (kwasem indoliloctowym) w stężeniu 0,57 μM oraz BAP (benzyloaminopuryna) w stężeniu 2,2 μM (**publikacja H5**).

Po uzyskaniu kultur pędowych sprawdziłam wpływ cytokinin i zmiany konsystencji podłoża MS na współczynnik mnożenia pędów. Aby określić efekt rodzaju i stężenia cytokininy, kultury prowadziłam na agarowym podłożu MS zawierającym 0,57 μM IAA i jedną z czterech cytokinin: BAP, zeatynę, kinetynę (w stężeniach 1, 2, 4, 8 μM) lub TDZ (tidiazuron) (w stężeniu 0,2, 0,5, 1 μM) (**publikacja H4**). Najwyższy współczynnik mnożenia, wynoszący 25 pąków/pędów na eksplantat, osiągnęłam w obecności BAP w stężeniu 2 μM . W tych warunkach uzyskiwałam również bardzo wysoki przyrost świeżej i suchej masy (około 65-krotny w ciągu 5 tygodni). Jeszcze lepsze wyniki w odniesieniu do produkcji biomasy (około 75-krotny przyrost świeżej masy w ciągu 5 tygodni) osiągnęłam, kiedy stężenie benzyloaminopuryny w podłożu było wyższe (4 μM).

Wykorzystując optymalną dla proliferacji pędów kombinację regulatorów wzrostu (0,57 μM IAA i 2 μM BAP) podjęłam próbę namnażania pędów *S. alpina* w kulturze płynnej (podłoże bez agaru), a otrzymane wyniki porównałam z tymi osiągniętymi podczas hodowli na podłożu stałym (zestalonym agarem 0,7%) i półstałym (zestalonym agarem 0,35%) (**publikacja H7**). Wykorzystanie płynnej pożywki obniża koszty hodowli, a w wielu przypadkach skutkuje także wzrostem współczynnika mnożenia (Russowski i wsp. 2006; Pati i wsp. 2011; Cavallaro i wsp. 2014). Pierwsze eksperymenty z kulturą pędów *S. alpina* w płynnym podłożu zarówno w warunkach wytrząsanych (na wytrząsarce rotacyjnej; 100 rpm) jak i stacjonarnych (bez wytrząsania) zakończyły się niepowodzeniem; eksplantaty nie podejmowały wzrostu i obumierały. Wynikało to najprawdopodobniej z całkowitego zanurzenia wierzchołków pędów w pożywkę i związanej z tym ograniczonej możliwości wymiany gazowej i/lub stresu. Aby uniknąć całkowitego zanurzenia zastosowałam materiały podporowe w postaci bakteryjnej nanocelulozy (Instytut Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej) i pianki poliuretanowej (EuroFoam, Zgierz), na których umieszczałam eksplantaty (**publikacja H7**). Takie rozwiązanie pozwoliło nie tylko na zwiększenie współczynnika mnożenia

i wyższy przyrost biomasy uzyskanych pędów tarczycy alpejskiej, ale także na obniżenie kosztów hodowli poprzez usunięcie z niej agaru. W przypadku zastosowania jako materiału podporowego celulozy w ciągu 5 tygodni z jednego eksplantatu uzyskałam ponad 36 nowych pąków/pędów bocznych. Było to około 50% więcej niż w przypadku kultur prowadzonych na podłożach agarowych (stałych i półstałych). Jednocześnie otrzymywane w ten sposób pędy były dobrej jakości, a procent szklistości był bardzo niski (0,6%).

Uzyskanie korzystnych wyników w kulturze płynnej z materiałem podporowym zainspirowało mnie do zwiększenia skali i prowadzenia hodowli pędów *S. alpina* w 5 litrowym bioreaktorze rozpyłowym. Aby uniknąć całkowitego zanurzenia, eksplantaty były umieszczane na siatce ze stali nierdzewnej i tylko czasowo były spryskiwane płynnym podłożem wzrostowym MS z 0,57 μM IAA i 2 μM BAP (w cyklu 40s rozpylania podłoża i 2-minutowa przerwa w rozpylaniu) (**publikacja H7**). W ten sposób z inokulatu liczącego 15 wierzchołków pędów po 5 tygodniach otrzymywałam około 450 pąków lub pędów bocznych, co wskazuje, że współczynnik mnożenia pędów w bioreaktorze rozpyłowym wynosił prawie 30 i był niższy w porównaniu z kulturą prowadzoną w podłożu płynnym z wykorzystaniem nanocelulozy, ale wyższy niż w hodowli na podłożu stałym i półstałym. Korzystny był również wysoki przyrost biomasy, najwyższy spośród wszystkich zastosowanych systemów dla hodowli pędów *S. alpina*, co pozwoliło na uzyskanie w ciągu jednego cyklu pracy bioreaktora przy wykorzystaniu 1 L podłoża dużej ilości materiału roślinnego (ponad 18 g świeżej i 1,64 g suchej masy) do badań fitochemicznych (**publikacja H7**).

Namnożone na stałym, półstałym i w płynnym podłożu pędy *S. alpina* ukorzeniałam w ciągu 4 tygodni na agarowym podłożu $\frac{1}{2}$ MS (podłoże MS ze zredukowaną do połowy zawartością makro- i mikroelementów) bez regulatorów wzrostu (**publikacja H5, H7**). Stwierdziłam, że zdolność do tworzenia korzeni zależała od konsystencji podłoża użytego dla proliferacji pędów. Pędy namnażane na podłożach agarowych (podłoże stałe i półstałe) ukorzeniały się w ponad 90%. W przypadku pędów pozyskanych z podłoży płynnych, procent ukorzeniań był niższy i wynosił 72 lub 84%, w zależności od zastosowanego w podłożu do namnażania materiału podporowego (pianka poliuretanowa, nanoceluloza). Ukorzenione pędy tarczycy alpejskiej przenosiłam do doniczek zawierających wysterylizowaną mieszaninę piasku, torfu i ziemi ogrodniczej i umieszczałam w szklarni. Rośliny bardzo dobrze się aklimatyzowały. Na tym etapie nie obserwowałam już różnic w przeżywalności roślin pochodzących z różnych systemów hodowlanych.

Po 12 tygodniach wzrostu w glebie współczynnik przeżywalności roślin wynosił 95-98%. Otrzymane rośliny przenoszono do uprawy w warunkach polowych (Ogród Roślin Leczniczych), gdzie zakwitły w drugim roku wegetacji (**publikacja H5, H7**).

W przypadku drugiego badanego przez mnie gatunku, *S. altissima*, opracowałam procedurę mikrorozmnażania poprzez indukcję pąków bocznych oraz drogą organogenezy poprzez indukcję pąków przybyszowych zregenerowanych z tkanki kalusowej (**publikacja H1, H2**).

W celu otrzymania organogenego kalusa eksplantaty pochodzące ze sterylnych siewek (liścienie, hypokotyle, korzenie) wykladałam na agarowe (0,7%) podłoża MS i SH (Schenka i Hildebrandta 1972) uzupełnione różnymi kombinacjami regulatorów wzrostu. Spośród stosowanych w doświadczeniu wariantów pożywek do dalszych badań wybrałam dwie: MS z 0,54 μM NAA (kwas naftylo-1-octowy) i 0,9 μM TDZ oraz SH z 0,54 μM NAA, 0,89 μM BAP i 2,26 μM 2,4-D (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy) (**publikacja H1**). Najlepszą odpowiedź w postaci formowania intensywnie rosnącego, regenerującego pąki kalusa uzyskałam na eksplantatach pochodzących z hypokotyli. Szczególnie intensywna indukcja pąków zachodziła na kalusach hodowanych na podłożu SH. W tych warunkach podczas pojedynczego 6-tygodniowego pasażu uzyskiwałam średnio 13 nowych pędów. Na podłożu MS w tym czasie na kalusie powstawało około 5 pędów. Proliferacja pędów na podłożu SH odbywała się jednak kosztem wzrostu kalusa. Aby zapobiec całkowitej redukcji tkanki kalusowej i zapewnić ciągłość hodowli, kulturę prowadziłam w ciemności. W tych warunkach obserwowałam intensywny wzrost kalusa bez obniżenia współczynnika indukcji pąków, chociaż proces rozwoju pąków był wolniejszy. Okres hodowli trzeba było wydłużyć z 6 do 8 tygodni, aby uzyskane pędy osiągnęły długość i morfologię odpowiednią do ukorzeniania. Pędy rosnące w ciemności były wyjątkowo cienkie, wiotkie, miały bardzo drobne często etiolowane liście i wymagały przeniesienia na światło, aby odzyskać pokrój typowy dla pędów *S. altissima*.

Obie otrzymane linie kalusowe (ta hodowana na podłożu SH oraz ta rosnąca na podłożu MS) były zdolne do indukcji pędów przez ponad 4 lata i utrzymywały wysoki współczynnik mnożenia. Jak wiadomo długo pasażowane kultury hodowane na podłożach z dodatkiem regulatorów wzrostu mogą być podatne na zmiany na poziomie genetycznym i epigenetycznym określane zmiennością somaklonalną (Larkin i Snowcroft 1981). Z tego względu po okresie 2 lat postanowiłam ocenić stabilność genetyczną pędów *S. altissima* pozyskiwanych z kalusa na obu podłożach (MS, SH). Jako materiał kontrolny użyłam siewki wyhodowane z nasion w doniczkach w warunkach szklarniowych. W badaniach

wykorzystałam analizę molekularną ISSR (**publikacja H1**). Do analizy zastosowałam 8 primerów stosowanych wcześniej w badaniach z różnymi innymi gatunkami *Scutellaria*. Dawały one po reakcji PCR z wyizolowanym z materiału roślinnego DNA dobrze widoczne, policzalne prążki na żelu agarozowym. Całkowita ilość prążków w zależności od zastosowanego primera wahała się od 1 do 10. Wielkość odpowiadających im produktów amplifikacji wynosiła od 300 do 1100 par zasad. Obraz prążków (ich liczba i położenie) otrzymany w przypadku wszystkich primerów nie różnił się dla DNA wyizolowanego z pędów zregenerowanych z dwuletnich kultur kalusowych (linii hodowanej na podłożu MS z 0,54 μM NAA i 0,9 μM TDZ oraz linii z podłoża SH z 0,54 μM NAA, 0,89 μM BAP i 2,26 μM 2,4-D) i dla DNA siewek, co oznacza, że pędy przybyszowe zregenerowane z tkanki kalusowej były identyczne z roślinami otrzymywanymi z nasion, a kalus przez długi okres czasu charakteryzował się wysoką stabilnością genetyczną (**publikacja H1**).

Dla mikrorozmnażania *S. altissima* wykorzystywałam również pąki boczne. Ich proliferację prowadziłam na stałym (0,7% agar) podłożu MS uzupełnionym auksyną (IAA w stężeniu 0,57 μM) oraz różnymi cytokininami: zeatyną, kinetyną, BAP (w stężeniach 1, 2, 4, 8 μM) oraz TDZ (w stężeniu 0,2, 0,5, 1 μM) (**publikacja H8**). Tak jak w przypadku tarczycy alpejskiej do mnożenia pędów przy udziale istniejących merystemów optymalne okazało się podłoże z dodatkiem BAP (2 -8 μM), ale w przypadku tego gatunku współczynnik mnożenia był znacznie niższy (6 nowych pędów/pąków bocznych w ciągu 5 tygodni). Kultura pędów hodowana na podłożach zawierających BAP w wyższych stężeniach (4, 8 μM) dawała także najwyższe przyrosty biomasy, chociaż w przypadku tego ostatniego parametru podobne wyniki osiągnęłam na podłożach uzupełnianych TDZ w stężeniu 0,5 i 1 μM (**publikacja H8**).

Uzyskane na drodze namnażania pędy boczne i przybyszowe *S. altissima* przenosiłam bezpośrednio do doniczek zawierających wysterylizowaną mieszaninę piasku, torfu i ziemi ogrodniczej i ukorzeniałam *ex vitro* w szklarni (**publikacja H1, H2, H8**). Rośliny bardzo dobrze się aklimatyzowały. Po 12 tygodniach wzrostu w glebie, przeżywało 90% roślin pochodzących z pędów przybyszowych indukowanych na kalusie hodowanym na podłożu SH oraz 95% pędów przybyszowych uzyskanych z organogenego kalusa rosnącego na podłożu MS oraz pędów bocznych otrzymanych z istniejących merystemów. Otrzymane rośliny po okresie aklimatyzacji przenosiłam do uprawy w warunkach polowych (Ogród Roślin Leczniczych), gdzie osiągały dojrzałość i zakwitały.

Identyfikacja biologicznie czynnych związków polifenolowych i określenie ich zawartości

Otrzymany metodami biotechnologicznymi materiał roślinny analizowałam fitochemicznie w odniesieniu do zawartości wybranych związków polifenolowych. W metanolowo-wodnych ekstraktach *S. alpina* i *S. altissima* wykorzystując metodę UHPLC (ang. Ultra High Pressure Liquid Chromatography) stwierdziłam obecność werbaskozydu, bajkaliny, wogonozydu, luteoliny oraz 7-*O*-glukozydu luteoliny. Identyfikacji związków dokonywałam na podstawie porównania czasów retencji, widm UV i widm masowych metabolitów w badanych próbkach z tymi dla związków wzorcowych. Dokładny opis analizy ekstraktów i identyfikacji obecnych w nich związków przedstawiłam w **publikacjach H1, H2, H5, H8**.

Zawartość analizowanych metabolitów w materiale uzyskanym z hodowli *in vitro* (kultury kalusowe, kultura zawieszinowa, kultury pędów, zregenerowane *in vitro* rośliny) *S. alpina* i *S. altissima* porównywałam z ich poziomem w korzeniach i pędach roślin rosnących w glebie i otrzymanych z nasion pochodzących z tego samego źródła, co nasiona dla zapoczątkowania kultur *in vitro*.

Związki polifenolowe w kulturach *in vitro* *S. alpina*

Wytwarzanie metabolitów badałam w nieodróżnicowanej morfologicznie kulturze kalusowej i zawieszinowej *S. alpina* hodowanych, odpowiednio, na stałym lub w płynnym podłożu MS uzupełnionym 0,54 μM NAA i 0,9 μM TDZ (**publikacja H5**), a także w kulturze pędów prowadzonej w obecności różnych cytokinin na stałym (0,7% agar) podłożu MS (**publikacja H4, H5**) oraz po zmianie konsystencji podłoża na płynne (bez agaru) i półpłynne (0,35% agar) (**publikacja H7**).

Kultury kalusowe i zawieszinowe

Zapoczątkowana z hypokotylu tkanka kalusowa hodowana na podłożu MS uzupełnionym 0,54 μM NAA i 0,9 μM TDZ charakteryzowała się wysokim poziomem metabolitów (werbaskozyd, bajkalina, wogonozyd, luteolina), wśród których dominowała bajkalina (**publikacja H5**). Aby ocenić dynamikę akumulacji metabolitów w trakcie cyklu wzrostu kultury i ustalić czas optymalny dla ich biosyntezy, oznaczenia zawartości związków aktywnych prowadziłam co 5 dni w ciągu 25 dni hodowli. Stwierdziłam,

że zawartość wszystkich analizowanych metabolitów w tkance kalusowej zmieniała się w podobny sposób, osiągając maksimum w 15 dniu hodowli, czyli w czasie kiedy kultura wchodziła w fazę stacjonarną i biomasa była najwyższa. W tym czasie zawartości werbaskozydu (9 mg/g s.m.) i luteoliny (3,9 mg/g s.m.) w kalusie były wyższe, zaś poziom bajkaliny (16,9 mg/g s.m.) i wogonozydu (10,4 mg/g s.m.) tylko nieco niższy od tych stwierdzonych w korzeniach otrzymanych konwencjonalnie (z nasion) roślin *S. alpina*.

Aby ocenić stabilność uzyskanej kultury kalusowej, badałam również jak zmieniała się zawartość flawonoidów i werbaskozydu z wiekiem kalusa. Największe różnice w poziomie metabolitów obserwowałam na początku hodowli w młodej kulturze kalusowej między 10 i 20 pasażem (każdy trwający 14 dni); przykładowo kalus po 20 pasażach (kultura 10-miesięczna) wytwarzał 40% więcej bajkaliny niż kalus po 10 pasażach (kultura 5-miesięczna) (21,4 mg/g s.m. vs. 15,4 mg/g s.m.). Badania wykazały, że najwięcej metabolitów zawierała 1,5-letnia tkanka kalusowa (po 40 pasażach); w tym kalusie zawartości werbaskozydu, bajkaliny, wogonozydu i luteoliny wynosiły: 10,5, 26,3, 14 i 4,5 mg/g s.m. W kolejnych pasażach zmiany w stężeniu metabolitów były niewielkie (maksymalnie 20% różnice) i zależały od analizowanego związku. Ta wysoko produktywna tkanka kalusowa *S. alpina* charakteryzowała się także wysokim przyrostem biomasy (17-krotny w ciągu 2 tygodni), co pozwoliło uznać ją za dobre i stabilne źródło badanych metabolitów (**publikacja H5**).

Otrzymana z kalusa i rosnąca na podłożu o tym samym składzie (MS z 0,54 μ M NAA i 0,9 μ M TDZ), kultura zawieszinowa tarczycy alpejskiej produkowała także znaczne ilości analizowanych związków, ale w odniesieniu do flawonów były to poziomy 2-krotnie niższe niż w kalusie. Z drugiej strony zawartość werbaskozydu w zawiesinie osiągała wartość 36,4 mg/g s.m., czyli była 5 razy wyższa niż w korzeniach i ponad 11 razy wyższa niż w pędach dwuletnich otrzymanych z nasion roślin *S. alpina* (**publikacja H3, H5**). Poziom związków w kulturze zmieniał się podczas cyklu wzrostu, ale każdy z nich osiągał maksimum w czasie fazy stacjonarnej (od 12 do 18 dnia) (**publikacja H5**). Biorąc pod uwagę wiek kultury, najwyższe zawartości metabolitów stwierdziłam w komórkach rosnących przez 20-25 pasaży (9-12 miesięcy w kulturze *in vitro*). Wydajność tej kultury po 2 tygodniach wzrostu w przeliczeniu na 1 litr podłoża wynosiła: ponad 500 mg werbaskozydu, 250 mg bajkaliny, 160 mg wogonozydu i prawie 60 mg luteoliny. Po roku hodowli poziom flawonoidów w zawiesinie obniżył się (o 12-25%), podczas gdy zawartość werbaskozydu cały czas utrzymywała się na stałym wysokim poziomie (**publikacja H5**).

Kultury pędów

Zawartości związków biologicznie czynnych w ekstraktach z pędów *S. alpina* oznaczałam podczas ich kilkuletniej hodowli (ponad 3 i pół roku) na stałym podłożu MS uzupełnionym 0,57 μM IAA oraz 2,2 μM BAP. Najwyższe poziomy flawonoidów stwierdziłam w półtorarocznej kulturze *in vitro*. Wynosiły one dla bajkaliny: 11,7 mg/g s.m., dla wogonozydu: 3,2 mg/g s.m., a dla luteoliny: 3,35 mg/g s.m. Po kolejnym roku zawartość tych związków w pędach wyraźnie obniżyła się (o około 35-50%). W odniesieniu do werbaskozydu najwięcej tego fenyloetanoidu wytwarzały młode pędy, po 6 pasażach (ponad 8 mg/g s.m.); w starszych kulturach poziom tego związku był nawet o 25% niższy (**publikacja H5**).

Aby zwiększyć biosyntezę metabolitów, kultury pędów *S. alpina* prowadziłam na agarowym podłożu MS z 0,57 μM IAA uzupełnianym różnymi cytokininami (BAP, kinetyna, zeatyna, TDZ) w różnych stężeniach (**publikacja H4**). Dla wytwarzania luteoliny i jej glukozydu najefektywniejsze okazało się podłoże zawierające BAP w stężeniu 2 μM . Hodowane na tym podłożu pędy wytwarzały 3,35 mg/g s.m. luteoliny i 1,68 mg/g s.m. 7-*O*-glukozydu luteoliny. W przypadku pozostałych metabolitów najlepsze wyniki uzyskałam na podłożu MS uzupełnionym tidiazuronem. Po 5 tygodniach wzrostu w obecności 0,5 μM TDZ zawartości bajkaliny, wogonozydu i werbaskozydu w pędach wynosiły, odpowiednio, 18,79 mg/g s.m., 7,04 mg/g s.m. oraz 9,76 mg/g s.m. i były 1,5-9 razy wyższe niż w pędach kontrolnych hodowanych na podłożu z dodatkiem samej auksyny (0,57 μM IAA) (**publikacja H4**).

W publikacji H7 opisałam wpływ konsystencji podłoża na wytwarzanie wtórnych metabolitów w kulturze pędów. W doświadczeniach zastosowałam podłoże: stałe (agar 0,7%), półstałe (0,35%) i płynne (bez agaru). Aby chronić eksplantaty przed całkowitym zanurzeniem w płynnym podłożu stosowałam materiały podporowe (nanoceluloza, pianka poliuretanowa). Pędy *S. alpina* rosnące w systemie płynnym wykorzystującym jako podporę bionanocelulozę wytwarzały 1,5-2 razy więcej badanych związków w porównaniu do pędów rosnących na stałym podłożu MS o tym samym składzie regulatorów wzrostu. Ponadto kultura pędów w płynnej pożywce charakteryzowała się 4-krotnie wyższym przyrostem biomasy w porównaniu z podłożem stałym, co pozwoliło na uzyskanie wyższych ilości metabolitów podczas cyklu wzrostu (5 tygodni).

Obserwacje dotyczące wzrostu kultury pędów i produkcji metabolitów w systemach płynnych ułatwiły mi ustalenie warunków odpowiednich dla zwiększenia skali hodowli. W doświadczeniach zastosowałam bioreaktor aeroponiczny, w którym materiał roślinny

umieszcza się na siatce ze stali nierdzewnej i okresowo spryskuje płynnym podłożem. Zawartość bajkaliny (15,18 mg/g s.m.), wogonozydu (4,08 mg/g s.m.) i luteoliny (5,15 mg/g s.m.) w pędach rosnących w bioreaktorze była zbliżona do tej stwierdzonej w pędach hodowanych w płynnej pożywce z bionanocelulozą. Z drugiej strony poziomy werbaskozydu (6,95 mg/g s.m.) i glukozydu luteoliny (1,45 mg/g s.m.) w pędach z bioreaktora były niższe, porównywalne do tych w kulturach stałych. Po uwzględnieniu przyrostu biomasy (ponad 18 g w ciągu 5 tygodni) produkcja metabolitów w bioreaktorze (w mg/L podłoża) osiągała wartość: 11,4 dla werbaskozydu, 24,9 dla bajkaliny, 6,7 dla wogonozydu, 8,45 dla luteoliny i 2,4 dla 7-O-glukozydu luteoliny. Wysoki przyrost biomasy i prawidłowa morfologia uzyskanych pędów pozwalają przypuszczać, że możliwe będzie dalsze zwiększenie produkcji metabolitów w pędach tarczycy alpejskiej hodowanych w bioreaktorze aeroponicznym poprzez optymalizację wielkości inokulatu czy kontaktu pomiędzy materiałem roślinnym i podłożem wzrostowym (czas i ilość aplikowanej pożywki).

Zregenerowane *in vitro* rośliny

Z namnożonych i ukorzenionych w warunkach *in vitro* pędów otrzymałam rośliny *S. alpina*, w których po dwóch latach hodowli w warunkach polowych określałam (osobno w pędach i korzeniach) zawartość badanych metabolitów (**publikacja H5**). Stwierdziłam, że korzenie były lepszym źródłem bajkaliny (ponad 20 mg/g s.m.) i wogonozydu (12,68 mg/g s.m.) niż części pędowe (po 1,29 mg/g s.m. obu związków). Te ostatnie wytwarzały natomiast więcej werbaskozydu (9,71 mg/g s.m. vs. 7,16 mg/g s.m.) (**publikacja H5**).

Zawartość metabolitów w organach (pędy korzenie) zregenerowanych *in vitro* roślin porównywałam z tą uzyskaną dla roślin tarczycy alpejskiej wyhodowanych z nasion i rosnących w tych samych warunkach, co rośliny otrzymane w wyniku mikrorozmnażania. Wszystkie analizowane rośliny były zbierane w stadium kwitnienia. Zaobserwowałam istotne różnice w zawartości werbaskozydu, którego poziom w ekstraktach z części nadziemnych zregenerowanych *in vitro* roślin było 3-krotnie wyższy niż w roślinach macierzystych. Pędy otrzymanych z nasion roślin *S. alpina* charakteryzowały się niską zawartością bajkaliny i wogonozydu (ok. 4 mg/g s.m.), ale ich poziom w tym materiale roślinnym był wyższy niż w częściach nadziemnych roślin uzyskanych na drodze mikrorozmnażania (ok. 1,3 mg/g s.m.). Nie stwierdziłam natomiast wyraźnych różnic w wytwarzaniu związków w korzeniach roślin *S. alpina* rozmnażanych z nasion i pochodzących z hodowli *in vitro*. (**publikacja H3, H5**).

Związki polifenolowe w kulturach *in vitro* *S. altissima*

Zawartość metabolitów oceniałam w dwóch kaulogennych liniach kalusowych *S. altissima* hodowanych na stałych podłożach SH z 0,54 μM NAA, 0,89 μM BAP i 2,26 μM 2,4-D oraz MS uzupełnionym 0,54 μM NAA i 0,9 μM TDZ (**publikacja H1**), a także w kulturze pędów bocznych prowadzonej w obecności różnych cytokinin na stałym podłożu MS (0,7% agar) (**publikacja H2, H8**).

Kultury kalusowe

Zawartość metabolitów oceniałam w dwóch organogennych kalusach po roku i dwóch latach przebywania w warunkach *in vitro*. Najwięcej flawonoidów stwierdziłam w 2-letniej linii kalusowej hodowanej na podłożu SH z 0,54 μM NAA, 0,89 μM BAP oraz 2,26 μM 2,4-D (**publikacja H1**); tkanka zawierała około 32 mg/g s.m. bajkaliny i 7,5 mg/g s.m. wogonozydu. Były to poziomy znacznie wyższe niż w korzeniach roślin macierzystych pochodzących z 2-letniej uprawy. W przypadku werbaskozydu bardziej wydajną linią był kalus rosnący na podłożu MS uzupełnionym 0,54 μM NAA i 0,9 μM TDZ, który wytwarzał 2-krotnie więcej tego związku w porównaniu z linią hodowaną na podłożu SH (**publikacja H1**).

Kultury pędów

Przedmiotem badań fitochemicznych była również kultura pędów *S. altissima* zapoczątkowana z wierzchołkowych części siewek i prowadzona przez 4 lata na stałym podłożu MS uzupełnionym 0,57 μM IAA i 2,2 μM BAP. Wytwarzanie bioaktywnych metabolitów zachodziło najefektywniej w kulturze pędów po okresie około półtora roku przebywania w warunkach *in vitro*. W tym czasie poziom werbaskozydu w pędach dochodził prawie do 5 mg/g s.m. i był dwukrotnie wyższy niż w korzeniach i 3-krotnie wyższy niż w częściach nadziemnych rosnących w gruncie dwuletnich roślin. Kultura pędów *S. altissima* wytwarzała także luteolinę (ok 3,5 mg/g s.m.), bajkalinę (do 3 mg/g s.m.) i wogonozyd (do 1 mg/g s.m.), których poziomy były wyższe niż w częściach nadziemnych otrzymanych z nasion roślin hodowanych przez okres 2 lat w glebie, jednak w przypadku bajkaliny i wogonozydu znacznie niższe niż w korzeniach tych roślin (**publikacja H2**). Warto także podkreślić, że biosynteza metabolitów wtórnych w kulturze pędów *S. altissima* utrzymywała się na stałym poziomie w ciągu prawie 4 lat.

W kolejnych badaniach oceniałam wpływ różnych stężeń i typów cytokinin na biosyntezę polifenoli w kulturze pędów tarczycy wyniosłej (**publikacja H8**). Spośród

czterech zastosowanych cytokinin (BAP, kinetyna, zeatyna, TDZ), które dodawałam do podłoża MS zestalonego agarem i uzupełnionego 0,57 μM IAA, najkorzystniejszą okazał się TDZ. W obecności tej cytokiny w stężeniu 1 μM głównym metabolitem była bajkalina; jej zawartość zwiększyła się 3-krotnie w porównaniu z pędami hodowanymi na podłożu kontrolnym (podłoże MS uzupełnione tylko auksyną) (6,99 mg/g s.m. vs. 2,22 mg/g s.m.). TDZ zwiększał również sześciokrotnie poziom werbaskozydu (6,2 mg/g s.m. vs. 1,03 mg/g s.m. na podłożu z dodatkiem samej auksyny) (**publikacja H8**).

Zregenerowane *in vitro* rośliny

Do badań fitochemicznych wykorzystałam części nadziemne i podziemne zregenerowanych *in vitro* rosnących w glebie roślin *S. altissima* zebranych w stadium kwitnienia. Głównym miejscem akumulacji flawonów typowych dla rodzaju *Scutellaria* okazały się korzenie tych roślin, w których stwierdziłam 22,15 mg/g s.m. bajkaliny i 6,92 mg/g s.m. wogonozydu, podczas gdy ekstrakty z części nadziemnych zawierały te związki jedynie w ilości po 0,3 mg/g s.m. W tych ekstraktach dominującymi metabolitami była luteolina (2,1 mg/g s.m.) i jej glukozyd (3,1 mg/g s.m.). Analiza porównawcza ekstraktów z korzeni i pędów roślin zregenerowanych *in vitro* i tych wyprowadzonych z nasion nie wykazała istotnych różnic w zawartości poszczególnych związków polifenolowych (**publikacja H2**).

Ocena aktywności biologicznej ekstraktów pozyskanych z gatunków *S. alpina* i *S. altissima*

W pracach określałam również aktywność przeciwutleniającą oraz przeciwglikacyjną ekstraktów uzyskanych z obu badanych przeze mnie gatunków tarczyc (**publikacja H2, H3, H4, H6**).

Aktywność antyoksydacyjna ekstraktów z *S. alpina*

Potencjał przeciwutleniający ekstraktów z pędów *S. alpina* oceniałam stosując dwa testy bazujące na mechanizmie SET (single electron transfer): test FRAP (według Pulido i wsp. 2000) określający zdolność ekstraktów do hamowania redukcji jonów żelaza i test zobojętniania wolnych rodników ABTS (2,2-azynobis(3etylobenzotiazolino-6-sulfonian))

według metody Re i wsp. (1999) (**publikacja H4**). Badane ekstrakty pochodziły z pędów hodowanych na podłożu MS uzupełnionym różnymi cytokininami (BAP, kinetyna, zeatyna, TDZ). Dla ekstraktów z tarczycy alpejskiej aktywność „zmiatania” wolnych rodników wyrażona jako wartość EC_{50} (stężenie ekstraktu, przy którym zawartość wolnego rodnika zmniejszyła się o połowę) zawierała się w granicach od 28,3 do 118,6 $\mu\text{g/mL}$, a zdolność redukcji jonów żelaza wynosiła pomiędzy 265,7 i 775,6 $\mu\text{M Fe(II)/g s.m.}$ ekstraktu. Na podstawie wyników obu testów stwierdziłam, iż najwyższy potencjał antyoksydacyjny wykazywał ekstrakt z pędów hodowanych w obecności 0,5 μM TDZ jako cytokininy, który charakteryzował się także najwyższym poziomem analizowanych metabolitów. Najsłabsze właściwości przeciwutleniające obserwowałam w odniesieniu do ekstraktów z pędów hodowanych na podłożu kontrolnym (bez cytokinin) oraz podłożach jako cytokininę zawierających zeatynę w stężeniu 2 i 4 μM . Przeprowadzona przez mnie analiza korelacji wykazała, silną zależność pomiędzy zawartością oznaczanych przeze mnie w ekstraktach metabolitów i wynikami testów antyoksydacyjnych ($r = -0,93$ dla testu ABTS oraz $r = 0,97$ dla testu FRAP). Związkiem, którego zawartość w pędach najsilniej wiązała się z aktywnością przeciwutleniającą ekstraktów była bajkalina ($r = -0,93$ dla testu ABTS i $r = 0,95$ dla testu FRAP) (**publikacja H4**). W **publikacji H6** oceniałam aktywność antyoksydacyjną ekstraktów z korzeni i części nadziemnych roślin tarczycy alpejskiej zapoczątkowanych z nasion. W tych badaniach zastosowałam test FRAP, test oparty na zobojętnianiu wolnych rodników DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) (Brand-Williams i wsp. 1995) oraz test zahamowania peroksydacji lipidów TBARS (Choi i wsp. 2002), bazujący na mechanizmie HAT (hydrogen atom transfer), najlepiej odnoszący się do układów biologicznych. Stwierdziłam, że ekstrakt z korzeni *S. alpina* będący dobrym źródłem analizowanych metabolitów, zwłaszcza bajkaliny i wogonozydu, charakteryzował się szczególnie wysokim potencjałem przeciwutleniającym; jego zdolność redukcji jonów żelaza wynosiła 718 $\mu\text{M Fe(II)/g s.m.}$ ekstraktu, siła „zmiatania” rodnika DPPH wyrażona jako wartość EC_{50} 69 $\mu\text{g/mL}$, a zdolność do zahamowania utleniania kwasu linolowego przy stężeniu ekstrakt 250 $\mu\text{g/L}$ 60% (**publikacja H6**).

Otrzymane z pędów i korzeni 2-letnich roślin *S. alpina* ekstrakty badałam również w zakresie możliwości ich zastosowania dla ochrony składników osocza krwi ludzkiej przez skutkami stresu oksydacyjnego (**publikacja H3**). Czynnikiem indukującym stres oksydacyjny użytymi w doświadczeniu był nadtlenek wodoru oraz mieszanina nadtlenku wodoru z żelazem. Aktywność antyoksydacyjną ekstraktów oceniałam na podstawie ich zdolności do hamowania tworzenia anionorodnika nadtlenkowego (O_2^-) (Ando i Steiner

1973) oraz obniżenia poziomu powstających reaktywnych produktów rozpadu kwasów tłuszczowych, będących biomarkerami peroksydacji lipidów, które dają barwne połączenia z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) (Rice-Evans i wsp. 1991). Badane ekstrakty w stężeniu 50 µg/mL w istotny sposób hamowały peroksydację lipidów w osoczu. Dla wyciągu z korzeni tarczycy alpejskiej przy zastosowaniu układu $H_2O_2+Fe^{2+}$ jako induktora, poziom powstawania produktów utleniania lipidów spadał prawie o 60%. W przypadku ekstraktu z części nadziemnych wartość ta była niższa i wynosiła ok. 45%. Oba ekstrakty charakteryzowały się również wysoką zdolnością hamowania utleniania grup tiolowych w białkach. Liczba wolnych grup tiolowych w próbkach po wywołaniu indukowanego stresu oksydacyjnego w obecności ekstraktów z tarczycy alpejskiej wzrastała 4-krotnie w porównaniu z kontrolą, którą stanowiło osocze z czynnikiem indukującym stres (H_2O_2 lub $H_2O_2+Fe^{2+}$) bez ekstraktów (**publikacja H3**).

Aktywność antyoksydacyjna ekstraktów z *S. altissima*

W **publikacji H2** określałam potencjał antyoksydacyjny ekstraktów pozyskanych z kultur pędów, części naziemnych i podziemnych roślin zregenerowanych *in vitro* oraz zapoczątkowanych z nasion. Do tego celu wykorzystałam trzy testy: „zmiatania” wolnych rodników ABTS, redukcji jonów żelaza oraz zahamowania peroksydacji lipidów. Równocześnie wykorzystując metodę spektrofotometryczną w ekstraktach oznaczałam całkowitą zawartość flawonoidów i polifenoli (**publikacja H2**). Najsilniejszą aktywność we wszystkich testach wykazywał ekstrakt z korzeni roślin zregenerowanych *in vitro*, będący również spośród badanych ekstraktów najlepszym źródłem flawonoidów. Jego zdolność redukcji jonów żelaza wynosiła ponad 500 µM Fe(II)/g s.m. ekstraktu, siła „zmiatania” rodnika ABTS wyrażona jako wartość EC_{50} 30,2 µg/mL, a zdolność do zahamowania utleniania kwasu linolowego 30%, kiedy ekstrakt zastosowano w stężeniu 100 µg/mL oraz 50% przy stężeniu ekstraktu 250 µg/mL. Wielkość współczynnika korelacji wskazuje na istnienie silnej korelacji pomiędzy całkowitą zawartością polifenoli w ekstraktach *S. altissima* i ich aktywnością przeciwutleniającą określoną metodami FRAP i ABTS (odpowiednio, $r = 0,90$ i $r = 0,93$) oraz nieco słabszą dla testu peroksydacji lipidów ($r = 0,64$) (**publikacja H2**).

Dalsze badania dotyczyły zahamowania reakcji utleniania przebiegających w osoczu ludzkim pod wpływem stresu oksydacyjnego przez ekstrakty z korzeni i pędów wyhodowanych z nasion roślin tarczycy wyniosłej (**publikacja H3**). Oba ekstrakty w stężeniu 50 µg/mL charakteryzowały się zbliżonym poziomem zahamowania utleniania

lipidów, który przy czynniku wyzwalającym w postaci $H_2O_2+Fe^{2+}$ wynosił 44-47%. Jednocześnie obserwowałam trzykrotnie wyższy poziom w surowicy wolnych nieutlenionych grup tiolowych stanowiących mierzalny biomarker zahamowania powstawania anionorodnika nadtlenkowego w obecności ekstraktu z pędów i czterokrotnie wyższy w przypadku ekstraktu z korzeni w porównaniu z kontrolą (osocze z czynnikiem indukującym stres bez ekstraktów) (**publikacja H3**).

Przedstawione wyniki dotyczące badań aktywności antyoksydacyjnej obu gatunków rodzaju *Scutellaria* wskazują, iż mogą one stanowić dobre źródło naturalnych antyoksydantów i w związku z tym mogą być wykorzystywane w profilaktyce chorób układu krążenia, chorób nowotworowych czy neurodegeneracyjnych. Nie zauważyłam wyraźnych różnic w działaniu przeciwutleniającym ekstraktów z pędów i korzeni roślin, chociaż części podziemne akumulują bajkalinę i wogonozyd w znacznie wyższej ilości. Porównanie całkowitej zawartości flawonoidów i polifenoli w ekstraktach z części podziemnych i nadziemnych dla obu gatunków sugeruje, że istotny udział w aktywności antyoksydacyjnej mogą mieć także inne polifenole obecne w ekstraktach. Z drugiej strony wykazałam wyraźne różnice w aktywności przeciwutleniającej ekstraktów *S. alpina* i *S. altissima*. Wyższy potencjał antyoksydacyjny ekstraktów z tarczycy alpejskiej niewątpliwie ma związek z wyższą zawartością w nich związków polifenolowych.

Aktywność antyglykacyjna

Dane piśmiennictwa donoszą, że surowce o właściwościach przeciwutleniających mogą przeciwdziałać długoterminowym powikłaniom cukrzycy (Sero i wsp. 2013; Matsuda i wsp. 2003). Przewlekła hiperglikemia jest bowiem między innymi odpowiedzialna za nadprodukcję wolnych rodników i związany z tym stres oksydacyjny oraz nasilone wytwarzanie końcowych produktów zaawansowanej glikacji białek (AGE). Glikacja jest nieenzymatyczną reakcją tworzenia połączeń pomiędzy grupami aminowymi białek i karbonylowymi cukrów redukujących takich jak glukoza. Początkowo są to układy mało stabilne i odwracalne, ale ostatecznie powstają związki trwałe, które prowadzą do strukturalnych i funkcjonalnych modyfikacji w białkach. Glikacja pobudza też powstawanie reaktywnych form tlenu, które indukują utlenianie lipidów, fragmentację kwasów nukleinowych i jeszcze bardziej nasilają sam proces glikacji (Sero i wsp. 2013). Przewlekłymi następstwami powstawania glikowanego kolagenu jest obniżenie sprężystości ścian naczyń krwionośnych, co nie tylko przyspiesza rozwój zmian miażdżycowych, ale także prowadzi do takich powikłań jak retinopatia, zaćma, nefropatia

czy neuropatia cukrzycowa. Ponadto wysoki poziom AGE we krwi podwyższa ryzyko wystąpienia niektórych nowotworów i przyspiesza starzenie się organizmów. Od wieków niektóre gatunki roślin są stosowane jako surowce obniżające poziom cukru we krwi. Prowadzone w ostatnich latach badania dowiodły, że skuteczność surowców roślinnych w ich walce z następstwami cukrzycy może być też oparta na aktywności przeciwutleniającej i udziale w redukcji stresu oksydacyjnego oraz na bezpośrednim zahamowaniu powstawania lub neutralizowaniu powstających końcowych produktów zaawansowanej glikacji białek. Ze względu na wstępne doniesienia, iż niektóre flawonoidy wykazujące aktywność antyoksydacyjną, hamowały również tworzenie się AGE (Matsuda i wsp. 2003), a badane przeze mnie surowce charakteryzowała silna aktywność przeciwutleniająca, w kolejnych doświadczeniach skupiłam się na określeniu potencjału antyglykacyjnego ekstraktów z pędów i korzeni roślin *S. alpina* i *S. altissima* (**publikacja H6**). W badaniach wykorzystałam także obecne w ekstraktach bioaktywne metabolity z grupy polifenoli: bajkalinę, wogonozyd, luteolinę, 7-*O*-glikozyd luteoliny i werbaskozyd. Do oznaczeń zastosowałam bogatą w albuminy surowicę wołową, a jako czynnik inicjujący glikację mieszaninę cukrów redukujących w postaci glukozy i fruktozy. Poziom tworzenia się produktów zaawansowanej glikacji monitorowałam przy udziale metody fluorescencyjnej wykorzystującej fale o maksimum wzbudzenia i emisji, odpowiednio 335 nm i 385 nm. Spadek fluorescencji określany w procentach wskazywał na zahamowanie tworzenia AGE w obecności ekstraktu/związku w porównaniu z kontrolą, którą stanowiła mieszanina samej surowicy i cukrów redukujących. Badane ekstrakty wykazywały istotne, zależne od dawki właściwości antyglykacyjne. Aktywność ekstraktów otrzymanych z *S. alpina* była 2,5-3 krotnie wyższa niż analogicznych ekstraktów z *S. altissima*. W stężeniu 100 µg/mL ekstrakty z pędów i korzeni tarczycy alpejskiej hamowały tworzenie AGE w 70%, a ich wartości IC₅₀ (wskazujące na stężenie ekstraktu przy jakim zachodziło 50%-owe zahamowanie glikacji względem próbki kontrolnej) wynosiły 57,9 µg/mL w przypadku pędów oraz 61,4 µg/mL dla korzeni. Spośród związków użytych w analizach najsilniejszą aktywność antyglykacyjną stwierdziłam dla bajkaliny (90% dla stężenia 100 µg/mL) i luteoliny (85% dla stężenia 100 µg/mL). Silnym działaniem odznaczał się również werbaskozyd (76%), który hamował powstawanie końcowych produktów glikacji w takim samym stopniu, co aminoguanidyna, znana ze swoich właściwości antyglykacyjnych i zastosowana w moich badaniach jako kontrola pozytywna. Dwa pozostałe związki czynne (wogonozyd, glukozyd luteoliny) również w istotny sposób hamowały powstawanie AGE (ok. 50% dla stężenia 100 µg/mL).

Analizy wykazały także bardzo silną korelację pomiędzy całkowitą zawartością flawonoidów w badanych ekstraktach i siłą ich działania antyglykacyjnego ($r = 0,99$). Istotny był również związek pomiędzy hamowaniem tworzenia produktów glikacji, a zawartością werbaskozydu w ekstraktach ($r = 0,73$) (**publikacja H6**).

Najważniejsze osiągnięcie prowadzonych przeze mnie prac:

Przedstawione w pracach zgłoszonych w postępowaniu habilitacyjnym wyniki dotyczą biotechnologii dwóch gatunków roślin z rodzaju *Scutellaria*: *S. alpina* i *S. altissima*, badań fitochemicznych w odniesieniu do identyfikacji i analizy ilościowej metabolitów z grupy polifenoli oraz określenia metodami *in vitro* aktywności antyoksydacyjnej i przeciwglykacyjnej uzyskanych z tych roślin ekstraktów. Są to pierwsze tak kompleksowe badania tych gatunków tarczyc.

Do głównych osiągnięć w zakresie biotechnologii można zaliczyć:

- uzyskanie morfologicznie niezróżnicowanych kultur kalusowych i zawieszinowych tarczycy alpejskiej charakteryzujących się wysokim przyrostem biomasy (17-krotnym w ciągu 2 tygodni)
- opracowanie metody mikrorozmnażania tarczycy alpejskiej z pąków szczytowych i otrzymanie zdolnych do wzrostu w warunkach polowych roślin; cykl obejmował namnażanie pędów (5 tygodni) i ich ukorzenianie (4 tygodnie)
- ustalenie, że współczynnik mnożenia pędów *S. alpina*, a tym samym efektywność mikrorozmnażania, można istotnie zwiększyć przez dobór odpowiedniego typu i stężenia cytokininy oraz zmianę konsystencji podłoża MS. Najwyższy współczynnik mnożenia (36 pąków/pędów w ciągu 5 tygodni) uzyskałam prowadząc kulturę w podłożu płynnym z zastosowaniem nanocelulozy jako materiału podporowego oraz IAA (0,57 μM) i BAP (2 μM) jako regulatorów wzrostu; po 3 miesiącach z pojedynczego eksplantatu można było uzyskać prawie 1000 roślin
- ustalenie, że możliwe jest namnażanie pędów *S. alpina* na dużą skalę w 5-litrowym aeroponicznym bioreaktorze rozpyłowym z wykorzystaniem płynnego podłoża MS z 0,57 μM IAA i 2 μM BAP; z inokulatu liczącego 15 wierzchołków pędów po 5 tygodniach otrzymałam 446 pąków/pędów bocznych o całkowitej świeżej masie ponad 18 g.

- opracowanie procedury regeneracji roślin tarczycy wyniosłej z pąków szczytowych pochodzących z wierzchołkowych części pędów oraz z pąków przybyszowych pochodzących z tkanki kalusowej. Najwyższy współczynnik mnożenia pędów wynoszący 13 uzyskałam w ciągu 8 tygodni z pochodzącego z hypokotyłu kalusa hodowanego na podłożu SH z 0,54 μM NAA, 0,89 μM BAP oraz 2,26 μM 2,4-D. Wykazałam stabilność kalusa w zakresie zdolności do regeneracji pędów podczas 4-letniej hodowli, a metodą molekularną (ISSR) potwierdziłam brak zmienności somaklonalnej w pędach regenerowanych po ponad 2 letniej hodowli w warunkach *in vitro*. Namnożone pędy boczne i przybyszowe łatwo tworzyły korzenie *ex vitro* (90-95%), co pozwoliło wyeliminować etap ukorzeniania i skrócić czas otrzymywania roślin.

Przeprowadzona metodą UHPLC analiza zawartości metabolitów z grupy polifenoli (bajkalina, wogonozyd, luteolina, 7-O-glukozyd luteoliny, werbaskozyd) wykazała, że:

- modyfikując typ kultury (kalusowa, zawiesinowa, pędów), warunki wzrostu (rodzaj podłoża, jego konsystencja, rodzaj i stężenie cytokininy), czas hodowli i jej wiek można uzyskać kultury *in vitro* *S. alpina* i *S. altissima* o podobnym lub wyższym potencjale biosyntetycznym niż rosnące w gruncie rośliny macierzyste
- spośród badanych kultur najlepszym źródłem bajkaliny okazał się organogeny kalus *S. altissima* hodowany na podłożu SH z 0,54 μM NAA, 0,89 μM BAP i 2,26 μM 2,4-D (poziom tego flawonu po 8 tygodniach hodowli wynosił ok. 32 mg/g s.m i był 30% wyższy niż w korzeniach 2-letnich rosnących w glebie roślin) i niezróżnicowany kalus *S. alpina* rosnący na podłożu MS z 0,54 μM NAA i 0,9 μM TDZ wytwarzający bajkalinę w ilości 26,3 mg/g s.m. już po 2 tygodniach hodowli. W tym drugim materiale stwierdziłam też najwyższy poziom wogonozydu; jego zawartość w tkance kalusowej po 2 tygodniach wzrostu wynosiła ok. 15 mg/g s.m. i była o 40% wyższa niż w korzeniach dwuletnich roślin wyhodowanych z nasion
- najwięcej luteoliny (5 mg/g s.m) i jej 7-O-glukozydu (3 mg/g s.m) produkowały pędy *S. alpina* rosnące w podłożu płynnym MS uzupełnionym 0,57 μM IAA i 2 μM BAP z nanocelulozą jako materiałem podporowym. Ilości te były 1,5-3 razy wyższe niż w korzeniach i pędach roślin uzyskanych z nasion po dwóch latach uprawy w glebie
- dla biosyntezy werbaskozydu najkorzystniejsza okazała się kultura zawiesinowa tarczycy alpejskiej hodowana w podłożu MS z 0,54 μM NAA i 0,9 μM TDZ; osiągnięta po

2 tygodniach wzrost maksymalna zawartość tego związku (36 mg/g s.m.) była 5-11-krotnie wyższa niż w częściach nadziemnych i podziemnych 2-letnich roślin macierzystych

- otrzymane w wyniku mikrorozmnażania rośliny *S. alpina* wytwarzały większe ilości związków biologicznie aktywnych niż rośliny *S. altissima*, a korzenie zregenerowanych roślin okazały się lepszym źródłem flawonoidów charakterystycznych dla rodzaju *Scutallaria* (bajkaliny i wogonozydu) od pędów tych roślin
- poziom badanych metabolitów w korzeniach i częściach nadziemnych roślin otrzymanych w wyniku mikrorozmnażania i tych pozyskanych z nasion i hodowanych w glebie był zbliżony; tylko w przypadku pędów zregenerowanych *in vitro* roślin *S. alpina* stwierdziłam wyższe zawartości werbaskozydu i nieco niższe bajkaliny i wogonozydu w porównaniu z roślinami otrzymanymi metodą konwencjonalną

Uzyskany materiał roślinny *S. alpina* i *S. altissima* poddałam badaniom biologicznym oceniającym ich potencjał przeciwutleniający i zdolność do zahamowania tworzenia AGE.

- Stwierdziłam, że badane przeze mnie ekstrakty tarczyc wykazywały właściwości przeciwutleniające we wszystkich zastosowanych przeze mnie testach (redukcji jonów metali, zobojętniania wolnych rodników, ochrony grup tiolowych w białkach przed utlenianiem i zahamowania peroksydacji lipidów) oraz istotnie hamowały tworzenie końcowych produktów glikacji. Na tej podstawie można stwierdzić, że uzasadnionym jest stosowanie badanych surowców w schorzeniach o etiologii związanej ze stresem oksydacyjnym takich jak choroby układu krążenia, choroby nowotworowe, choroby neurodegeneracyjne czy cukrzyca.
- Silniejszą aktywność antyoksydacyjną i antyglykacyjną wykazywały ekstrakty *S. alpina*, które charakteryzowały się wyższą zawartością związków polifenolowych niż te pozyskane z *S. altissima*
- Zaobserwowałam wyraźną korelację pomiędzy całkowitą zawartością polifenoli, a właściwościami przeciwutleniającymi i antyglykacyjnymi badanych ekstraktów oraz pomiędzy potencjałem przeciwutleniającym ekstraktów i ich zdolnością do hamowania tworzenia AGE.

Wyniki badań opublikowanych w pracach zostały sfinansowane ze środków statutowych Zakładu Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego

w Łodzi (Projekt „Hodowla *in vitro* roślin leczniczych; wytwarzanie metabolitów wtórnych.” Nr 503/3-012-01/503-31-001) (lata 2009-2015).

Piśmiennictwo:

Abe F, Nagao T, Okabe H. Antiproliferative constituents in plants. 9. Aerial parts of *Lippia dulcis* and *Lippia canescens*. Biol Pharm Bull 2002; 25:920-2.

Ando Y, Steiner M. Sulphydryl and disulphide groups of platelet membranes: determination of disulphide groups. Biochim Biophys Acta 1973; 311: 26-37.

Andrikopoulos NK, Kaliora AC, Assimopoulou AN, Papageorgiou VP. Inhibitory activity of minor polyphenolic and non-polyphenolic constituents of olive oil against *in vitro* low-density lipoprotein oxidation. J Med Food 2002; 5:1-7.

Awad R, Arnason JT, Trudeau V, Bergeron C, Budzinski JW, Foster BC, Merali Z. Phytochemical and biological analysis of skullcap (*Scutellaria lateriflora* L.): a medicinal plant with anxiolytic properties. Phytomedicine 2003; 10:640-649.

Backhouse N, Delporte C, Apablaza C, Farías M, Goity L, Arrau S, Miranda, H. Antinociceptive activity of *Buddleja globosa* (matico) in several models of pain. J Ethnopharmacol 2008; 19:160-5.

Baumann S, Fas SC, Giaisi M, Müller WW, Merling A, Gülow K, Li-Weber M. Wogonin preferentially kills malignant lymphocytes and suppresses T-cell tumor growth by inducing PLC γ 1-Ca $^{2+}$ -dependent apoptosis. Blood 2008; 111:2354-63.

Błaszczyk T, Krzyżanowska J, Lamer-Zarawska E. Screening for antimycotic properties of 56 traditional Chinese drugs. Phytother Res 2000; 14:210–212.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Sci Technol 1995; 28: 25-30.

Cai Q, Rahn RO, Zhang R. Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. Cancer Lett 1997; 119:99-107.

Cavallaro V, Patanè C, Cosentino SL, Di Silvestro I, Copani V. Optimizing *in vitro* large scale production of giant reed (*Arundo donax* L.) by liquid medium culture. Biomass Bioenergy 2014; 69:21-27.

Chen S, Ruan Q, Bedner E, Deptala A, Wang H, Hsieh TC, Darzynkiewicz, Z. Effects of the flavonoid baicalin and its metabolite baicalein on androgen receptor expression, cell cycle progression and apoptosis of prostate cancer cell lines. Cell Proliferation 2001; 34:293-304.

Cheng Y, He G, Mu X, Zhang T. Neuroprotective effect of baicalein against MPTP neurotoxicity, Neuroscience Letters 2008; 441:16-20.

- Chiu FL, Lin JK. Downregulation of androgen receptor expression by luteolin causes inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis in human prostate cancer cells and xenografts. *Prostate* 2008; 68:61-71.
- Choi J, Conrad CC, Malakowsky CA, Talent JM, Yuan CS, Gracy RW. Flavones from *Scutellaria baicalensis* Georgi attenuate apoptosis and protein oxidation in neuronal cell lines. *Biochim Biophys Acta General Subjects* 2002; 1571:201–210.
- Choi CW, Kim SC, Hwang SS, Choi BK, Ahn HJ, Lee MY, Park SH, Kim, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* 2000; 163:1161-1168.
- Collin HA. Secondary product formation in plant tissue cultures. *Plant Growth Regul* 2001; 34:119-134.
- Davis PH. *Flora of Turkey and the Aegean Islands*. Edinburgh Univ. Press. 1982; Vol 7.
- Döring AS, Petersen M. Production of caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids in plants and suspension cultures of *Glechoma hederacea*. *Phytochem Lett* 2014; 10: cxi-cxvii.
- Du GJ, Song ZH, Lin HH, Han XF, Zhang S, Yang YM. Luteolin as a glycolysis inhibitor offers superior efficacy and lesser toxicity of doxorubicin in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 372:497-502.
- Fett-Neto AG, Melanson SJ, Nicholson SA, Pennington JJ, DiCosmo F. Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell cultures of *Taxus cuspidata*. *Biotechnol Bioeng* 1994; 44:967-971.
- Flora Europaea*. Eds: Tutin T, Heywood H, Burges A, Valentine D. Cambridge University Press. 1972; vol 3.
- Fujita Y. Industrial production of shikonin and berberine. Applications of plant cell and tissue culture. *Ciba Foundation Symposium* 137. Chichester: Wiley. 1988; 228–238.
- Gates MA, Tworoger SS, Hecht JL, De VI, Rosner B, Hankinson SE. A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 2007;121:2225-32.
- Guo Q, Zhao L, You Q, Yang Y, Gu H, Song G, Xin J. Anti-hepatitis B virus activity of wogonin *in vitro* and *in vivo*. *Antivir Res* 2007; 74:16-24.
- Gutierrez-Venegas G, Kawasaki-Cardenas P, Arroyo-Cruz SR, Maldonado-Frias S. Luteolin inhibits lipopolysaccharide actions on human gingival fibroblasts. *Eur J Pharmacol* 2006; 41:95-105.
- Harris GK, Qian Y, Leonard SS, Sbarra DC, Shi X. Luteolin and chrysin differentially inhibit cyclooxygenase-2 expression and scavenge reactive oxygen species but similarly inhibit prostaglandin-E2 formation in RAW 264.7 cells. *J Nutr* 2006; 136:1517-21.
- He X, Wang Y, Gao M, Li X, Zhang T, Du G. Baicalein protects rats brain mitochondria against chronic cerebral hypoperfusion-induced oxidative damage. *Brain Res* 2009; 1249:212-221.

Hippolyte I, Marin B, Baccou JC, Jonard R. Growth and rosmarinic acid production in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L. *Plant Cell Rep* 1992; 11(3):109-112.

Horinaka M, Yoshida T, Shiraishi T, Nakata S, Wakada M, Nakanishi R, Nishino H, Sakai T. The combination of TRAIL and luteolin enhances apoptosis in human cervical cancer HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333:833-8.

Hsu HY. Chinese drugs Huang-Lien (*Coptis teeta*), Huang-Chin (*Scutellaria baicalensis*) and Ko-Kun (*Pueraria thunbergiana*). IV. Antibacterial activity of wogonin from *Scutellaria baicalensis*. *J Taiwan Pharm Assoc* 1954; 6:7-10.

Hu C, Kitts DD. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells. *Mol Cell Biochem* 2004; 265:107-13.

Huang Y, Tsang SY, Yao X, Chen ZY. Biological properties of baicalein in cardiovascular system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2005; 5:177-184.

Hui K, Huen M, Wang H, Zheng H, Sigel E, Baur R, Ren H, Li W, Wong J, Xue H. Anxiolytic effect of wogonin, a benzodiazepine receptor ligand isolated from *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochem Pharmacol* 2002; 64:1415-1424.

Hussain, M. S., Fareed, S., Ansari, S., Rahman, M. A., Ahmad, I. Z., Saeed, M. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *J Pharm Bioallied Sci* 2012; 4:10-20.

Ichimura T, Yamanaka A, Ichiba T, Toyokawa T, Kamada Y, Tamamura T, Maruyama S. Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; 7:18-21.

Jang SI, Kim HJ, Hwang KM, Jekal SJ, Pae HO, Choi BM, Kim YC. Hepatoprotective effect of baicalin, a major flavone from *Scutellariae radix*, on acetaminophen-induced liver injury in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2003; 25:585-94.

Joshee N, Patrick TS, Mentreddy RS, Yadav AK. Skullcap: Potential medicinal crop. Reprinted from: Janick J and Whipkey A (eds.). *Trends in New crops and new uses* 2002; 580-586

Kim HJ, Woo ER, Shin CG, Hwang DJ, Park H, Lee YS. HIV-1 integrase inhibitory phenylpropanoid glycosides from *Clerodendron trichotomum*. *Arch Pharm Res* 2001; 24:286-91.

Kim JS, Jobin C. The flavonoid luteolin prevents lipopoly-saccharide-induced NF-kappaB signalling and gene expression by blocking I kappaB kinase activity in intestinal epithelial cells and bone-marrow derived dendritic cells. *Immunology* 2005; 115:375-87.

Kim JY, Lee SY, Kim DH. Effects of flavonoids isolated from *Scutellariae radix* on cytochrome P-450 activities in human liver microsomes. *J Toxicol Environ Health A* 2002; 65:373-81

Kimata M, Inagaki N, Nagai H. Effects of luteolin and other flavonoids on IgE-mediated allergic reactions. *Planta Med* 2000; 66:25-29.

Koda A. Anti-allergic actions of crude drugs and blended Chinese traditional medicines: effects on type 1 and type 4 allergic reactions. *Fol Pharmacol Jpn* 1982; 80:31-41.

Kumagai T, Müller CI, Desmond JC, Imai Y, Heber D, Koeffler HP. *Scutellaria baicalensis*, a herbal medicine: anti-proliferative and apoptotic activity against acute lymphocytic leukemia, lymphoma and myeloma cell lines. *Leuk Res* 2007; 31:523-30.

Larkin PJ, Scowcroft WR. Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet* 1981; 60:97-214.

Lee DH, Kim C, Zhang L, Lee YJ. Role of p53, PUMA, and Bax in wogonin-induced apoptosis in human cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2008; 75:2020-33.

Lee JH, Lee JY, Kang HS, Jeong CH, Moon H, Whang WK, Sim SS. The effect of acteoside on histamine release and arachidonic acid release in RBL-2H3 mast cells. *Arch Pharm Res* 2006a 29:508-513.

Lee KW, Kim HJ, Lee YS, Park HJ, Choi JW, Ha J, Lee KT. Acteoside inhibits human promyelocytic HL-60 leukemia cell proliferation via inducing cell cycle arrest at G₀/G₁ phase and differentiation into monocyte. *Carcinogenesis* 2007; 28:1928-36.

Lee KY, Jeong EJ, Lee HS, Kim YC. Acteoside of *Callicarpa dichotoma* attenuates scopolamine-induced memory impairments. *Biol Pharm Bull* 2006b; 29:71-4.

Lee LT, Huang YT, Hwang JJ, Lee PP, Ke FC, Nair MP, Kanadaswam C, Lee MT. Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by quercetin and luteolin leads to growth inhibition and apoptosis of pancreatic tumor cells. *Anticancer Res* 2002; 22:1615-27

Leung HWC, Yang WH, Lai MY, Lin CJ, Lee HZ. Inhibition of 12-lipoxygenase during baicalein-induced human lung nonsmall carcinoma H460 cell apoptosis. *Food Chem Toxicol* 2007; 45:403-11.

Li BQ, Fu T, Dongyan Y, Mikovits JA, Ruscetti FW, Wang JM. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276:534-8.

Li-Weber M. New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents wogonin, baicalein and baicalin. *Cancer Treat Rev* 2009; 35:57-68.

Liu AL, Liu B, Qin HL, Lee SM, WangYT, Du GH. Anti-Influenza virus activities of flavonoids from the medicinal plant *Elsholtzia rugulosa*. *Planta Med* 2008;74:847-51.

Ma SC, Du J, But PPH, Deng, XL, Zhang YW, Ooi VEC, Lee SF. Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus. *J Ethnopharmacol* 2002; 79:205-11.

Machha A. Baicalein impairs vascular tone in normal rat aortas: Role of superoxide anions. *Eur J Pharmacol* 2007; 565:1-3.

Malikov VM, Yuldashev MP. Phenolic compounds of plants of the *Scutellaria* L. genus. Distribution, structure, and properties. *Chem Natural Compd* 2002; 38:358-406.

Manju V, Nalini N. Protective role of luteolin in 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. *Cell Biochem Funct* 2007; 25:189-94.

Marniemi J, Alanen E, Impivaara O, Seppanen R, Hakala P, Rajala T, Ronnema T. Dietary and serum vitamins and minerals as predictors of myocardial infarction and stroke in elderly subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005; 15:188-97.

Matsuda H, Wang T, Managi H, Yoshikawa M. Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. *Bioorgan. Med. Chem.* 2003; 11:5317-5323.

Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florencio MH, Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res* 2002; 36:1199-208.

Mitra B, Saha A, Chowdhury AR, Pal C, Mandal S, Mukhopadhyay S, Bandyopadhyay S, Majumder HK. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. *Mol Med* 2000; 6:527-41.

Murashige T, Skoog F A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 1962; 15:473-497.

Murch SJ, Rupasinghe HV, Goodenowe D, Saxena PK. A metabolomic analysis of medicinal diversity in Huang-qin (*Scutellaria baicalensis* Georgi) genotypes: discovery of novel compounds. *Plant Cell Rep* 2004; 23:419-425.

Nishikawa K, Furukawa H, Fujioka T, Fujii H, Mihashi K, Shimomura, K, Ishimaru K. Phenolics in tissue cultures of *Scutellaria*. *Natural Med* 1999; 53:209-213.

Parajuli P, Joshee N, Rimando AM, Mittal S, Yadav AK. *In vitro* antitumor mechanisms of various *Scutellaria* extracts and constituent flavonoids. *Planta Med* 2009; 75:41-8.

Park S, Hahm KB, Oh TY, Jin JH, Choue R. Preventive effect of flavonoid, wogonin, against ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Dig Dis Sci* 2004; 49:384-94.

Pati PK, Kaur J, Singh P A liquid culture system for shoot proliferation and analysis of pharmaceutically active constituents of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *PCTOC* 2011; 105(3):299-307.

Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agr Food Chem* 2000; 48:3396-3402.

Quanbo X, Koji H, Yasuhiro T, Tani T, Namba T, Kadota S. Hepatoprotective activity of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Planta Med* 1998; 64:120-5.

Rao SR, Ravishankar GA. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 2002; 20:101-153.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol Med* 1999; 26:1231-1237.

Rice-Evans CA, Diplock AT, Symons MCR. *Techniques in free radical research*. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo. 1991.

Russowski D, Maurmann N, Rech SB, Fett-Neto AG. Role of light and medium composition on growth and valepotriate contents in *Valeriana glechomifolia* whole plant liquid cultures. PCTOC 2006; 86(2):211-218.

Sartori MR, Pretto JB, Cruz AB, Bresciani LF, Yunes RA, Sortino M, Zacchino SA, Cechine, VF. Antifungal activ-ity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). Pharmazie 2003; 58:567-9.

Senatore F, Rigano D, Formisano C, Grassia A, Basile A, Sorbo S. Phytogrowth-inhibitory and antibacterial activity of *Verbascum sinuatum*. Fitoterapia 2007; 78:144-247.

Schapoval EES, Winter de Vargas MR, Chaves CG, Bridi R, Zuanazzi JA, Henriques, AT. Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. J Ethnopharmacol 1998; 60:53-9.

Shang XF, He XR, He XY, Li MX, Zhang RX, Fan PC, Zhang QL, Jia ZP. The genus *Scutellaria* an ethnopharmacological and phytochemical review. J Ethnopharmacol 2010; 128:279-313.

Schenk RU, Hildebrandt AC. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can J Bot 1972; 50:199-204

Séro L, Sanguinet L, Blanchard P, Dang BT, Morel S, Richomme P, Seraphin D, Derbré S. Tuning a 96-well microtiter plate fluorescence-based assay to identify AGE inhibitors in crude plant extracts. Molecules 2013; 18:14320-14339

Shi R, Huang Q, Zhu X, Ong YB, Zhao B, Lu J, Ong CN, Shen HM. Luteolin sensitizes the anticancer effect of cis-platin viac-Jun NH2-terminal kinase-mediated p53 phosphorylation and stabilization. Mol Cancer Ther 2007; 6:1338-47.

Shieh DE, Cheng HY, Yen MH, Chiang LC, Lin CC. Baicalin-induced apoptosis is mediated by Bcl-2-dependent, but not p53-dependent, patchway in human leukemia cell lines. Am J Chin Med 2006; 34:245-61.

Shilpa K, Varun K, Lakshmi, BS An alternate method of natural drug production: Elciting secondary metabolite production using plant cell culture. J Plant Sci 2010; 5:222-247.

Tsao TF, Newman MG, Kwok YY, Horikoshi AK. Effect of Chinese and western antimicrobial agents on selected oral bacteria. J Den Res 1982; 61:1103-1106.

Ueda H, Yamazaki C, Yamazaki M. Inhibitory effect of *Perilla* leaf extract and luteolin on mouse skin tumor promotion. Biol Pharm Bull 2003; 26:560-3.

Ulbrich B, Wiesner W, Arens H. Large-scale production of rosmarinic acid from plant cell cultures of *Coleus blumei* Benth. In Primary and secondary metabolism of plant cell cultures. Springer Berlin Heidelberg. 1985; 293-303.

Vijaya SN, Udayasri PV, Aswani KY, Ravi BB, Phani Y, Vijay VM. Advancements in the production of secondary metabolites. J Nat Prod 2010; 3:112-23.

Wakabayashi I, Kenichi Y. Wogonin inhibits inducible prostaglandin E2 production in macrophages. Eur J Pharmacol 2000; 406:477-81.

- Wan JY, Gong X, Zhang L, Li HZ, Zhou YF, Zhou QX. Protective effect of baicalin against lipopolisaccharide/D-galactosamine-induced liver injury in mice by up-regulation of heme oxygenase-1. *Eur J Pharmacol* 2008; 587:302-8.
- Wang F, Xu Z, Ren L, Tsang S, Hue H. GABA-a receptor subtype selectivity underlying selective anxiolytic effect of baicalin, *Neuropharmacology* 2008;55:231-1237.
- Woo KJ, Lim JH, Suh SI, Kwon, YK, Shin SW, Kim SC, Kwon TK. Differential inhibitory effects of baicalein and baicalin on LPS-induced cyclooxygenase-2 expression through inhibition of C/EBP β DNA-binding activity. *Immunobiol* 2006; 211:359-68.
- Wruck CJ, Claussen M, Fuhrmann G, Romer L, Schulz A, Pufe T, Waetzig V, Peipp M, Herdegen T, Gotz ME. Luteolin protects rat PC12 and C6 cells against MPP+ induced toxicity via an ERK dependent Keap1-Nrf2-ARE pathway. *J Neural Transm Suppl* 2007; 72:57-67.
- Xu HX, Lee SF. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. *Phytother Res* 2001; 15:39-43.
- Zarzuelo A, Jimenez I, Gamez MJ, Utrilla P, Fernandez I, Torres MI, Osuna I. Effects of luteolin 5-O-beta-rutinoside in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 1996; 58:2311-2316.
- Zgórka G. Retention behavior of silica bonded and novel polymeric reversed phase sorbents in studies on flavones as chemotaxonomic markers of *Scutellaria* L. genus. *J. Chromatogr. A* 2006; 120:230-236.
- Zhang F, Jia Z, Deng Z, Wei Y, Zheng R, Yu L. *In vitro* modulation of telomerase length and cell cycle in MKN45 cells by verbascoside. *Planta Med* 2002; 68:115-18.
- Zhang YY, Wang XY, Wang XR, Xu ZH, Liu Z, Ni Q, Chu XP, Qiu MF, Zhao AH, Jia W. Protective effect of flavonoids from *Scutellaria baicalensis* Georgi on cerebral ischemia injury. *J. Ethnopharmacol.* 2006; 108:355–360.
- Zhao C, Dodin G, Yuan C, Chen H, Zheng R, Jia Z, Fan BT. „ *In vitro* ” protection of DNA from Fenton reaction by plant polyphenol verbascoside. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1723:114-23.
- Zhou LG, Wu JY. (2006). Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinal in China. *Nat Prod Rep* 2006; 23:789-810.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Moja praca naukowa związana jest z biotechnologią roślin. Przede wszystkim zajmuję się hodowlą *in vitro* gatunków leczniczych. Opracowuję metody mikrorozmnażania roślin oraz prowadzę analizę jakościową i ilościową metabolitów wytwarzanych w pozyskanym z kultur materiale roślinnym. Podejmuję próby modyfikacji warunków hodowli mające na celu zwiększenie produkcji bioaktywnych związków. Ponadto prowadzę badania z zakresu oceny aktywności biologicznej, przede wszystkim o charakterze przeciwutleniającym, ekstraktów i związków pochodzenia roślinnego.

a) działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Badania z zakresu biotechnologii roślin rozpoczęłam w roku 2002 w ramach studiów doktoranckich w Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Gatunkiem, którym zajmowałam się w ramach mojej pracy doktorskiej była *Salvia officinalis*. W toku prowadzonych badań najpierw uzyskałam kultury zróżnicowane (pędów, korzeni transformowanych) i niezróżnicowane (kalusowe i zawiesinowe) szalwii lekarskiej, a następnie oznaczałam w nich produkcję metabolitów znanych ze swoich właściwości przeciwutleniających takich jak: kwas rozmarynowy, kwas karnozolowy i karnozol. Wyniki badań stanowiły treść mojej rozprawy doktorskiej pod tytułem „Metabolity wtórne o właściwościach przeciwutleniających w kulturach *in vitro* *Salvia officinalis* L.”, którą obroniłam w 2006 roku. Zostały one także opisane w kilku publikacjach (**publikacje D1-D5**) i przedstawione na 4 konferencjach naukowych (**konferencje K1-K4**).

W roku 2005 w trakcie moich studiów doktoranckich przeszłam szkolenie z zakresu analizy aktywności przeciwutleniającej ekstraktów roślinnych u doktora, a obecnie prof. dr hab. Adama Matkowskiego w Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej ówczesnej Akademii Medycznej (obecnie Uniwersytet Medyczny) we Wrocławiu.

b) działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam pracę z roślinnymi kulturami *in vitro* szalwii lekarskiej w Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej UM w Łodzi. Badania

dotyczyły określania aktywności przeciwutleniającej otrzymanych kultur szalwii lekarskiej (**publikacja D6**). Podjęłam też próby zwiększenia produkcji metabolitów z grupy diterpenów i polifenoli w kulturach pędów i korzeni transformowanych na drodze elicytacji (**publikacja D8, konferencja K5**). Dążyłam do zwiększenia skali hodowli kultur szalwii poprzez prowadzenie ich najpierw w podłożu płynnym w naczyniach Magenta (**publikacja D7**), a następnie w bioreaktorze rozpyłowym (**publikacja D10**). Opracowałam metodę zamykania wierzchołków pędów szalwii w postaci kapsułek alginianowych, które mogły być przechowywane i następnie wykorzystane do namnażania wysokoproduktywnego materiału (**publikacja D11, konferencja K7**).

Jednocześnie od roku 2009 podjęłam badania nad kulturami *Scutellaria altissima* i *S. alpina*, które zaowocowały między innymi publikacjami przedstawionymi do niniejszego postępowania habilitacyjnego (**publikacje H1-H8 oraz publikacja D9, konferencje K6, K8-K10, K12-K13**). W celu poszerzenia tematyki moich prac i uzyskania umiejętności oceny ewentualnej zmienności w prowadzonych kulturach, zapoznałam się z metodą izolacji DNA i techniką PCR.

Ponadto zajęłam się oceną aktywności przeciwutleniającej innych gatunków roślin. Analizowałam właściwości antyoksydacyjne produkujących kwas rozmarynowy korzeni transformowanych oraz kultur niezróżnicowanych (kalus, zawiesina) *Dracocephalum moldavica* (**publikacja D12, D23, konferencja K14**). Oznaczyłam też całkowitą zawartość polifenoli w badanych ekstraktach pszczelnika mołdawskiego i wykazałam zależność pomiędzy zawartością tej grupy związków oraz zawartością kwasu rozmarynowego

i aktywnością antyoksydacyjną ekstraktów. Oceniałam potencjał przeciwutleniający ekstraktów z liści i korzeni wyhodowanych *in vitro* oraz *in vivo* (z nasion) roślin *Rehmannia glutinosa*. Oznaczałam całkowitą zawartość polifenoli i flawonoidów w tych ekstraktach oraz określiłam zależność pomiędzy produkcją tych metabolitów, a aktywnością biologiczną (**publikacja D14**). Badałam potencjał antyoksydacyjny oraz zawartość polifenoli i flawonoidów w ekstraktach z nadziemnych części roślin *Ballota nigra* różniących się wiekiem, stadium wegetacji i sposobem otrzymania (mikrorozmnażanie, propagacja z nasion) (**publikacja D17**). Moje badania dotyczyły również oceny działania przeciwutleniającego ekstraktów z embriogennego kalusa, pozyskanych z niego pędów i nadziemnych części rosnących w polu roślin *Panax quinquefolium*. Analizowałam zależność pomiędzy tą aktywnością i obecnymi w badanych ekstraktach z żeń-szenia amerykańskiego ginsenozydami i polifenolami (**publikacja D18**).

Prowadzone przeze mnie badania właściwości antyoksydacyjnych dotyczyły również kultur kalusowych *Harpagophytum procumbens*. W ekstraktach z hakorośli rozesełanej oznaczałam całkowitą zawartości polifenoli, flawonoidów oraz antocyjanów, aby skorelować je ze stwierdzoną aktywnością biologiczną (**publikacja D21, konferencja K11**). W analizach antyoksydacyjnych posługiwałam się kilkoma testami *in vitro*. Były to testy oceniające: „zmiatanie” wolnych rodników ABTS oraz DPPH, redukcję jonów metali: żelaza i molibdenu oraz test zahamowania peroksydacji lipidów.

Od 2012 roku prowadzę badania nad kulturami *in vitro* dwóch gatunków szałwii: *Salvia viridis* (szałwia zielona) i *S. bulleyana*. Pierwszy z nich to gatunek występujący głównie w rejonie śródziemnomorskim. Dla tego gatunku stosując techniki biotechnologiczne uzyskałam kultury pędów i kultury kalusowe. Przy udziale bakterii *Agrobacterium rhizogenes* udało mi się uzyskać 5 charakteryzujących się intensywnym wzrostem klonów korzeni transformowanych. Przeprowadziłam analizę jakościową, a w przypadku dominujących metabolitów z grupy polifenoli również ilościową w hodowanym na różnych podłożach i w różnych warunkach materiale roślinnym. Uzyskane do tej pory wyniki dotyczące pracy nad szałwią zieloną zostały przedstawione na konferencji (**konferencja K8**). Publikacja opisująca metodykę uzyskania korzeni włóśnikowych, potwierdzająca metodami biologii molekularnej ich transformację, omawiająca selekcję uzyskanych klonów, ich hodowlę na różnych podłożach i związane z tym różnice we wzroście i produkcji metabolitów z grupy polifenoli jest na etapie przygotowania. Drugi gatunek szałwii, którym się obecnie zajmuję, *S. bulleyana*, nie występuje w Europie. Naturalnym jego siedliskiem są Chiny, a przede wszystkim ich północno-zachodnia prowincja Yunnan, gdzie surowiec jest od wieków stosowany w medycynie ludowej jako zamiennik dla znanej i cenionej w lecznictwie dalekowschodnim, ale dziś również zachodnim, szałwii czerwonokorzeniowej (*S. miltiorrhiza*). W moich badaniach uzyskałam kultury pędów tego gatunku. Pędy namnażałam na podłożach w obecności różnych kombinacji auksyn i cytokinin w celu uzyskania wysokiego współczynnika mnożenia oraz wysokiej produkcji metabolitów wtórnych. Wysoki współczynnik mnożenia pędów uzyskałam także na drodze bezpośredniej organogenezy wykorzystując jako materiał wyjściowy liście pędów z hodowli *in vitro*. Po ukorzenieniu i aklimatyzacji udało mi się pozyskać zregenerowane rośliny *S. bulleyana*, które początkowo rosły w szklarni, a następnie zostały też przeniesione do uprawy polowej. Wychodząc z eksplantatów siewkowych otrzymałam też kultury kalusowe *S. bulleyana*. W dalszych badaniach udało mi się przeprowadzić

efektywną transformację pędów i liści przy użyciu bakterii *Agrobacterium rhizogenes* i uzyskać kultury transformowanych korzeni i pędów tego gatunku (**konferencja K15**). Obecnie jestem na etapie potwierdzania transformacji, selekcji uzyskanych klonów i oceny ich przydatności pod względem produkcji bioaktywnych metabolitów. Potrzebne są dalsze badania zwłaszcza dotyczące szczegółowych analiz fitochemicznych, aby uzyskane wyniki dotyczące *S. bulleyana* mogły zostać opublikowanego.

6. Współpraca naukowa

- W1. współpraca z prof. Adamem Matkowskim z Zakładu Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu w zakresie analizy aktywności biologicznej wyciągów roślinnych
- W2. współpraca z dr Ireneuszem Bilichowskim oraz prof. dr hab. Elżbietą Mikiciuk-Olasik z Zakładu Chemii Leków Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w zakresie analiz fitochemicznych ekstraktów z szałwii lekarskiej
- W3. współpraca z dr Krzysztofem Gołębiem i dr hab. Jakubem Gburkiem z Katedry Biochemii Uniwersytet Medycznego we Wrocławiu w zakresie analiz właściwości antyglikacyjnych wyciągów roślinnych *Scutellaria* i występujących w tych ekstraktach polifenoli
- W4. współpraca z dr hab. Aleksandrą Królicką z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed w zakresie potwierdzenia transformacji korzeni szałwii lekarskiej
- W5. współpraca z prof. Beatą Olas i dr Bogdanem Kontkiem z Katedry Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego w zakresie wykorzystania ekstraktów roślinnych w doświadczeniach dotyczących stresu oksydacyjnego
- W6. współpraca dr Markiem Kołodziejczykiem, dr Przemysławem Rytczakiem i prof. dr hab. Stanisławem Bieleckim z Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej w zakresie produkcji bionanocelulozy używanej jako materiał podporowy w kulturach płynnych roślin z rodzaju *Scutellaria*
- W7. współpraca z dr Ewą Kochan z Zakładu Biotechnologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w zakresie analizy właściwości przeciwutleniających ekstraktów z żeń-szenia

W8. współpraca z dr hab. Anną Kiss z Zakładu Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Warszawie w zakresie analizy LC-MS/MS ekstraktów z korzeni transformowanych i pędów *Salvia viridis*.

7. Udział w projektach badawczych

Grant MNiSW/KBN Nr PBZ-KBN-092/P05/2003. Tytuł projektu: „Poszukiwanie nowych źródeł produktów naturalnych o aktywności biologicznej: przeciwdrobnoustrojowej, przeciwzapalnej, przeciwutleniającej i cytostatycznej pozyskiwanych z wybranych gatunków roślin z hodowli *in vivo* i *in vitro*, z wykorzystaniem metod biotechnologicznych” (2003-2006). Udział: wykonawca.

Projekt badawczy finansowany z funduszy statutowych Zakładu Biologii i Botaniki Farmaceutycznej UM w Łodzi (Nr 503/3-012-01/503-31-001) „Hodowla *in vitro* roślin leczniczych; wytwarzanie metabolitów wtórnych” (2009-2015). Udział: wykonawca.

8. Nagrody i stypendia za działalność naukową

2007 – nagroda Fundacji Hasco-Lek za rozprawę doktorską (3 miejsce) w konkursie na najlepsze rozprawy z zakresu farmacji przemysłowej

2015 - nagroda naukowa zespołowa III stopnia przyznawana przez JM Rektora UM w Łodzi za współautorstwo cyklu publikacji „Wykorzystanie metod biotechnologicznych dla mikrorozmnażania i produkcji metabolitów wtórnych w roślinach leczniczych”

2016 - nagroda naukowa zespołowa II stopnia przyznawana przez JM Rektora UM w Łodzi dla pierwszego autora cyklu publikacji „Produkcja metabolitów wtórnych i aktywność biologiczna gatunków z rodzaju *Scutellaria*”.

9. Kursy i szkolenia

- Szkolenie z zakresu analizy aktywności przeciwutleniającej ekstraktów roślinnych. Akademia Medyczna we Wrocławiu w roku 2005
- Kurs języka angielskiego dla kadry naukowej organizowany przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi w roku akademickim 2010/2011

- Szkolenie „Podstawy metodyki nauczania dyscyplin biomedycznych” z zakresu nowoczesnej metodyki nauczania i metod oceniania organizowane przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi w 2011 roku
- Warsztaty z zakresu określania właściwości przeciwgrzybiczych ekstraktów roślinnych prowadzone przez prof. Fernandę Marię Leal Santos z Uniwersytetu Trás-os-Montes i Alto Douro, w Vila Real w Portugalii w roku 2016

10. Członkostwo w towarzystwach naukowych

Członek Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego

Członek Okręgowej Izby Aptekarskiej w Łodzi

11. Działalność organizacyjna

Kadencja 2016 – 2020 delegat pracowników naukowo-dydaktycznych niebędących pracownikami samodzielnymi w Radzie Wydziału.

12. Recenzje prac naukowych

W latach 2009-2017 występowałam w roli recenzenta 24 prac naukowych złożonych do publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym: Journal of Plant Interactions, Applied Microbiology and Biotechnology, Food Chemistry, Molecules, ABC Botanica, The Scientific World Journal, Plant Biosystems, Natural Product Research, Cytotechnology i Acta Physiologiae Plantarum.

13. Podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych:

Mój dorobek naukowo-badawczy obejmuje:

- 23 oryginalne pełnotekstowe prace opublikowane w czasopismach, w tym 20 w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). W 17 pracach jestem pierwszym autorem
- 6 prac przeglądowych, których jestem pierwszym autorem
- 1 monografię, której jestem pierwszym autorem
- 1 pracę popularnonaukową, której jestem pierwszym autorem
- 15 streszczeń z doniesień zjazdowych prezentowanych na ogólnopolskich (6) i międzynarodowych (9) konferencjach naukowych

- udział w 1 projekcie badawczym finansowanych przez MNiSW/KBN
- sumaryczny współczynnik Impact Factor według listy JCR zgodnie z rokiem opublikowania: **25,122**; łączna punktacja MNiSW: **462** pkt (w tym na 8 publikacji wchodzących w skład postępowania habilitacyjnego przypada IF – **12,911** oraz **175** pkt MNiSW)
- liczba wszystkich cytowań publikacji według bazy Web of Science TM Core Collection: **191**, wg bazy Scopus: **223**
- liczba cytowań (bez autocytowań) według bazy Web of Science TM Core Collection: **161**, wg bazy Scopus: **197**
- index Hirsha (h-index) według Web of Science TM Core Collection i wg bazy Scopus: **7**

Magdalena Grzegorzuk - Karolak