

Załącznik nr 3

dr n. farm. Ewa Skala

AUTOREFERAT

***Rhaponticum carthamoides* w kulturze *in vitro*, potencjalne źródło pochodnych kwasów kawoilochinowych i olejku eterycznego oraz właściwości biologiczne tego gatunku**

Łódź 2019

SPIS TREŚCI

1. IMIĘ I NAZWISKO.....	5
2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE.....	5
3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU.....	5
4. PREZENTACJA OSIĄGNIĘĆ STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ HABILITACJI wynikających z art. 16, ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (DZ.U. nr 65, poz. 595, ze zm.).....	6
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	6
4.2. Wykaz publikacji stanowiących podstawę habilitacji.....	6
4.3. Omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników.....	9
4.3.1. Wprowadzenie.....	9
4.3.2. Cel i zakres przeprowadzonych badań.....	11
4.3.3. Omówienie wyników przeprowadzonych badań.....	12
4.3.3.1. Badania biotechnologiczne.....	12
4.3.3.1.1. Mikrorozmnażanie <i>R. carthamoides</i> poprzez organogenezę pośrednią i bezpośrednią (publikacja P.2, komunikat zjazdowy K.14.).....	12
4.3.3.1.2. Badania molekularne roślin uzyskanych na drodze organogenezy pośredniej i bezpośredniej (metoda RAPD i ISSR) oraz zastosowanie cytometrii przepływowej do oznaczenia zawartości DNA w roślinach zregenerowanych <i>in vitro</i> (publikacja P.2.).....	14
4.3.3.1.3. Otrzymanie i wzrost korzeni transformowanych <i>R. carthamoides</i> (publikacja P.1., komunikat zjazdowy K.13.).....	16
4.3.3.1.4. Regeneracja pędów z korzeni transformowanych <i>R. carthamoides</i> i otrzymanie z nich całych roślin (publikacja P.8., komunikat zjazdowy K.43.).....	17
4.3.3.1.4.1. Potwierdzenie transformacji roślin metodą PCR i hybrydyzacja Southern (publikacja P.8.).....	18
4.3.3.2. Identyfikacja i określenie zawartości niektórych metabolitów wtórnych w uzyskanym <i>in vitro</i> materiale roślinnym oraz izolacja z korzeni transformowanych szczodraka	

krokozowego olejku eterycznego, identyfikacja jego składników i określenie ich zawartości.....	19
4.3.3.2.1. Metabolity wtórne roślin otrzymanych na drodze organogenezy (publikacja P.2., komunikat zjazdowy K.14.).....	19
4.3.3.2.2. Metabolity wtórne korzeni transformowanych (publikacja P.1.).....	21
4.3.3.2.3. Metabolity wtórne roślin zregenerowanych z korzeni transformowanych (publikacja P.8., komunikat zjazdowy K.43.).....	22
4.3.3.2.4. Izolacja olejku eterycznego z korzeni transformowanych <i>R. carthamoides</i> i z korzeni roślin rosnących w gruncie, identyfikacja ich składników oraz określenie ich zawartości (publikacja P.4., komunikat zjazdowy K.22.).....	23
4.3.3.3. Ocena aktywności biologicznej.....	24
4.3.3.3.1. Cytotoksyczność wodno-metanolowych ekstraktów z korzeni transformowanych (publikacja P.3., P.5.-P.7. oraz komunikaty zjazdowe K.17., K.27., K.38.) oraz z części nadziemnych i korzeni roślin transformowanych zregenerowanych z korzeni transformowanych <i>R.</i> <i>carthamoides</i> (publikacja P.8., komunikat zjazdowy K.43.) wobec komórek różnych linii nowotworowych.....	24
4.3.3.3.2. Indukcja apoptozy przez wodno-metanolowe ekstrakty z korzeni transformowanych <i>R. carthamoides</i> w komórkach różnych linii nowotworowych (publikacja P.3., P.5.-P.7. oraz komunikaty zjazdowe K.17., K.27., K.38.).....	26
4.3.3.3.3. Aktywność antyoksydacyjna wodno-metanolowych ekstraktów z części nadziemnych i korzeni roślin zregenerowanych z korzeni transformowanych <i>R.</i> <i>carthamoides</i> (publikacja P.8., komunikat zjazdowy K.43.) w modelach biologicznych oraz aktywność antyoksydacyjna olejków eterycznych wyzolowanych z korzeni transformowanych i korzeni roślin rosnących w gruncie (publikacja P.4., komunikat zjazdowy K.22.).....	32
4.3.3.3.4. Aktywność przeciwzapalna olejków eterycznych wyizolowanych z korzeni transformowanych i korzeni roślin <i>R. carthamoides</i> rosnących w gruncie (publikacja P.4., komunikat zjazdowy K.22.).....	33
4.3.3.3.5. Właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze olejków eterycznych wyzolowanych z korzeni transformowanych i korzeni roślin <i>R. carthamoides</i> rosnących w gruncie (publikacja P.4., komunikat zjazdowy K.22.).....	34

4.3.4. Podsumowanie osiągnięć stanowiących podstawę habilitacji.....	34
4.3.5. Literatura.....	37
5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH.....	41
5.1. Omówienie działalności naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora.....	41
5.2. Omówienie działalności naukowo-badawczej po uzyskaniu stopnia doktora.....	42
5.3. Projekty badawcze.....	45
5.4. Szkolenia.....	45
5.5. Członkostwo w towarzystwach naukowych.....	46
5.6. Działalność dydaktyczna i popularyzatorska.....	46
5.6.1. Działalność dydaktyczna.....	46
5.6.2. Działalność popularyzatorska.....	48
5.7. Recenzje prac naukowych.....	48
5.8. Nagrody.....	48
5.9. Współpraca naukowa.....	49
5.10. Podsumowanie osiągnięć naukowo badawczych.....	50

1. IMIĘ I NAZWISKO Ewa Dagmara Skąła

2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE - z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej

2016 - dyplom ukończenia studiów podyplomowych Biologia sądowa, Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska. Praca końcowa "Zabójca w kapeluszu. Zatrucie muchomorem sromotnikowym". Promotor - Prof. dr hab. B. Bukowska

2009 - stopień doktora nauk farmaceutycznych (z wyróżnieniem) nadany 29 maja 2009 uchwałą Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi na podstawie rozprawy doktorskiej "*Salvia przewalskii* Maxim. w kulturze *in vitro* - mikrorozmnażanie, wytwarzanie tanszynonów i olejku eterycznego" wykonanej w Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej UM w Łodzi. Promotor - Prof. dr hab. H. Wysokińska. Recenzenci - Prof. dr hab. M. Skłodowska (Uniwersytet Łódzki), dr hab. B. Thiem, Prof. UM w Poznaniu (Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu)

1999 - tytuł magistra biologii uzyskany 24 czerwca 1999 roku, na Uniwersytecie Łódzkim, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (studia dzienne), kierunek - biologia, specjalność - fizjolog-genetyk. Tytuł pracy magisterskiej "Badanie potencjalnej mutageniczności oczyszczonych ekstraktów z zakwitu fitoplanktonu w Zbiorniku Jezioro testem aberracji chromosomowych *Vicia in vivo*". Promotor - Prof. dr hab. R. Osiecka

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU

2015 - do chwili obecnej adiunkt, Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

2009 - 2015 asystent, Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

- 2001 - 2009** starszy referent techniczny, Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna w Łodzi, a od 2002 Uniwersytet Medyczny w Łodzi
- 1999 - 2001** starszy referent inżynieryjno-techniczny, Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna w Łodzi

4. PREZENTACJA OSIĄGNIĘĆ STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ HABILITACJI (wynikających z art. 16, ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (DZ.U. nr 65, poz. 595, ze zm.)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

"Rhaponticum carthamoides w kulturze in vitro, potencjalne źródło pochodnych kwasów kawoilochinowych i olejku eterycznego oraz właściwości biologiczne tego gatunku"

Osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego obejmuje cykl **8** publikacji oryginalnych opublikowanych w latach 2015-2019, o łącznym współczynniku oddziaływania *Impact Factor* (IF) równym **24,329** i wartości punktacyjnej MNiSW **215**.

4.2. Wykaz publikacji stanowiących podstawę habilitacji

P.1. Skala E.*, Kicel A., Olszewska M.A., Kiss A.K., Wysokińska H., 2015, Establishment of hairy root cultures of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin for the production of biomass and caffeic acid derivatives, *BioMed Research International*, Volume 2015, article ID181098, 11 pages. <https://dx.doi.org/10.1155/2015/181098>

IF=**2,134**; punktacja MNiSW=**20**

P.2. Skala E.*, Grąbkowska R., Sitarek P., Kuźma Ł., Błauż A., Wysokińska H., 2015, *Rhaponticum carthamoides* regeneration through direct and indirect organogenesis,

molecular profiles and secondary metabolite production, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 123: 83-98. doi: 10.1007/s11240-015-0816-1

IF=2,39; punktacja MNiSW 30

P.3. Skala E.*, Sitarek P., Toma M., Szemraj J., Radek M., Nieborowska-Skorska M., Skorski T., Wysokińska H., Śliwiński T., 2016, Inhibition of human glioma cell proliferation by altered Bax/Bcl-2-p53 expression and apoptosis induction by *Rhaponticum carthamoides* extracts from transformed and normal roots, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68: 1454-1464. doi: 10.1111/jphp.12619

IF=2,405; punktacja MNiSW 25

P.4. Skala E.*, Rijo P., Garcia C., Sitarek P., Kalembe D., Toma M., Szemraj J., Pytel D., Wysokińska H., Śliwiński T., 2016, The essential oils of *Rhaponticum carthamoides* hairy roots and roots of soil grown-plants: chemical composition and antimicrobial, anti-inflammatory, and antioxidant activities, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2016, article ID 8505384, 10 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8505384>

IF=4,593; punktacja MNiSW=30

P.5. Skala E.*, Kowalczyk T., Toma M., Szemraj J., Radek M., Pytel D., Wieczfinska J., Wysokińska H., Śliwiński T., Sitarek P., 2018, Induction of apoptosis in human glioma cell lines of various grades through the ROS-mediated mitochondrial pathway and caspase activation by *Rhaponticum carthamoides* transformed root extract, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 445: 89-97. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3254-z>

IF=2,561; punktacja MNiSW=20,

P.6. Skala E.*, Toma M., Kowalczyk T., Śliwiński T., Sitarek P., 2018, *Rhaponticum carthamoides* transformed root extract inhibits human glioma cells viability, induces double strand DNA damage, H2A.X phosphorylation, and PARP1 cleavage, *Cytotechnology*, 70: 1585-1594. <https://doi.org/10.1007/s10616-018-0251-3>

IF=1,461; punktacja MNiSW=20,

P.7. Skala E.*, Synowiec E., Kowalczyk T., Śliwiński T., Sitarek P., 2018, *Rhaponticum carthamoides* transformed root extract has potent anticancer activity in human leukemia

and lung adenocarcinoma cell lines, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2018, article ID 8198652, 8 pages. <https://doi.org/10.1155/2018/8198652>

IF=4,936; punktacja MNiSW=30

P.8. Skala E.*, Picot L., Bijak M., Saluk-Bijak J., Szemraj J., Kicel A., Olszewska M.A., Sitarek P., 2019, An efficient plant regeneration from *Rhaponticum carthamoides* transformed roots, enhanced caffeoylquinic acid derivatives production in pRi-transformed plants and their biological activity, *Industrial Crops & Products*, 129: 327-338. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.020>

IF=3,849; punktacja MNiSW=40

* - prace, w których występowałam w roli autora korespondencyjnego

Kopie publikacji wchodzących w skład przedstawionego postępowania habilitacyjnego (**P.1.-P.8.**) zamieściłam w *Załączniku nr 6*. Opis mojego indywidualnego wkładu w powstanie każdej z wieloautorskich publikacji znajduje się w *Załączniku nr 8*. Oświadczenia współautorów opisujące ich indywidualny wkład w powstanie prac przedstawionych, jako osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę habilitacji, zestawiałam w *Załączniku nr 7*.

Wyżej wymienione publikacje powstały dzięki finansowaniu ze środków statutowych Zakładu Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (503/3-012-01/503-31-001). Publikacje **P.1.** i **P.8.** były częściowo finansowane ze środków statutowych Zakładu Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (503/3-022-01/503-31-001) oraz publikacja **P.8.** z grantu Uniwersytetu Łódzkiego 506/1136 i "The French Cancer League (Comité 17)".

Poza publikacjami **P.1.-P.8.** stanowiącymi podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego wyniki moich prac badawczych zostały zaprezentowane także w formie komunikatów zjazdowych (*Załącznik nr 8*, pozycje **K.13.-K.14.**, **K.17.-K.18.**, **K.22.**, **K.27.**, **K.38.**, **K.43.**) na krajowych i międzynarodowych konferencjach tematycznych.

4.3. Omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników

4.3.1. Wprowadzenie

Rhaponticum carthamoides (Wild.) Ilijn. - szczodrak krokoszowaty, jest jednym z przedstawicieli rodziny Asteraceae. Jest to bylina rosnąca w stanie dzikim na Syberii (Góry Sajańskie, Altaj), w północnej Mongolii oraz w Kazachstanie (Kokoska i Janovska, 2009). Jest gatunkiem rzadkim i zagrożonym wyginięciem. Ze względu na cenne właściwości lecznicze, gatunek ten jest uprawiany w Rumunii, Słowacji, a także w Polsce (Zawiślak, 2010). Surowcem stosowanym w rosyjskiej medycynie oficjalnej jest korzeń i kłącze (*Rhizoma et radix Rhapontici*, *Leuzeae rhizoma et radix*, *Rhapontici radix*, *Leuzeae radix*) zbierane w trzecim roku uprawy (Zawiślak, 2010). Surowiec ten jest standaryzowany na obecność 20-hydroksyekdysonu, którego zawartość nie może być mniejsza niż 0,1% (Timofeev i wsp., 2006). Głównymi metabolitami odpowiedzialnymi za lecznicze działanie *R. carthamoides* są ekdysteroidy, kwasy fenolowe i flawonoidy. Ponadto, w szczodraku krokoszowatym występują sterole, laktony seskwiterpenowe, antocyjany, glikozydy triterpenowe, poliacetyleny, kwas askorbinowy, lipidy, lignany, garbniki, żywice oraz olejki eteryczne (Kokoska i Janovska, 2009). *R. carthamoides* stosowany jest od wieków w tradycyjnej medycynie chińskiej, mongolskiej i tybetańskiej. Wykazuje działanie adaptogenne i stosowany był, jako środek wspomagający rekonwalescencję, w stanie przemęczenia po przebytych chorobach, a także w przemęczeniu psychicznym czy zwalczaniu stresu. Ponadto, poprawia zdolność koncentracji i uczenia się. Stosowany jest również przez sportowców i kulturystów w celu zwiększenia masy mięśniowej, siły i wytrzymałości, podniesienia wydolności fizycznej i szybkiej regeneracji po wyczerpujących treningach. Ekstrakty i preparaty ze szczodraka krokoszowatego wykazują także m.in. działanie przeciwutleniające, immunomodulujące, przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne wobec np. *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacteroides fragilis* i *Staphylococcus aureus*, przeciwgrzybicze przeciwko *Aspergillus fumigatus*, *Candida glabrata*, oraz *Trichophyton mentagrophytes*, czy przeciw pasożytnicze - stosowane w leczeniu mi.in. ostrej i przewlekłej giardiozy (Kokoska i Janovska, 2009). Obecne w *R. carthamoides* ekdysteroidy oraz flawonoidy wykazują pozytywny wpływ na układ sercowo-naczyniowy. W badaniach na zwierzętach wykazano wspomagający wpływ przy miażdżycy tętnic, cukrzycy, zawale mięśnia sercowego, a także zapaleniu wątroby (Kokoska i Janovska, 2009). Ponadto, ekdysteroidy stymulują erytropoezę, powodując zwiększenie poziomu krwinek czerwonych i hemoglobiny we krwi (Syrov i wsp., 1997), a także obniżają poziom glukozy we krwi na skutek pobudzania trzustkowych wysepek Langerhansa i wpływają na wewnątrztrętrowe

przemiany glukozy (Kokoska i Janovska, 2009). Petkov i wsp. (1984) wykazali, że wodno-alkoholowy ekstrakt z korzeni *R. carthamoides* nie wykazywał toksycznego działania u samców myszy albinosowych, nawet w dużych dawkach (do 40 g/kg), siedem dni po podaniu.

Roślinne kultury *in vitro* wykorzystywane są m.in. do pozyskiwania metabolitów wtórnych mających zastosowanie, jako leki, naturalne barwniki i substancje zapachowe w lecznictwie, przemyśle spożywczym czy kosmetycznym. Przeszkodą w ich pozyskiwaniu metodami konwencjonalnymi jest m.in. powolny wzrost roślin oraz ich niska zawartość w roślinie. Ponadto, pozyskiwanie ich ze stanowisk naturalnych przyczynia się do niszczenia naturalnych siedlisk roślin, co grozi wyginięciem niektórych gatunków o cennych właściwościach leczniczych. Kultury *in vitro* prowadzi się w ściśle kontrolowanych warunkach. Można prowadzić je na dużą skalę, w bioreaktorach. Niewątpliwymi zaletami roślinnych kultur *in vitro* jest m.in. uniezależnienie od pory roku, czy klimatu, jak również krótszy czas otrzymania metabolitów wtórnych. Dlatego też, wybór roślinnych kultur *in vitro* do pozyskiwania metabolitów wtórnych wydaje się być, jak najbardziej słuszne. Do produkcji metabolitów wtórnych wykorzystuje się najczęściej kultury zawieszinowe oraz kultury organów, głównie korzeni transformowanych otrzymanych po transformacji genetycznej przy użyciu bakterii glebowej *Agrobacterium rhizogenes* (Vanisree i wsp., 2004; Srivastava i wsp., 2018). Korzenie transformowane mogą stanowić alternatywną drogę do pozyskiwania cennych metabolitów wtórnych i dla uprawy roślin w glebie, zwłaszcza gdy surowcem są korzenie. Pozwala to na uniknięcie zniszczenia całej rośliny i plantacji roślin. Ponadto, korzenie transformowane charakteryzują się stabilnością genetyczną, szybkim wzrostem w podłożach bez regulatorów wzrostu, wysokim przyrostem biomasy w krótkim czasie i umożliwiają otrzymanie metabolitów wtórnych na poziomie podobnym lub często wyższym niż ten występujący w korzeniach roślin uprawianych czy rosnących w warunkach naturalnych. Mogą również syntetyzować nowe związki nieobecne w macierzystej roślinie, a także mogą gromadzić metabolity wtórne, które zazwyczaj występują w nadziemnych częściach.

Korzenie transformowane można również wykorzystać do regeneracji całych transgenicznych roślin, które często wytwarzają metabolity wtórne na poziomie wyższym niż roślina macierzysta oraz mogą wykazywać większą biomasę, zwłaszcza ich korzenie (Roychowdhury i wsp., 2013).

4.3.2. Cel i zakres przeprowadzonych badań

Głównym celem naukowym przedstawionego do oceny postępowania habilitacyjnego było wprowadzenie do kultury *in vitro* endemicznego, zagrożonego wyginięciem gatunku z rodziny Asteraceae, *Rhaponticum carthamoides* - szczodrak krokoszowaty, i uzyskanie różnymi metodami biotechnologicznymi materiału roślinnego, który mógłby być alternatywą do pozyskiwania surowca z tego gatunku.

- **Badania biotechnologiczne** obejmowały mikrorozmnażanie tego gatunku poprzez organogenezę pośrednią i bezpośrednią, otrzymanie kultur korzeni transformowanych poprzez transformację genetyczną przy użyciu *Agrobacterium rhizogenes* oraz selekcję linii uzyskanych korzeni wykazującej najwyższe przyrosty biomasy, a także regenerację pędów z korzeni transformowanych i uzyskanie z nich całych roślin.

Ponadto, badania obejmowały:

- **identyfikację i określenie zawartości niektórych metabolitów wtórnych** (pochodnych kwasów kawoilochinowych, flawonoidów oraz 20-hydroksyekdysonu) w uzyskanym *in vitro* materiale roślinnym (roślinach zregenerowanych na drodze organogenezy, korzeniach transformowanych i zregenerowanych z nich roślinach) oraz **izolację** z korzeni transformowanych szczodraka krokoszowatego **olejku eterycznego i identyfikację jego składników**.
- ocenę **aktywności biologicznej** wodno-metanolowych ekstraktów z materiału roślinnego uzyskanego metodami biotechnologicznymi. Była to ocena aktywności cytotoksycznej ekstraktu z korzeni transformowanych wobec różnych ludzkich komórek nowotworowych, takich, jak komórki ludzkiego glejaka w stadium II-IV, pochodzących od pacjentów oraz komórek glejaka U87MG, a także wobec dwóch linii komórkowych ludzkiej białaczki limfoblastycznej CCRF-CEM i szpikowej K562 oraz komórek nabłonkowych niedrobnokomórkowego raka płuc A549. Ponadto, badania biologiczne obejmowały ocenę tego ekstraktu pod kątem mechanizmu jego działania w tych liniach komórkowych tj. indukowanie apoptozy, zbadanie poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) i potencjału błony mitochondrialnej, poziomu ekspresji niektórych genów związanych z procesem apoptozy lub poziomu ich białek (Bax, Bcl-2, Tp53, kaspaza 3 i kaspaza 9), oszacowanie poziomu komórek z przełamanym PARP1 i ufosforylowanym histonem H2A.X, które są markerami związanymi z uszkodzeniami DNA. Określono także poziom uszkodzeń

mitochondrialnego DNA w genach *ND1* i *ND5* oraz jądrowego DNA w genach *TP53* i *HPRT1*. Celem niniejszych badań było również określenie aktywności cytotoksycznej wobec komórek czerniaka ludzkiego A2058 ekstraktów z korzeni i części nadziemnych roślin transformowanych szczodraka krokoszowatego.

Określiłam także aktywność antyoksydacyjną na plazmie krwi ludzkiej ekstraktów z korzeni i części nadziemnych roślin transformowanych tego gatunku. Olejek wyizolowany z korzeni transformowanych został zbadany w kierunku aktywności antyoksydacyjnej, przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej, jak również przeciwzapalnej.

Jako materiał porównawczy, w badaniach fitochemicznych i biologicznych zostały użyte korzenie 3-letnich roślin uprawianych w gruncie, w Ogrodzie Roślin Leczniczych Zakładu Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi lub korzenie i części nadziemne pochodzące z 3-miesięcznych roślin rosnących w szklarni, wyhodowanych metodą konwencjonalną, z nasion pochodzących z tego samego zbioru, co nasiona wykorzystane do zapoczątkowania kultur *in vitro*.

4.3.3. Omówienie wyników przeprowadzonych badań

4.3.3.1. Badania biotechnologiczne

4.3.3.1.1. Mikrorozmnażanie *R. carthamoides* poprzez organogenezę pośrednią i bezpośrednią (publikacja P.2., komunikat zjazdowy K.14.)

W pierwszym etapie badań sprawdziłam zdolności różnych eksplantatów, pozyskanych z 3-tygodniowych, aseptycznie wyhodowanych siewek (liścienie, hypokotyl, korzenie), jak i 5-tygodniowych wyhodowanych *in vitro* pędów (liście), do regeneracji pąków i pędów przybyszowych *R. carthamoides*.

Eksplantaty z siewek umieściłam na agarowym (0,7%) podłożu MS (Murashige and Skooga) (Murashige i Skoog, 1962) uzupełnionym auksyną: 2,4-D (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy), NAA (kwas naftylooctowy) lub IBA (kwas indolilo-3-masłowy) w połączeniu z cytokiną BA (benzyladenina). Regulatory wzrostu zastosowałam w stężeniach 0,2 lub 0,5 mg L⁻¹. Stosunek cytokininy do auksyny w podłożach wynosił 2,5:1 lub 1:2,5. Wybór regulatorów wzrostu zastosowanych w tym doświadczeniu opierał się na moich wstępnych badaniach i badaniach innych autorów na tym gatunku (Li i wsp., 2013; Zand i wsp., 2014). Pędy *R. cartahmoides* z eksplantatów z siewek otrzymałam na drodze

organogenezy pośredniej, z tkanki kalusowej. Zand i wsp. (2014) najwyższą odpowiedź uzyskali na podłożu MS wzbogaconym 2,4-D ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$) i BA ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$). W tych warunkach 89% eksplantatów liściowych było zdolnych do regenerowania pędów. Jednak w moich badaniach po zastosowaniu 2,4-D w stężeniu $0,2$ lub $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ w połączeniu z BA w stężeniu $0,2$ lub $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ obserwowałam jedynie indukcję nieorganogennej tkanki kalusowej lub tkanki kalusowej regenerującej korzenie. Regeneracja pędów *R. carthamoides* była możliwa, gdy kalus hodowałam w obecności NAA lub IBA, jako auksyny i BA, jako cytokininy. W tych warunkach, po 5 tygodniach hodowli większość eksplantatów z siewek tworzyła zwarty, zielony lub żółto-zielony kalus regenerujący pąki i pędy przybyszowe. Spośród dwóch zastosowanych auksyn, NAA była bardziej efektywna dla regeneracji pędów przybyszowych niż IBA. **Maksymalną liczbę pąków/pędów (prawie 4 na kalus) i najwyższy procent kultur regenerujących pąki/pędy (92%) uzyskałam dla kalusów pochodzących z liścieni, hodowanych na pożywce MS zawierającej $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA i $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ BA.** Ponadto, zaobserwowałam, że z każdym kolejnym pasażem tkanki kalusowe traciły zdolność do indukcji pąków/pędów, a jedynie kalusy zapoczątkowane z korzeni siewek hodowane przez 1 rok na podłożu MS zawierającym NAA i BA zachowały zdolność tworzenia pędów. Pędy uzyskane w ten sposób wykorzystałam następnie do ukorzeniania.

Pędy szczodraka krokoszowatego otrzymałam także na drodze organogenezy bezpośredniej z eksplantatów liściowych tj. blaszek i ogonków pochodzących z 5-tygodniowych wyhodowanych *in vitro* pędów. Eksplantaty umieściłam na agarowym ($0,7\%$) podłożu MS bez regulatorów wzrostu lub uzupełnionym BA w stężeniu $0,2$ lub $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ lub w połączeniu z auksyną IBA, NAA lub 2,4-D ($0,2$ lub $0,5 \text{ mg L}^{-1}$). Stosunek cytokininy do auksyny w podłożach wynosił $2,5:1$ lub $1:2,5$. Podobnie, jak w przypadku eksplantatów pochodzących z siewek, eksplantaty liściowe hodowane na podłożu MS zawierającym 2,4-D ($0,2$ lub $0,5 \text{ mg L}^{-1}$) i BA ($0,2$ lub $0,5 \text{ mg L}^{-1}$) nie wykazywały zdolności regenerujących pędy. Pąki/pędy nie tworzyły się również na eksplantatach hodowanych na podłożu bez regulatorów wzrostu. Eksplantaty liściowe wykazywały wysoką zdolność do indukcji pędów, po 5 tygodniach hodowli, 83-100% eksplantatów regenerowało 3-4,5 pąków/pędów na eksplantat, zarówno, na podłożu uzupełnionym samym BA lub w połączeniu z NAA lub IBA. **Maksymalną liczbę pąków/pędów (około 4,5 na eksplantat) uzyskałam na podłożu MS uzupełnionym $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ BA i $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA. W tych warunkach 93,5-100% eksplantatów było zdolnych do indukcji pąków/pędów.**

Pędy zregenerowane na drodze organogenezy pośredniej i bezpośredniej ukorzeniałam na agarowym ($0,7\%$) podłożu MS o zredukowanej do połowy ilości makro-

i mikroelementów ($\frac{1}{2}$ MS) bez regulatorów wzrostu lub uzupełnionym auksyną IBA w stężeniach 0,2; 0,5; 1,0; 1,5 lub 2,0 mg L⁻¹. Pędy ukorzeniane na podłożu $\frac{1}{2}$ MS wzbogaconym IBA wytwarzały więcej korzeni na pędzie (do 4,3) niż te hodowane bez auksyny (1,4/pęd), ale korzenie te były krótsze (1,5-4,1 vs. 5,4 cm). Po zastosowaniu 0,5 mg L⁻¹ IBA, 97% pędów było zdolnych do tworzenia korzeni i było to dwukrotnie więcej niż dla pędów ukorzenianych bez auksyny (maksymalnie 47%). Zaobserwowałam, że sposób regeneracji pędów, pośrednio z tkanki kalusowej i bezpośrednio z eksplantatów liściowych ma wpływ na czas tworzenia korzeni, efektywność ukorzeniania, liczbę i długość korzeni. W przypadku pędów uzyskanych poprzez organogenezę pośrednią obecność IBA była konieczna do ich ukorzeniania.

Ukorzenione pędy następnie hodowałam w doniczkach zawierających mieszaninę ziemi, piasku, torfu i perlitu (4:3:3:3 v/v/v/v), w szklarni, przez 3 miesiące. Po 3 miesiącach aklimatyzacji przeżyły wszystkie rośliny uzyskane na drodze organogenezy bezpośredniej i tylko 44% roślin otrzymanych na drodze organogenezy pośredniej. Rośliny uzyskane poprzez organogenezę bezpośrednią były wyższe, miały więcej liści różniących się morfologicznie od liści roślin otrzymanych poprzez organogenezę pośrednią, ich korzenie były dłuższe i liczniejsze, a świeża masa roślin była prawie dwa razy wyższa niż roślin otrzymanych poprzez organogenezę pośrednią. Nie zaobserwowałam znaczących różnic morfologicznych między roślinami uzyskanymi poprzez bezpośrednią organogenezę, a tymi rozmnażanymi z nasion, które były w tym samym wieku i rosły w identycznych warunkach, jak rośliny zregenerowane *in vitro* (publikacja P.2.).

4.3.3.1.2. Badania molekularne roślin uzyskanych na drodze organogenezy pośredniej i bezpośredniej (metoda RAPD i ISSR) oraz zastosowanie cytometrii przepływowej do oznaczenia zawartości DNA w roślinach zregenerowanych *in vitro* (publikacja P.2)

Ponieważ rośliny otrzymane na drodze organogenezy pośredniej i bezpośredniej różniły się morfologicznie, chciałam sprawdzić, czy rośliny te wykazują podobieństwo genetyczne między sobą i między roślinami macierzystymi, uzyskanymi z nasion pochodzących z tego samego zbioru, co nasiona wykorzystane do zapoczątkowania kultur *in vitro*. W tym celu zastosowałam metody ISSR-PCR i RAPD-PCR pozwalające na określenie stabilności genetycznej zregenerowanych *in vitro* roślin. Analizę podobieństwa genetycznego przeprowadziłam z użyciem 9 starterów RAPD (OPA 1-4, OPA 8-10, OPA 13

i OPA 17) i 8 starterów ISSR (UBC 807, UBC 811-813, UBC 830 i UBC 834-836). Wielkość otrzymanych fragmentów RAPD wynosiła od 100 do 2500 pz, a liczba zamplifikowanych fragmentów wahała się od 5 (OPA 13) do 14 (OPA 9). Ogółem otrzymałam 77 fragmentów RAPD, a średnio pojedynczy starter generował 8,5 fragmentów. Wśród otrzymanych 77 fragmentów, 19 było polimorficznych ze średnią liczbą polimorficznych fragmentów na starter, 2,1. Największą liczbę (3) polimorficznych fragmentów otrzymałam dla starterów OPA 1, OPA 10 i OPA 17, a najniższą (0) dla starterów OPA 4 i OPA 13. Współczynnik podobieństwa Jaccarda dla roślin zregenerowanych bezpośrednio z eksplantatów liściowych i roślin macierzystych był wysoki i wynosił 0,941, zaś w przypadku roślin zregenerowanych z tkanki kalusowej wynosił ok. 0,7.

W przypadku ISSR-PCR, wielkość otrzymanych fragmentów wynosiła, podobnie jak w przypadku RAPD-PCR, od 100 do 2500 pz. Najwięcej fragmentów (12) uzyskałam w przypadku startera UBC 807, a najniższą liczbę fragmentów (5) dla startera UBC 835. Osiem wybranych starterów ISSR wygenerowało łącznie 65 fragmentów. Średnio pojedynczy starter ISSR generował 8,1 fragmentów. Spośród 65 fragmentów uzyskanych ze starterów ISSR, 42 były monomorficzne, a 23 polimorficzne ze średnią liczbą fragmentów polimorficznych 2,9 na starter. Starter UBC 834 dawał największą liczbę polimorficznych prążków (4), podczas gdy UBC 835 dawał najniższą (0). Współczynnik podobieństwa Jaccarda wykazał, że tożsamość genetyczna roślin uzyskanych na drodze organogenezy bezpośredniej z roślinami macierzystymi była bardzo wysoka, podobnie, jak podczas analizy RAPD-PCR, i wynosiła 0,947. Natomiast, rośliny zregenerowane na drodze organogenezy pośredniej wykazywały wysokie podobieństwo genetyczne do tkanki kalusowej, z której zostały zregenerowane (0,824).

W badaniach zastosowałam także cytometrię przepływową w celu oszacowania zawartości DNA w roślinach zregenerowanych na drodze organogenezy pośredniej i bezpośredniej. Cytometria przepływowa zapewnia szybki i dokładny pomiar zawartości jądrowego DNA i od lat jest najbardziej popularną metodą do tego celu stosowaną. Zawartość DNA w roślinach zregenerowanych bezpośrednio z eksplantatów liściowych (2,38 pg/2C) była podobna do tej uzyskanej dla roślin macierzystych (2,27 pg/2C), zaś rośliny zregenerowane poprzez pośrednią organogenezę wykazały wyższą zawartość jądrowego DNA (2,47 pg/2C) niż roślina macierzysta.

4.3.3.1.3. Otrzymanie i wzrost korzeni transformowanych *R. carthamoides* (publikacja P.1., komunikat zjazdowy K.13.)

W celu otrzymania korzeni transformowanych *R. carthamoides* przeprowadziłam transformację genetyczną tego gatunku przy użyciu bakterii glebowej *Agrobacterium rhizogenes*. Jako eksplantaty zastosowałam liście 4-tygodniowych wyhodowanych *in vitro* pędów. W pracy wykorzystałam dwa szczepy agropinowe *A. rhizogenes*, A4 i ATCC15834, którymi zakażane były liście w środkową część ogonka lub u podstawy blaszki liściowej poprzez nakłuwanie. Stwierdziłam, że miejsce infekcji nie miało istotnego wpływu na częstość powstawania korzeni na eksplantatach. Natomiast, zaobserwowałam różnice w częstości powstawania korzeni w zależności od zastosowanego szczepu. Najwyższą częstość indukowania korzeni odnotowałam dla szczepu A4. Po 5 tygodniach hodowli na agarowym (0,7%) podłożu MS uzupełnionym acetosyringonem (200 μM), 43% eksplantatów zakażanych w blaszkę liściową tworzyło korzenie, które następnie hodowałam w płynnym podłożu Gamborga (B5) (Gamborg i wsp., 1968) o zredukowanej do połowy makro- i mikroelementów ($\frac{1}{2}$ B5). W pracy otrzymałam 8 klonów korzeni transformowanych, a do dalszych badań wybrałam jeden z nich (RC3) charakteryzujący się najwyższym przyrostem biomasy po 5 tygodniach hodowli. Transformację korzeni potwierdziłam metodą PCR. W analizowanym materiale DNA stwierdziłam obecność 4 genów tj. *rolA* (107 bp), *rolB* (386 bp), *rolC* (582 bp) i *aux1* (500 bp). W celu określenia optymalnych warunków wzrostu korzeni transformowanych *R. carthamoides*, korzenie hodowałam w różnych płynnych podłożach: B5, Schenk i Hildebrandt (SH) (Schenk i Hildebrandt, 1972) i Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd i McCown, 1980) z pełną i zredukowaną do połowy zawartością mikro- i makroelementów, w ciemności i na świetle (fotoperiod 16h oświetlenie/8h ciemność, lampy fluorescencyjne o natężeniu $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Korzenie rosnące w podłożach z pełną zawartością mikro- i makroelementów wykazywały wyższą biomasę (świeża i sucha masa) niż korzenie hodowane w podłożach o obniżonej o połowę zawartości mikro- i makroelementów. Ponadto, stwierdziłam, że światło wpływało korzystnie na wzrost korzeni transformowanych *R. carthamoides*, za wyjątkiem korzeni hodowanych w pożywkach SH i $\frac{1}{2}$ SH. **Po 35 dniach hodowli najwyższe przyrosty biomasy, świeża (93 g L^{-1}) i sucha masa (12 g L^{-1}), osiągały korzenie rosnące w podłożu WPM, na świetle.** Korzenie hodowane w tym samym podłożu, ale w ciemności osiągały, odpowiednio, 83 g L^{-1} i $7,5 \text{ g L}^{-1}$, świeżej i suchej masy.

4.3.3.1.4. Regeneracja pędów z korzeni transformowanych *R. carthamoides* i otrzymanie z nich całych roślin (publikacja P.8., komunikat zjazdowy K.43.)

Zaobserwowałam, że korzenie transformowane były zdolne do spontanicznej regeneracji pąków i pędów podczas hodowli w różnych płynnych podłożach (SH i B5 z pełną i obniżoną do połowy zawartością makro- i mikroelementów), bez regulatorów wzrostu w ciemności lub na świetle (16h fotoperiod). Do regeneracji pąków i pędów nie były zdolne jedynie korzenie transformowane hodowane w podłożu WPM z pełną zawartością makro- i mikroelementów rosnące zarówno w ciemności, jak i na świetle. W optymalnych warunkach, w podłożu SH lub B5, ponad 90% kultur korzeni rosnących na świetle regenerowało pąki i pędy; jednak otrzymane pąki i pędy wykazywały zjawisko szklistości. Pąki i pędy powstawały bezpośrednio z korzeni, bez tworzenia tkanki kalusowej.

Kolejnym etapem badań było uzyskanie pędów z korzeni transformowanych *R. carthamoides* oraz określenie odpowiedniego podłoża do ich regeneracji. W tym celu 1 cm fragmenty korzeni transformowanych hodowałam na szalkach Petriego, na agarowym (0,7%) podłożu SH lub MS bez regulatorów wzrostu lub wzbogaconym tylko cytokininą BA w stężeniu 0,2 lub 0,5 mg L⁻¹ lub w połączeniu z auksyną, kwasem indolilo-3-octowym (IAA) w stężeniu 0,1 mg L⁻¹, przez okres 5 tygodni. Stwierdziłam, że rodzaj podłoża i zastosowanie regulatorów wzrostu wpływają na zdolności regeneracyjne korzeni transformowanych. Podłoże MS było lepsze do regeneracji pędów niż podłoże SH, zwłaszcza gdy uzupełnione było regulatorami wzrostu. Na podłożu MS, 17-99% transformowanych korzeni wytwarzało średnią liczbę pąków i pędów od dwóch do siedmiu, podczas, gdy na podłożu SH, 13-53% eksplantatów wytwarzało 2-3 pąki i pędy. Gdy pożywki nie były uzupełnione regulatorami wzrostu, tylko 13-17% eksplantatów było w stanie regenerować pąki i pędy.

Zdolności regeneracyjne korzeni transformowanych do indukcji pędów można było zwiększyć, gdy korzenie były hodowane w obecności BA (0,2 mg L⁻¹ lub 0,5 mg L⁻¹). Bardziej efektywną regenerację pędów (85%) obserwowałam przy wyższym stężeniu cytokininy w podłożu MS. Optymalnym podłożem do regeneracji pąków i pędów było podłoże MS wzbogacone BA w stężeniu 0,5 mg L⁻¹ i IAA w stężeniu 0,1 mg L⁻¹. W tych warunkach 99% korzeni transformowanych regenerowało około 7 pąków i pędów na eksplantat. Z kolei na podłożu SH, w tych samych warunkach, tylko 53% eksplantatów regenerowało 2,6 pąków i pędów. W celu namnożenia zregenerowanych pędów *R. carthamoides*, pędy odcinałam od korzeni transformowanych i przenosiłam pojedynczo na agarowe (0,7%) podłoże MS uzupełnione 0,1 mg L⁻¹ IAA i 0,2 mg L⁻¹ BA. Aby uzyskać ustabilizowaną kulturę pędów transformowanych, pędy hodowałam przez 12,

5-tygodniowych, pasaży. Po 5 tygodniach średnia liczba pąków i pędów na eksplantat wyniosła 3. Pędy osiągały 2,4 g/probówkę świeżej masy i 0,4 g/probówkę suchej masy. Ponadto zaobserwowałam, że nieliczne pędy tworzyły korzenie. Następnie transformowane pędy ukorzeniałam na agarowym (0,7%) podłożu MS, zawierającym połowę makro- i mikroelementów, bez regulatorów wzrostu. W tych warunkach po 5 tygodniach wzrostu, 100% pędów tworzyło liczne korzenie o długości ok. 7 cm.

Ukorzenione pędy były aklimatyzowane w doniczkach, w szklarni. Po trzech miesiącach wzrostu w warunkach *ex vitro* przeżyło 47% transformowanych roślin. Po okresie aklimatyzacji porównałam morfologię transformowanych roślin z 3-miesięcznymi roślinami wyhodowanymi z nasion rosnącymi w identycznych warunkach. Transformowane rośliny były niższe niż rośliny wyhodowane z nasion i osiągały ok. 7 cm (vs. 20 cm). Ponadto, rośliny transformowane charakteryzowały się mniejszą średnią liczbą liści na roślinę (12 vs. 18). Dodatkowo zaobserwowałam typową dla transformowanych roślin morfologię liści, które były małe i wąskie. Ponadto, liście roślin transformowanych nie miały powcinanej blaszki liściowej, jak to obserwowałam dla roślin wyhodowanych z nasion. Rośliny transformowane wykazywały ponad 1,5-krotnie wyższą całkowitą świeżą biomasę, obliczoną jako łączna masa liści i korzeni (30,9 g) niż rośliny wyhodowane z nasion (18,4 g). Rośliny transformowane wykazywały około 7,5-krotnie wyższą świeżą masę korzeni (27,3 g) niż masę liści (3,6 g), podczas gdy rośliny wyhodowane z nasion wykazywały 1,5 razy niższą świeżą masę korzeni niż masę liści. Te zmiany w biomasie roślin transformowanych wiązały się z tym, że system korzeniowy roślin transformowanych był silniej rozwinięty, a korzenie posiadały dłuższe i liczne odgałęzienia boczne.

4.3.3.1.4.1. Potwierdzenie transformacji roślin metodą PCR i hybrydyzacja Southern (publikacja P.8.)

Analiza PCR genomowego DNA wyizolowanego z roślin transformowanych potwierdziła obecność 3 genów z plazmidu *A. rhizogenes*: *rolB* (386 bp), *rolC* (582 bp) i *aux1* (500 bp). Transformacja roślin została również potwierdzona poprzez hybrydyzację Southern dla genu *rolB*.

4.3.3.2. Identyfikacja i określenie zawartości niektórych metabolitów wtórnych w uzyskanym *in vitro* materiale roślinnym oraz izolacja z korzeni transformowanych szczodraka krokoszowego olejku eterycznego, identyfikacja jego składników i określenie ich zawartości

Materiał uzyskany z kultur *in vitro* tj. rośliny otrzymane na drodze organogenezy pośredniej i bezpośredniej, a także korzenie transformowane i zregenerowane z nich rośliny poddałam analizie fitochemicznej pod kątem obecności kwasów fenolowych (kwasów kawoilochinowych i ich pochodnych) lub flawonoidów i jednego ekdysteroidu - 20-hydroksyekdysonu. Identyfikacji metabolitów wtórnych dokonałam na podstawie analizy UPLC-PDA-ESI-MS³ wodno-metanolowych (80% v/v) ekstraktów roślinnych oraz na podstawie porównania czasów retencji i widm UV metabolitów w badanych ekstraktach z tymi dla związków wzorcowych wykorzystując metodę UHPLC-DAD. Warto podkreślić, że niektóre z tych związków tj. kwas 1,3-di-O-kawoilochinowy, kwas 1,5-di-O-kawoilochinowy, kwas 3,4-di-O-kawoilochinowy, kwas 3,5-di-O-kawoilochinowy, kwas 4,5-di-O-kawoilochinowy i kwas 1,4,5-tri-O-kawoilochinowy zostały zidentyfikowane w *R. carthamoides* po raz pierwszy. Zawartość metabolitów wtórnych w analizowanym materiale roślinnym została przeprowadzona w oparciu o metodę HPLC-PDA (publikacje **P.1.** i **P.8.**) oraz UHPLC-DAD (publikacja **P.2.**). Opis zastosowanych metod, identyfikacja, a także ilościowe oznaczenia metabolitów wtórnych w badanym materiale roślinnym zostało przedstawione w publikacjach **P.1.**, **P.2.** i **P.8.** Ponadto, z korzeni transformowanych wyizolowałam olejek eteryczny i dokonałam identyfikacji jego składników na podstawie porównania ich czasów retencji i widm MS z tymi zgromadzonymi w bazach komputerowych (NIST 98.1, Wiley 8th Ed., and MassFinder 4.1.) oraz na podstawie danych literaturowych, a także podałam procentową zawartość zidentyfikowanych w olejku eterycznym składników. Metodyka i wyniki uzyskane z tej części badań zostały przedstawione w publikacji **P.5.**

Jako materiał porównawczy w badaniach fitochemicznych zastosowałam rośliny *R. carthamoides* wyhodowane nasion pochodzących z tego samego zbioru, co nasiona wykorzystane do zapoczątkowania kultur *in vitro*.

4.3.3.2.1. Metabolity wtórne roślin otrzymanych na drodze organogenezy (publikacja **P.2.**, komunikat zjazdowy **K.14.**)

Metodą UHPLC-DAD oznaczyłam ilościowo kwas chlorogenowy i 20-hydroksyekdyson w wodno-metanolowych ekstraktach z liści i korzeni 3-miesięcznych

roślin szczodraka krokoszowego zregenerowanych *in vitro* na drodze organogenezy bezpośredniej i pośredniej. Ich zawartość została porównana z zawartością w ekstraktach z liści i korzeni 3-miesięcznych roślin otrzymanych z nasion, rosnących w tych samych warunkach, w szklarni, co rośliny otrzymane *in vitro*. Zawartość kwasu chlorogenowego była różna w zależności od pochodzenia roślin, jak i rodzaju materiału (korzenie i liście). Najwyższe stężenie kwasu chlorogenowego stwierdziłam w liściach roślin zregenerowanych bezpośrednio z eksplantatów liściowych ($12,2 \text{ mg g}^{-1}$ suchej masy (s.m.)) i było to 13-krotnie wyższa zawartość niż w liściach roślin zregenerowanych z tkanki kalusowej ($0,9 \text{ mg g}^{-1}$ s.m.). W korzeniach tych ostatnich roślin zawartość kwasu chlorogenowego była 1,5-krotnie wyższa ($3,9 \text{ mg g}^{-1}$ s.m.) niż w korzeniach roślin uzyskanych na drodze organogenezy bezpośredniej ($2,5 \text{ mg g}^{-1}$ s.m.).

Inną klasą metabolitów wtórnych *R. carthamoides* są ekdysteroidy z dominującym wśród nich 20-hydroksyekdysonem (Kokoska i Janovska, 2009). Zawartość 20-hydroksyekdysonu w liściach i korzeniach roślin otrzymanych na drodze organogenezy pośredniej była 3- i 1,5-krotnie wyższa niż w liściach i korzeniach roślin otrzymanych na drodze organogenezy bezpośredniej (odpowiednio, $7,4 \text{ mg g}^{-1}$ s.m. i $3,04 \text{ mg g}^{-1}$ s.m. w porównaniu z $2,5 \text{ mg g}^{-1}$ s.m. i $2,1 \text{ mg g}^{-1}$ s.m.).

W porównaniu do roślin pochodzących z nasion, rośliny zregenerowane bezpośrednio z eksplantatów liściowych wykazywały podobny poziom zarówno kwasu chlorogenowego, jak i 20-hydroksyekdysonu. Istotną różnicę ($p < 0,05$) zaobserwowałam jedynie w odniesieniu do zawartości kwasu chlorogenowego w korzeniach tych roślin, która była o 33% wyższa w korzeniach roślin wyprowadzonych z nasion. Liście i korzenie roślin zregenerowane z tkanki kalusowej zawierały znacznie wyższe ilości 20-hydroksyekdysonu niż rośliny zregenerowane bezpośrednio z eksplantatów oraz rośliny pochodzące z nasion. W odniesieniu do kwasu chlorogenowego rośliny zregenerowane na drodze organogenezy bezpośredniej zawierały podobne stężenie tego kwasu, jak rośliny wyprowadzone z nasion tj. w korzeniach ok. 3 mg g^{-1} i w liściach ok. 12 mg g^{-1} s.m.. Natomiast liście roślin otrzymanych na drodze organogenezy pośredniej gromadziły tylko ok. 1 mg g^{-1} s.m. tego związku i było to 10-krotnie mniej niż w liściach roślin pochodzących z nasion, podczas gdy korzenie obu tych roślin zawierały podobny poziom pochodnej kwasu kawowego.

Podsumowując, najwyższy poziom kwasu chlorogenowego (12 mg g^{-1} s.m.) stwierdziłam w liściach roślin uzyskanych bezpośrednio z eksplantatów liściowych, podczas gdy liście roślin zregenerowanych z tkanki kalusowej gromadziły najwyższe ilości 20-hydroksyekdysonu ($7,4 \text{ mg g}^{-1}$ s.m.).

4.3.3.2.2. Metabolity wtórne korzeni transformowanych (publikacja P.1.)

W korzeniach transformowanych *R. carthamoides* hodowanych w podłożu WPM, w którym korzenie wykazywały najwyższe przyrosty biomasy, zidentyfikowano metodą UPLC-PDA-ESI-MS³, 3 kwasy mono-kawoilochinowe (kwas 3-O-kawoilochinowy; kwas 4-O-kawoilochinowy; kwas 5-O-kawoilochinowy), 5 kwasów di-kawoilochinowych (kwas 1,3-di-O-kawoilochinowy; kwas 1,5-di-O-kawoilochinowy; kwas 3,4-di-O-kawoilochinowy; kwas 3,5-di-O-kawoilochinowy; kwas 4,5-di-O-kawoilochinowy), 1 kwas tri-kawoilochinowy (kwas 1,4,5-tri-O-kawoilochinowy) i 2 niezidentyfikowane pochodne kwasów tri-kawoilochinowych. Analizie poddano wodno-metanolowe ekstrakty z korzeni transformowanych rosnących na świetle (16h fotoperiod) i w ciemności. Zawartość zidentyfikowanych metabolitów wtórnych (analiza HPLC-PDA) porównano z ich zawartością w ekstraktach z korzeni 3-letnich roślin *R. carthamoides* rosnących w glebie. W moich badaniach stwierdziłam, że światło ma pozytywny wpływ na biosyntezę metabolitów wtórnych w korzeniach transformowanych *R. carthamoides*. Światło także wpływało korzystnie na zawartość kwasów kawoilochinowych w korzeniach transformowanych innych gatunków z rodziny Asteraceae takich jak, *Echinacea purpurea* (Abbasi i wsp., 2007) czy *Cichorium intybus* (Malarz i wsp., 2013). **Wyniki moich badań wykazały, że całkowite stężenie kwasów kawoilochinowych i ich pochodnych było około 2-krotnie wyższe w korzeniach hodowanych na świetle (19,08 mg g⁻¹ suchej masy (s.m.) niż rosnących w ciemności (11,45 mg g⁻¹ s.m.), a dominującą frakcją w obu kulturach były pochodne kwasów tri-kawoilochinowych (8,01 mg g⁻¹ s.m. w korzeniach hodowanych na świetle i 5,89 mg g⁻¹ s.m. w korzeniach hodowanych w ciemności) z niezidentyfikowaną ich pochodną, która stanowiła 75% kwasów tri-kawoilochinowych.** Ponadto, pochodna ta była głównym związkiem wśród wszystkich zidentyfikowanych kwasów kawoilochinowych w korzeniach transformowanych (5,97 mg g⁻¹ s.m. w korzeniach hodowanych na świetle i 4,34 mg g⁻¹ s.m. w korzeniach hodowanych w ciemności). Kwasy tri-kawoilochinowe i ich pochodne występują rzadziej w roślinach niż mono- i di-kawoilochinowe pochodne (Park, 2010). Kwas 5-O-kawoilochinowy (kwas chlorogenowy) był głównym metabolitem wtórnym pochodnych kwasów mono-kawoilochinowych w korzeniach transformowanych szczodraka krokoszowego, którego zawartość wahała się od 1,96 mg g⁻¹ s.m. do 5,12 mg g⁻¹ s.m. i była wyższa w korzeniach hodowanych na świetle. Spośród 5 zidentyfikowanych kwasów di-kawoilochinowych, w najwyższych ilościach w obu kulturach występował kwas 3,5-di-O-kawoilochinowy (3,08 mg g⁻¹ s.m. w korzeniach hodowanych na świetle i 1,92 mg g⁻¹ s.m. w korzeniach hodowanych w ciemności). **Ponadto, stwierdziłam,**

że jedynie korzenie hodowane na świetle były zdolne do syntezy glikozydów flawonoidów (heksozyd kwercytyny, heksozyd luteoliny i heksozyd patuletyny), których całkowite stężenie wynosiło 2,93 mg g⁻¹ s.m.. W porównaniu do korzeni 3-letnich roślin *R. carthamoides* uprawianych w gruncie produkcja kwasów kawaloilochinowych i ich pochodnych była 2-3-krotnie wyższa w tych korzeniach niż w korzeniach transformowanych, a głównym metabolitem był kwas chlorogenowy (18,26 mg g⁻¹ s.m.). Ponadto, zawartość niezidentyfikowanej pochodnej kwasu tri-kawoilochinowego (dominującego metabolitu korzeni transformowanych) była 17 i 23 razy niższa niż w korzeniach transformowanych. Dodatkowo, nie zidentyfikowałam w korzeniach roślin rosnących w gruncie kwasu 1,4,5-tri-*O*-kawoilochinowego, który był obecny w korzeniach transformowanych. Z drugiej strony, korzenie transformowane nie syntetyzowały 20-hydroksyekdysonu, którego stężenie w korzeniach roślin hodowanych w gruncie wynosiło 5,6 mg g⁻¹ s.m..

4.3.3.2.3. Metabolity wtórne roślin zregenerowanych z korzeni transformowanych (publikacja P.8., komunikat zjazdowy K.43.)

Transformacja przy użyciu *A. rhizogenes* znacząco zwiększyła produkcję metabolitów wtórnych w roślinach transformowanych *R. carthamoides* zregenerowanych z korzeni transformowanych. Profile fitochemiczne ekstraktów z roślin transformowanych i roślin wyhodowanych z nasion, zarówno tych pochodzących z liści, jak i korzeni porównywałam za pomocą UPLC-PDA-ESI-MS³ i HPLC-PDA zgodnie z metodą z poprzedniej publikacji **P.1.**, w której oznaczono kwasy kawoilochinowe i ich pochodne oraz flawonoidy i 20-hydroksyekdyson. Badania jakościowe i ilościowe wykazały dominację pochodnych kwasów kawaloilochinowych we wszystkich ekstraktach, z niską zawartością lub brakiem flawonoidów i 20-hydroksyekdysonu. Niemniej jednak, zaobserwowałam jakościowe i ilościowe różnice pomiędzy ekstraktami z roślin transformowanych i roślin wyhodowanych z nasion. Rośliny transformowane były szczególnie bogate w pochodne kwasów kawaloilochinowych, których całkowita zawartość w korzeniach (33,5 mg g⁻¹ s.m.) i liściach (15,5 mg g⁻¹ s.m.) była znacząco wyższa niż ta w korzeniach (11,3 mg g⁻¹ s.m.) i liściach (11,6 mg g⁻¹ s.m.) roślin wyhodowanych z nasion. **Głównymi związkami zidentyfikowanymi w korzeniach roślin transformowanych (materiałem roślinnym, w którym określono najwyższą zawartość metabolitów wtórnych) był kwas chlorogenowy (10,6 mg g⁻¹ s.m.), niezidentyfikowana pochodna kwasu tri-kawoilochinowego (7,3 mg g⁻¹ s.m.), kwas 3,5-di-*O*-kawoilochinowy (5,5 mg g⁻¹ s.m.) i kwas 4,5-di-*O*-kawoilochinowy (3,7 mg g⁻¹ s.m.); w porównaniu z korzeniami roślin**

wyhodowanych z nasion, ich odpowiednie zawartości były 1,8-, 74-, 2- i 4,6-krotnie wyższe. Rośliny transformowane i rośliny wyhodowane z nasion różniły się także względnymi proporcjami między pochodnymi kwasów mono-, di- i tri-kawoilochinowych. W ekstraktach roślin wyhodowanych z nasion, zarówno pochodzących z korzeni, jak i z liści, dominującymi składnikami były izomeryczne kwasy mono-kawoilochinowe. W korzeniach roślin transformowanych udział procentowy pochodnych kwasów mono-, di- i tri-kawoilochinowych był podobny, podczas gdy, w liściach roślin transformowanych dominowały pochodne kwasów tri-kawoilochinowych. Ponadto stwierdziłam, że liście roślin transformowanych akumulowały wyższe stężenie pochodnych kwasów di- i tri-kawoilochinowych niż liście roślin wyhodowanych z nasion.

Jakościowy profil wszystkich ekstraktów roślin transformowanych i roślin wyhodowanych z nasion był podobny, ale warto zauważyć, że **kwasy 3-O-kawoilochinowy i kwas 1,4,5-tri-O-kawoilochinowy nie zostały wykryte, odpowiednio, w liściach roślin transformowanych oraz w korzeniach roślin wyhodowanych z nasion. Poza tym korzenie roślin wyhodowanych z nasion różniły się od pozostałych ekstraktów obecnością 20-hydroksyekdysonu (4,25 mg g⁻¹ s.m.).**

Z dostępnej literatury wiadomo, że transformacja za pomocą *A. rhizogenes* wzmocniła produkcję niektórych kwasów kawoilochinowych, takich jak kwas chlorogenowy, kwas 3,5-di-O-kawoilochinowy lub 4,5-di-O-kawoilochinowy również w transformowanych kalusach *Rubia cordifolia*, karczocha czy transformowanych pędach *Hypericum perforatum*, co może być spowodowane obecnością wprowadzonych genów *rol* (Shkryl i wsp., 2008; Vereshchagina i wsp., 2014; Tusevski i wsp., 2014).

4.3.3.2.4. Izolacja olejku eterycznego z korzeni transformowanych R. carthamoides i z korzeni roślin rosnących w gruncie, identyfikacja ich składników oraz określenie ich zawartości (publikacja P.4., komunikat zjazdowy K.22.)

Olejek eteryczny wyizolowałam z korzeni transformowanych *R. carthamoides* hodowanych na świetle (16h fotoperiod) i z korzeni roślin rosnących w gruncie zastosowaniem pary wodnej, z użyciem aparatu Derynga. Badania wykazały, że profil chemiczny obu olejków był różny. W olejku eterycznym pozyskanym z korzeni transformowanych i korzeni roślin rosnących w gruncie zidentyfikowałam, odpowiednio, 44 i 41 związków. W obu olejkach eterycznych dominowały seskwiterpeny, w szczególności węglowodory seskwiterpenów (54,7-62,2%). **W olejku eterycznym z korzeni roślin rosnących w gruncie głównymi składnikami był aplotaksen**

(all-cis-heptadeca-1,8,11,14-tetraen) (27,3%), nardosina-1(10),11-dien (20,7%) oraz dauca-4(11),8-dien (10,2%). Ponadto, olejek ten zawierał w znacznych ilościach petasiten (4,3%) i *trans- α -bergamoten* (4,2%). Z kolei, **olejek eteryczny wyizolowany z korzeni transformowanych charakteryzował się obecnością cyperenu (18,2%), 13-norcypera-1(5,11(12)-dienu (15,3%) i kadalenu (7,2%).** Ilość tych związków była znacznie wyższa (odpowiednio 7-, 11- i 12-krotne) niż w olejku eterycznym z korzeni roślin rosnących w gruncie. Główne związki zidentyfikowane w olejku eterycznym z korzeni roślin rosnących w gruncie, takie jak nardosina-1(10),11-dien i dauca-4(11),8-dien, petasiten i *trans- α -bergamoten* nie zostały wykryte w olejku eterycznym pochodzącym z korzeni transformowanych, a aplotaksen obecny był jedynie w ilościach śladowych.

4.3.3.3. Ocena aktywności biologicznej

W pierwszym etapie badań sprawdziłam efekt cytotoksyczny wodno-metanolowych ekstraktów z korzeni roślin uprawianych w gruncie oraz z korzeni transformowanych *R. carthamoides* wobec komórek prawidłowych. Wyniki moich badań wykazały, że ekstrakty te nie były cytotoksyczne wobec prawidłowych ludzkich astrocytów w badanym zakresie stężeń (0,1-1,5 mg mL⁻¹), po 24 godzinnym traktowaniu (publikacje **P.3.** i **P.5.**). Przeżywalność komórek w tym przypadku wynosiła ponad 80%.

4.3.3.3.1. Cytotoksyczność wodno-metanolowych ekstraktów z korzeni transformowanych (publikacja P.3., P.5.-P.7. oraz komunikat zjazdowy K.17., K.27., K.38.) oraz z części nadziemnych i korzeni roślin transformowanych zregenerowanych z korzeni transformowanych R. carthamoides (publikacja P.8., komunikat zjazdowy K.43.) wobec komórek różnych linii nowotworowych

W cyklu badań sprawdziłam cytotoksyczną aktywność (testem MTT) wodno-metanolowych ekstraktów z korzeni transformowanych *R. carthamoides* wobec komórek glejaka ludzkiego w II, III (publikacja **P.5.**) oraz IV stadium (publikacja **P.3.**) zaawansowania uzyskane z guzów pacjentów oraz komercyjnej linii glejaka U87MG (w IV stadium zaawansowania) (publikacja **P.6.**). Kancerogenność komórek pobranych od pacjenta została potwierdzona odpowiednimi markerami (D10S1709, D10S1172 i D22S283) (publikacja **P.3.**).

Test MTT wykazał cytotoksyczny efekt wodno-metanolowych ekstraktów z korzeni transformowanych *R. carthamoides* wobec komórek glejaka ludzkiego w II, III (publikacja **P.5.**) oraz IV stadium (publikacja **P.3.**) zaawansowania uzyskane z guzów pacjentów oraz

komercyjnej linii glejaka U87MG (w IV stadium zaawansowania) (publikacja **P.6.**) w zależności od zastosowanego stężenia ekstraktu ($0,5-3 \text{ mg mL}^{-1}$). Przeżywalność komórek glejaka zmniejszała się wraz ze wzrostem stężenia ekstraktu (publikacja **P.3., P.5. i P.6.**). Ponadto, badania przeprowadzone z użyciem ekstraktów z korzeni roślin *R. carthamoides* rosnących w gruncie wykazały, że ekstrakt ten był mniej cytotoksyczny wobec komórek glejaka (IV stadium zaawansowania) niż ekstrakt z korzeni transformowanych (publikacja **P.3.**). Przeżywalność komórek po zastosowaniu $0,5-3 \text{ mg mL}^{-1}$ ekstraktu z korzeni transformowanych obniżała się do 60-10% w zależności od badanej linii komórkowej glejaka ludzkiego różniącej się stopniem zaawansowania (publikacja **P.3., P.5. i P.6.**). Ekstrakt ten wykazywał najwyższą cytotoksyczność wobec komórek glejaka w II stopniu zaawansowania. Wartość IC_{50} wynosiła $0,75 \text{ mg mL}^{-1}$ (publikacja **P.5.**). Dla komórek glejaka w III oraz IV stopniu zaawansowania, zarówno pochodzących od pacjenta, jak i linii komercyjnej U87MG, $IC_{50}=1 \text{ mg mL}^{-1}$ (publikacja **P.5. i P.6.**). Ponadto, stwierdziłam, że ekstrakt z korzeni transformowanych szczodraka krokoszowego w stężeniu $0,75-1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ hamował także proliferację komórek i tworzenie kolonii komórek glejaka ludzkiego w II i III stadium zaawansowania (publikacja **P.5.**).

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie efektu cytotoksycznego ekstraktów z korzeni transformowanych *R. carthamoides* i korzeni roślin rosnących w gruncie (w stężeniu $0,019-5 \text{ mg mL}^{-1}$) na trzech innych liniach nowotworowych: ludzkiej białaczki szpikowej (K562) i limfoblastycznej (CCRF-CEM) oraz komórek nabłonkowych niedrobnokomórkowego raka płuc (A549) (publikacja **P.7.**). Stwierdziłam, że oba ekstrakty hamowały po 24 godzinym traktowaniu przeżywalność komórek wszystkich testowanych linii komórkowych wraz ze wzrostem stężenia, a **ekstrakt z korzeni transformowanych posiadał silniejsze właściwości**. Ponadto, obie **linie komórkowe białaczki (CCRF-CEM i K-562) były bardziej wrażliwe na działanie tego ekstraktu niż komórki nabłonkowe niedrobnokomórkowego raka płuc A549**. W przypadku obu testowanych linii komórkowych białaczki ekstrakt wykazywał podobną cytotoksyczność. Wartość IC_{50} wynosiła dla tych linii komórkowych $0,313 \text{ mg mL}^{-1}$. W przypadku komórek linii A549, dwukrotnie wyższe stężenie ekstraktu powodowało zahamowanie przeżywalności komórek w 50%.

W moich badaniach określiłam również cytotoksyczne działanie wobec komórek ludzkiego czerniaka A2058 ekstraktów otrzymanych z 3-miesięcznych roślin transformowanych *R. carthamoides* rosnących *ex vitro* w szklarni, które zostały zregenerowane z korzeni transformowanych tego gatunku oraz 3-miesięcznych roślin

wyprowadzonych z nasion rosnących w tych samych warunkach, co rośliny transformowane (publikacja P.8.). Ekstrakty roślinne, pochodzące zarówno z roślin wyprowadzonych z nasion, jak i roślin transformowanych hamowały wzrost komórek czerniaka A2058 po 72 godzinnym traktowaniu (4,2-55%), w zastosowanym zakresie stężeń (2,5-40 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Podsumowując, ekstrakty ze szczodraka krokoszowego wykazywały różny stopień cytotoksyczności wobec różnych linii nowotworowych. Najbardziej wrażliwe na działanie ekstraktów roślinnych były komórki czerniaka ludzkiego A2058. Ekstrakty z roślin transformowanych zregenerowane z korzeni transformowanych *R. carthamoides* hamowały wzrost tych komórek do ok. 50% już po zastosowaniu 40 $\mu\text{g/mL}$ tego ekstraktu, po 72 godzinnym traktowaniu (publikacja P.8.). W przypadku ekstraktu z korzeni transformowanych *R. carthamoides* wyższe jego stężenia były potrzebne do zahamowania wzrostu komórek w 50%, dla komórek białaczki linii CCRF-CEM i K-562 (0,313 mg mL^{-1}) i komórek nabłonkowych niedrobnokomórkowego raka płuc A549 (0,625 mg mL^{-1}), po 24 godzinach inkubacji (publikacja P.7.). Efekt cytotoksyczny ekstraktów z korzeni transformowanych szczodraka wobec ludzkich komórek glejaka był obserwowany przy wyższych jego stężeniach. Wartość IC_{50} wynosiła 0,75 mg mL^{-1} dla komórek glejaka w II stadium zaawansowania i 1 mg mL^{-1} dla komórek glejaka w III i IV stadium zaawansowania, zarówno dla komórek wyizolowanych od pacjenta, jak i linii komercyjnej U87MG (publikacja P.3., P.5. i P.6.).

Działanie cytotoksyczne ekstraktów z *R. carthamoides* może być związane z wysoką zawartością pochodnych kwasów kawaloilochinowych obecnych w tych ekstraktach ponieważ liczne, wcześniejsze badania wykazały, że pochodne te wykazują działanie przeciwnowotworowe wobec komórek różnych linii nowotworowych (Kurata i wsp., 2007; Puangpraphant i wsp., 2011; Gouthamchandra i wsp., 2017).

4.3.3.3.2. Indukcja apoptozy przez wodno-metanolowe ekstrakty z korzeni transformowanych *R. carthamoides* w komórkach różnych linii nowotworowych (publikacja P.3., P.5.-P.7. oraz komunikaty zjazdowe K.17., K.27., K.38.)

Ponieważ ekstrakty z korzeni transformowanych szczodraka krokoszowego wykazywały efekt cytotoksyczny poprzez hamowanie przeżywalności komórek różnych linii nowotworowych (komórki glejaka ludzkiego w różnym stadium zaawansowania - II, III i IV, oraz komórki ludzkiej białaczki linii CCRF-CEM i K-562 i komórki nabłonkowe niedrobnokomórkowego raka płuc A549) kolejnym etapem badań była próba określenia mechanizmu jego działania.

Analiza cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej wykazała, że w komórkach glejaka ludzkiego w IV stadium zaawansowania, po 24 godzinnym traktowaniu ekstraktem z korzeni transformowanych (i dla porównania z korzeni roślin rosnących w gruncie) w stężeniu 0,25-0,75 mg mL⁻¹ następuje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie S i G2/M. Procent komórek w fazie S nie traktowanych ekstraktami wynosił 7%, natomiast po inkubacji z ekstraktami roślinnymi wzrósł do 17% i 26%, w zależności od badanego ekstraktu (0,75 mg mL⁻¹). Procent komórek w fazie G2/M wzrastał do 46% i 59% z 21%, przy czym procent komórek w fazie G2/M był wyższy po zastosowaniu ekstraktu z korzeni transformowanych (publikacja **P.3.**).

W kolejnym badaniu z zastosowaniem cytometrii przepływowej wykazałam, że ekstrakt z korzeni transformowanych szczodrała krokoszowego indukował apoptozę i procent komórek apoptotycznych (wczesna i późna apoptoza) wzrastał z 3,5-10% (dla komórek kontrolnych nie traktowanych ekstraktem, w zależności od stadium zaawansowania) do ok. 30% w przypadku komórek glejaka ludzkiego w III i IV stadium zaawansowania i do ponad 40% w przypadku komórek glejaka ludzkiego w II stadium zaawansowania, po 24 godzinnym traktowaniu ekstraktem z korzeni transformowanych w stężeniu 0,75 mg mL⁻¹ (publikacja **P.3. i P.5.**). Po zastosowaniu ekstraktu w wyższym stężeniu, tj. 1 mg mL⁻¹, procent komórek wzrastał, do ok. 50% i 60%, odpowiednio, dla komórek w III i II stadium zaawansowania (publikacja **P.5.**).

Apoptoza jest procesem zaprogramowanej śmierci komórki, charakteryzującym się m.in. kondensacją chromatyny, fragmentacją jądra, tworzeniem się ciałek apoptotycznych, czy wzrostem poziomu ROS oraz aktywacją kaspaz (Steinbach i Weller, 2004; Forbes-Hernández i wsp., 2014). Apoptoza może zachodzić poprzez dwie drogi: drogę zewnątrzpochodną (receptora śmierci) i wewnątrzpochodną (mitochondrialny szlak apoptotyczny) (Forbes-Hernández i wsp., 2014). W szlaku zewnątrzpochodnym wiązanie ligandów z błonowymi receptorami śmierci prowadzi do aktywacji kaspazy-8 (Li i wsp., 2015). Mitochondrialny szlak apoptotyczny jest regulowany przez białka rodziny Bcl-2 z białkami pro- i anty-apoptotycznymi (Steinbach i Weller, 2004) i charakteryzuje się zmianą przepuszczalności błon mitochondrialnych (Forbes-Hernández i wsp., 2014). Wyniki moich badań wykazały, że ekstrakt z korzeni transformowanych *R. carthamoides* po 24 godzinnym traktowaniu komórek powodował ok. 3-krotny wzrost stężenia ROS w komórkach glejaka ludzkiego (II i III stadium) w porównaniu do komórek kontrolnych, które nie były traktowane ekstraktem (publikacja **P.5.**). Ponadto, ekstrakt ten obniżał potencjał błony mitochondrialnej w komórkach glejaka ludzkiego, 2-2,5-krotnie

w komórkach w II i III stadium zaawansowania (publikacja **P.5.**) i ok. 5-krotnie w komórkach glejaka w IV stadium zaawansowania (publikacja **P.3.**).

Z literatury wiadomo, że ROS hamuje ekspresję Bcl-2 i zwiększa ekspresję Bax (Jung i wsp., 2016). Aktywacja Bax z kolei indukuje uwalnianie cytochromu c z mitochondriów do cytosolu, w wyniku czego powstaje apoptosom i aktywuje kaspazę inicjacyjną, kaspazę-9 (Chen i Wang, 2002; Furnari i wsp., 2015). Z kolei kaspaza-9 może aktywować inne kaspazy, efektorowe lub egzekucyjne, w tym kaspazę-3, -6 lub -7 (Steinbach i Weller, 2004; Kuno i wsp., 2012). Aktywowana kaspaza-8 jest zdolna do aktywacji efektorowych kaspaz, tj. kaspazy-3 lub kaspazy-7, które inicjują śmierć komórki (Kuno i wsp., 2012). Wyniki moich badań wykazały, że ekstrakt z korzeni transformowanych *R. carthamoides*, po 24 godzinnym traktowaniu komórek, indukował apoptozę w komórkach glejaka ludzkiego (w stadium II-IV) zwiększając ekspresję pro-apoptotycznego genu *Bax* i jednocześnie obniżając ekspresję anty-apoptotycznego genu *Bcl-2* (publikacja **P.3.** i **P.5.**), a także zwiększał poziom ekspresji *kaspazy-3* i *kaspazy-9* w komórkach glejaka ludzkiego w stadium II i III (publikacja **P.5.**) oraz *Tp53* w komórkach glejaka we wszystkich badanych stadiach zaawansowania (publikacja **P.3.** i **P.5.**). Wyniki te sugerują, że apoptoza zachodząca w badanych komórkach glejaka ludzkiego (II-IV stadium) po traktowaniu ekstraktem z korzeni transformowanych *R. carthamoides* może być indukowana na drodze mitochondrialnej i/lub poprzez kombinację szlaków apoptozy zarówno mitochondrialnego, jak i receptora śmierci.

Kolejnym celem badań była chęć odpowiedzi na pytanie, czy 24 godzinne traktowanie ekstraktem z korzeni transformowanych *R. carthamoides* komórek glejaka w stadium IV zaawansowania, pochodzących od pacjenta i linii komercyjnej U87MG może indukować apoptozę tych komórek przez indukcję uszkodzeń DNA w teście kometowym, oraz zwiększenie liczby komórek z przełamanym PARP1 (polimeraza poli(ADP-rybozy)) (*cleaved PARP1-positive cells*) i ufosforylowanym histonem H2A.X (γ -H2A.X-*positive cells*) (marker dwuniciowych pęknięć DNA). W moich badaniach oceniałam także poziom ekspresji dwóch genów *UHRF1* (*ang. ubiquitin-like with PHD and ring finger protein 1*) i *DNMT1* (metylotransferaza DNA) w tych liniach komórkowych (publikacja **P.6.**). PARP1, jest zależnym od jądra enzymem zależnym od NAD^+ aktywowanym w odpowiedzi na uszkodzenie DNA, które odgrywa rolę w przenoszeniu ADP-rybozy (Gobeil i wsp., 2001; Kim i wsp., 2005). PARP1 odpowiada za naprawę DNA, stabilność DNA i regulację transkrypcji (Los i wsp., 2002). W odpowiedzi na aktywację kaspaz, białko PARP1 o masie 116 kDa jest cięte na fragment o wielkości 85 kDa, co wskazuje na apoptozę komórki

(Bhouri i wsp., 2012; Finco i wsp., 2016; Esposito i wsp., 2017). Ekstrakt z korzeni transformowanych szczodraka krokoszowego (w stężeniu $0,75 \text{ mg mL}^{-1}$) powodował zwiększenie liczby komórek z przełamanym PARP1 w obu badanych liniach w porównaniu do komórek kontrolnych, nie traktowanych ekstraktem, przy czym poziom tych komórek był dla obu linii podobny (55%). Ponadto, ekstrakt ten indukował także w teście kometowym uszkodzenia DNA (podwójne pęknięcia DNA). Procent uszkodzeń DNA wzrastał wraz ze stężeniem ekstraktu roślinnego i w najwyższym badanym stężeniu ($1,5 \text{ mg mL}^{-1}$) indukował więcej uszkodzeń DNA w komórkach glejaka otrzymanych od pacjenta niż w komórkach U87MG (41% vs. 34%). Ponieważ poziom dwuniciowych pęknięć DNA jest skorelowany z poziomem ufosforylowanego histonu H2A.X, w moich badaniach z zastosowaniem cytometrii przepływowej określiłam poziom γ -H2A.X-pozytywnych komórek i stwierdziłam, że procent komórek wykazujących ekspresję γ -H2A.X wzrastał w obu testowanych liniach komórek glejaka po traktowaniu ekstraktem z korzeni transformowanych szczodraka w porównaniu z komórkami kontrolnymi nie traktowanymi ekstraktem i był znacząco wyższy dla komórek U87MG (około 83%) w porównaniu z komórkami glejaka pochodzącymi od pacjenta (około 70%). Poziom γ -H2A.X zmierzono również za pomocą testu Elisa, a wyniki tego badania potwierdziły wzrost poziomu γ -H2A.X w obu badanych liniach glejaka. Określiłam również poziom ekspresji mRNA dwóch genów, *UHRF1* i *DNMT1*, które są markerami epigenetycznymi DNA. Białko UHRF1 pojawia się w miejscach uszkodzeń DNA (Tien i wsp., 2011) i bezpośrednio rekrutuje DNMT1 do hemimetylowanego DNA (Sidhu and Capalash, 2017). Obniżenie poziomu UHRF1 w komórkach nowotworowych powoduje wzrost uszkodzeń DNA i hamowanie proliferacji tych komórek, a także zatrzymanie cyklu komórkowego i apoptozę zależną od kaspazy-8 (Tien i wsp., 2011). Ponadto, Tien i in. (2011) zaobserwowali podniesiony poziom γ -H2A.X i przełamanego PARP1 w komórkach wykazujących obniżony poziom UHRF1. Wyniki moich badań wykazały, że poziom mRNA *UHRF1* i *DNMT1* był obniżony po zastosowaniu ekstraktu z korzeni transformowanych *R. carthamoides* w obu badanych liniach glejaka, przy czym istotne różnice pomiędzy liniami glejaka obserwowałam w poziomie ekspresji genu *UHRF1*.

W odniesieniu do cytotoksycznego efektu ekstraktu z korzeni transformowanych *R. carthamoides* transformowanych (stężenie IC_{50}) wobec komórek białaczki linii CCRF-CEM i K-562 i komórek nabłonkowych niedrobnokomórkowego raka płuc A549, po 24 godzinach inkubacji oceniłam także potencjał błony mitochondrialnej w komórkach tych linii nowotworowych, poziom uszkodzeń mitochondrialnego DNA (mtDNA) w genach *ND1* oraz *ND5* kodujących, odpowiednio, dehydrogenazę NADH 1 i 5 oraz jądrowego DNA

(nDNA) w genach *TP53* kodującym białko p53 i *HPRT1* kodującym fosforybozylotransferazę hipoksantynową 1 (metodą SLR-qRT-PCR) oraz liczbę kopii mtDNA (qRT-PCR) (publikacja **P.7.**). Jako materiał porównawczy zastosowałam ekstrakt z korzeni roślin rosnących w gruncie. Zaobserwowałam, że oba ekstrakty roślinne obniżają potencjał mitochondrialny we wszystkich trzech testowanych liniach komórkowych w porównaniu z komórkami kontrolnymi, nie traktowanymi ekstraktami. Ponadto, warto podkreślić, że ekstrakt z korzeni transformowanych wykazywał silniejsze właściwości i obniżał potencjał błony mitochondrialnej około 2,5-krotnie w komórkach ludzkiej białaczki K-562 i 1,2-krotnie w komórkach CCRF-CEM i A549.

W komórkach nowotworowych mutacje mtDNA mogą być indukowane przez ROS i reaktywne aldehydy, co powoduje zmiany w kodowanych białkach potrzebnych do funkcjonowania mitochondriów (Barrera i wsp., 2016). Ekstrakty z korzeni transformowanych i korzeni roślin rosnących w gruncie wykazywały działanie genotoksyczne, zwiększając poziom uszkodzeń mtDNA w regionie *ND1* w komórkach wszystkich trzech badanych linii nowotworowych (K-562, CCRF-CEM i A549) i w regionie *ND5* tylko w komórkach ludzkiej białaczki (K-562 i CCRF-CEM). Poziom uszkodzeń w komórkach linii K-562 w regionie *ND1* wynosił 3,6 uszkodzeń na 10 kb DNA po traktowaniu ekstraktem z korzeni roślin rosnących w gruncie i 4,7 uszkodzeń na 10 kb DNA po traktowaniu ekstraktem z korzeni transformowanych. Ponadto, ekstrakt z korzeni transformowanych indukował również więcej uszkodzeń w komórkach linii CCRF-CEM w regionie *ND1* w porównaniu z ekstraktem z korzeni roślin rosnących w gruncie: 4,1 uszkodzeń na 10 kb DNA w porównaniu z 2,8 uszkodzeń na 10 kb DNA. Z kolei, dla komórek linii A549: ok. 5 uszkodzeń na 10 kb DNA po traktowaniu ekstraktem z korzeni roślin rosnących w gruncie i 5,5 uszkodzeń na 10 kb DNA po traktowaniu ekstraktem z korzeni transformowanych (bez różnic istotnych statystycznie) (publikacja **P.7.**).

Zwiększony poziom uszkodzeń mtDNA w regionie *ND5* obserwowałam tylko w liniach komórkowych ludzkiej białaczki: 2,9 uszkodzeń na 10 kb DNA (ekstrakt z korzeni roślin rosnących w gruncie) i 4,0 uszkodzeń na 10 kb DNA (ekstrakt z korzeni transformowanych) w komórkach linii K-562 i 4,3 uszkodzeń na 10 kb DNA (ekstrakt z korzeni roślin rosnących w gruncie) i 4,6 uszkodzeń na 10 kb DNA (ekstrakt z korzeni transformowanych) w komórkach linii CCRF-CEM. Nie stwierdziłam istotnych różnic w poziomie uszkodzeń w regionie *ND5* pomiędzy badanymi ekstraktami roślinnymi dla komórek CCRF-CEM (publikacja **P.7.**).

Dodatkowo, określiłam także poziom uszkodzeń nDNA w regionie *TP53* i *HPRT1* w komórkach ludzkiej białaczki K-562 i CCRF-CEM i komórkach nabłonkowych niedrobnokomórkowego raka płuc A549, po 24 godzinach inkubacji z ekstraktami z korzeni transformowanych i korzeni roślin rosnących w gruncie (publikacja **P.7.**). Ekstrakty z korzeni wykazywały aktywność genotoksyczną poprzez zwiększenie uszkodzeń nDNA w regionie *TP53* w liniach komórkowych ludzkiej białaczki (K-562 i CCRF-CEM), ale nie stwierdziłam istotnych różnic między badanymi ekstraktami. W komórkach linii K-562 ekstrakty roślinne zwiększyły uszkodzenia nDNA do ok. 3,5 uszkodzeń na 10 kb, a w komórkach CCRF-CEM do ok. 4,5 uszkodzeń na 10 kb. Ponadto, oba ekstrakty roślinne nie powodowały indukcji uszkodzeń w regionie *HPRT1* w żadnej z testowanej linii komórkowej.

W kolejnym badaniu określiłam również liczbę kopii mtDNA w komórkach linii K-562, CCRF-CEM i A549 po ich 24 godzinnym traktowaniu ekstraktami z korzeni transformowanych szczodraka krokoszowego i korzeni roślin rosnących w gruncie (publikacja **P.7.**). Stwierdziłam, że liczba kopii mtDNA była nieznacznie podwyższona po traktowaniu tymi ekstraktami roślinnymi we wszystkich testowanych liniach komórkowych, ale bez znaczących różnic statystycznych ($p < 0,05$) w porównaniu z komórkami kontrolnymi (nie traktowanymi ekstraktami). Obniżona, jak i podwyższona liczba kopii mtDNA może zwiększać ryzyko powstawania nowotworu (van Gisbergen i wsp., 2015; Barrera i wsp., 2016), a niska liczba kopii w komórkach nowotworowych może być odpowiedzialna za progresję nowotworu (van Gisbergen i wsp., 2015) lub oporność na chemioterapię (van Osch i wsp., 2015). Stwierdzono również, że zmniejszenie liczby kopii mtDNA zwiększa ekspresję genu oporności wielolekowej 1 (MDR1), z wyższą tolerancją na środki przeciwnowotworowe w ludzkich komórkach 143B osteosarkoma, komórkach HCT-8 raka okrężnicy i komórkach wątrobiaka (Hsu i wsp., 2016). Z kolei Mei i wsp. (2015) sugerują, że niższa liczba kopii mtDNA może powodować wzrost poziomu ROS w komórkach nowotworowych i zwiększać wrażliwość na leki chemioterapeutyczne poprzez indukcję apoptozy.

4.3.3.3.3. Aktywność antyoksydacyjna wodno-metanolowych ekstraktów z części nadziemnych i korzeni roślin zregenerowanych z korzeni transformowanych *R. carthamoides* (publikacja P.8., komunikat zjazdowy K.43.) w modelach biologicznych oraz aktywność antyoksydacyjna olejków eterycznych wyizolowanych z korzeni transformowanych i korzeni roślin rosnących w gruncie (publikacja P.4., komunikat zjazdowy K.22.)

Kwasy fenolowe, które powszechnie występują w diecie człowieka, wykazują wysokie działanie antyoksydacyjne i mogą zapobiegać chorobom związanym ze stresem oksydacyjnym, jak na przykład choroba niedokrwienna serca, miażdżyca, czy nadciśnienie (Kołodziejczyk-Czepas i wsp., 2013). Wzrost produkcji wolnych rodników i spadek aktywności antyoksydacyjnej powoduje zachwianie równowagi między utleniaczami i przeciwutleniaczami co prowadzi do stresu oksydacyjnego. Korzenie i kłącza *R. carthamoides*, które są stosowane w preparatach nutraceutycznych i suplementach diety bogate są w kwasy fenolowe (Kokoska i Janovska, 2009; publikacja P.1.). Aktywność antyoksydacyjna *R. carthamoides* została wykazana wcześniej w prostych modelach chemicznych *in vitro*, m.in. w testach DPPH, ABTS i FRAP (Milauskas i wsp., 2004; Biskup i Lojkowska, 2009; Kokoska i Janovska, 2009). W świetle mojej wiedzy brak jest doniesień dotyczących badań antyoksydacyjnych ekstraktów z tego gatunku w modelach biologicznych. W publikacji P.8. wykazałam, po raz pierwszy, że ekstrakty z korzeni i liści 3-miesięcznych roślin transformowanych *R. carthamoides* rosnących *ex vitro* w szklarni, które zostały zregenerowane z korzeni transformowanych tego gatunku oraz 3-miesięcznych roślin wyprowadzonych z nasion wykazują działanie antyoksydacyjne na ludzkie osocze krwi w testach DPPH, ABTS i FRAP i mogą chronić składniki osocza przed stresem oksydacyjnym. Wyniki testów DPPH i ABTS wykazały, że ekstrakty pochodzące z roślin transformowanych, zarówno z liści, jak i korzeni, w stężeniach 25 i 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ wykazywały istotnie ($p < 0,01$) wyższą aktywność wychwytywania wolnych rodników w ludzkim osoczu krwi niż ekstrakty z roślin wyprowadzonych z nasion. Ponadto, ekstrakty z korzeni wykazywały silniejsze działanie antyoksydacyjne niż ekstrakty z liści. Ekstrakt z korzeni roślin transformowanych (50 $\mu\text{g/mL}$) wykazywał najwyższą zdolność wychwytywania wolnych rodników zarówno w testach ABTS, jak i DPPH: odpowiednio 5,1 mM Troloxu i 2,1 mM Troloxu. W teście FRAP statystycznie istotne ($p < 0,01$) zwiększenie potencjału redukcyjnego osocza obserwowałam przy stężeniu wynoszącym 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dla wszystkich ekstraktów, za wyjątkiem ekstraktu z liści roślin wyprowadzonych

z nasion. Aktywność antyoksydacyjna ekstraktów z roślin transformowanych (korzeni i liści) i z korzeni roślin wyprowadzonych z nasion były porównywalne.

Właściwości antyoksydacyjne wykazywał ponadto, olejek eteryczny wyizolowany z korzeni transformowanych *R. carthamoides* hodowanych w płynnym podłożu WPM, na świetle (16h fotoperiod) i korzeni roślin rosnących w gruncie (w stężeniu $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) powodując obniżenie poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) ok. 1,5-krotnie w ludzkich astrocytach traktowanych lipopolisacharydem (LPS) (publikacja P.4.). Pomiar poziomu ROS określono za pomocą pomiaru fluorescencji 2,7-dichlorofluoresceiny (DCF).

4.3.3.4. Aktywność przeciwzapalna olejków eterycznych wyizolowanych z korzeni transformowanych i korzeni roślin *R. carthamoides* rosnących w gruncie (publikacja P.4., komunikat zjazdowy K.22.)

W pracy określiłam również właściwości przeciwzapalne olejku eterycznego wyizolowanego z korzeni transformowanych *R. carthamoides* rosnących na świetle (16h fotoperiod), w płynnym podłożu WPM oraz korzeni roślin rosnących w gruncie. W badaniu tym, jako czynnik indukujący proces zapalny w ludzkich astrocytach zastosowałam lipopolisacharyd (LPS). LPS jest głównym składnikiem zewnętrznej błony bakterii Gram-ujemnych i jest znany jako induktor stanu zapalnego w różnych komórkach, w tym także astrocytów (Bellaver i wsp., 2015). LPS jest rozpoznawany przez receptor 4 Toll-podobny (TLR4) astrocytów i traktowanie astrocytów LPS aktywuje czynnik transkrypcyjny (NF- κ B) i kinazę białkową aktywowaną mitogenami (MAPK), które prowadzą do uwolnienia mediatorów stanu zapalnego, takich jak pro- i przeciwzapalne cytokiny lub czynnika martwicy nowotworów (TNF- α) czy też nadprodukcję reaktywnych form tlenu (ROS) (Bellaver i wsp., 2015). Właściwości przeciwzapalne olejków określiłam na podstawie pomiaru poziomu IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α i GM-CSF metodą ELISA i RT-PCR. W pierwszym etapie badań wykazałam, że oba olejki eteryczne wyizolowane z korzeni transformowanych oraz korzeni roślin rosnących w gruncie nie były cytotoksyczne wobec ludzkich astrocytów (przeżywalność komórek ponad 80%) w zakresie stężeń $100\text{--}400 \mu\text{g mL}^{-1}$. Przeżywalność komórek spadała poniżej 60% po zastosowaniu wyższych stężeń olejków eterycznych tj. 1600 i $3200 \mu\text{g mL}^{-1}$. **Olejki eteryczne z korzeni transformowanych i korzeni roślin rosnących w gruncie obniżały poziom IL-1 β , IL-6 i TNF- α , ale nie IL-8, IL-10, czy GM-CSF wraz ze wzrastającym stężeniem (25 , 50 i $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) w ludzkich astrocytach stymulowanych LPS.**

4.3.3.3.5. Właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze olejków eterycznych wyizolowanych z korzeni transformowanych i korzeni roślin *R. carthamoides* rosnących w gruncie (publikacja P.4., komunikat zjazdowy K.22.)

Olejki eteryczne wyizolowane z korzeni transformowanych *R. carthamoides* oraz korzeni roślin rosnących w gruncie sprawdziłam także pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) oraz grzybów (*Saccharomyces cerevisiae* i *Candida albicans*) poprzez oznaczanie minimalnego stężenia hamującego (MIC), minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) i minimalnego stężenia grzybobójczego (MFC). Stwierdziłam, że olejki eteryczne, zarówno wyizolowane z korzeni transformowanych oraz korzeni roślin rosnących w gruncie wykazywały silniejszą aktywność przeciwbakteryjną ($\text{MIC}=125\text{-}250\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) niż aktywność przeciwgrzybiczą ($\text{MIC}=625\text{-}1250\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$). **Najwyższą aktywność przeciwbakteryjną olejków eterycznych z wartością MIC wynoszącą $125\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ zaobserwowałam w przypadku *Enterococcus faecalis* i *Pseudomonas aeruginosa*.** Nie stwierdziłam istotnej różnicy we wrażliwości pomiędzy bakteriami Gram-dodatnimi i bakteriami Gram-ujemnymi po działaniu olejków eterycznych. W celu oszacowania bakteriostatycznych i bakteriobójczych właściwości obu olejków eterycznych oceniono również wartości MBC. Wartości te były nie więcej niż czterokrotnie wyższe niż wartości MIC.

4.3.4. Podsumowanie osiągnięć stanowiących podstawę habilitacji

1. Zregenerowałam pędy *R. carthamoides* poprzez organogenezę pośrednią (z eksplantatów pozyskanych z 3-tygodniowych aseptycznie wyhodowanych siewek) i organogenezę bezpośrednią (z liści 5-tygodniowych wyhodowanych *in vitro* pędów). Zregenerowane pędy następnie ukorzeniłam i przeprowadziłam ich aklimatyzację w szklarni.
2. Rośliny uzyskane na drodze organogenezy pośredniej różniły się morfologicznie i genetycznie od roślin otrzymanych na drodze organogenezy bezpośredniej. Współczynnik podobieństwa Jaccarda w analizie RAPD-PCR i ISSR-PCR dla roślin zregenerowanych bezpośrednio z eksplantatów liściowych i roślin macierzystych był wysoki i wynosił 0,94. W przypadku roślin zregenerowanych poprzez organogenezę pośrednią w analizie RAPD-PCR współczynnik Jaccarda wynosił ok. 0,7. Rośliny te w analizie ISSR-PCR wykazywały wysokie podobieństwo genetyczne do tkanki kalusowej, z której zostały zregenerowane (0,82).

3. Rośliny zregenerowane na drodze organogenezy wytwarzały kwas chlorogenowy oraz 20-hydroksyekdyson. Najwyższy poziom kwasu chlorogenowego ($12 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.m.}$) stwierdziłam w liściach roślin uzyskanych bezpośrednio z eksplantatów liściowych, podczas gdy liście roślin zregenerowanych z tkanki kalusowej gromadziły najwyższe ilości 20-hydroksyekdysonu ($7,4 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.m.}$).
4. Uzyskałam korzenie transformowane poprzez transformację genetyczną przy użyciu *Agrobacterium rhizogenes* oraz wyselekcjonowałam linię korzeni wykazujących najwyższe przyrosty biomasy. Po 35 dniach hodowli, najwyższe przyrosty biomasy, świeża (93 g L^{-1}) i sucha masa (12 g L^{-1}), osiągały korzenie rosnące w podłożu WPM, na świetle (16h fotoperiod).
5. Z korzeni transformowanych po raz pierwszy zregenerowałam całe rośliny, które wykazywały typową dla transformowanych roślin morfologię liści, które były małe i wąskie. Rośliny transformowane wykazywały wyższą całkowitą świeżą biomasę ($30,9 \text{ g}$) niż rośliny wyhodowane z nasion ($18,4 \text{ g}$). Ponadto, rośliny transformowane wykazywały około 7,5-krotnie wyższą świeżą masę korzeni ($27,3 \text{ g}$) niż masę liści ($3,6 \text{ g}$).
6. Korzenie transformowane oraz zregenerowane z nich rośliny są cennym źródłem kwasów kawoilochinowych i ich pochodnych. Niektóre z kwasów kawoilochinowych, takich jak kwas 1,3-di-O-kawoilochinowy, kwas 1,5-di-O-kawoilochinowy, kwas 3,4-di-O-kawoilochinowy, kwas 3,5-di-O-kawoilochinowy, kwas 4,5-di-O-kawoilochinowy i kwas 1,4,5-tri-O-kawoilochinowy zostały zidentyfikowane w *R. carthamoides* po raz pierwszy.
7. Światło ma pozytywny wpływ na biosyntezę metabolitów wtórnych w korzeniach transformowanych. Całkowite stężenie kwasów kawoilochinowych i ich pochodnych było około 2-krotnie wyższe w korzeniach hodowanych na świetle (19 mg g^{-1} suchej masy (s.m.) niż rosnących w ciemności ($11,5 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.m.}$) a dominującą frakcją w obu kulturach były pochodne kwasów tri-kawoilochinowych. Ponadto, niezidentyfikowana pochodna kwasów tri-kawoilochinowych była głównym związkiem wśród wszystkich zidentyfikowanych kwasów kawoilochinowych zarówno w korzeniach transformowanych rosnących na świetle, jak i w ciemności (odpowiednio, $6 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.m.}$ i $4 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.m.}$). Korzenie hodowane na świetle były zdolne do syntezy glikozydów flawonoidów (heksozyd kwercytyny, heksozyd luteoliny i heksozyd patuletyny).

8. Rośliny transformowane są także bogate w pochodne kwasów kawaloilochinowych, których całkowita zawartość w korzeniach ($33,5 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.m.}$) i liściach ($15,5 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.m.}$) była znacząco wyższa niż ta w korzeniach ($11 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.m.}$) i liściach ($12 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.m.}$) roślin wyhodowanych z nasion. Głównymi związkami zidentyfikowanymi w korzeniach roślin transformowanych, w których stwierdzono najwyższą zawartość metabolitów wtórnych, był kwas chlorogenowy ($11 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.m.}$), niezidentyfikowana pochodna kwasu tri-kawoilochinowego ($7 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.m.}$), kwas 3,5-di-O-kawoilochinowy ($5,5 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.m.}$) i kwas 4,5-di-O-kawoilochinowy ($4 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.m.}$).
9. Ekstrakty z korzeni i liści 3-miesięcznych roślin transformowanych rosnących *ex vitro* w szklarni, które zostały zregenerowane z korzeni transformowanych wykazywały działanie antyoksydacyjne na ludzkie osocze krwi w testach DPPH, ABTS i FRAP.
10. Ekstrakty ze szczodraka krokoszowego wykazywały różny stopień cytotoksyczności wobec komórek różnych linii nowotworowych. Najbardziej wrażliwe na działanie ekstraktów roślinnych były komórki czerniaka ludzkiego A2058. Ekstrakty z roślin transformowanych hamowały wzrost tych komórek do ok. 50% po zastosowaniu $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ tego ekstraktu, po 72 godzinnym traktowaniu. W przypadku ekstraktu z korzeni transformowanych wyższe jego stężenia były potrzebne do zahamowania wzrostu komórek w 50%, dla komórek ludzkiej białaczki linii CCRF-CEM i K-562 ($0,313 \text{ mg mL}^{-1}$) i komórek nabłonkowych niedrobnokomórkowego raka płuc A549 ($0,625 \text{ mg mL}^{-1}$), po 24 godzinach inkubacji. Efekt cytotoksyczny ekstraktów z korzeni transformowanych wobec ludzkich komórek glejaka był obserwowany przy wyższych jego stężeniach. Wartość IC_{50} wynosiła $0,75 \text{ mL}^{-1}$ dla komórek glejaka w II stadium zaawansowania i 1 mg mL^{-1} dla komórek glejaka w III i IV stadium zaawansowania, zarówno dla komórek wyizolowanych od pacjenta, jak i linii komercyjnej U87MG.
11. Ekstrakt z korzeni transformowanych wykazał zdolność do indukcji apoptozy poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie S i G₂/M, wzrost stężenia reaktywnych form tlenu i obniżenie potencjału błony mitochondrialnej, zmianę poziomu ekspresji genów zaangażowanych w apoptozę (*Bax*, *Bcl-2*, *Tp53*, *kaspaza 3* i *kaspaza 9*) oraz wzrost uszkodzeń DNA, zmianę poziomu komórek z przełamanym PARP1 i ufosforylowanym H2A.X oraz obniżenie poziomu ekspresji genów *DNMT1* i *UHRF1* w komórkach glejaka ludzkiego. W komórkach ludzkiej białaczki linii CCRF-CEM i K-562 oraz komórkach nabłonkowych niedrobnokomórkowego raka płuc A549 ekstrakt z korzeni

transformowanych indukował apoptozę poprzez zmniejszenie potencjału błony mitochondrialnej oraz wykazywał aktywność genotoksyczną poprzez zwiększenie uszkodzeń mtDNA w regionie *ND1* i *ND5* oraz nDNA w regionie *TP53*.

12. Olejki eteryczne wyizolowane z korzeni transformowanych i korzeni roślin rosnących w gruncie wykazały różny profil chemiczny. W obu olejkach eterycznych dominowały seskwiterpeny, w szczególności węglowodory seskwiterpenów (54,7-62,2%). W olejku eterycznym z korzeni roślin rosnących w gruncie głównymi składnikami był aplotaksen (all-cis-heptadeca-1,8,11,14-tetraen) (27,3%), nardosina-1(10),11-dien (20,7%) oraz dauca-4(11),8-dien (10,2%). Z kolei, olejek eteryczny wyizolowany z korzeni transformowanych charakteryzował się obecnością cyperenu (18,2%), 13-norcypera-1(5,11(12)-dienu (15,3%) i kadalenu (7,2%).

13. Olejki eteryczne z korzeni transformowanych i korzeni roślin rosnących w gruncie obniżały poziom IL-1 β , IL-6 i TNF- α , ale nie IL-8, IL-10, czy GM-CSF w ludzkich astrocytach stymulowanych LPS oraz wykazywały właściwości antyoksydacyjne powodując obniżenie poziomu ROS w tych komórkach. Oba olejki eteryczne wykazywały także aktywność przeciwdrobnoustrojową. Najwyższą aktywność przeciwbakteryjną z wartością MIC=125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ zaobserwowałam w przypadku *Enterococcus faecalis* i *Pseudomonas aeruginosa*.

4.3.5. Literatura

- Abbasi B.H., Tian C.-L., Murch S. J., Saxena P. K., Liu C.-Z., 2007, Light-enhanced caffeic acid derivatives biosynthesis in hairy root cultures of *Echinacea purpurea*, *Plant Cell Rep*, 26(8): 1367–1372
- Barrera G., Gentile F., Pizzimenti S., Canuto R.A., Daga M., Arcaro A., Cetrangolo G.P., Lepore A., Ferretti C., Dianzani Ch., Muzio G., 2016, Mitochondrial dysfunction in cancer and neurodegenerative diseases: spotlight on fatty acid oxidation and lipoperoxidation products, *Antioxidants*, 5: 7
- Bellaver B., Souza D.G., Bobermin L.D., Souza D.O., Gonçalves C.-A., Quincozes-Santos A., 2015, Resveratrol protects hippocampal astrocytes against LPS-induced neurotoxicity through HO-1, p38 and ERK pathways, *Neurochem Res*, 40(8): 1600-1608
- Bhourri W., Boubaker J., Skandrani I., Ghedira K., Ghedira L.Ch., 2012, Investigation of the apoptotic way induced by digallic acid in human lymphoblastoid TK6 cells, *Cancer Cell Int*, 12: 26
- Biskup E., Lojkowska E., 2009, Evaluation of biological activities of *Rhaponticum carthamoides* extracts, *J Med Plant Res*, 3: 1092-1098

- Chen M., Wang J., 2002, Initiator caspases in apoptosis signaling pathways, *Apoptosis* 7(4): 313–319
- Esposito T., Sansone F., Franceschelli S., Del Gaudio P., Picerno P., Aquino R.P., Mencherini T., 2017, Hazelnut (*Corylus avellana* L.) shells extract: phenolic composition, antioxidant effect and cytotoxic activity on human cancer cell lines, *Int J Mol Sci*, 18: pii:E392
- Finco F.D.B.A., Kloss L., Graeve L., 2016, Bacaba (*Oenocarpus bacaba*) phenolic extract induces apoptosis in the MCF-7 breast cancer cell line via the mitochondria-dependent pathway, *NFS J*, 5: 5–15
- Forbes-Hernández T.Y., et al., 2014, The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: a focus on apoptotic mechanism, *Food Chem Toxicol*, 68: 154–182
- Furnari F.B., Fenton T., Bachoo R.M., Mukasa A., Stommel J.M., Stegh A., Hahn W.C., Ligon K.L., Louis D.N., Brennan C., Chin L., De Pinho R.A., Cavenee W.K., 2015, Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment, *Genes Dev*, 21: 2683–2710
- Gamborg O.L., Miller R. A., Ojima K., 1968, Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, *Exp Cell Res*, 5 (10): 151–158
- Gobeil S., Boucher C.C., Nadeau D., Poirier G.G., 2001, Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases, *Cell Death Differ*, 8:588–594
- Gouthamchandra K., Sudeep H.V., Venkatesh B.J., Prasad K.S., 2017, Chlorogenic acid complex (CGA7), standardized extract from green coffee beans exerts anticancer effects against cultured human colon cancer HCT-116 cells, *Food Science and Human Wellness*, 6: 147-153
- Hsu Ch.-Ch., Tseng L.-M., Lee H.-Ch., 2016, Role of mitochondrial dysfunction in cancer progression", *Exp Biol Med*, 241: 1281–1295, doi:10.1177/1535370216641787
- Jung H., Bae J., Ko S.K., Sohn U.D., 2016, Ultrasonication processed *Panax ginseng* berry extract induces apoptosis through an intrinsic apoptosis pathway in HepG2 cells, *Arch Pharm Res*, 39:855–862
- Kim M.Y., Zhang T., Kraus W.L., 2005, Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD? into a nuclear signal, *Genes Dev*, 19: 1951–1967. <https://doi.org/10.1101/gad.1331805>
- Kokoska L. i Janowska D., 2009, Chemistry and pharmacology of *Rhaponticum carthamoides*: a review, *Phytochemistry*, 70 (7): 842–855
- Kolodziejczyk-Czepas J., Olas B., Malinowska J., Wachowicz B., Moniuszko-Szajwaj B., Kowalska I., Oleszek W., Stochmal A., 2013, *Trifolium pallidum* and *Trifolium scabrum* extracts in the protection of human plasma components, *J Thromb Thrombolysis*, 35: 193–199. doi.: 10.1007/s11239-012-0792-9
- Kuno T., Tsukamoto T., Hara A., Tanaka T., 2012, Cancer chemoprevention through the induction of apoptosis by natural compounds, *J Biophys Chem*, 3(2): 156–173

- Kurata R., Adachi M., Yamakawa O., Yoshimoto M., 2007, Growth suppression of human cancer cells by polyphenolics from sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaves, *J Agr Food Chem*, 55: 185-190
- Li Q., Deng M., Zhang J., Zhao W., Song Y., Li Q., Huang Q., 2013, Shoot organogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Lysionotus serratus* D. Don. *Sci World J*, Volume 3013, 7 pages, ID 280384. doi: 10.1155/2013/280384
- Li Q., et al., 2015, Antiproliferative and apoptosis- inducing activity of schisandrin B against glioma cells, *Cancer Cell Int*, 15: 12
- Lloyd G. B. i McCown B. H., 1980, Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoottip culture, *Proceedings of the International Plant Propagator's Society*, 30: 421–427
- Los M., Ferrari D., Stepczynska A., Stroh Ch., Renz A., Herceg Z., Wang Z.-Q., Schulze-Osthoff K., 2002, Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling, *Mol Biol Cell*, 13: 978–988
- Malarz J., Stojakowska A., Kisiel W., 2013, Long-term cultured hairy roots of chicory-a rich source of hydroxycinnamates and 8-deoxylactucin glucoside, *Appl Biochem Biotechnol*, 171(7): 1589–1601
- Mei H., Sun S., Bai Y., Chen Y., Chai R., Li H., 2015, Reduced mtDNA copy number increases the sensitivity of tumor cells to chemotherapeutic drugs, *Cell Death Dis*, 6: e1710, doi:10.1038/cddis.2015.78
- Miliauskas G., Venskutonis P.R., van Beek T.A., 2004, Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts, *Food Chem*, 85: 231–237
- Murashige T., Skoog F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol Plant*, 15: 473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Park H.-J., 2010, Chemistry and pharmacological action of caffeoylquinic acid derivatives and pharmaceutical utilization of chwinamul (Korean Mountainous Vegetable), *Archives of Pharmacal Research*, 33(11): 1703–1720
- Petkov V., Roussinov K., Todorov S., Lazarova M., Yonkov D., Draganova S., 1984, Pharmacological Investigations on *Rhaponticum carthamoides*, *Planta Med*, 50 (3): 205-209
- Puangpraphant S.K., Potts G., de Mejia E.G., 2011, Dicafeoylquinic acids in Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF- κ B nucleus translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and -3 in human colon cancer cells, *Mol Nutr Food Res*, 55: 1509-1522
- Roychowdhury D., Majumder A., Jha S., 2013, *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation in medicinal plants: prospects and challenges, chapter 2, pp. 29-68, in: *Biotechnology for Medicinal*

- Plants, Micropropagation and Improvement, Chandra S., Lata H., Varma A. (eds.), XVI, Hardcover, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, ISBN: 978-3-642-29973-5. doi: 10.1007/978-3-642-29974-2_2
- Schenk R. U., Hildebrandt A. C., 1972, Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, *Canadian Journal of Botany*, 50(1): 199–204
- Shkryl Y.N., Veremeichik G.N., Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N., 2008, Individual and combined effects of the *rol* A, B, and C genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli, *Biotechnol Bioeng*, 100(1): 118–125
- Sidhu H., Capalash N., 2017, UHRF1: the key regulator of epigenetics and molecular target for cancer therapeutics, *Tumor Biol*, 39: 1–11. <https://doi.org/10.1177/1010428317692205>
- Srivastava M., Mehrotra S., Mishra S., 2018, Hairy Roots. An Effective Tool of Plant Biotechnology, wyd. Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2018, ISBN 978-981-13-2561-8, ISBN 978-981-13-2562-5 (eBook). <https://doi.org/10.1007/978-981-13-2562-5>
- Steinbach J.P., Weller M., 2004, Apoptosis in gliomas: molecular mechanisms and therapeutic implications, *J Neurooncol*, 70: 245–254
- Syrov V.N., Nasyrova S.S., Khushbaktova, Z.A., 1997, The results of experimental study of phytoecdysteroids as erythropoiesis stimulators in laboratory animals, *Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologiya*, 60(3): 41–44
- Tien A., Senbanerjee S., Kulkarni A., Mudbhary R., Goudreau B., Ganesan S., Sadler K.C., Ukomadu Ch., 2011, UHRF1 depletion causes a G2/M arrest, activation of DNA damage response and apoptosis, *Biochem J*, 435: 175–185. <https://doi.org/10.1042/BJ20100840>
- Timofeev N.P., Lapin A.A., Zelenkov V.N., 2006, Quality assessment of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin as medicinal raw material by the bromic antioxidant capacity estimation, *Journal Chemistry and Computational Simulation: Butlerov Communications*, 8(2): 35–40
- Tusevski O., Petreska Stanoeva J., Stefova M., Pavokovic D., Gadzovska Simic S., 2014, Identification and quantification of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. transgenic shoots, *Acta Physiol Plant*, 36: 2555–2569
- van Gisbergen M.W., Voets A.M., Starmans M.H.W., de Coo I.F.M., Yadak R., Hoffmann R.F., Boutros P.C., Smeets H.J.M., Dubois L., Lambin P., 2015, How do changes in the mtDNA and mitochondrial dysfunction influence cancer and cancer therapy? Challenges, opportunities and models, *Mutat Res*, 764: 16–30

- van Osch F.H.M., Voets A.M., Schouten L.J., Gottschalk R.W.H, Simons C.C.J.M., van Engeland M., Lentjes M.H.F.M., van den Brandt P.A., Smeets H.J.M., Weijnenberg M.P., 2015, Mitochondrial DNA copy number in colorectal cancer: between tissue comparisons, clinicopathological characteristics and survival, *Carcinogenesis*, 36: 1502-1510
- Vanisree M., Lee Ch.-Y., Lo S.-F., Nalawade S.M., Lin Ch.Y., Tsay H.-S., 2004, Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures, *Bot Bull Acad Sin*, 45: 1-22
- Vereshchagina Y.V., Bulgakov V.P., Grigorchuk V.P., Rybin V.G., Veremeichik G.N., Tchernoded G.K., Chau L.T., 2014, The *rolC* gene increases caffeoylquinic acid production in transformed artichoke cells, *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(18): 7773-7780
- Zand A., Babaei A., Omidbaigi R., Daneshfar E., 2014, Study on callus induction and plant regeneration of *Leuzea carthamoides* via tissue culture system. *J Med Plant Res*, 8:260–268. doi:10.5897/JMPR11.610
- Zawiślak G., 2010, Lecznicze właściwości szczodraka krokoszowego, 2010, *Panacea*, 30(1): 26-27

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

5.1. Omówienie działalności naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

Biotechnologią roślin zajmuje się od roku 1999 kiedy zaraz po studiach zostałam zatrudniona w Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Akademii Medycznej w Łodzi (obecnie Uniwersytet Medyczny) na etacie starszego referenta inżynierjno-technicznego. Pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Haliny Wysokińskiej zgłębiałam tajniki świata roślin, a zwłaszcza biotechnologii. Od samego początku pracy fascynowała mnie praca naukowo-badawcza. Początkowo, przedmiotem moich badań były cztery gatunki szalwii z rodziny Lamiaceae (Jasnotowate). Były to *Salvia nemorosa*, *S. splendens*, *S. sclarea* i *S. przewalskii*. Badania biotechnologiczne na tych gatunkach obejmowały m.in. opracowanie metody ich mikrorozmnażania zarówno z tkanek merystematycznych, jak i poprzez organogenezę. Wyniki uzyskanych badań zostały opublikowane w 4 pracach (Załącznik nr 8, publikacje **A.1-A.4**) i zaprezentowane w postaci komunikatów zjazdowych na 12 konferencjach krajowych i międzynarodowych (Załącznik nr 8, pozycje **K.1.-K.12.**). *S. przewalskii* był przedmiotem moich dalszych badań w pracy doktorskiej zatytułowanej "Salvia przewalskii Maxim. w kulturze *in vitro* - mikrorozmnażanie, wytwarzanie tanszynonów i olejku eterycznego" wykonanej w Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytet Medyczny w Łodzi, wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. H. Wysokińska. Przy użyciu wybranych technik biotechnologicznych otrzymałam różnego typu kultury *in vitro* tego

gatunku (kultury kalusowe, zawiesinowe, kultury pędów oraz korzeni transformowanych), opracowałam metodę przechowywania pąków szczytowych i bocznych w postaci somatycznych nasion i zregenerowałam całe rośliny. Otrzymany materiał poddałam badaniom fitochemicznym (pod kątem wytwarzania tanszynonów i olejku eterycznego) oraz biologicznym (oznaczanie aktywności przeciwbakteryjnej i cytotoksycznej wyizolowanych olejków).

5.2. Omówienie działalności naukowo-badawczej po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora w 2009 roku zostałam zatrudniona na etacie asystenta, a w 2015 na etacie adiunkta w Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, gdzie kontynuowałam pracę związaną z biotechnologią roślin. Jako zakończenie badań związanych z *Salvia przewalskii*, gatunkiem szalwii, który był przedmiotem badań mojej pracy doktorskiej i jednocześnie stanowił przedmiot badań w ramach grantu NCN (NN 405 678040, we współpracy z Instytutem Włókien i Roślin Leczniczych w Poznaniu wykonawca części projektu) została opublikowana praca dotycząca wzrostu kultur kalusowych i zawiesinowych tego gatunku, jak również produkcji 4 tanszynonów przez te kultury oraz przez kultury pędów (Załącznik nr 8, publikacja A.5., komunikaty zjazdowe K.7. i K.9.).

Od roku 2012 zajęłam się nową tematyką naukowo-badawczą, która dotyczyła molekularnych aspektów w biotechnologii roślin. Rozpoczęcie tej tematyki wymagało ode mnie poznania podstawowych technik wykorzystywanych w analizie molekularnej roślin. We współpracy z dr Piotrem Szymczykiem z Zakładu Biotechnologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi rozpoczęłam pracę związane z klonowaniem w *Salvia miltiorrhiza* promotorów reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A i syntazy di-fosforanu kopalylu, genów o kluczowym znaczeniu dla biosyntezy tanszynonów. Wyniki uzyskane z tych badań zostały opublikowane w 2 pracach (Załącznik nr 8, publikacje A.11. i A.14.).

Dzięki poznaniu metod wykorzystywanych w analizie molekularnej roślin potwierdziłam metodą PCR transformację genetyczną korzeni lub zregenerowanych z nich roślin transformowanych różnych gatunków roślin m.in. *Rehmania glutinosa*, *Dracocephalum moldavica* i *Salvia viridis* (Załącznik nr 8, publikacja A.6., A.10., A.16.).

Ponadto, od roku 2012 zajęłam się badaniami biotechnologicznymi związanymi z dwoma, nowymi gatunkami, jeden należący do rodziny Asteraceae (Astrowate), *Rhaponticum carthamoides*, szczodrak krokoszowaty, drugi do rodziny Campanulaceae

(Dzwonkowate), *Codonopsis pilosula*. W chwili obecnej prowadzę kilka ustabilizowanych, roślinnych kultur *in vitro* *R. carthamoides*, gatunku o cennych właściwościach biologicznych. Wyniki badań związane z tym gatunkiem stanowią cykl publikacji zgłoszonych do oceny przedstawionego postępowania habilitacyjnego (publikacje **P.1.-P.8.**, *Załącznik nr 6*, oraz doniesienia zjazdowe **K.13.-14.**, **K.17.-18.**, **K.22.**, **K.27.**, **K.38.**, **K.43.**, *Załącznik nr 8*). W swoich badaniach, dodatkowo wykazałam, że wstępne traktowanie komórek jajnika chomika chińskiego ekstraktem z korzeni transformowanych *R. carthamides* miało efekt naprawczy uszkodzeń DNA oraz ochronny DNA przed uszkodzeniami oksydacyjnymi i skutkowało obniżeniem oksydacyjnych uszkodzeń DNA (publikacja **A.9.**, doniesienie zjazdowe **K.18.**, *Załącznik nr 8*).

Otrzymałam również kulturę pędów z wierzchołkowych części siewek oraz korzenie transformowane *C. pilosula*, gatunku obcego naszej flory, występującego w stanie naturalnym na terenie Chin. W Chińskiej Farmakopei wysuszone korzenie różnych gatunków z rodzaju *Codonopsis*, wśród nich *C. pilosula*, figurują jako surowiec *Codonopsis radix*. Surowiec ten jest alternatywny dla korzeni *Panax ginseng* i znany jest jako "żeń-szeń dla ubogich". W badaniu z moim udziałem określiłam także zdolności regeneracyjne eksplantatów z siewek tego gatunku. Wyniki z tych badań zostały przedstawione, jako doniesienie zjazdowe (pozycja **K.44.**, *Załącznik nr 8*).

Od roku 2013 zaczęłam współpracę z dr Przemysławem Sitarkiem z macierzystego Zakładu Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi i uczestniczyłam w wyprowadzeniu różnego rodzaju kultur *in vitro* innego gatunku z rodziny Lamiaceae (Jasnotowate), o cennych właściwościach biologicznych, *Leonurus sibiricus*. Były to kultury korzeni transformowanych oraz kultury pędów, z których otrzymano całe rośliny. Uczestniczyłam także w hodowli korzeni transgenicznych tego gatunku wykazujących nadekspresję AtPAP1 (gen kodujący czynnik transkrypcyjny AtPAP1 pochodzący z *Arabidopsis thaliana* znajdujący się pod kontrolą konstytutywnego promotora wirusa mozaiki kalafiora (CaMV 35S)) w 5L bioreaktorze rozpyłowym (publikacje **A.7.-A.8.**, **A.15.**, **A.19.**, *Załącznik nr 8*).

Brałam również udział w cyklu badań związanych z właściwościami biologicznymi ekstraktów z materiału pozyskanego z kultur *in vitro* *Leonurus sibiricus* oraz *Menyanthes trifoliata*. Były to m.in. badania określające efekt ochronny i naprawczy DNA ekstraktów oraz właściwości anytoksydacyjne, cytotoksyczne, jak również zdolność indukowania apoptozy poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego, zmianę potencjału mitochondrialnego czy ekspresji genów związanych z apoptozą oraz indukcję uszkodzeń DNA. Uczestniczyłam

także w izolacji olejku eterycznego z korzeni transformowanych i nietransformowanych *L. sibiricus*. Wyniki uzyskane z tych badań zostały przedstawione w kilku publikacjach i doniesieniach zjazdowych krajowych i międzynarodowych (współautor) (Załącznik nr 8, publikacje A.7., A.8, A.12.-13., A.15. A.17, A.19.-A.21; doniesienie zjazdowe K.15.-16., K.19-21., K.28., K.33., K.39., K.42.).

W ramach badań Studenckiego Koła Naukowego działającego przy Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wyprowadziłam kultury korzeni transformowanych *Salvia miltiorrhiza*, gatunku należącego do rodziny Lamiaceae. Ponadto, w cyklu badań we współpracy ze studentami działającymi w Kole Naukowym został określony efekt ochronny i naprawczy DNA wodno-metanolowego ekstraktu z korzeni transformowanych tego gatunku na ludzkie limfocyty krwi obwodowej poddane działaniu nadtlenu wodoru a także poziom ekspresji genów antyoksydacyjnych i cytokin zapalnych na ludzkie komórki indukowane nadtlakiem i LPS po działaniu tego ekstraktu. Wykazano również, że ekstrakt z korzeni transformowanych szalwii czerwonej indukuje apoptozę w komórkach glejaka ludzkiego. Wyniki tych badań zostały przedstawione w postaci komunikatów zjazdowych (Załącznik nr 8, pozycja K.23.-24., K.30., K.34.).

Inne badania prowadzone z moim udziałem dotyczyły określenia właściwości cytotoksycznych oraz indukowania apoptozy w różnych liniach nowotworowych (A549 i CCRF-CEM) poprzez zmianę potencjału błony mitochondrialnej oraz indukowanie uszkodzeń mitochondrialnego i jądrowego DNA przez diterpeny wyizolowane z roślin z rodzaju *Plectranthus*. Wyniki tych badań zostały zaprezentowane, jako komunikaty zjazdowe na 7 międzynarodowych konferencjach (Załącznik nr 8, pozycja K.31.-32., K.35.-K.37., K.40.-41.).

Zaangażowana byłam także w projekcie badań dotyczących wpływu palenia tytoniu przez krótki okres czasu na zmiany zachodzące w układzie krwionośnym i oddechowym wpływając na ekspresję genów (*TGF-β*, *TIMP-1*, *SOD1*, *arginaza 1*) odpowiedzialnych za przebudowę dróg oddechowych i równowagę oksydacyjną w komórkach krwi, co prowadzić może do rozwoju przewlekłej obturacyjnej choroby płuc. Traktowanie jednojądrzastych komórek krwi obwodowej składnikami dymu papierosowego, jak na przykład nikotyną, 1-nitrozodimetyloaminą, N-nitro-pirolidynem, chlorkiem winylu, czy akroleiną indukuje ekspresję *TGF-β* i *TIMP-1*. Z wyników tych badań powstała jedna praca (Załącznik nr 8, publikacja A.18.).

5.3. Projekty badawcze

2002-2004, 2010-2018 projekt badawczy finansowany ze środków statutowych Zakładu Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytet Medyczny w Łodzi, nr 503/3-012-01/503-31-001, „Hodowla *in vitro* roślin leczniczych; wytwarzanie metabolitów wtórnych”, wykonawca części projektu

2011-2014 grant NCN (NN 405 678040) we współpracy z Instytutem Włókien i Roślin Leczniczych w Poznaniu, "Porównawcze badania aktywności przeciwalkoholowej wyciągów otrzymanych z szałwii czerwonokorzeniowej (*Salvia miltiorrhiza*) oraz szałwii przewalskiego (*Salvia przewalskii*) z surowców pochodzących z upraw polowych i hodowli *in vitro*", wykonawca części projektu

2005-2007 badania własne, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, nr 502-13-329, kierownik projektu Prof. dr hab. Halina Wysokińska, "Badanie składu i aktywności cytotoksycznej olejku eterycznego otrzymanego z kultur *in vitro* i roślin *in vivo* *Salvia przewalskii*", wykonawca projektu

2003 -2006 grant MNiSW/KBN (nr PBZ-KBN-092/P05/2003), „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”, wykonawca części projektu

2002-2005 badania własne, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, nr 502-13-842(189), kierownik projektu Prof. dr hab. Halina Wysokińska, "Diterpeny w transgenicznym korzeniach i zregenerowanych *in vitro* roślinach *Salvia przewalskii*", wykonawca projektu

5.4. Szkolenia

- W **2001** roku odbyłam kurs "Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) - teoria, metodyka i metody optymalizacji warunków analizy" organizowany przez Katedrę Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydziału Farmaceutycznego, Akademii Medycznej w Lublinie.
- W latach **2016-2017** odbyłam kurs "Metodyka Nauczania w Dyscyplinach Biomedycznych", zorganizowany przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi, a od **2017**

roku uczestniczę w kursach w ramach projektu "Ready to Teach" organizowanego przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi.

5.5. Członkostwo w towarzystwach naukowych

od 2016 Polskie Towarzystwo Genetyczne

od 2016 Polskie Towarzystwo Biochemiczne

5.6. Działalność dydaktyczna i popularyzatorska

5.6.1. Działalność dydaktyczna

- 2017 rok - współudział w przygotowaniu i prowadzenie kursu "*Etiologia, obraz kliniczny i diagnostyka zarażeń pasożytniczych*" na Wydziale Farmaceutycznym UM w Łodzi, zorganizowanego przez Oddział Kształcenia Podyplomowego UM w Łodzi
- 2005 rok - współudział w przygotowaniu i prowadzenie kursu zielarsko-medycznego, na Wydziale Farmaceutycznym UM w Łodzi, zorganizowanego przez Katedrę Farmakognozji UM w Łodzi
- od 2012 roku koordynator przedmiotu "Biologia i genetyka" dla studentów I roku Wydziału Farmaceutycznego UM w Łodzi, Kierunek Farmacja
- Prowadzenie wykładów i ćwiczeń z przedmiotu "Biologia i genetyka" dla studentów I roku Wydziału Farmaceutycznego UM w Łodzi, Kierunek Farmacja
- Prowadzenie wykładów i seminariów z przedmiotu "Biologia i genetyka" dla studentów I roku Wydziału Farmaceutycznego UM w Łodzi, Kierunek Kosmetologia (studia stacjonarne i niestacjonarne)
- Prowadzenie ćwiczeń z przedmiotu "Biologia i genetyka" (obecnie "Biologia medyczna") dla studentów I roku Wydziału Farmaceutycznego UM w Łodzi, Kierunek Oddział Medycyny Laboratoryjnej
- Współudział w przygotowaniu programu nauczania i prowadzenie wykładów, seminariów i ćwiczeń z przedmiotu "Diagnostyka parazytologiczna" dla studentów II roku Wydziału Farmaceutycznego UM w Łodzi, Kierunek Oddział Medycyny Laboratoryjnej (2017/2018)
- Prowadzenie ćwiczeń z przedmiotu "Botanika farmaceutyczna" dla studentów I roku Wydziału Farmaceutycznego UM w Łodzi, Kierunek Farmacja
- Przygotowanie i prowadzenie zajęć z systematyki roślin w terenie dla studentów I roku Wydziału Farmaceutycznego UM w Łodzi, Kierunek Farmacja

- Przygotowanie i prowadzenie seminariów na zajęciach fakultatywnych "Rośliny, jako alergen i remedium w schorzeniach alergicznych" dla studentów II roku Wydziału Farmaceutycznego UM w Łodzi, Kierunek Farmacja
- Przygotowanie i prowadzenie seminariów na zajęciach fakultatywnych "Biotechnologia roślin – nowoczesne metody otrzymywania naturalnych leków i kosmetyków" dla studentów IV roku Wydziału Farmaceutycznego UM w Łodzi, Kierunek Farmacja
- Przygotowanie i prowadzenie seminariów na zajęciach fakultatywnych "Zieloni zabójcy, trujące rośliny krajowe i zagraniczne" dla studentów I roku Wydziału Farmaceutycznego UM w Łodzi, Kierunek Oddział Medycyny Laboratoryjnej
- Przygotowanie i prowadzenie ćwiczeń z biotechnologii roślin leczniczych dla studentów IV roku Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej w latach 2003/2004 i 2004/2005
- Uczestniczenie w egzaminach z przedmiotu "Biologia i genetyka" oraz "Botanika farmaceutyczna" dla I roku Wydziału Farmaceutycznego UM w Łodzi, Kierunek Farmacja, z przedmiotu "Biologia i genetyka" dla studentów I roku Wydziału Farmaceutycznego UM w Łodzi, Kierunek Kosmetologia, z przedmiotu "Biologia i genetyka" (obecnie "Biologia medyczna") dla studentów I roku Wydziału Farmaceutycznego UM w Łodzi, Kierunek Oddział Medycyny Laboratoryjnej
- Opiekun naukowy Studenckiego Koła Naukowego działającego przy Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej UM w Łodzi w latach 2003 - 2006
- Współpraca ze studentami Młodej Farmacji w organizowaniu Drzwi Otwartych na Wydziale Farmacji UM w Łodzi
- Opiekun naukowy 12 prac magisterskich na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Kierunek Farmacja, promotor 1 pracy magisterskiej na Wydziale Farmaceutycznym UM w Łodzi, Kierunek Farmacja oraz promotor jednej pracy licencjackiej na Wydziale Farmaceutycznym UM w Łodzi, Kierunek Kosmetologia
- Recenzent 2 prac magisterskich na Wydziale Farmaceutycznym UM w Łodzi, Kierunek Farmacja, jednej pracy magisterskiej oraz dwóch prac licencjackich na Wydziale Farmaceutycznym UM w Łodzi, Kierunek Kosmetologia

5.6.2. Działalność popularyzatorska

- 22.03.2012 wykład "Roślinne kultury *in vitro*" wygłoszony z okazji jubileuszu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
- 2009 - zajęcia w terenie w Łódzkim Ogrodzie Botanicznym ze stypendystami Fundacji „Dzieło Nowego Tysiąclecia”
- udział w 44 krajowych i międzynarodowych konferencjach, zjazdach i sympozjach (Załącznik 8)

5.7. Recenzje prac naukowych

W latach 2014-2018 recenzowałam prace w następujących czasopismach: *Acta Physiologiae Plantarum* (2), *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* (1), *Applied Biochemistry and Biotechnology* (1), *Journal of Agricultural Science and Technology* (1), *Molecular and Cellular Biochemistry* (1), *Scientific Reports* (1), *OncoTargets and Therapy* (1), *BMC Complementary and Alternative Medicine* (1), *Industrial Crops and Products* (1).

5.8. Nagrody

2017

- nagroda I stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi dla pierwszego autora za cykl publikacji "Właściwości przeciwzapalne, przeciwbakteryjne i przeciwutleniające olejku eterycznego z korzeni transformowanych *Rhaponticum carthamoides* oraz właściwości przeciwnowotworowe wobec komórek glejaka ludzkiego ekstraktu z tych korzeni"
- nagroda II stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za współautorstwo cyklu publikacji "*Leonurus sibiricus* - właściwości przeciwutleniające i przeciwnowotworowe olejków z korzeni transformowanych"

2016

- nagroda I stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi dla pierwszego autora za cykl publikacji "Właściwości przeciwutleniające i przeciwnowotworowe korzeni transformowanych *Rhaponticum carthamoides*"
- nagroda I stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za współautorstwo cyklu publikacji "*Leonurus sibiricus* - właściwości przeciwutleniające i przeciwnowotworowe korzeni transformowanych"

- nagroda III stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za współautorstwo publikacji "Identyfikacja i oznaczanie kwasu rozmarynowego oraz salwianolowego B w korzeniach transformowanych *Dracocephalum forestii*"
- nagroda III stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za współautorstwo cyklu publikacji "Produkcja glikozydów irydoidowych i fenyloetanoidowych w korzeniach włóśnikowatych *Rehmania glutinosa* Libosch. po elicytacji jasmonianem metylu oraz w roślinach zregenerowanych na korzeniach włóśnikowatych"

2015

- nagroda II stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi dla pierwszego autora za cykl publikacji "*Salvia przewalskii* i *Rhaponticum carthamoides* w kulturze *in vitro*"

2008, 2006 i 2004 - nagroda II stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za osiągnięcia w pracy zawodowej dla pracowników niebędących nauczycielami akademickimi

2001 - nagroda II stopnia Rektora Akademii Medycznej w Łodzi za osiągnięcia w pracy zawodowej dla pracowników niebędących nauczycielami akademickimi

5.9. Współpraca naukowa

Prace stanowiące podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego powstały we współpracy z:

- Z dr Przemysławem Sitarkiem, dr hab. Łukaszem Kuźmą i dr Renatą Grąbkowską z zespołu macierzystego Zakładu Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
- Z Prof. dr hab. Tomaszem Śliwińskim i jego współpracownikami z Laboratorium Genetyki Medycznej Uniwersytetu Łódzkiego
- Z Prof. dr hab. Januszem Szemrajem z Zakładu Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
- Z dr hab. Maciejem Radkiem, Prof. Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, z Kliniki Neurochirurgii, Chirurgii Kręgosłupa i Nerwów Obwodowych Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. WAM – Centralny Szpital Weteranów w Łodzi
- Z dr hab. Moniką Olszewską, Prof. Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, i z dr Agnieszką Kicel z Zakładu Farmakognozji, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

- Z Prof. dr hab. Anną K. Kiss z Katedry Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
- Z Prof. dr hab. Danutą Kalembą z Instytutu Podstaw Chemii Żywności Politechniki Łódzkiej
- Z Prof. Patricią Rijo i jej współpracownikami z Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.U.Lisboa), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Portugal oraz Center for Research in Biosciences & Health Technologies (CBIOS), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal
- Z dr hab. Laurentem Picotem z UMRi CNRS 7266 LIENSs, University of La Rochelle, France
- Z Prof. dr hab. Tomaszem Skorskim i jego współpracownikami z Department of Microbiology and Immunology, Fels Institute for Cancer Research and Molecular Biology, Temple University, School of Medicine, Philadelphia, PA, USA
- Z dr Dariuszem Pytlem z Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical University of South Carolina, Hollings Cancer Center, USA
- Z dr hab. Michałem Bijakiem i dr hab. Joanną Saluk-Bijak, Prof. Uniwersytetu Łódzkiego, z Katedry Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego
- Z dr Andrzejem Błaużem z Pracowni Cytometrii, Katedra Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego
- Z dr Tomaszem Kowalczykiem z Katedry Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Łódzkiego
- Z dr Joanną Wieczfińską z Zakładu Immunopatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

5.10. Podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych

- prace oryginalne opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* - **28** (w tym jako pierwszy autor **13**); przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora - **3** (pierwszy autor); po uzyskaniu stopnia naukowego doktora - **25** (w tym jako pierwszy autor **10**)
- **1** publikacja naukowa z listy MNiSW, bez IF (przed uzyskaniem stopnia doktora) (2 pkt)
- **1** monografia zagraniczna - współautor (4 pkt)
- rozdział w książce - współautor

- 44 komunikaty zjazdowe zaprezentowanych na krajowych (17) i międzynarodowych (27, w tym 17 zagranicznych) konferencjach tematycznych
- udział w realizacji 2 grantów badawczych finansowanych przez MNiSW/KBN oraz NCN, 2 projektów badawczych finansowanych z funduszu Prace własne oraz jednego projektu badawczego finansowanego z funduszy statutowych Zakładu Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
- sumaryczny IF wszystkich publikacji według listy *Journal Citation Reports* (zgodnie z rokiem ich opublikowania) wynosi 72,761. Sumaryczny IF publikacji, w których jestem pierwszym autorem 31,396.
- suma punktów MNiSW wszystkich prac 707. Suma punktów MNiSW prac, w których jestem pierwszym autorem wynosi 292.
- całkowita liczba cytowań wg bazy *ISI Web of Science Core Collection* (2019): 121; wg bazy *Scopus* (2019): 165
- indeks Hirscha (h-index) wg *ISI Web of Science Core Collection* (2019): 7; wg bazy *Scopus* (2019): 8
- ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1139-6840>

Ewa Skala