

Ewa Agnieszka Kochan

Autoreferat

Załącznik numer 2

Zakład Biotechnologii Farmaceutycznej

Wydział Farmaceutyczny

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź 2019

1. Imię i nazwisko:

Ewa Agnieszka Kochan

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

a) Dyplom magistra biologii uzyskany 24 czerwca 1994 roku

Praca magisterska pt.: „Wpływ kwasu salicylowego i zakażeń *Botrytis cinerea* na zawartość fenoli i aktywność peroksydazy w liściach truskawki namnażanych techniką *in vitro*” została wykonana w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi. Promotor pracy: prof. dr hab. Henryk Urbanek

b) Stopień doktora nauk farmaceutycznych nadany 27 września 2004 roku uchwałą Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Rozprawa doktorska pt.: „Hodowla *in vitro* i badania fitochemiczne *Panax quinquefolium*” została wykonana w Zakładzie Biosyntezy Środków Leczniczych (obecnie Zakład Biotechnologii Farmaceutycznej). Promotor rozprawy: prof. dr hab. Aleksander Chmiel

c) Świadectwo ukończenia Studiów Podyplomowych Komercjalizacji Nauki i Technologii Uniwersytetu Łódzkiego, uzyskane 14 kwietnia 2014 roku, wraz z certyfikatem Uniwersytetu Teksańskiego w Austin z dnia 9 listopada 2013 roku. Praca końcowa w postaci biznes planu pt: ”Nowoczesna formuła leku przeciwzapalnego”.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2.01. 1996 – 30.09. 2012	asystent Samodzielnej Pracowni Biosyntezy Środków Leczniczych/Zakładu Biosyntezy Środków Leczniczych obecnie Zakładu Biotechnologii Farmaceutycznej
1.10. 2012 – obecnie	adiunkt Zakładu Biotechnologii Farmaceutycznej

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

a) tytuł osiągnięcia naukowego

„Optymalizacja warunków hodowli i biosyntezy ginsenozydów w kulturach korzeni transformowanych żeńszenia północnoamerykańskiego, prowadzonych w kolbach wstrząsanych i bioreaktorze rozpyłowym.”

Zgłoszony do postępowania habilitacyjnego cykl prac obejmuje 7 publikacji naukowych

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

H1. **Kochan Ewa**, Królicka Aleksandra, Chmiel Aleksander. Growth and ginsenoside production in *Panax quinquefolium* hairy roots cultivated in flasks and nutrient sprinkle bioreactor. Acta Physiol Plant 2012, 34, 1513-1518

impact factor 1.305; KBN/MNiSW 25.000

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części eksperymentalnej (zapoczątkowanie kultur korzeni transformowanych, hodowla kultur w kolbach wstrząsanych i bioreaktorze rozpyłowym, wyznaczenie krzywej wzrostu i biosyntezy ginsenozydów, izolacji badanych metabolitów z materiału roślinnego i udziale w oznaczaniu saponin metodą HPLC), na zebraniu i opracowaniu wyników oraz przygotowaniu manuskryptu opisującego uzyskane wyniki. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

H2. **Kochan Ewa**, Szymańska Grażyna, Szymczyk Piotr. Effect of sugar concentration on ginsenoside biosynthesis in hairy root cultures of *Panax quinquefolium* cultivated in shake flasks and nutrient sprinkle bioreactor Acta Physiol Plant 2014, 36, 3, 613-619

impact factor 1.584; KBN/MNiSW 25.000

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu doświadczeń, wykonaniu części eksperymentalnej (utrzymywanie kultur korzeni transformowanych, prowadzenie kultur na podłożach z różnymi stężeniami sacharozy w małej i powiększonej skali, przygotowanie ekstraktów do analiz fitochemicznych, udział w

oznaczaniu saponin metodą HPLC), na zebraniu i opracowaniu wyników oraz przygotowaniu manuskryptu opisującego uzyskane wyniki. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

H3. Kochan Ewa, Szymczyk Piotr, Kuźma Łukasz, Szymańska Grażyna. Nitrogen and phosphorus as the factors affecting ginsenoside production in hairy root cultures of *Panax quinquefolium* cultivated in shake flasks and nutrient sprinkle bioreactor. Acta Physiol Plant 2016, 38, 6, 149

impact factor 1.364; KBN/MNiSW 25.000

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu części doświadczalnej (hodowli i zbiorze materiału roślinnego rosnącego na podłożach z różnymi stężeniami azotu i fosforu w małej i powiększonej skali, przygotowaniu ekstraktów do analizy fitochemicznej, współudziale w wykonaniu oznaczeń ilościowych), zebraniu, analizie i opracowaniu wyników oraz w przygotowaniu manuskryptu opisującego uzyskane wyniki. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

H4. Kochan Ewa, Szymczyk Piotr, Kuźma Łukasz, Lipert Anna, Szymańska Grażyna. Yeast extract stimulates ginsenoside production in hairy root cultures of American ginseng cultivated in shake flasks and nutrient sprinkle bioreactors. Molecules 2017, 22, 6, E880

impact factor 3.098; KBN/MNiSW 30.000

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu koncepcji pracy i wykonaniu części eksperymentalnej (hodowli i zbiorze materiału roślinnego hodowanego na podłożach z różnymi stężeniami ekstraktu drożdżowego w małej i powiększonej skali, przygotowaniu wyciągów roślinnych do analizy fitochemicznej, współudziale w wykonaniu oznaczeń ilościowych) zebraniu, analizie i opracowaniu wyników oraz w przygotowaniu manuskryptu, opisującego uzyskane wyniki. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

H5. Kochan Ewa, Szymczyk Piotr, Kuźma Łukasz, Szymańska Grażyna, Wajs-Bonikowska Anna, Bonikowski Radosław, Sienkiewicz Monika. The increase of triterpene saponin production by *trans*-anethole in hairy root cultures of *Panax quinquefolium*. Molecules 2018, 23, 2674

impact factor 3.098; KBN/MNiSW 30.000

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu doświadczeń i wykonaniu części eksperymentalnej (hodowli i zbiorze korzeni transformowanych na podłożach z różnymi stężeniami trans-anetolu, przygotowaniu ekstraktów do analizy fitochemicznej, współudziale w wykonaniu oznaczeń ilościowych, zebraniu, analizie i opracowaniu wyników oraz w przygotowaniu manuskryptu opisującego uzyskane wyniki. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

H6. Kochan Ewa, Balcerczak Ewa, Lipert Anna, Szymańska Grażyna, Szymczyk Piotr. Methyl jasmonate as a control factor of the synthase squalene gene promoter and ginsenoside production in American ginseng hairy root cultured in shake flasks and a nutrient sprinkle bioreactor. *Ind Crops Prod* 2018, 115, 182-193

impact factor 3.849; KBN/MNiSW 40.000

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wyznaczeniu koncepcji badań i wykonaniu części eksperymentalnej (hodowli i zbiorze korzeni transformowanych na podłożach z różnymi stężeniami jasmonianu metylu w małej i powiększonej skali, przygotowaniu wyciągów roślinnych do analizy fitochemicznej, izolacji genomowego DNA, charakterystyce in silico uzyskanego promotora, współudziale w wykonaniu oznaczeń ilościowych) zebraniu, analizie i opracowaniu wyników oraz w przygotowaniu manuskryptu, opisującego uzyskane wyniki. Mój udział procentowy szacuję na 75%.

H7. Kochan Ewa, Balcerczak Ewa, Szymczyk Piotr, Sienkiewicz Monika, Zielińska-Bliźniewska Hanna, Szymańska. Grażyna. Abscisic acid regulates the 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase gene promoter and ginsenoside production in *Panax quinquefolium* hairy root cultures. *Int J Mol Sci* 2019, 20, 1310

impact factor 3.687; KBN/MNiSW 30.000

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wyznaczeniu koncepcji badań i wykonaniu części eksperymentalnej (hodowli i zbiorze korzeni transformowanych na podłożach z różnymi stężeniami kwasu abscysynowego, przygotowaniu wyciągów roślinnych do analizy fitochemicznej, izolacji genomowego DNA, charakterystyce in silico uzyskanego promotora, współudziale w wykonaniu oznaczeń ilościowych) zebraniu, analizie i opracowaniu wyników oraz w przygotowaniu manuskryptu, opisującego uzyskane wyniki. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

We wszystkich powyższych pracach występowałam w roli autora korespondencyjnego.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania Impact Factor (IF) publikacji wytypowanych do cyklu w postępowaniu habilitacyjnym wynosi 17,96, punkty MNiSW – 205

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

Wprowadzenie w tematykę badawczą publikacji zgłoszonych w postępowaniu habilitacyjnym

Właściwości lecznicze roślin od wieków wykorzystywane były w medycynie i ludowych praktykach zielarskich. Jednym z gatunków, stosowanych w celach terapeutycznych od setek lat jest żeńszeń pięciolistny, zwany żeńszaniem amerykańskim, *Panax quinquefolium* (L.) Alph.Wood (syn. *Panax quinquefolius* (L.), *Aralia quinquefolia* (L.) Decne. & Planch., *Ginseng quinquefolium* (L.) Alph.Wood, *Panax americanus* (Raf.) Raf., *Panax cuneatus* Raf.). Naturalnym siedliskiem tej rośliny są lasy liściaste na wschodzie USA i Kanady (Pengelly i Bennet 2011). Żeńszeń amerykański należy do rodzaju *Panax*. Rodzaj ten obejmuje 14 gatunków, spośród których kilka naturalnie występuje w Azji, a najbardziej znany jest *Panax ginseng* - żeńszeń właściwy, koreański lub azjatycki. Nazwa rodzajowa wywodzi się od greckiego słowa, oznaczającego „wszystko leczący”, co zapewne związane jest z przypisywaniem gatunkom, należącym to tego taksonu, prawie nieograniczonych właściwości leczniczych. Surowcem farmakopealnym tej byliny jest korzeń.

Triterpenowe saponiny jako główne związki czynne żeńszczenia

W ostatnim 50-leciu znaczenie farmakologiczne i kliniczne żeńszczenia znacznie wzrosło. W dużym stopniu przyczyniły się do tego badania fitochemiczne, dzięki którym wykryto w tej roślinie ponad 200 substancji aktywnych biologicznie. Niezwykle cennymi związkami czynnymi surowca są saponiny triterpenowe - ginsenozydy, inaczej zwane panaksozydami, które są odpowiedzialne za większość działań

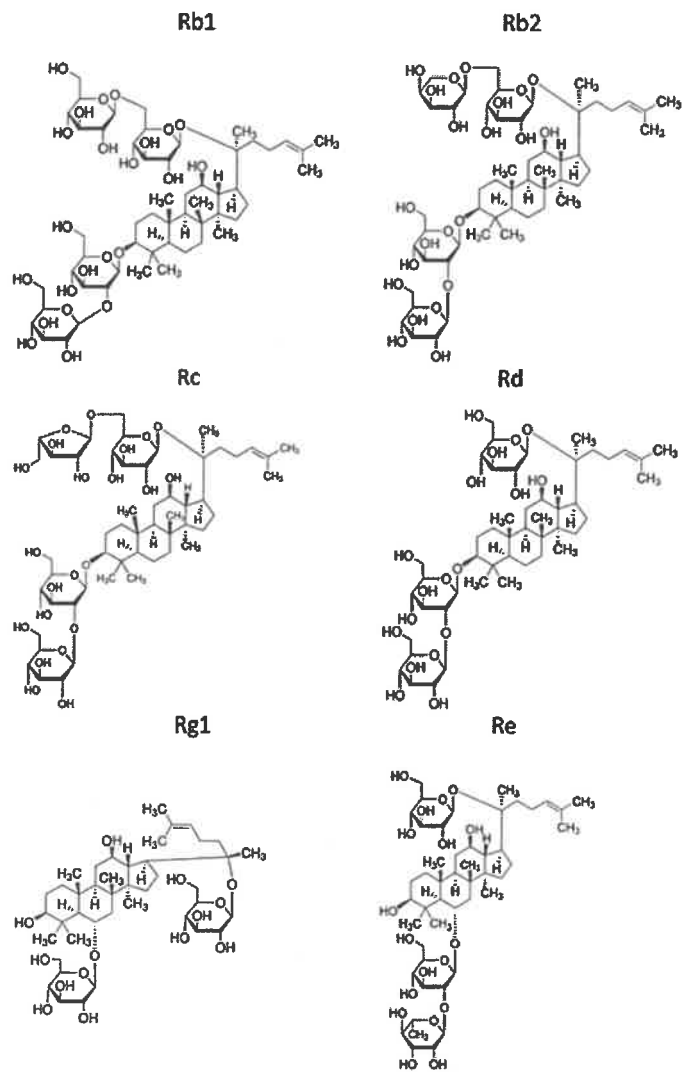
farmakologicznych. Z chemicznego punktu widzenia ginsenozydy są związkami glikozydowymi składającymi się z części niecukrowej – aglikonu oraz łańcucha lub łańcuchów cukrowych.

W budowie chemicznej ginsenozydów można wyróżnić trzy typy aglikonów:

- aglikony tertacyklicznego **typu dammaranu** (do najważniejszych należą pochodne 20(S)-protopanaksadiolu i 20(S)-protopanaksatriolu),
- aglikony pentacyklicznego **typu kwasu oleanolowego**, oraz
- aglikony tetracyklicznego **typu ocotilolu**

W skład części cukrowej saponin wchodzi najczęściej heksozy (glukoza, galaktoza), 6-deoksyheksozy (furanosa, ramnoza), pentozy (arabinoza, ksyloza) oraz kwasy uronowe (kwas glukuronowy). Zazwyczaj występują one w formie cyklicznej i tworzą wiązania półacetalowe z aglikonem.

W większości ginsenozydy są glikozydowymi pochodnymi dammaranu składającego się z 17 atomów węgla w strukturze czteropierścieniowej z różnymi resztami cukrowymi przyłączonymi do pozycji C-3 i C-20. (Ryc. 1). Ginsenozydy są nazywane "Rx", gdzie "R" oznacza korzeń, a "x" opisuje, w alfabetycznej kolejności, polarność związku zgodnie z wartością R_f na rozdziale chromatograficznym. Na przykład metabolit Ra jest najmniej polarnym związkiem, a Rb jest bardziej polarnym niż Ra. Zidentyfikowano ponad 30 tzw. głównych ginsenozydów, które podzielono na dwa rodzaje: pochodne 20 (S) -protopanoksadiolu (PPD) i pochodne 20 (S) -protopanoksatriolu (PPT). Do pochodnych PPD należą takie metabolity jak: Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd, Rg3, Rh2, Rs1. Są one określane jako ginsenozydy grupy Rb. Natomiast do pochodnych PPT zalicza się panaksozydy Re, Rf, Rg1, Rg2, Rh1, F1, F3. Dla odmiany te związki są określane jako ginsenozydy grupy Rg (Leung i Wang 2010). Ponadto zidentyfikowano kilka rzadkich ginsenozydów, takich jak saponina ocotilolowa F11 (24-R-pseudoginsenozyd) i pentacykliczna saponina oleananowa Ro (Leung i Wang 2010).

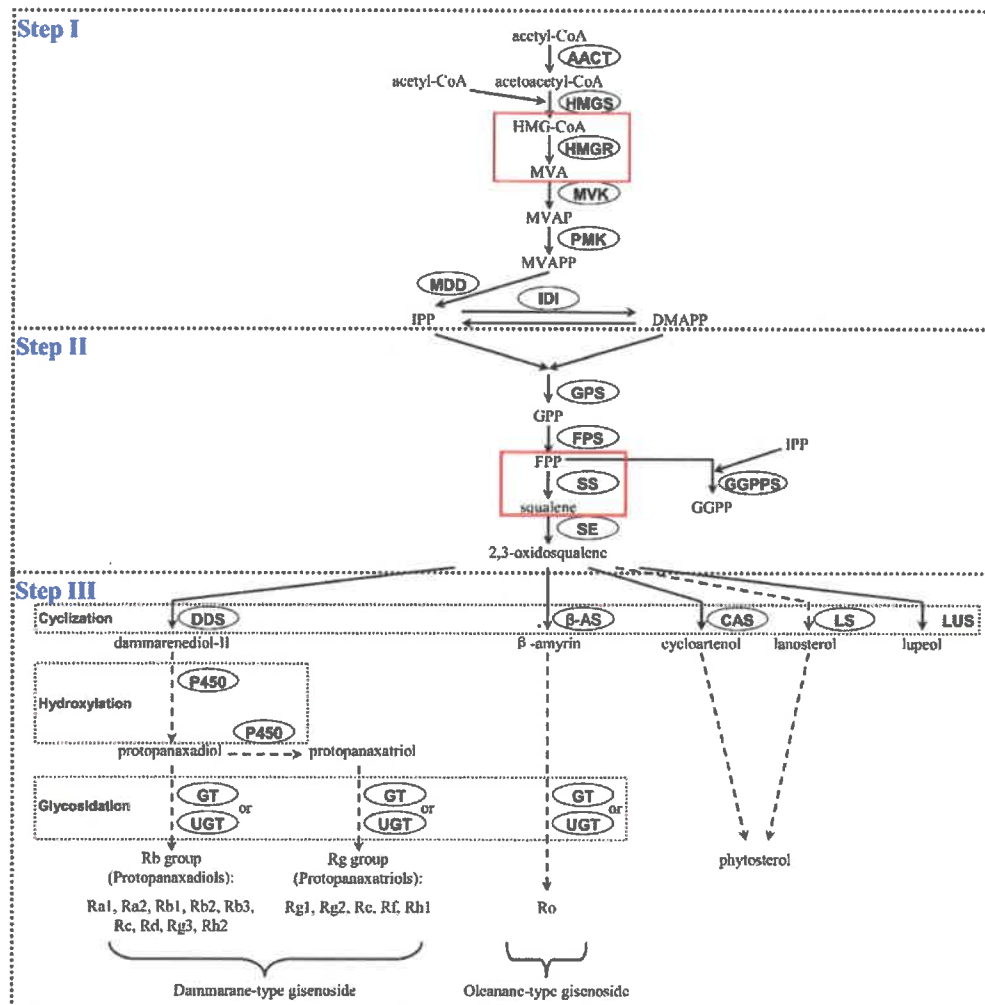


Ryc.1. Struktury wybranych ginsenozydów, pochodnych protopanaxadiolu i protopanaxatriolu.

Biosynteza ginsenozydów

Ginsenozydy powstają w cytozolu poprzez szlak mewalonianu (MVA). Ich biosynteza obejmuje więcej niż 20 enzymatycznych etapów (Ryc. 2), w których uczestniczą: reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A (HMGR), syntaza pirofosforanu farnezyli (FPS), syntaza skwalenu (SS), syntaza dammarenediolu-II (DS), syntaza β -amyryny (AS), cytochrom P450 (CYP450) i UDP-glikozylotransferaza (UGT). Całą ścieżkę można podzielić na trzy etapy. W pierwszym powstają prekursorzy żeńszeniowych saponin - difosforan izopentenyłowy (IPP) i jego izomer

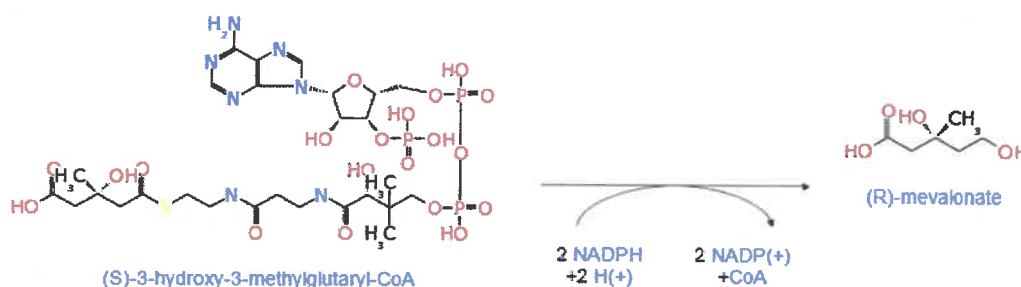
dimetylalodifosforan (DMAPP). Następnie IPP i DMAPP są przekształcane w 2,3-oksydoskwalen. Ostatni etap biosyntezy żeńszeniowych saponin obejmuje proces cyklizacji, hydroksylacji i glikozylacji.



Ryc. 2. Schematyczne przedstawienie szlaku biosyntezy ginsenozydów w żeńszeniu (według Cao i wsp. 2015)

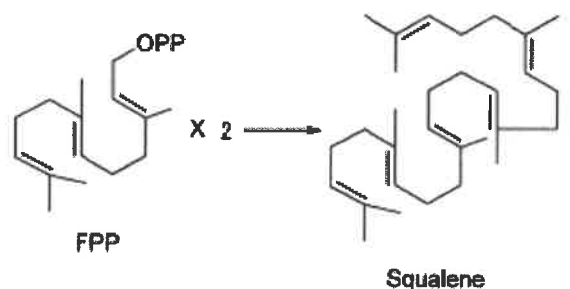
AACT, transferaza acetoacetylo-CoA; CAS, syntaza cykloartenolu; DDS, syntaza dammarenediolowa; DMAPP, difosforan dimetylowy; FPP, difosforan farnezyli; FPS, syntaza difosforanu farnezyli; GGPPS, syntaza difosforanu geranylgeranyli; GGPP, difosforan geranylgeranyli; GPP, difosforan geranyli; GPS, syntaza difosforanu geranyli; GT, glukosylotransferaza; HMGR, reduktaza HMG-CoA (reduktaza 3-hydrokso-3-metyloglutarylo-CoA); HMGS, syntaza HMG-CoA; IDI, izomeraza delta izopentenylo-difosforanu; IPP, difosforan izopentenyli; LS, syntaza lanosterolu; LUS, syntaza lupeolu; MVA, kwas mewalonowy; MVAP, fosforan mewalonianu; MVAPP, difosforan mewalonianu; MDD, dekarboksylaza difosforanu mewalonianu; PMK, kinaza fosfomewalonianowa; P450, cytochrom P450; SE, epoksydaza skwalenu; SS, syntaza skwalenu; β-AS, syntaza β-amyriny; UGT, UDP- glukosylotransferaza

Reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A (HMGR) jest uznawana za pierwszy enzym limitujący szlak mewalonianu. Katalizuje ona zależną od NAD(P)H redukcję 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA (HMG-CoA) do mewalonianu - prekursora wszystkich związków izoprenoidowych. Jak pokazuje schemat (Ryc. 2, 3) HMGR może regulować biosyntezę ginsenozydów poprzez regulację syntezy IPP i DMAPP.



Ryc. 3 Schemat reakcji, w której uczestniczy reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA

W kolejnym etapie biosyntezy żeńszeniowych saponin syntaza pirofosforanu farnezylu (FPS) przeprowadza konwersję difosforanu geranylu do difosforanu farnezylu (FPP). Jest on substratem dla syntazy skwalenu (SSq), która kondensuje dwie cząsteczki FPP w wyniku czego powstaje skwalen – kluczowy prekursor w biosyntezie fitosteroli i triterpenów (Ryc. 2, 4)



Ryc. 4 Schemat reakcji, w której uczestniczy syntaza skwalenu

W dalszej kolejności epoksydaza skwalenu katalizuje utlenianie podwójnego wiązania skwalenu w celem uzyskania 2,3-oksydoskwalenu. Związek ten pod wpływem syntazy dammarenediolu-II i syntazy β-amaryny (AS) może być przekształcony

odpowiednio do ginsenozydów typu dammaranu i typu oleananu. Syntaza dammaredniolu-II doprowadza do powstania dammaredniolu, który ulega następnie utlenianiu i hydroksylacji dzięki cytochromom P450. Ostatnim etapem biosyntezy ginsenozydów jest glikozylacja przeprowadzana przez glikozylotransferazy UDP (UGTs). UGTs przenoszą reszty glikozyłowe z aktywowanych cukrów na aglikony ginsenozydów, regulując w ten sposób powstawanie poszczególnych metabolitów, różniących się bioaktywnością, rozpuszczalnością i stabilnością.

Farmakologia żeńszenia

Wpływ *P. quinquefolium* i zawartych w nich ginsenozydów na zdrowie człowieka został wnikliwie przebadany. Eksperymenty, przeprowadzone *in vitro* jak i *in vivo*, potwierdziły, że żeńszeh amerykański korzystnie oddziałuje na metabolizm organizmu i jego wydolność psychofizyczną. Działa przeciwstresowo i adaptogennie poprzez przywrócenie homeostazy (Liao i wsp. 2018). Wywiera korzystny wpływ na poziomie komórkowym na funkcje organów i układów (nerwowego, hormonalnego, sercowo-naczyniowego, odpornościowego, trawiennego). Saponiny zawarte w żeńszehu regulują przepuszczalność błon komórkowych. Reagując ze specyficznymi białkami błon komórkowych modyfikują ich strukturę, tym samym mogą oddziaływać na aktywność błonowych receptorów, enzymów i kanałów jonowych (Qi i wsp. 2011). Podanie żeńszehu wywiera wpływ na układ nerwowy w postaci łagodzenia objawów choroby Alzheimera, zapobieganiu uszkodzeniom neuronalnym w przebiegu udaru niedokrwiennego i poprawie funkcji poznawczych (ułatwienie procesów uczenia się i zapamiętywania). Antyamnezyczne działanie saponin żeńszehiowych wiąże się z inhibicyjnym działaniem ginsenozydów na peptydy β -amyloidowe. Peptydy te selektywnie likwidują uwalnianie cholinergicznych neurotransmiterów w obrębie hipokampa i kory mózgowej przez co przyczyniają się do dysfunkcji i degeneracji neuronów (Radad i wsp. 2011, Liu i wsp. 2011, Kim i wsp. 2013). Szerokie badania kliniczne wykazały, że ginsenozydy, należące do grupy Rg stymulują ośrodkowy układ nerwowy, podwyższają aktywność motoryczną, przeciwdziałają zmęczeniu, poprawiają zdolność koncentracji, przyspieszają odruchy warunkowe. Ginsenozydy grupy Rb wyciszają OUN, działają przeciwbólowo i przeciwdrgawkowo.

Dobroczynny wpływ żeńszenia na układ sercowo-naczyniowy przejawia się w regulacji rytmu serca w przypadkach zaburzeń jego czynności spowodowanych dysfunkcją elektrolityczną lub bodźcami nerwowymi. Wpływa on również na właściwe funkcjonowanie naczyń krwionośnych, hamuje agregację płytek krwi, działa przeciwmiażdżycowo, reguluje poziom lipidów we krwi. (Xu i wsp. 2013, Lee i Kim 2014)

Stwierdzono także, że żeńszeń moduluje działanie układu immunologicznego. Pod wpływem ginsenozydów następuje stymulacja makrofagów, wzrost wytwarzania limfocytów typu T, komórek zwanych naturalnymi zabójcami (NK), interleukiny 1 i 6 (Kim i wsp. 2017).

W obrębie układu pokarmowego łagodzi uszkodzenia przełyku, wywołane przez refluks, zapobiega powstawaniu wrzodów żołądka. Działa przeciwcukrzycowo (zwiększa wrażliwość tkanek na insulinę) i przeciw otyłości (pośrednio przez obniżenie wchłaniania tłuszczu z diety).

Ponadto żeńszeń wykazuje właściwości przeciwdrobnoustrojowe, antyoksydacyjne i przeciwnowotworowe (odpowiada za apoptozę komórek nowotworowych, zmniejsza skutki uboczne działania chemoterapeutyków) (Qi i wsp. 2011). Literatura donosi o jego działaniu odmładzającym i regeneracyjnym na skórę (Shin i wsp. 2017).

Źródła pozyskania biomasy żeńszeniowej

Początkowo surowiec do produkcji leczniczych preparatów żeńszeniowych pozyskiwano ze stanowisk naturalnych lecz ze względu na wyczerpywanie się tych zasobów podjęto próby uprawy żeńszenia, najpierw w warunkach naturalnego występowania, a następnie w warunkach polowych. Obecnie duże zapotrzebowanie i wysokie ceny (od 20 do 1105 dolarów za kilogram) osiągnęte za korzeń żeńszenia, a także brak możliwości pozyskania surowca ze stanu naturalnego (od 1972 roku żeńszeń wpisano do „Czerwonej Księgi Ginących Gatunków”) spowodowały, że w ostatnim czasie znacznie zwiększono powierzchnię uprawy polowej żeńszenia. Uprawy gruntowe tej rośliny są bardzo pracochłonne, charakteryzują się długim okresem (minimum 3-4 lata) potrzebnym do otrzymania wartościowego surowca, wysokimi kosztami

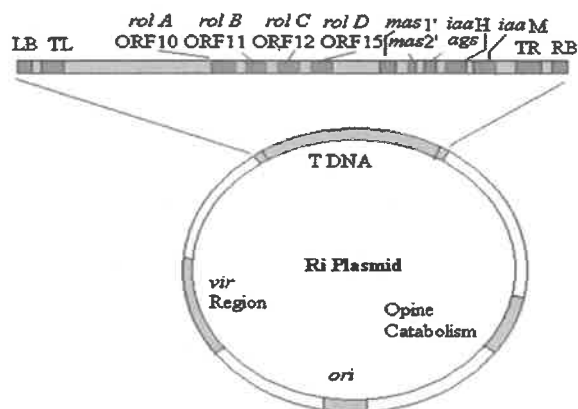
związanymi z agrotechniką i stosowaniem profilaktycznych zabiegów ochrony roślin (żeńszeń jest rośliną niezwykle podatną na choroby grzybowe, a także chętnie atakowaną przez szkodniki (Cruse-Sandersi wsp. 2004, Jia i wsp. 2009, Proctor i wsp. 2013). Szansą na szybsze otrzymanie w wystandaryzowanych warunkach, bogatego w składniki biologicznie czynne surowca są kultury *in vitro*. Od wielu lat w światowych laboratoriach prowadzone są badania nad możliwością wykorzystania roślinnych kultur *in vitro* jako źródła substancji leczniczych. Uniezależniłyby one przemysł farmaceutyczny i kosmetyczny od surowców pozyskiwanych z uprawy lub stanu naturalnego. Obiecujące w tym zakresie wydają się być bioreaktorowe hodowle zawieszin i korzeni transformowanych. Pod koniec lat 80 ubiegłego wieku została wdrożona przez firmę Nitto Denko Electric Industrial Corporation przemysłowa produkcja ginsenozydów, uzyskanych w kulturach zawieszinowych *P. ginseng* w bioreaktorach mieszadłowych (Hikino H 1991). W wyniku doskonalenia opisanej technologii opracowano proces kilkuetapowego namnażania biomasy, stopniowo dochodząc do fazy produkcyjnej w bioreaktorach mieszadłowych o pojemności 25 m³. W stabilnym i powtarzalnym procesie uzyskano plon biomasy 20 g suchej masy na litr podłoża w ciągu 4 tygodni. Skład chemiczny i właściwości biomasy żeńszeniowej otrzymanej w bioreaktorze były takie same jak z upraw polowych (Hibbino i Ushiyama 1998). Jak dotąd nie opracowano wydajnej technologii pozyskania ginsenozydów z kultur korzeni transformowanych któregośkolwiek gatunku żeńszenia.

Korzenie transformowane – otrzymywanie, charakterystyka

W ostatnich latach pojawiły się liczne doniesienia literaturowe, poświęcone kulturom korzeni włóśnikowatych (hairy root cultures, HR cultures) (Mishra i Ranjan R. 2008, Pistelli i wsp. 2010, Talanoi wsp. 2012, Rangslangi wsp. 2018, Khan i wsp. 2018). Zainteresowanie hodowlami tego typu korzeni wzrasta, albowiem mogą stać się alternatywnym sposobem pozyskania cennych metabolitów wtórnych wobec upraw polowych czy kultur zawieszin komórkowych. Kultury korzeni włóśnikowatych charakteryzują się zaletami, których często nie posiadają kultury komórkowe (Smetanska 2008). Cechują się szybkim wzrostem bez konieczności stosowania dodatkowych hormonów, co daje możliwość wytworzenia dużej ilości biomasy w stosunkowo krótkim czasie, są stabilne genetycznie, nie zaobserwowano drastycznego

spadku akumulacji metabolitów w miarę starzenia się linii korzeni. Wyróżniają się plagiotropizmem i brakiem geotropizmu, wytwarzaniem licznych korzeni bocznych ze zwiększoną strefą włośnikową, zróżnicowaną budową komórkową i strukturalną integracją tkanek, co odgrywa dużą rolę w prawidłowym przebiegu procesów metabolicznych, zwłaszcza, że niektóre metabolity są syntetyzowane jedynie w wyspecjalizowanych organach i zazwyczaj występują tylko w nadziemnych częściach roślin. Ich cenną zaletą jest również relatywna łatwość zmiany skali produkcji, co dodatkowo podnosi ich wartość, jako potencjalnych „producentów” pożądanych związków (Mehrotra i wsp. 2016).

Kultury korzeni transgenicznych uzyskuje się poprzez transformację genetyczną z udziałem szczepów *Agrobacterium rhizogenes*. Są to Gram-ujemne bakterie glebowe z rodziny *Rhizobiaceae*, zdolne do wywoływania choroby zwanej „chorobą włośnikowatości” u różnych gatunków roślin, szczególnie dwuliściennych (Georgiev i wsp. 2008, Chandra 2012). Fitopatogen indukuje tworzenie cienkich, wielokrotnie rozgałęzionych korzeni przybyszowych w miejscu zranienia infekowanej rośliny poprzez przeniesienie do komórki roślinnej, a następnie zintegrowanie z jej aparatem genetycznym odpowiedniego fragmentu plazmidowego DNA, zwanego T-DNA. Jest on zlokalizowany na dużym plazmidzie oznaczonym jako pRi (roots inducing plasmid) ze względu na fakt, że odpowiada za wywoływanie transformacji i powstanie korzeni włośnikowatych. Plazmid pRi może zawierać więcej niż jeden fragment T-DNA (Chen i Otten 2017). Fragment T-DNA otaczają dwie wysoce homologiczne sekwencje graniczne o długości 25 pz, określane jako LB (ang. left border) i RB (ang. right border). Ramiona te pozwalają na skuteczne wycięcie T-DNA z plazmidu pRi, a następnie zintegrowanie go z chromosomem komórki roślinnej. W zależności od szczepu bakteryjnego T-DNA może być pojedynczy lub podzielony na dwa odcinki prawy (TR-DNA) i lewy (TL-DNA). Odcinki te oddzielnie integrują się z genomem rośliny. Na TL -DNA zidentyfikowano loci czterech genów (tzw. *rol* genów): *rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD*. Dla indukcji korzeni w pełni udokumentowana została rola ekspresji genu *rol B* (Altamura i wsp. 2004, Pistelli i wsp. 2010).



Rycina 5. Budowa plazmidu Ri należącego do *Agrobacterium rhizogenes* (według Chandra 2012).

TR-DNA zawiera dwa typy genów: onkogeny (*iaaM*, *iaaH*, *ipt*) i geny odpowiedzialne za wytwarzanie opin. Te pierwsze kodują enzymy zaangażowane w syntezę fitohormonów regulujących wzrost rośliny tj.: auksyn (*iaaH* koduje hydrolazę indoloacetamidową i *iaaM* – monooksygenazę tryptofanu) oraz cytokin (*ipt* koduje transferazę izoprenylową). Ekspresja tych genów prowadzi do akumulacji wymienionych związków i zakłócenia fizjologicznej równowagi hormonalnej, co skutkuje niekontrolowaną proliferacją komórek z wytworzeniem korzeni. Drugi typ genów warunkuje syntezę opin, czyli produktów kondensacji aminokwasów i cukrów, stanowiących składniki odżywcze wykorzystywane jako źródło azotu i węgla przez *Agrobacterium*. Na podstawie rodzaju opin zużywanych przez bakterie, szczepy *Agrobacterium rhizogenes* można podzielić na następujące grupy: agropinowe, mannopinowe, mikimppinowe, kukumopinowe (Georgiev i wsp 2008)

Na plazmidzie Ri, oprócz T-DNA, znajduje się również region wirulencji (tzw. *vir* region), kodujący białka, ułatwiające proces przeniesienia T-DNA do komórki roślinnej, oraz geny odpowiedzialne za katabolizm opin. Te regiony nie są przenoszone do komórki docelowej, mimo iż biorą udział w oddziaływaniu bakteria-roślina. Region *vir* zawiera około 35 genów wirulencji, zgrupowanych w co najmniej osiem operonów (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG*, *virF* i *virH*). Kodowane przez nie białka wirulencji kontrolują przeniesienie fragmentu T i jego włączenie do chromosomu rośliny. Inny region tworzą geny odpowiedzialne za wchłanianie i metabolizm opin.

Proces transferu genów z *A. rhizogenes* do komórek roślinnych obejmuje kilka podstawowych etapów: kolonizację bakterii, indukcję bakteryjnego systemu wirulencji, powstanie kompleksu T-DNA, przeniesienie T-DNA oraz jego integrację do genomu gospodarza. Fitopatogeny *A. rhizogenes* rozpoznają w swoim otoczeniu cząstki sygnałowe wydzielane przez zranione tkanki roślinne. Należą do nich: związki fenolowe (m.in. AS – acetosyringon, DDF – dimetyloester dehydrodiferulowy, MMCP – 1-hydroksymetylo-2-(4-hydrokso-3-metoksyfenylo)-cyklopropan), monosacharydy (kwas D-glukuronowy, D-glukoza, L-arabinoza) oraz niskie stężenie fosforanów. (Chandran i Potty 2011) Ważnym czynnikiem jest też odpowiednie pH otoczenia. W wyniku chemotaksji bakterie ulegają kolonizacji na powierzchni komórek roślinnych. Środowiskowe bodźce chemiczne uczynniają układ wirulencji *Agrobacterium* począwszy od białka VirA, które w dalszej kolejności fosforyluje białko VirG. Białko VirG indukuje zaś ekspresję pozostałych genów tworzących region vir, a te biorą udział w generowaniu jednoniciowej cząsteczki T-DNA. Kluczową rolę w tym kroku odgrywają białka VirD1 i VirD2 czyli endonukleazy, odpowiadające za wycinanie fragmentu T w obszarze sekwencji granicznych LB i RB. Następnie białka VirD2 i VirE2 zostają związane z końcem 5' jednoniciowego DNA wskutek czego powstaje białkowo-nukleinowy kompleks. Kompleks T-DNA przenoszony jest z *Agrobacterium* do cytoplazmy komórki roślinnej przez kanał transferowy utworzony z protein kodowanych przez operon virB i virD4. Białka VirE2 i VirD2, ułatwiają kierowanie kompleksu T do jądra komórkowego, gdzie T-DNA ulega integracji z chromosomem roślinnym (Georgiev i wsp 2008).

W procesie transformacji biorą udział również geny *chvA*, *chvA B*, *chvE*, które zostały zlokalizowane na chromosomie bakteryjnym. Geny *chvA*, *chvB* kodują białka odpowiedzialne za połączenie bakterii z komórką roślinną. Natomiast produkty *chvE* biorą udział w aktywacji genów *vir* (Pistelli i wsp. 2012). W wyniku transformacji za pomocą *A. rhizogenes* pochodzący z plazmidu bakteryjnego Ri transferowy DNA (T-DNA) ulega trwałemu wbudowaniu w genom roślinny. Efektem tego procesu jest wzrost korzeni włósnikowatych w miejscu infekcji bakteriami. Po oddzieleniu od eksplantatu i eliminacji bakterii, korzenie transformowane mogą rosnać na stałym lub płynnym podłożu. Każdy uzyskany w miejscu zakażenia korzeń daje początek jednej linii. Klony korzeni mogą się różnić morfologią, przyrostem biomasy i zdolnością do

syntezy metabolitów wtórnych. Dlatego też kolejnym etapem po uzyskaniu kultury jest selekcja linii, która charakteryzuje się wysokim przyrostem biomasy i wydajną syntezą związków czynnych.

Celem zwiększenia produktywności hodowli korzeni transformowanych optymalizuje się warunki dla wzrostu i akumulacji cennych metabolitów. Jednym z zabiegów do tego prowadzących jest badanie wpływu składników podłoża na obydwie parametry. Wiele doniesień wskazuje, że dobranie odpowiedniego stężenia cukrów w pożywce odgrywa istotną rolę. Najczęściej wykorzystywanym źródłem węgla w kulturach *in vitro* jest sacharoza. Jej początkowa zawartość w podłożu może wpływać na ilość biomasy jak i produkcję wielu metabolitów. Na przykład 10% zawartość sacharozy w podłożu najbardziej stymulowała wzrost i produkcję kwasu rozmarynowego w kulturach korzeni transformowanych hyzopa lekarskiego (Kochan i wsp. 1999). Zjawisko zwiększenia stężenia sacharozy w pożywce sprzyjało również natężeniu biosyntezy hioscjaminy, antrachinonów, związków fenolowych i flawonoidowych w korzeniach włośnikowatych *Datura stramonium* oraz korzeniach przybyszowych *Morinda citrifolia* (Pavlow i wsp. 2009, Baque i wsp. 2012). Ilość cukrów w podłożu regulowała także akumulację innych metabolitów takich jak: tiofen, izoflawonoidy, sennozydy A i B, kwas gymnemowy odpowiednio w kulturach korzeni włośnikowatych: *Tagetes laxa*, *Pueraria phaseoloides*, *Senna alata* czy *Gymnema sylvestre* (Rodriguez Talou i Giulietti 1995, Liang i wsp. 2004, He i wsp. 2005, Putalun i wsp. 2006, Nagella i wsp. 2013).

Do ważnych czynników, wpływających na produkcję biomasy i metabolitów wtórnych, należy również źródło azotu. Większość podłoży wykorzystywanych do hodowli *in vitro* zawiera zarówno jony azotanowe jak i amonowe. Publikowane dane wskazują, że na produkcję cennych związków istotny wpływ wywiera zarówno forma azotu, jego stężenie, jak i wzajemne proporcje jonów, które zawierają azot. Bensadek i wsp. (2001, 2008) stwierdzili, że obniżenie zawartości zarówno jonu azotanowego jak i amonowego znacznie sprzyjało biosyntezie alkaloidów tropanowych w kulturach korzeni transformowanych *Atropa belladonna*. Autorzy ci, zaobserwowali również, że zwiększenie poziomu NO_3^- negatywnie wpłynęło na akumulację tych związków. Natomiast Liu i wsp. (2013) pokazał, że w korzeniach włośnikowatych *Anisodus acutangulus* zawartość alkaloidów tropanowych rośnie wraz z podwyższeniem stężenia

NH_4^+ . Całkowicie odmienne obserwacje uzyskano dla korzeni przybyszowych *Eleutherococcus koreanum*, które efektywniej syntetyzowały aktywne składniki, gdy stężenie jonów NO_3^- zostało zwiększone, a stężenie jonów amonowych zmniejszone.

Fosfor odgrywa istotną rolę w szeregu procesów, w tym: w wytwarzaniu energii, syntezie kwasu nukleinowego, fotosyntezie, glikolizie, oddychaniu, syntezie i stabilności błon cytoplazmatycznych czy regulacji aktywności enzymów. W podłożach stosowanych w roślinnych hodowlach *in vitro* występuje zwykle w postaci fosforanów. Ich poziom decyduje o intensywności wzrostu biomasy jak również może być czynnikiem regulującym syntezę metabolitów wtórnych.

Wyższe stężenia fosforanów z reguły pobudzają wzrost komórek, natomiast negatywnie wpływają na akumulację związków czynnych. Obniżenie zawartości PO_4^{3-} w pożywce zwiększyło wytwarzanie ajmalicyny i związków fenolowych w hodowlach zawiesinowych *Catharanthus roseus* oraz flawonoidów i kwasu lukrecjowego w hodowlach korzeni przybyszowych *Glycyrrhiza uralensis* (Ramachandra Rao i Ravishankar 2002, Yin i wsp. 2014). W przeciwieństwie do tych badań, zwiększenie ilości jonów fosforanowych stymulowało syntezę digitoksyny w kulturach *Digitalis purpurea*, jak również betacjaniny w hodowlach komórkowych *Chenopodium rubrum* i *Phytolacca americana* (Ramachandra Rao i Ravishankar 2002).

Obok optymalnego stężenia cukrów, azotu czy fosforu w podłożu, na zwiększenie produkcji metabolitów w kulturach *in vitro* mają wpływ również zabiegi technologiczne. Jednym z najczęściej stosowanych jest proces elicytacji. Polega on na poddaniu kultury *in vitro* działaniu elicytora.

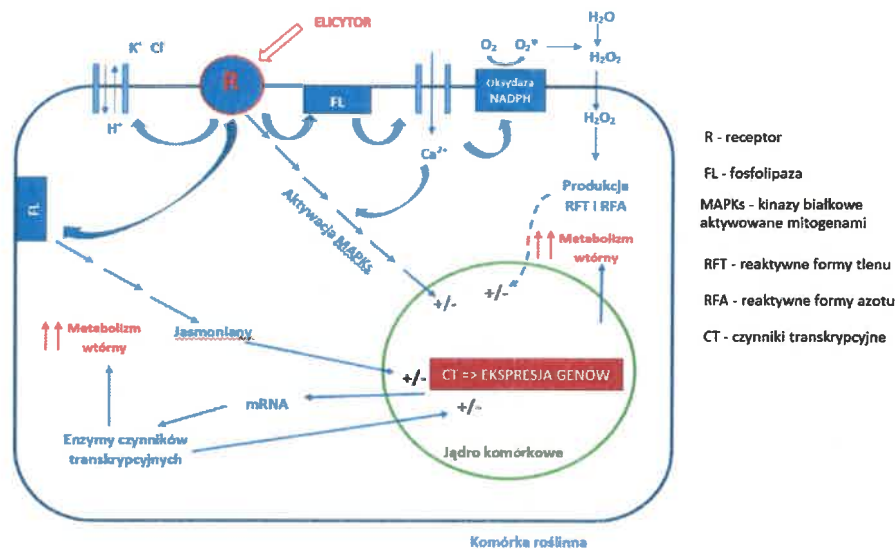
Nazwa elicytor odnosi się do związków chemicznych pochodzących z różnych źródeł, które mogą wywołać u roślin reakcje obronne, prowadzące do nagromadzenia się metabolitów wtórnych. Tym samym zastosowanie elicytorów może być bardzo skuteczną metodą do zwiększenia wydajności produkcji metabolitów wtórnych (Ramirez-Esterada i wsp 2016)

Elicytory zostały sklasyfikowane na podstawie ich "charakteru": na biotyczne i abiotyczne lub na podstawie ich "pochodzenia": na egzogenne i endogenne.

Elicytory biotyczne są pochodzenia biologicznego, mogą pochodzić od patogenu (tzw. zewnętrzne elicytory) lub od samej rośliny (czasami nazywane są endogennymi elicytorami). Do elicytorów biotycznych zaliczane są: polisacharydy pochodzące ze

ściany komórkowej roślin (pektyny, celuloza) lub bakterii (chityna, glukany), glikoproteiny, białka G i białka wewnątrzkomórkowe. Jako elicytory biotyczne stosuje się złożone preparaty biologiczne, gdzie nieznana jest struktura cząsteczkowa składników np. ekstrakt drożdżowy oraz preparaty zawierające elementy ściany komórkowej bakterii oraz preparaty, których strukturę cząsteczkową udało się ustalić, np. polisacharydy, oligosacharydy, glikoproteiny, białka oraz kwasy tłuszczowe (Vasconsuelo i wsp. 2007). Elicytory abiotyczne nie mają pochodzenia biologicznego, należą do nich: promieniowanie UV, stosowanie cykli zamrażania i rozmrażania, metale ciężkie oraz związki chemiczne zdolne do uszkodzenia DNA i błony komórkowej: detergenty, fungicydy i herbicydy (Murthy i wsp. 2014).

Dokładny mechanizm molekularny oddziaływania elicytorów na metabolizm komórki jest wciąż przedmiotem badań wielu ośrodków naukowych. Według jednej z wysuniętych hipotez, w pierwszej kolejności elicytor łączy się z receptorem zlokalizowanym na powierzchni komórki, za pomocą którego, komórka rozpoznaje rodzaj sygnału i generuje odpowiedź. Receptor składa się głównie z białka roślinnego R odpowiedzialnego za ekspresję genów *avr* i transmembranowego receptora kinaz białkowych. Geny *avr* wpływają na produkcję cząsteczek działających jako czynnik wyzwalający, dlatego nie wszystkie rośliny reagują na wszystkie rodzaje elicytora. Po odebraniu sygnału w komórce następuje szereg zmian następujących kolejno po sobie: odwracalna fosforylacja i defosforylacja białek związanych z membraną, cytozolem i kanałem jonowym Ca^{2+} , zewnątrzkomórkowa alkalizacja i zakwaszenie cytoplazmy, aktywacja wtórnych przekaźników-fosfolipazy (PLC), 1,4,5 trifosforanu (IP3), diacyloglicerolu (DAG), cAMP i kinazy aktywowanej mitogenem (MAPK). Wytwarzane są także reaktywne formy tlenu (ROS) np. anion ponadtlenkowy i H_2O_2 o aktywności przeciwbakteryjnej. ROS zaangażowane są w sieciowanie białek obecnych w ścianie komórkowej i indukują geny związane z obronnością roślin. W przekazywaniu sygnału w komórce uczestniczą również białka G. Następuje produkcja jasmonianów, ekspresja genów późnej odpowiedzi obronnej i akumulacja wtórnych metabolitów. Mechanizm procesu elicytacji przedstawia rycina 6 (Ramirez-Esterada i wsp 2016).



Ryc. 6 Schemat przedstawiający prawdopodobny mechanizm działania elicytora (Ramirez-Esterada i wsp. 2016).

Skuteczność procesu elicytacji zależy przede wszystkim od interakcji pomiędzy komórką roślinną, a elicytorem. Dane literaturowe wskazują, że parametry takie jak rodzaj i stężenie elicytora, czas trwania elicytacji, wiek kultury i jej typ, dodatek regulatorów wzrostu, skład pożywki i warunki hodowli mają wpływ na działanie elicytora (Vasconsuelo i wsp. 2007).

Poszczególne rodzaje elicytorów nie działają specyficznie. Ten sam elicytor może stymulować wydzielanie metabolitów wtórnych u kilku różnych gatunków roślin. Na przykład jasmonian metylu (MeJe) wpływa na zwiększenie syntezy metabolitów wtórnych w korzeniach włósnikowatych *Ambrosia maritima*, *Datura stramonium*, *Hyoscyamus muticus* i *Solanum tuberosum* (Vasconsuelo i wsp. 2007). Z drugiej strony ten sam gatunek rośliny może być wrażliwy na działanie różnych elicytorów. Przykładem ilustrującym ten fakt może być zwiększenie produkcji kwasu rozmarynowego w korzeniach *Ocimum basilicum* pod wpływem kwasu salicylowego, kwasu jasmonowego czy chitozanu (Goel i wsp. 2011).

Stężenie elicytora jest czynnikiem mającym istotny wpływ na produkcję metabolitów wtórnych. Dla każdego gatunku rośliny optymalny jego poziom może być inny

(Vasconsuelo i wsp. 2007). Najodpowiedniejszym stężeniem jasmonianu metylu (MeJa) dla zwiększenia produkcji gossypolu i jego metylowych pochodnych w korzeniach włóśnikowatych *Gossypium barbadense* okazało się 100 μM (Frankfater i wsp. 2009). Najwyższy poziom lignanów w kulturach *Linum tauricum* odnotowano, gdy zastosowano 150 μM MeJa (Inkova 2009), a wydajność syntezy hyperycyny w bioreaktorowych kulturach nietransformowanych korzeni *Hypericum perforatum* osiągnęła szczyt przy użyciu 350 μM MeJa (Wu i wsp. 2014). Zwiększenie stężenia elicytora w pewnych granicach powoduje wzrost produkcji metabolitów wtórnych, jednak zbyt wysoki jego poziom może doprowadzić do zmniejszenia wydajności syntezy. Kultury komórkowe *Catharanthus roseus* poddane działaniu 5% elicytora grzybowego wykazywały wzrost poziomu ajmalicyny, jednakże podwyższenie stężenia powyżej 10% hamowało produkcję tego metabolitu (Namdeo 2007).

Dane literaturowe wskazują, że czas trwania elicytacji wpływa na odpowiedź komórkową i decyduje o wyniku działania elicytora. Siedmiodniowa elicytacja była najbardziej odpowiednia dla wydajnej produkcji kwasu walerianowego w kulturach korzeni transformowanych *Valeriana officinalis* (Torkamani i wsp. 2014), a 4 i 6 dniowa dla akumulacji madekasozydu i azjatykozydu w kulturach komórkowych *Centella asiatica* (James i wsp. 2013). Inne obserwacje przytacza Namdeo (2007) wskazując, że poziom ajmalicyny w kulturze zawieszinowej *Catharanthus roseus* osiągnął maksimum po dwudniowej ekspozycji na elicytor.

Analizując doniesienia różnych autorów należy wskazać, że proces optymalizacji warunków dla wzrostu i akumulacji metabolitów wtórnych jest kluczowy w uzyskaniu kultur o wysokiej wydajności i powinien być przeprowadzany indywidualnie dla danej hodowli.

Korzenie włóśnikowe są chętnie stosowane do uzyskiwania cennych metabolitów, a znaczący postęp w pełniejszym wykorzystaniu ich potencjału dokonał się w latach 90 ubiegłego wieku. Było to możliwe w wyniku lepszego poznania molekularnych mechanizmów transferu T-DNA do roślin i związaną z tym możliwością wprowadzania do tych organizmów nowych genów, także w wyniku zdobycia pełniejszej wiedzy na temat przebiegu i regulacji wybranych szlaków metabolicznych (Talano i wsp. 2012).

Omówienie celu naukowego prac objętych postępowaniem habilitacyjnym i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Głównym celem badań ujętych w cyklu prac było otrzymanie kultur korzeni włośnikowatych żeńszenia północnoamerykańskiego *P. quinquefolium* oraz optymalizacja warunków wzrostu i biosyntezy ginsenozydów w tych kulturach. W pracach zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego jako osiągnięcie (Publikacje H1-H7) wykorzystałam metody biotechnologiczne, molekularne i fitochemiczne.

Przeprowadzone badania obejmowały:

1. uzyskanie korzeni transformowanych żeńszenia pięciolistnego *Panax quinquefolium*
2. charakterystykę wzrostu powyższych kultur, hodowanych w kolbach oraz zoptymalizowanie składu podłoża dla uzyskania najwyższego plonu biomasy
3. identyfikację i określenie zawartości ginsenozydów oraz optymalizację warunków dla ich wydajnej biosyntezy
4. izolację i charakterystykę promotorów wybranych genów kodujących kluczowe enzymy, uczestniczące w biosyntezie ginsenozydów
5. prace nad zwiększeniem zawartości badanych związków w kulturze korzeni włośnikowatych poprzez elicytację
6. opracowanie warunków dla powiększenia skali procesu hodowli korzeni włośnikowatych *P. quinquefolium* i biosyntezy ginsenozydów w bioreaktorze rozpyłowym

Otrzymywanie korzeni transformowanych żeńszenia pięciolistnego *Panax quinquefolium*

Materiałem wyjściowym do otrzymania korzeni transformowanych były siewki, które uzyskano z upraw polowych Akademii Rolniczej (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy) w Lublinie. Zostały one odkażone, opłukane w sterylnej wodzie i podzielone na fragmenty, które infekowałam szczepem *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 (**Publikacja H1**). Po ośmiu tygodniach na 15% zakażonych eksplantatów tworzyły się korzenie. Po 4-tygodniowej hodowli, mierzące około 1,5 cm długości korzenie przenosiłam pojedynczo na płynne podłoże MS (Murashige-Skooge 1962),

uzupełnione ampicyliną (300-500 mg L⁻¹). Celem uzyskania lepszego wzrostu kultury te następnie umieściłam w podłożu B-5 (Gamborg i wsp. 1968). Po eliminacji bakterii z zastosowaniem antybiotyku otrzymałam 5 sterylnych linii korzeni transformowanych. Dalszy wzrost podjęły trzy klony oznaczone jako A, B, G. Transformacja uzyskanych korzeni została potwierdzona metodą PCR (**publikacja H1**). Przeprowadzona analiza genetyczna wykazała obecność genów *rolB* (423 pz) i *rolC* (626 pz), pochodzących z plazmidu Ri bakterii, co świadczy o trwałym ich wbudowaniu w genom uzyskanych korzeni. Jednocześnie stwierdziłam, że badane linie korzeni były wolne od bakterii, na co wskazywała obecność produktu genu *virG* jedynie w próbce pochodzącej z *A. rhizogenes*. Na podstawie morfologii korzeni, przyrostu świeżej i suchej masy, a także wstępnych analiz zawartości saponin do dalszych badań wybrałam linię A.

Charakterystyka i optymalizacja warunków wzrostu korzeni transformowanych żeńszenia pięciolistnego *Panax quinquefolium*

Dla linii A korzeni transformowanych *P. quinquefolium* zbadalam dynamikę przyrostu biomasy. Podczas 50-dniowego cyklu wzrostu, co 5 dni pobierałam próby, które posłużyły do oceny badanego parametru. Przebieg zmian biomasy kultury miał charakter sigmoidalny. W ciągu pierwszych 5 dni obserwowałam lag fazę, podczas której waga korzeni zmieniała się nieznacznie w stosunku do inokulatu. Następnie odnotowałam szybki przyrost biomasy (do 20 dnia hodowli). Po 20 dniu hodowli przyrost suchej masy był już wolniejszy – kultura osiągnęła fazę powolnego wzrostu, a następnie fazę stacjonarną. Maksymalny plon świeżej i suchej biomasy był odpowiednio 10- i 7,5- krotnie wyższy w stosunku do inokulum (**Publikacja H1**).

Kolejnym etapem prac była optymalizacja warunków dla wzrostu korzeni. Analiza danych literaturowych (Kochan i wsp. 1999, Petrova i wsp. 2015, Xu i wsp. 2009) wskazuje, że do najważniejszych czynników, wpływających na przyrost biomasy korzeni transformowanych należy właściwy dobór stężenia cukru w pożywce. Aby określić odpowiednią jego ilość zastosowałam siedem stężeń sacharozy 10, 20, 30, 50, 70, 100, 120 g L⁻¹. Najwyższy plon świeżej biomasy uzyskałam przy zastosowaniu w podłożu 30 g L⁻¹ sacharozy. Dla tego wariantu odnotowałam 18-krotny przyrost tego parametru w porównaniu do inokulum. Nieco inne wyniki otrzymałam badając wpływ stężenia cukru w podłożu na poziom suchej masy korzeni. Optymalnym stężeniem

sacharozy okazało się 50 g L^{-1} , dla którego zaobserwowałam, aż 37-krotny przyrost w odniesieniu do inokulum (**Publikacja H2**).

Z przeprowadzonych przeze mnie doświadczeń wynika również, że nie tylko poziom cukrów może mieć znaczenie w procesie optymalizowania warunków dla wzrostu korzeni transformowanych. Innym czynnikiem mogącym wpływać na przyrost biomasy jest ilość azotu w podłożu i źródła jego pozyskania. Poniższa tabela pokazuje zastosowane warianty podłoża B-5 różniące się poziomem N całkowitego i stężeniem jonów NO_3^- i NH_4^+ .

Tabla 1. Stężenie jonów, będących źródłem azotu w standardowym i zmodyfikowanym podłożu Gamborga, w którym prowadzono hodowlę transformowanych kultur korzeni *P. quinquefolium*

		stężenie [mM]										
KNO_3	NO_3^-	0	12.4	12.4	18.75	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8*	24.8	49.5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	NH_4^+	1	0.5	1	1	0	0.5	0.8	1*	2	1	
Całkowity N		1	12.9	13.3	19.75	24.8	25.3	25.6	25.8*	26.8	50	

* stężenia w standardowym podłożu B-5

Otrzymane wyniki wykazały, że dla wzrostu korzeni włósnikowatych *P. quinquefolium* ma znaczenie obecność obydwu źródeł azotu w podłożu, natomiast ogólna zawartość tego pierwiastka w podłożu jest mniej istotna. Przy eliminacji jonu NO_3^- lub NH_4^+ obserwowałam drastyczną redukcję wzrostu korzeni. Najkorzystniejszymi warunkami okazały się warianty podłoży, w których stosunek jonów azotanowych do amonowych wyniósł 24,8. Jest on zachowany przy standardowym składzie pożywki B-5 lub gdy ilość obydwu jonów jest obniżona do połowy (**Publikacja H3**).

Stwierdziłam także, że szczególną rolę we wzroście kultury odgrywa fosfor. W podłożach stosowanych dla kultur *in vitro* najczęściej występuje on w postaci fosforanów. Spośród pięciu badanych stężeń PO_4^{3-} (0,55; 0,83; 1,1; 1,65; 2,21 mM) najodpowiedniejszym dla pozyskania biomasy korzeni transformowanych żeńszienca amerykańskiego było stężenie 1.65 mM PO_4^{3-} . Jednakże różnice między średnimi wartościami suchej masy uzyskane przy tym wariantcie podłoża i wariantach z 0,83 lub 1,1mM fosforanów, okazały się nieznaczne i statystycznie nieistotne. Najniższa ilość

PO_4^{3-} spośród zastosowanych w podłożu B-5 (0,55 mM) wyraźnie hamowała wzrost badanej kultury (**Publikacja H3**).

Identyfikacja i określenie zawartości ginsenozydów w uzyskanych kulturach oraz optymalizacja warunków dla wydajnej ich biosyntezy

W uzyskanych hodowlach korzeni włośnikowatych zidentyfikowałam i określiłam ilościowo zarówno pochodne protopanaksadiolu, jaki protopanaksatriolu. Dla ustalenia zawartości poszczególnych metabolitów wykorzystałam metodę HPLC.

W kulturach korzeni transformowanych, dla których określono dynamikę wzrostu, zbadałam również dynamikę produkcji saponin. W ciągu 50-dniowego okresu hodowli stwierdziłam obecność sześciu badanych ginsenozydów (Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1). Suma wszystkich oznaczanych związków stopniowo wzrastała do 30 dnia hodowli. Między 30 a 45 dniem kultury zaobserwowałam nieznaczne wahania ich ilości względem maksymalnego poziomu (3,09 - 3,57 mg g^{-1} s.m.). Po 45 dniu hodowli zawartość saponin zaczęła się obniżać. Analizując biosyntezę badanych ginsenozydów (rozumianą jako sumaryczną zawartość 6 związków) na tle krzywej wzrostu korzeni można stwierdzić dużą zgodność dynamiki obu procesów. Fazie wzrostu towarzyszyła produkcja saponin. Od 30 dnia hodowli odnotowałam niewielkie wahania sumarycznej zawartości badanych metabolitów. W tym czasie także zmiany suchej masy były nieznaczne. Dla poszczególnych związków ich maksymalny poziom był osiąganym w różnym czasie trwania hodowli. W 30 dniu cyklu oznaczono najwyższą produkcję ginsenozydów Rc, Rd i Rg1. Trzydziesty piąty dzień najbardziej sprzyjał syntezie saponiny Rb1 i Rb2, natomiast 5 dni później ilościowo dominował metabolit – ginsenozyd Re (**Publikacja H1**).

Analizując zawartości saponin w kilku kolejnych pasażach zauważyłam tendencję do stopniowego zwiększania się ich poziomu. Po ustabilizowaniu się ilości oznaczanych metabolitów zajęłam się optymalizacją warunków dla wydajnej biosyntezy ginsenozydów w badanych kulturach. Podobnie jak w przypadku biomasy zbadałam wpływ kilku stężeń sacharozy (10, 20, 30, 50, 70, 100, 120 g L^{-1}) w podłożu na zawartość żeńszeniowych saponin. Ich maksymalną ilość, wyrażoną jako suma metabolitów Rb1, Rb2, Rc, Rd Rg1 i Re (9 mg g^{-1} s.m.), odnotowałam przy zastosowaniu cukru w ilości 30 g L^{-1} . Ten wariant również najbardziej sprzyjał

akumulacji pojedynczych związków takich jak: Rb1, Rc, Rg1 i Re. Poziom tych ginsenozydów był dwukrotnie wyższy w porównaniu do oznaczonego w podłożu uzupełnionym 2 czy 5% sacharozy. Pozostałe testowane warianty stężeń cukrów jeszcze bardziej obniżały ilość tych związków. Zaskakującym wynikiem był profil zmian poziomu saponiny Rb2, okazało się, że był zależny od początkowej ilości cukrów w podłożu. Syntezie tego związku sprzyjało bowiem stężenie 20 i 70 gL⁻¹ sacharozy. Niezależnie od zastosowanego stężenia sacharozy ilościowo dominował metabolit Rb1 wśród pochodnych protopanaksadiolu i Re wśród pochodnych protopanaksatriolu. Zawartość metabolitu Rd była najniższa, a jego ilość nie ulegała zmianie w zależności od zastosowanego stężenia cukru. Uzyskane rezultaty wskazały, że optymalnym stężeniem sacharozy dla wydajnej biosyntezy większości badanych saponin w kulturach korzeni transformowanych *P. quinquefolium* hodowanych w kolbach było stężenie 30 gL⁻¹ (Publikacja H2). Uzyskana ilość ginsenozydów była wyższa niż w 6-letnich korzeniach głównych *P. ginseng*, pozyskanych z gruntu (Kang i Kim 2016).

Przeprowadzone przez mnie badania pokazały, że odpowiednie stężenie jonów amonowych i azotanowych istotnie wpływa na biosyntezę ginsenozydów w badanych kulturach. Zmniejszanie stężenia azotanów przy jednoczesnym pozostawieniu na stałym poziomie jonów amonowych wywoływało wzrost akumulacji pochodnych protopanaksatriolu (Rg1+Re). Natomiast zawartość pochodnych protopanaksadiolu (Rb1+Rb2+Rc+Rd) zmieniała się nieznacznie. Całkowite usunięcie jonów azotanowych wyraźnie obniżało zdolność akumulacji badanych związków. Uzyskane rezultaty wskazały również, że optymalnym stężeniem dla uzyskania najbardziej wydajnej biosyntezy saponin okazało się podłoże ze zmniejszoną do połowy zawartością jonów NO₃⁻ w stosunku do standardowego podłoża B-5. Podobne obserwacje odnotowałam przy stopniowym zmniejszaniu stężenia jonów amonowych i pozostawieniu na stałym poziomie stężenia jonów azotanowych. W tym przypadku zarówno saponiny z grupy Rb jak i ginsenozydy należące do grupy Rg wykazywały tendencję wzrostową. Całkowite usunięcie jonów amonowych nie wywołało znaczącej redukcji zawartości oznaczanych metabolitów, choć wyraźnie hamowało przyrost biomasy. Analiza powyższych rezultatów wskazuje, że obniżenie zawartości NO₃⁻ i NH₄⁺ do połowy ich ilości co w standardowym podłożu B-5 najbardziej sprzyja wydajnej syntezie ginsenozydów (sumaryczna zawartość: 11,15 mg g⁻¹ s.m.) i nie wpływa negatywnie na wzrost kultur.

Rezultaty dotyczące zawartości poszczególnych metabolitów również potwierdziły, że powyższy wariant podłoża Gamborga znacznie stymuluje ich akumulację w porównaniu do standardowego podłoża B-5. Ilość ginsenozydów Rb1, Rc i Re zwiększyła się dwukrotnie, ilość saponiny Rb2 aż 13,5 krotnie, natomiast poziom ginsenozydów Rd i Rg1 wzrósł o 20% (**Publikacja H3**).

Kolejnym etapem optymalizowania warunków biosyntezy ginsenozydów w kulturach korzeni transformowanych był dobór odpowiedniego stężenia jonów fosforanowych. Zastosowałam te same warianty stężeń PO_4^{3-} jak w doświadczeniach dotyczących biomasy tj. 0,55; 0,83; 1,1; 1,65; 2,21 mM. Najwyższą zawartość sumy 6 oznaczanych związków tj. 8,83 mg g⁻¹ s.m. uzyskałam na podłożu zawierającym 0,83 mM jonów fosforanowych. Ilość ta przekroczyła o 20 % poziom produkcji ginsenozydów, otrzymanych w kulturach korzeni rosnących na kontrolnym podłożu B-5, zawierającym standardowe ilości poszczególnych składników. Stężenie 0,83 mM PO_4^{3-} sprzyjało akumulacji zarówno pochodnych protopanaksadiolu, jak i protopanaksatriolu, choć w tym ostatnim przypadku podobny poziom uzyskano dla stężenia 1,1 mM PO_4^{3-} . Wyższe stężenia jonów fosforanowych niż 1,1mM powodowały znaczny spadek zawartości saponin grupy Rg. Optymalne stężenia fosforanów dla akumulacji poszczególnych ginsenozydów były różne. Najwyższy poziom Rb1, Rc i Re uzyskano przy zastosowaniu 0,83 mM PO_4^{3-} . Maksymalną ilość metabolitów Rb2, Rg1 i Rd odnotowałam odpowiednio przy użyciu 0,55; 1,1 i 2,21 mM PO_4^{3-} w podłożu.

W kolejnych doświadczeniach zmodyfikowałam skład podłoża zgodnie z wariantami z najefektywniejszą biosyntezą badanych związków. Zmiany w składzie podłoża objęły obniżenie do połowy zawartości jonów amonowych i azotanowych oraz zmniejszenie do 0,83 mM zawartości jonów fosforanowych w stosunku do standardowego (kontrolnego) podłoża Gamborga. W efekcie uzyskałam sumaryczną zawartość sześciu badanych saponin na poziomie 12,45 mg g⁻¹ s.m., co było wartością dwukrotnie wyższą w stosunku do kontroli (standardowy skład podłoża B-5). Modyfikacja ilości NO_3^- , NH_4^+ i PO_4^{3-} w podłożu miała najkorzystniejszy wpływ na zawartość saponin Rb1 (3-krotny wzrost zawartości), Rb2 (ponad 14-krotny wzrost zawartości) i Re (ponad 3-krotny wzrost zawartości). Poziom Rc i Rg1 podniósł się odpowiednio 1,78 razy i 1,45 razy. Ilość Rd pozostała bez zmian (**Publikacja H3**).

Wzrost korzeni transformowanych *P. quinquefolium* hodowanych w bioreaktorze rozpyłowym

Część prowadzonych przeze mnie badań poświęciłam powiększaniu skali hodowli korzeni transformowanych *P. quinquefolium* przechodząc od hodowli w kolbach Erlenmeyera do hodowli w bioreaktorze rozpyłowym o pojemności 10 dm³. Zabieg taki wiąże się z przeniesieniem kultur w zupełnie odmienne warunki. We wnętrzu bioreaktora kultury korzeni wzrastają osadzone na stalowej siatce i są czasowo zraszane rozpyloną pożywką. W cyklu hodowalnym okres dostarczania podłoża trwał 30 sekund, po czym następowała 60 sekundowa przerwa. Po 30-dniowej hodowli odnotowałam 5-krotny przyrost suchej masy korzeni. Osiągnięty plon biomasy był niższy od uzyskanego w kolbach wstrząsanych (**Publikacja H1**).

Podobnie jak w przypadku hodowli, prowadzonych w kolbach, także dla hodowli bioreaktorowych wyznaczałam optymalne stężenie cukru w podłożu celem pozyskania najintensywniejszego wzrostu badanych kultur. Korzystając z rezultatów uzyskanych w badaniach w małej skali (kolby), które wyraźnie pokazały, że stężenia sacharozy poniżej 20 gL⁻¹ i powyżej 70 g L⁻¹ znacznie hamują wzrost korzeni, do badań w bioreaktorze wybrałam zakres stężeń cukru pomiędzy 20 a 70 gL⁻¹. Najwyższą średnią wartość świeżej biomasy (89,59 gL⁻¹) uzyskałam przy zastosowaniu 30 g L⁻¹ sacharozy w podłożu, natomiast dla suchej masy korzystne okazały się dwa stężenia cukru 30 i 50 gL⁻¹ (odpowiednio uzyskałam 11,19 i 11,53 gL⁻¹s.m.), przy czym nie odnotowałam między nimi różnic istotnych statystycznie. Uzyskane dane wskazały, że przyrost biomasy korzeni transformowanych w bioreaktorze jest niższy w porównaniu do hodowli prowadzonych w kolbach (**Publikacja H2**).

Produkcja ginsenozydów w kulturach korzeni transformowanych *P. quinquefolium* hodowanych w bioreaktorze rozpyłowym

Mimo niższego przyrostu biomasy odnotowanego po 30 dniowej hodowli w bioreaktorze zawartość sumy oznaczanych ginsenozydów (6,47 mgg⁻¹ s.m.) była dwukrotnie wyższa w porównaniu do otrzymanej w korzeniach hodowanych w kolbach, dla których określono dynamikę produkcji saponin. Poziom poszczególnych metabolitów był również wyższy w ekstraktach korzeni, pochodzących z kultur bioreaktorowych. Podobnie jak w kulturach prowadzonych w skali laboratoryjnej,

spośród pochodnych protopanaksadiolu ilościowo dominowała saponina Rb1 (1,99 mgg⁻¹ s.m.), natomiast wśród pochodnych protopanaksatriolu metabolit Re (1,77 mgg⁻¹ s.m.) (**Publikacja H1**).

Równoległe z poszukiwaniem najbardziej korzystnego stężenia sacharozy dla wzrostu korzeni w bioreaktorze podjęłam analizy, pozwalające stwierdzić jak poziom cukru w pożywce (w stężeniach: 20, 30, 50 i 70 gL⁻¹) może wpłynąć na proces biosyntezy ginsenozydów w hodowlach pochodzących z powiększonej skali. Całkowita zawartość badanych związków nieznacznie wahała się w zależności od zastosowanego stężenia cukrów (5,99 - 6,65 mgg⁻¹ s.m.). Podobnie jak w przypadku korzeni hodowanych w kolbach ilościowo dominował metabolit Rb1 wśród pochodnych protopanaksadioli. Akumulacji tego związku sprzyjały niższe stężenia sacharozy (20 lub 30 gL⁻¹). Inaczej niż w kulturach prowadzonych w kolbach ilość metabolitu Rc nie zmieniała się w zależności od poziomu cukru. Spostrzeżenia dotyczące ginsenozydu Rd były podobne w hodowlach bioreaktorowych i w kolbach; był on syntetyzowany w najmniejszej ilości i jego poziom nie zmieniał się w zależności od wariantu podłoża. Dla pochodnych protopanaksatriolu zaobserwowano odmienną obserwację w porównaniu do kultur hodowanych w małej skali (kolby) – wyższym stężeniom cukru w podłożu towarzyszyła wyższa zawartość ginsenozydów Rg1 i Re (**Publikacja H2**).

Korzystając z doświadczeń przeprowadzonych w małej skali, do hodowli kultur korzeni w bioreaktorze rozpyłowym zastosowałam standardowe podłoże Gamborga i jego zmodyfikowaną wersję (obniżenie do połowy zawartości jonów amonowych i azotanowych oraz zmniejszenie do 0,83 mM zawartości jonów fosforanowych w stosunku do standardowego podłoża Gamborga). W efekcie uzyskałam 12,78 mgg⁻¹ s.m. ginsenozydów w korzeniach rosnących na podłożu kontrolnym i 2,75-krotny przyrost zawartości sumy saponin osiągając 35,12 mg g⁻¹ s.m. na zmodyfikowanym podłożu B-5. W przypadku poszczególnych saponin również odnotowałam znaczne zwiększenie ich zawartości: największe, ponad 5-krotne dla metabolitu Rd, blisko 4-krotne dla Rb1, około 3-krotne dla Rb2 i Rc oraz około 2-krotne dla Rg1 i Re.

Izolacja i charakterystyka promotorów wybranych genów kodujących kluczowe enzymy w biosyntezie ginsenozydów

Zapoznanie się z technikami biologii molekularnej (tj. izolacja genomowego i plazmidowego DNA, nabycie umiejętności projektowania starterów czy dobierania odpowiednich warunków dla przebiegu wydajnej reakcji PCR) pozwoliło mi na podjęcie badań z zakresu genetyki, dotyczących promotorów wybranych genów, kodujących kluczowe enzymy w biosyntezie ginsenozydów. Uzyskane kultury korzeni transformowanych stały się materiałem do wyizolowania, zsekwencjonowania i scharakteryzowania promotorów dwóch genów, kodujących 2 kluczowe enzymy reduktazę 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A (HMGR) oraz syntazę skwalenu (SSq), które biorą udział w biosyntezie żeńszeniowych saponin. HMGR może regulować biosyntezę ginsenozydów poprzez regulację syntezy mewalonianu - prekursora wszystkich związków izoprenoidowych. Natomiast syntaza skwalenu (SSq), bezpośrednio przyczynia się do utworzenia skwalenu – głównego prekursora w biosyntezie triterpenów (Ryc. 2). Zainteresowanie promotorami genów tych enzymów wynika ze znaczenia ich właściwości, oraz chęci poznania czynników, wpływających na regulację aktywności promotora, a tym samym na regulację ekspresji genu. Z kolei poziom ekspresji genów koreluje z ilością syntetyzowanego enzymu, co może oddziaływać na efektywność przebiegu danej reakcji, w następstwie czego dany etap biosyntezy może być intensyfikowany lub hamowany. To ostatecznie wpływa na poziom produktu danej biosyntezy.

Prace dotyczące tej części badań rozpoczęłam od izolacji genomowego DNA z korzeni transformowanych *P. quinquefolium*. Uzyskany materiał genetyczny charakteryzował się wysoką czystością i odpowiednim stężeniem DNA. Następnie zaprojektowałam startery właściwe dla genów kodujących reduktazę 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A (HMGR) oraz syntazę skwalenu (Ssq). Zarówno genomowe DNA jak i startery wykorzystałam do przeprowadzenia reakcji PCR. Dobór odpowiednich warunków reakcji PCR pozwolił na uzyskanie fragmentów DNA, które następnie wbudowałam do odpowiedniego wektora i sklonowałam, a po wyizolowaniu, strawieniu i oczyszczeniu poddałam sekwencjonowaniu. Efektem tych prac było zgłoszenie sekwencji nuklotydowej promotorów genów *HMGR* i *Ssq* do GenBanku, gdzie zostały zdeponowane pod numerami KT869137.1 i KT869136.1. Charakterystykę

promotora genu *Ssq* i *HMGR*, wynikającą z analizy *in silico* zamieściłam odpowiednio w publikacji H6 i H7. Obydwa wyizolowane fragmenty genomowego DNA (741 pz) były tej samej długości i obejmują proksymalny promotor, 5'UTR i 5'CDS fragment regionu kodującego genu *SSq* i *HMGR*. W obrębie proksymalnego promotora genu *SSq*, między -28 i -21 bp znajduje się kasetta TATA-box. Natomiast w promotorze genu *HMGR* jest ona zlokalizowana między -35 and -28 bp w odniesieniu do potencjalnego miejsca startu transkrypcji (TSS). Badane promotory nie posiadały powtórzeń tandemowych i wysp CpG/CpNpG, co sugeruje potencjalny brak hamowania ekspresji genów z powodu metylacji cytozyny. Celem sprawdzenia, czy w obrębie badanych promotorów są obecne sekwencje regulatorowe wrażliwe na działanie elicytorów, skorzystałam z bazy danych PlantCARE. W obydwu badanych promotorach zidentyfikowałam kilka czynników *cis* o długości między 5 a 10 bp, które są homologiczne z *cis*-elementami, występującymi u innych roślin.

W promotorze genu syntazy skwalenu wśród nich były: CGTCA element, który jest zaangażowany w odpowiedź rośliny na działanie MeJA, a także motywy, mogące być aktywowane w odpowiedzi na światło (ACE-element, G-box element i GT1-element), stres cieplny (HSE element) lub suszę (MBS element) (**Publikacja H6**).

W obrębie promotora genu *HMGR* znalazły się: element ABRE (TACGTG), biorący udział w modulowaniu odpowiedzi rośliny na działanie kwasu abscysynowego, dwa elementy *cis* uczestniczące w odpowiedzi na działanie światła (BOX 4 (ATTAAT), G-BOX (TACGTG)), oraz TCA-element prawdopodobnie włączony w generowanie odpowiedzi rośliny na działanie kwasu salicylowego (**Publikacja H7**).

Uzyskane wyniki wskazują, że MeJA i kwas abscysynowy mogłyby być zastosowane jako potencjalne regulatory ekspresji odpowiednio genu syntazy skwalenu i reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A, co może w efekcie końcowym mieć wpływ na zawartość ginsenozydów w badanych kulturach korzeni transformowanych.

Eksperymentalna weryfikacja wpływu MeJa i kwasu abscysynowego na ekspresję genów kodujących syntazę skwalenu i reduktazę 3-hydrokso-3-metyloglutarylokoenzymu A metodą RT-PCR

Analiza RT-PCR potwierdziła, że jasmonian metylu reguluje ekspresję genu *SSq*, a proces ten zależy od stężenia elicytora. Najwyższą ekspresję badanego genu (w porównaniu do nietraktowanych prób 2435,4 krotnie wyższą) uzyskałam po zastosowaniu stężenia 250 μM MeJa. Wraz ze zmniejszaniem się dawki jasmonianu metylu zmniejszał się poziom ekspresji genu kodującego syntazę skwalenu. Okazało się również, że odpowiedź na poziomie molekularnym na działanie jasmonianu jest stosunkowo szybka - maksymalną ekspresję genu odnotowałam po 12 godzinach, po czym znacznie się ona obniżała (24h i 48h) (**Publikacja H6**).

Obecność elementu ABRE w promotorze genu *HMGR* wskazała, że potencjalnie może on być wrażliwy na działanie kwasu abscysynowego (ABA) i brać udział w modulowaniu odpowiedzi rośliny na ten związek. Jak dotąd wpływ ABA na ekspresję genu *HMGR* nie był badany w żadnym typie kultur *in vitro* żadnego z gatunków żeńszenia. Wykorzystując metodę RT-PCR doświadczałam potwierdziłam, że kwas abscysynowy reguluje ekspresję genu *PqHMGR* w zależności od stężenia (0,1; 0,25; 0,5 mgL^{-1}) i czasu ekspozycji (6, 12 i 24 godziny) (**Publikacja H7**). Zaobserwowałam podwyższoną transkrypcję genu kodującego reduktazę 3-hydrokso-3-metyloglutarylokoenzymu A już po 6 godzinach od podania 0,1 mgL^{-1} ABA. Jednakże najwyższy poziom ekspresji tego genu (9,4- krotny wzrost ekspresji w stosunku do kontroli) odnotowałam po 12 godzinach działania 0,25 mgL^{-1} kwasu abscysynowego na badane tkanki.

Próby zwiększania zawartości ginsenozydów w kulturze korzeni włośnikowatych *P. quinquefolium* poprzez zastosowanie elicytacji

Jak nadmieniałam we wprowadzeniu elicytacja jest zabiegiem, mającym wywołać reakcję obronną rośliny na różnego rodzaju warunki stresowe. Podstawowym bodźcem są elicytory, działające jako cząsteczki wzbudzające transdukcję sygnałów w komórce roślinnej, co w efekcie stymuluje szereg reakcji biochemicznych, prowadzących do powstania wielu grup metabolitów wtórnych. Ze względu na fakt, że proces elicytacji zależy od takich czynników jak: rodzaj, stężenie elicytora, czy czas ekspozycji na

elicytor, warunki podania egzogennych elicytorów w kulturach *in vitro* muszą być odpowiednio dobrane do każdej kultury i typu uzyskiwanych metabolitów. Wyniki eksperymentów poświęconych elicytacji kultur korzeni włósnikowatych *P. quinquefolium* zostały opisane w publikacjach H4-H7. Jako elicytory wybrałam jasmonian metylu (MeJa) (Publikacja H6), kwas abscysynowy (Publikacja H7), ekstrakt drożdżowy (Publikacja H4, Konferencja KH2) i *trans*-anetol (Publikacja H5, Konferencja KH3). Wytypowanie jasmonianu metylu i kwasu abscysynowego było powiązane z wynikami analiz *in silico* promotorów genów kodujących powstawanie syntazy skwalenu i reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A, oraz wynikami analizy RT-PCR, potwierdzającej oddziaływanie obu związków na badane geny. Zarówno MeJa, jak i ABA, oraz ekstrakt drożdżowy wcześniej stosowano w kulturach *in vitro* celem zwiększenia produkcji cennych związków (Łuczkiwicz i Kokotkiewicz 2005, Zhang i wsp. 2015, Lenka i wsp. 2015, Wawrosch i wsp. 2014). *Trans*-anetol jako potencjalny elicytor został użyty po raz pierwszy. W dostępnym piśmiennictwie nie odnalazłam doniesień o próbach elicytacji związkami należącymi do metabolitów wtórnych roślin, wchodzącymi w skład olejków eterycznych. Użyty przeze mnie jako elicytor – *trans*-anetol występuje w roślinach z rodziny *Apiaceae* takich jak anyż i koper włoski, a także anyż mirtowy. Wykazuje właściwości antybakteryjne i przeciwgrzybowe (Huang i wsp. 2010, Diao i wsp. 2014, Kwiatkowski i wsp. 2017). Ze względu na wysoką aktywność biologiczną można było przypuszczać, że podany do podłoża w kulturach *in vitro* może wywołać reakcję stresową, której wynikiem byłoby wzmożenie biosyntezy ginsenozydów.

We wszystkich przeprowadzonych doświadczeniach elicytory aplikowałam zanim poszczególne saponiny osiągały swój maksymalny poziom. W przypadku ABA zastosowałam, także wariant z podaniem elicytora już w dniu inokulacji. Okazało się, że istotne znaczenie dla uzyskania wysokiej produkcji saponin miał czas ekspozycji na elicytor i jego stężenie.

Podobnie jak w innych kulturach (Namdeo 2007, James i wsp. 2013) również i dla korzeni transformowanych *P. quinquefolium* stwierdziłam, że każdy z zastosowanych elicytorów wymaga innego czasu oddziaływania na kulturę, aby wywołać wydajną akumulację badanych związków: *trans*-anetol 24 godziny, ekstrakt drożdżowy trzy dni, jasmonianu metylu siedem dni, a kwas abscysynowy aż 28 dni.

Najwyższy przyrost całkowitej zawartości ginsenozydów (wyrażonych jako suma poszczególnych badanych związków) uzyskałam po zastosowaniu MeJa (trzykrotnie więcej w porównaniu do kontroli), a najodpowiedniejszym stężeniem spośród 5, 50, 100, 250, 500 μM okazało się 250 μM . Zaobserwowałam również, że wraz ze zwiększającym się stężeniem jasmonianu metylu, w granicach 5-250 μM , wzrastała sumaryczna zawartość ginsenozydów. Użycie 500 μM jasmonianu metylu wyraźnie hamowało syntezę triterpenowych saponin. Dłuższa elicytacja (7 dni) i 250 μM MeJa w podłożu sprzyjały wydajnej biosyntezie większości poszczególnych metabolitów, poza saponinami Rc i Rg1. W przypadku ginsenozydu Rb1 w tych warunkach odnotowano 5,6- krotny przyrost jego ilości w porównaniu do kontroli (**Publikacja H6**).

Dwukrotny wzrost sumarycznej zawartości ginsenozydów odnotowałam, gdy elicytorem był *trans*-anetol. Ze względu na brak jakichkolwiek danych, dotyczących poziomu *trans*-anetolu, który mógłby oddziaływać na metabolizm badanych kultur zastosowałam 12 stężeń tego związku w szerokim przedziale: 0,01; 0,1; 1; 2,5; 5 ; 10; 25; 50;100; 250; 500; 1000 μM . Początkowo zaplanowałam doświadczenia z czasem ekspozycji trwającym 3 i 7 dni, jak dla MeJA i YE. Jednakże pilotażowe badania wskazały wyraźne zahamowanie produkcji saponin po 7 dniach elicytacji (dane nie publikowane). Stąd też ostatecznie czas ekspozycji kultur korzeniowych na *trans*-anetol skróciłam do 1 i 3 dni. Poszerzyłam również ilość oznaczanych związków, co stało się możliwe dzięki pojawieniu się w ofercie handlowej kolejnych standardów saponin (Rb3, Rg2).

Uzyskane przeze mnie wyniki wskazały, że najwyższą sumaryczną zawartość saponin otrzymałam po zastosowaniu 1 μM *trans*-anetolu i 1 dniowej elicytacji. Warunki te były najkorzystniejsze również dla akumulacji pochodnych protopanaksadiolu: metabolitów Rc, Rb1, Rb2, Rb3 i Rd. Nieco inny profil zmian zawartości w zależności od stężenia *trans*-anetolu prezentowały pochodne protopanaksatriolu. Ginsenozyd Rg1 maksymalną zawartość osiągnął przy zastosowaniu 10 μM , a Re przy stężeniu 2,5 μM *trans*-anetolu w podłożu (**Publikacja H5**).

Ekstrakt drożdżowy (YE) jest przykładem typowego biotycznego elicytora, uzyskiwanego w wyniku autolizy komórek drożdżowych. Jest mieszaniną wielu substancji rozpuszczalnych w wodzie, np. aminokwasów, peptydów, węglowodanów,

minerałów i witamin głównie z grupy B. Do swych badań użyłam 7 stężeń ekstraktu drożdżowego w zakresie 50-2000 mgL⁻¹ (czas ekspozycji trwał 3 i 7 dni jak w przypadku MeJa). Najkorzystniejszymi warunkami dla pozyskania saponin okazało się zastosowanie 50 mgL⁻¹ ekstraktu drożdżowego i trzydniowa elicytacja. Poziom sumy oznaczanych saponin był 1,57 razy wyższy w porównaniu z próbami kontrolnymi (**Publikacja H4**). Powyższe warunki elicytacji powodowały znaczny wzrost poziomu metabolitów Rb1, Rb2, Rc i Rd (odpowiednio o 93%, 65% 33% i 45%). Przyrost zawartości ginsenozydów Rg1 i Re (odpowiednio o około 48% i 37%) odnotowano zarówno przy stężeniu 50 mgL⁻¹ YE jak i nieco wyższych stężeniach YE (np. 100, 250 mgL⁻¹) (**Publikacja H4**).

W doświadczeniach dotyczących elicytacji korzeni transformowanych *P. quinquefolium* zastosowałam także kwas abscysynowy podany w 4 stężeniach (0,1; 0,25; 0,5; 1 mgL⁻¹) (**Publikacja H7**). Opierając się na danych literaturowych (Łuczkiwicz i Kokotkiewicz 2005, Liang i wsp. 2013) wybrałam trzy czasy ekspozycji na działanie tego związku: 28 dni (ABA podane w dniu inokulacji), 3 dni oraz 24 godziny. Uzyskane wyniki pokazały, że krótszy czas elicytacji (1 lub 3 dni) nie wpłynął na całkowitą zawartość badanych metabolitów. Jednakże zastosowanie 28-dniowej elicytacji i wyższych stężeń kwasu abscysynowego (0,5 i 1 mgL⁻¹) spowodowało wzrost produkcji saponin o 14-16,25 %. Poziom pochodnych protopanaxadiolu (suma Rb1+Rb2+Rb3+Rc+Rd) była nieco mniejsza lub porównywalna z kontrolą dla krótszej elicytacji, a dłuższy czas ekspozycji na ABA spowodował obniżenie ilości tych saponin, szczególnie przy zastosowaniu 0.5 i 1 mgL⁻¹ ABA. Odmienne obserwacje odnotowałam dla pochodnych protopanaxatriolu. Ich ilość stopniowo zwiększała się wraz ze zwiększającym się stężeniem kwasu abscysynowego. Tendencja taka była zauważalna po 3 dniach elicytacji, a wyraźnie widoczna po 28 dniowej elicytacji. Najdłuższy czas elicytacji najbardziej sprzyjał akumulacji metabolitu Rg2, którego poziom wzrósł 17,38 razy w stosunku do kontroli, gdy zastosowałam 1 mgL⁻¹ ABA.

Elicytacja kultur bioreaktorowych korzeni transformowanych P. quinquefolium

Proces elicytacji przeprowadziłam również w kulturach korzeni włośnikowatych hodowanych w bioreaktorze. W tych doświadczeniach wykorzystałam warianty podłoży ze stężeniami jasmonianu metylu i ekstraktu drożdżowego, które okazały się najefektywniejsze dla produkcji saponin w korzeniach hodowanych w kolbach. Dla MeJa było to 250 μM . Podobnie jak w przypadku hodowli w małej skali (kolby) dłuższa ekspozycja na MeJa okazała się bardziej korzystna dla produkcji saponin. Ich zawartość była 1,87 razy wyższa od poziomu saponin oznaczonych w kolbach i porównywalna do zawartości w 3- i 4-letnich korzeniach gruntowych *P. quinquefolium* (Ko i wsp. 2009, Searels i wsp. 2013, Kołodziej i wsp. 2013). Najwyższy przyrost w stosunku do kontroli odnotowałam dla saponiny Rb1. W przypadku pochodnych protopanaxatriolu (metabolity Rg1 i Re) zauważyłam spadek ich zawartości po potraktowaniu korzeni jasmonianem metylu. Była to odmienna obserwacja w stosunku do rezultatów otrzymanych w kolbach. W hodowlach prowadzonych w mniejszej skali poziom tych związków był wyższy niż w kontroli niezależnie od czasu elicytacji (**Publikacja H6**).

Elicytacja ekstraktem drożdżowym w stężeniu 50 mgL^{-1} przez 3 i 7 dni pokazała, że trzydniowy czas ekspozycji korzeni na ten elicytor jest korzystniejszy. Wyniki te pokryły się z uzyskanymi w małej skali. Zawartość saponin w korzeniach z hodowli bioreaktorowych była 1,56 razy wyższa niż oznaczona w kolbach. Odnotowałam również wzrost zawartości wszystkich badanych związków, przy czym przyrost ilości metabolitów, będących pochodnymi protopanaxadiolu był większy (2,95-3,8 krotny w zależności od metabolitu) niż pochodnych protopanaxatriolu (1,4- i 1,5- krotny odpowiednio dla Rg1 i Re) (**Publikacja H4, Konferencja KH2**).

d) Najważniejsze osiągnięcia

Przeprowadzone przeze mnie badania doprowadziły do uzyskania kultur korzeni transformowanych zeńszenia północnoamerykańskiego *P. quinquefolium*. Kultury te akumulują ginsenozydy, na podobnym poziomie jak trzyletnie korzenie gruntowe tej rośliny, a czas ich hodowli w warunkach *in vitro* zajmuje jedynie 4 tygodnie. Zoptymalizowałam skład podłoża dla uzyskania najwyższego plonu biomasy oraz wydajnej biosyntezy ginsenozydów w badanych kulturach.

Po raz pierwszy wyizolowałam i scharakteryzowałam promotory genów, kodujących reduktazę 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A oraz syntazę skwalenu kluczowych enzymów, uczestniczących w biosyntezie ginsenozydów.

Udało mi się powiększyć skalę procesu hodowli korzeni włóśnikowatych *P. quinquefolium* i biosyntezy ginsenozydów, uzyskując wyższą produkcję żeńszeniowych saponin w 10 dm³ bioreaktorze rozpyłowym w porównaniu z kulturami prowadzonymi w kolbach.

Po raz pierwszy zastosowałam *trans*-anetol – produkt metabolizmu wtórnego roślin jako elicytor uzyskując dwukrotne zwiększenie produkcji ginsenozydów przy najkrótszym czasie ekspozycji kultury na działanie elicytora spośród wszystkich użytych przeze mnie elicytorów.

Perspektywy dalszych badań

W dalszych badaniach dotyczących korzeni transformowanych *P. quinquefolium* planuję szczegółowe określenie właściwości biologicznych otrzymanych kultur. Zamierzam ocenić potencjał antyoksydacyjny i poszerzyć charakterystykę aktywności przeciwdrobnoustrojowej szeregu ekstraktów pozyskanych z kultur korzeni włóśnikowatych żeńszenia północnoamerykańskiego, hodowanych w różnych warunkach, a także ocenić ich cyto- i genotoksyczność. Tego typu charakterystyka ekstraktów z korzeni, obok znajomości ich zdolności do biosyntezy cennych metabolitów, byłaby niezbędna dla ewentualnej komercjalizacji. Wydaje się to realne zważywszy na fakt, zainteresowania rezultatami moich badań belgijskiej firmy Green2chem oraz szwajcarskiej firmy biotechnologicznej DXC RT AG, które zajmują się przemysłowym uzyskiwaniem masy roślinnej oraz wartościowych metabolitów z wykorzystaniem kultur *in vitro*, w szczególności korzeni transformowanych, na rynek kosmetyczny, spożywczy i farmaceutyczny.

Bibliografia

1. Altamura MM (2004) *Agrobacterium rhizogenes rolB* and *rolD* genes: regulation and involvement in plant development. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 77(1), 89-101
2. Baque MA, Elgirban A, Lee EJ, Paek Y (2012) Sucrose related enhanced induction of anthraquinone, phenolics, flavonoids biosynthesis and activities of antioxidant enzymes in adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Acta Physiol Plant* 34, 405–415
3. Bensaddek L, Gillet F, Nava-Saucedo JE, Fliniaux MA (2001) The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. *J Biotech* 85, 35-40
4. Bensaddek L, Vilarreal ML, Fliniaux MA (2008) Induction and growth of hairy roots for the production of medicinal compounds. *Electronic Journal of Integrative Biosciences* 3(1), 2-9, Special Issue on Hairy roots (A. Lorence and F. Medinas-Bolivar, co-editors).
5. Cao H, Nuruzzaman M, Xiu H, Huang J, Wu K, Chen X, Li J, Wang L, Jeong JH, Park SJ, Yang F, Luo J, Luo Z (2015) Transcriptome analysis of methyl jasmonate-elicited *Panax ginseng* adventitious roots to discover putative ginsenoside biosynthesis and transport genes. *Int J Mol Sci* 16, 3035-3057; doi:10.3390/ijms16023035
6. Chandra S (2012) Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnol Lett* 34, 407-415
7. Chandran RP, Potty VP (2011) Different inducer molecules and strains of *Agrobacterium rhizogenes* on enhancing transformation frequency in host plants. *Biotechnology* 10, 203-208 doi:10.1186/1749-8546-5-20
8. Chen K, Otten L (2017) Natural *Agrobacterium* transformants: recent results and some theoretical considerations. *Front Plant Sci* 8, 1600
9. Cruse-Sanders JM, Hamrick JL (2004) Genetic diversity in harvested and protected populations of wild American ginseng, *Panax quinquefolius* L. (Araliaceae). *Am J Bot* 91, 540-548. doi: <https://doi.org/10.3732/ajb.91.4.540>
10. Diao WR, Hu QP, Zhang H, Xu JG (2014) Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food Control* 35, 109–116
11. Frankfater CR, Dowd MK, Triplett BA (2009) Effect of elicitors on the production of gossypol and methylated gossypol in cotton hairy roots. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 98, 341–349
12. Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50, 151–158
13. Georgiev M, Georgiev V, Weber J, Bley T, Ilieva M, Pavlov A. (2008) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformations: a powerful tool for the production of metabolites: a powerful tool for the production of metabolites. In: *Genetically Modified Plants*, (T. Wolf and

- J. Koch edits.); Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA, ISBN: 978-1-60456-696-3, 99-126
14. Goel KM, Mehrotra S, Kukreja AK (2011) Elicitor-induced cellular and molecular events are responsible for productivity enhancement in hairy root cultures: an insight study. *Biotechnol Appl Biochem* 165, 1342–1355
 15. He HJ, Liang P, Shi HP (2005) Effects of sucrose and light on the growth and production of secondary metabolites in *Pueraria phaseoloides* hairy roots. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 21(6),1003–1008 Abstract (article in Chinese)
 16. Hibbino K, Ushiyama K (1998) Commercial production of ginseng by plant cell culture technology. In: *Plant Cell Culture for the production of Food Ingredients Proceedings of ACS symposium*, (fu tj., sinGh G., Curtis Wr., Eds.) April 13–17, San Francisco, CA, Plenum, New York.
 17. Hikino H (1991) Traditional remedies and modern assessment the case of ginseng. In: *The medicinal plant industry*. (WijeseKera R. O. B., Ed.), Chapter 11, 149–162, CRC Press. Boca, Raton.
 18. Huang Y, Zhao J, Zhou L, Wang J, Gong Y, Chen X, Guo Z, Wang Q, Jiang W (2010) Antifungal activity of the essential oil of *Illicium verum* fruit and its main component trans-anethole. *Molecules* 15, 7558–7569
 19. Ionkova I (2009) Effect of methyl jasmonate on production of ariltetralin lignans in hairy root cultures of *Linum tauricum*. *Pharmacognosy Res* 1 (3), 102-105
 20. James JT, Tugizimana F, Steenkamp PA, Dubery IA (2013) Metabolomic analysis of methyl jasmonate-induced triterpenoid production in the medicinal herb *Centella asiatica* (L.) Urban. *Molecules* 18, 4267-4281. doi:10.3390/molecules18044267.
 21. Jia L, Zhao Y (2009) Current evaluation of the millennium phytomedicine--ginseng (I): etymology, pharmacognosy, phytochemistry, market and regulations. *Curr Med Chem* 16(19), 2475-84 doi: <https://doi.org/10.2174/092986709788682146>
 22. Kang OJ, Kim JS (2016) Comparison of ginsenoside contents in different parts of Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) *Prev Nutr Food Sci* 21(4), 389–392.
 23. Khan SA, Siddiqui MH, Osama K (2018) Bioreactors for hairy roots culture: a review. *Current Biotechnology* 7 (6) doi: 10.2174/2211550108666190114143824
 24. Kim HJ, Kim P, Shin CY (2013) A comprehensive review of the therapeutic and pharmacological effects of ginseng and ginsenosides in central nervous system. *J Ginseng Res* 37(1), 8–29
 25. Kim JH, Yi YS, Kim MY, Cho JY (2017) Role of ginsenosides, the main active components of *Panax ginseng*, in inflammatory responses and diseases. *J Ginseng Res* 41, (4), 435-443

26. Ko KS, Cho OS, Bae HM, Sohn UD, Im BO, Cho SH, Chung SH, Lee BY (2009) Change of ginsenoside composition of various American ginseng roots. *Korean Soc Appl Biol Chem* 52(2), 198-201 Short communication
27. Kochan E, Wysokińska H, Chmiel A, Grabias B (1999) Rosmarinic acid and other phenolic acids in hairy roots of *Hyssopus officinalis*. *Z Naturforsch C*, Bd 54 H. 1, 11-16
28. Kołodziej B (2013) Chemical composition and chosen bioactive properties of *Panax quinquefolius* extract. *Chemija* 24 (2), 151–159
29. Kwiatkowski P, Mnichowska-Polanowska M, Pruss A, Masiuk H, Dzięcioł M, Giedrys-Kalemba S, Sienkiewicz M (2017) The effect of fennel essentials oil in combination with antibiotics on *Staphylococcus aureus* strains isolated from carriers. *Burns* 43, 1544–1551.
30. Lee CH, Kim JH (2014) A review on the medicinal potentials of ginseng and ginsenosides on cardiovascular diseases. *J Ginseng Res* 38, 9(3), 161-166
31. Lenka SK, Nims NE, Vongpaseuth K, Boshar RA, Roberts SC, Walker EL (2015) Jasmonate responsive expression of paclitaxel biosynthesis genes in *Taxus cuspidata* cultured cells is negatively regulated by the bHLH transcription factors TcJAMYC1, TcJAMYC2, and TcJAMYC4. *Front Plant Sci* 16, 1–13 <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00115>. (article 115).
32. Leung KW, Wong AST (2010) Pharmacology of ginsenosides: a literature review. *Chin Med* 5: 20
33. Liang P, Shi HP, Qi Y (2004) Effect of sucrose concentration on the growth and production of secondary metabolites in *Pueraria phaseoloides* hairy roots. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao* 37 (5), 384–390 Abstract (article in Chinese)
34. Liang Z, Ma Y, Xu T, Cui B, Liu Y, Guo Z, Yang D (2013) Effects of abscisic acid, gibberellin, ethylene and their interactions on production of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* Bunge hairy roots. *Plos One* 8 (9) e72806
35. Liao L, He Y, Li L, Meng H, Dong Y, Yi F, Xiao P (2018) A preliminary review of studies on adaptogens: comparison of their bioactivity in TCM with that of ginseng-like herbs used worldwide *Chin Med* 13, 57.
36. Liu L, Hoang-Gia T, Wu H, Lee MR, Gu L, Wang C, Yun BS, Wang Q, Ye S, Sung CK (2011) Ginsenoside Rb1 improves spatial learning and memory by regulation of cell genesis in the hippocampal subregions of rats. *Brain Res* 1382, 147-154
37. Liu Q, Cui L, Guo Y, Ni X, Zhang Y, Kai G (2013) Optimization of nutritive factors in culture media for growth and tropane alkaloid production from *Anisodus acutangulus* hairy roots. *J Appl Pharm Sci* 3(01), 001-004
38. Luczkiewicz M, Kokotkiewicz A. (2005) *Genista tinctoria* hairy root cultures for selective production of isoliquiritigenin. *Z Naturforsch* 60c, 867-875

39. Mehrotra S, Mishra S, Srivastava V (2016) Bioreactor Technology for Hairy Roots Cultivation. Rozdział w: Bioprocessing of Plant In Vitro Systems, Pavlov, Atanas, Bley, Thomas (Eds.) 1-25 doi: [10.1007/978-3-319-32004-5_10-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-32004-5_10-1)
40. Mishra BN, Ranjan R (2008) Growth of hairy-root cultures in various bioreactors for the production of secondary metabolites. *Biotechnol Appl Biochem* 49, 1-10
41. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15, 473–497.
42. Murthy HN, Lee EJ, Paek KY (2014) Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 118 (1), 1–16
43. Nagella P, Thiruvengadam M, Jung SJ, Murthy HN, Chung IM (2013) Establishment of *Gymnema sylvestre* hairy root cultures for the production of gymnemic acid. *Acta Physiol Plant* 35, 3067–3073
44. Namdeo AG (2007) Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacogn Rev* 1, 69-79
45. Pavlov A, Berkov S, Weber J, Bley TH (2009) Hyoscyamine biosynthesis in *Datura stramonium* hairy root in vitro systems with different ploidy levels. *Appl Biochem Biotechnol* 157, 210–225 doi:10.1007/s12010-008-8264-6
46. Pengelly A, Bennett K (2011). Appalachian plant monographs: *Panax quinquefolius* L., American ginseng. Monography, Retrieved from <http://www.frostburg.edu/aces/appalachianplants/>
47. Petrova M, Zayova E, Dincheva I, Badjakov I, Vlahova M (2015) Influence of carbon sources on growth and GC-MS based metabolite profiling of *Arnica montana* L. hairy root *Turk J Biol* 39, 469-478
48. Pistelli L, Giovannini A, Ruffoni B, Bertoli A, Pistelli L. Hairy root cultures for secondary metabolites production. Chapter 13 w: *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors* edited by Maria Teresa Giardi, Giuseppina Rea and Bruno Berra. ©2010 Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.
49. Proctor JT, Shelp BJ (2013) Effect of boron nutrition on American ginseng in field and in nutrient cultures. *J Ginseng Res* 38(1), 73-77 doi: <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2013.11.002>
50. Putalun W, Pimmeuangkao S, De-Eknamkul W, Tanaka H, Shoyama Y (2006) Sennosides A and B production by hairy roots of *Senna alata* (L.) Roxb. *Z Naturforsch C* 61, 367–371
51. Qi LW, Wang CZ, Yuan CS (2011) Ginsenosides from American ginseng: chemical and pharmacological diversity. *Phytochemistry* 2011, 72(8), 689–699.
52. Radad K, Moldzio R, Rausch WD (2011) Ginsenosides and their CNS targets. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 17, 761–768c

53. Ramachandra Rao S, Ravishankar (2002) Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 20, 101-153
54. Ramirez-Estrada, K, Vidal-Limon H, Hidalgo D, Moyano E, Golenioswki M, Cusidó RM, Palazon J (2016) Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules* 21, 182
55. Rangslang RK, Liu Z, Lütken H, Favero BT. *Agrobacterium* spp. genes and ORFs: mechanisms and applications in plant science *Ciênc Agrotec* 42(5), 453-463 2018
56. Rodriguez Talou J, Giulietti AM (1995) *In vitro* thiophene production by transformed root cultures of *Tagetes laxa* (cabrera). *Biotechnol Lett* 17, 1337–1342
57. Searels M, Keen KD, Jonathan L. Horton JL, Clarke HD, Ward JR (2013) Comparing ginsenoside production in leaves and roots of wild American ginseng (*Panax quinquefolius*). *Am J Plant Sci* 4, 1252-1259 <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2013.46154>
58. Shin S, Lee JA, Son D, Park D, Jung E (2017) Anti-skin-aging activity of a standardized extract from *Panax ginseng* leaves *in vitro* and in human volunteer. *Cosmetics* 4, 18 doi:10.3390/cosmetics4020018
59. Smetanska I (2008) Production of secondary metabolites using plant cell cultures. *Adv Biochem* 111: 187–228 doi 10.1007/10_2008_103 *Engin/Biotechnol Special Issue on Hairy roots* (A. Lorence and F. Medinas-Bolivar, co-editors).
60. Talano MA, Oller ALW, González PS, Agostini E (2012) Hairy roots, their multiple applications and recent patents. *Recent Pat Biotechnol* 6 (2), 115-33
61. Torkamani MRD, Abbaspour N, Jafari M, Samadi A. (2014) Elicitation of valerenic acid in the hairy root cultures of *Valeriana officinalis* L (Valerianaceae). *Trop J Pharm Res* 13(6), 943-949 <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v13i6.17>
62. Vasconsuelo A, Boland R (2007) Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*, 172, 861–875
63. Wawrosch C, Schwaiger S, Stuppner H, Kopp B (2014) Lignan formation in hairy root cultures of Edelweiss (*Leontopodium nivale* ssp. *Alpinum* (Cass.) Greuter). *Fitoterapia* 97, 219–223
64. Wu SQ, Yu XK, Lian ML, Park SY, Piao XC (2014) Several factors affecting hypericin production of *Hypericum perforatum* during adventitious root culture in airlift bioreactors *Acta Physiol Plant* 36(4), 975–981
65. Xu H, Park JH, Kim YK, Park NI, Sook Young Lee SY, Park SU (2009) Optimization of growth and pyranocoumarins production in hairy root culture of *Angelica gigas* Nakai. *J Med Plants Res* 3(11), 978-981
66. Xu H, Yu X, Qu S, Chen Y, Wang Z, Sui D (2013) *In vivo* and *in vitro* cardioprotective effects of *Panax quinquefolium* 20(S)-protopanaxadiol saponins (PQDS), isolated from *Panax quinquefolium*. *Pharmazie* 68(4), 287-92

67. Yin S, Zhang Y, Gao W, Wang J, Liu H (2014) Effect of nitrogen source nad phosphate concentration on biomass and metabolites accumulation in adventitious root culture of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Acta Physiol Plant* 36, 915-921
68. Zhang W, Yang J, Zi J, Zhu J., Song L, Yu R. (2015) Effects of adding vindoline and MeJA on production of vincristine and vinblastine, and transcription of their biosynthetic genes in the cultured CMCs of *Catharanthus roseus*. *Nat Prod Commun* 10 (12), 2095–2096

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Moja praca naukowa związana jest przede wszystkim z biotechnologią roślin leczniczych. Początkowo koncentrowałam się nad uzyskaniem i prowadzeniem różnych rodzajów kultur *in vitro* kilku wybranych gatunków roślin leczniczych, w tym: *Hyssopus officinalis*, *Panax quinquefolium*, *Polemonium caeruleum*. Opracowałam warunki hodowli kultur kalusowych i zawieszinowych *Hyssopus officinalis* oraz *Panax quinquefolium*. Podjęłam udane próby mikrorozmnażania wielosiła błękitnego (*Polemonium caeruleum*) z pąków wierzchołkowych i żeńszenia pięciolistnego (*Panax quinquefolium*) na drodze embriogenezy pośredniej. Wśród prowadzonych przeze mnie roślinnych kultur *in vitro* były również hodowle korzeni włóśnikowatych, uzyskane na drodze genetycznej transformacji przy użyciu bakterii glebowych *Agrobacterium rhizogenes* (np. gatunki *Paulownia tomentosa*, *Hyssopus officinalis*). Były to hodowle w małej – laboratoryjnej, jak i w powiększonej skali – w bioreaktorze rozpyłowym. Zakres moich badań obejmował także analizę jakościową i ilościową metabolitów wytwarzanych w kulturach *in vitro* jak i roślinach macierzystych.

Opracowałam optymalne warunki dla wydajnej biosyntezy związków farmakologicznie czynnych, izolowanych z materiału roślinnego pozyskanego metodami biotechnologicznymi z kultur korzeni transformowanych *Hyssopus officinalis* oraz z kultury zawieszinowej *Panax quinquefolium*. Ponadto zajęłam się określaniem właściwości biologicznych ekstraktów, pozyskanych z żeńszenia pięciolistnego, pochodzącego z upraw polowych i hodowli *in vitro*. Skupiłam się na oszacowaniu potencjału antyoksydacyjnego i przeciwdrobnoustrojowego badanych wyciągów. Włączyłam się również w prace poświęcone antybakteryjnej aktywności wybranych olejków eterycznych i ich pojedynczych składników wobec izolatów klinicznych bakterii: *Actinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,

Enterobacter cloacae czy *Staphylococcus aureus*. Kolejnym etapem tych badań była analiza aktywności przeciwbakteryjnej połączeń olejków eterycznych z referencyjnymi związkami o działaniu przeciwdrobnoustrojowym.

Rozwinięcie warsztatu badawczego o eksperymenty molekularne i genetyczne, pozwoliło mi na poszerzenie moich prac w kierunku izolacji i charakterystyki promotorów genów, kodujących kluczowe enzymy dla biosyntezy związków biologicznie czynnych wybranych roślin leczniczych. Obok powyższych badań, w ramach współpracy z Wydziałem Wojskowo-Lekarskim i Wydziałem Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, zajęłam się problematyką dotyczącą zdrowego stylu życia oraz aktywności fizycznej sportowców i amatorów.

a) działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Moje zainteresowania biotechnologią roślin sięgają okresu studiów, już wtedy zajmowałam się roślinnymi hodowlami *in vitro*. W swojej pracy magisterskiej, którą wykonywałam pod kierunkiem profesora Henryka Urbanka w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego, badałam wpływ czynników biotycznych i abiotycznych na produkcję fenoli u truskawki prowadzonej metodą *in vitro*, a także oceniałam aktywność peroksydazy w surowcu roślinnym.

Znajomość tajników pracy z materiałem roślinnym, a także moje doświadczenie w prowadzeniu hodowli metodą *in vitro* pozwoliły mi na szybkie wdrożenie się w cykl prac, które rozpoczęłam wraz z zatrudnieniem na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi w Samodzielnej Pracowni Biosyntezy Środków Leczniczych (Zakład Biosyntezy Środków Leczniczych/obecnie Zakład Biotechnologii Farmaceutycznej) pod kierunkiem profesora Aleksandra Chmiela. W ramach współpracy z Zakładem Biologii i Botaniki Farmaceutycznej kierowanym przez profesor Halinę Wysokińską podjęłam badania nad hodowlami *in vitro* hyzopu lekarskiego (*Hyssopus officinalis*) z rodziny jasnotowatych (*Lamiaceae*) oraz nad izolacją i identyfikacją wybranych metabolitów wtórnych tej rośliny leczniczej. Opracowałam warunki hodowli niezróżnicowanych kultur kalusowych i zawiesinowych oraz kultur organów: pędów i korzeni transformowanych. Oprócz analizy przyrostu biomasy, w wymienionych kulturach oznaczyłam zawartość olejków eterycznych metodą chromatografii gazowej i kwasu

rozmarynowego przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej HPLC. Efekty prac nad tym gatunkiem zostały opublikowane w 3 artykułach, w tym jeden w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym oraz zaprezentowane na konferencjach polskich i międzynarodowych (3 polskie i 4 zagraniczne).

Publikacje:

1. **Ewa Kochan**, Halina Wysokińska, Aleksander Chmiel, Barbara Grabias. Rosmarinic acid and other phenolic acids in hairy roots of *Hyssopus officinalis*. Z. Naturforsch. C1999 Bd 54 H. 1, 11-16
2. Barbara Grabias, **Ewa Kochan**, Halina Wysokińska, Aleksander Chmiel. Porównanie produkcji kwasu rozmarynowego w niezróżnicowanych i zróżnicowanych kulturach *in vitro* *Hyssopus officinalis*. Zesz. Nauk. AR Krak. Scient. Pap. 1997: z. 50, 551-554, tab., bibliogr. 6 poz., VIII Ogólnopolska Konferencja Polskiej Sekcji IAPTC i Sekcji Kultur Tkanek Roślinnych Polskiego Towarzystwa Botanicznego Roślinne kultury *in vitro* w badaniach podstawowych i stosowanych Kraków, 25-27 sierpnia 1997
3. **Ewa Kochan**, Barbara Grabias, Halina Wysokińska, Aleksander Chmiel. Korzenie transformowane *Hyssopus officinalis* produkują fenolokwasy. Zesz. Nauk. AR Krak. Scient. Pap. 1997: z. 50, 545-549, tab., bibliogr. 8 poz., VIII Ogólnopolska Konferencja Polskiej Sekcji IAPTC i Sekcji Kultur Tkanek Roślinnych Polskiego Towarzystwa Botanicznego Roślinne kultury *in vitro* w badaniach podstawowych i stosowanych Kraków, 25-27 sierpnia 1997

Konferencje:

1. **Ewa Kochan**, Halina Wysokińska, Aleksander Chmiel. Hodowle *in vitro* *Hyssopus officinalis*. W: Aktualne kierunki badań w biochemii i biotechnologii: druga Konferencja Naukowa poświęcona Profesorowi Antoniemu Dmochowskiemu w setną rocznicę urodzin, Łódź, 12-14 grudnia 1996. Adres wydawniczy: Łódź, 1996, 164-165
2. Halina Wysokińska, Barbara Grabias, **Ewa Kochan**, Aleksander Chmiel, Lucjan Świątek. Production of rosmarinic acid by hairy roots of *Hyssopus officinalis*. W: Principles Regulating Biosynthesis and Storage of Secondary Products, Halle September 26-28, 1996: abstracts. Adres wydawniczy: Halle, 1996, 30-31
3. Halina Wysokińska, Danuta Kalemba, **Ewa Kochan**, Barbara Grabias, Aleksander Chmiel. Accumulation of volatile components in shoot and hairy root cultures of *Hyssopus officinalis* W: 44th Annual Congress on Medicinal Plant Research Prague, September 3-7, 1996: book of abstracts. Adres wydawniczy: Praha, 1996, 102, bibliogr. 5 poz.
4. **Ewa Kochan**, Barbara Grabias, Halina Wysokińska, Aleksander Chmiel. Phenolic acids in hairy root cultures of *Hyssopus officinalis*. W: 45th Annual Congress of the Society of Medical Plant Research September 7th-12th, 1997 Regensburg - Germany : program and abstracts / eds.: Gerhard Franz, Ulrike Vieweger. Adres wydawniczy: Regensburg, 1997, L02, bibliogr. 4 poz.
5. Barbara Grabias, **Ewa Kochan**, Halina Wysokińska, Aleksander Chmiel. Rosmarinic acid in hairy root cultures of *Hyssopus officinalis*. W: 46th Annual Congress Society for Medicinal Plant

Obok badań prowadzonych w skali laboratoryjnej włączyłam się również w prace poświęcone hodowlom kultur *in vitro* w powiększonej skali. Były to pionierskie doświadczenia z zastosowaniem bioreaktora rozpyłowego o pojemności 5 i 10 dm³. Proponowana konstrukcja bioreaktora (zaprojektowana i wykonana z udziałem prof. A. Chmiela, kierownika Samodzielnej Pracowni Biosyntezy Środków Leczniczych AM w Łodzi/Zakładu Biotechnologii Farmaceutycznej UM w Łodzi oraz firmy P.P.U. Vortex w Łodzi) pozwala na wzrost korzeni transformowanych (lub innych organów np. pędów), zawieszonych w przestrzeni bioreaktora w atmosferze powietrza, przy okresowym dostarczaniu składników odżywczych w postaci strumienia mgły, stąd również nazwa bioreaktor mgłowy lub rozpyłowy (mist bioreactor). Nasz Zakład, jako pierwszy w Polsce, rozpoczął badania z wykorzystaniem tego typu urządzenia. Zakres tych nowatorskich prac rozpoczął się od testowania pracy bioreaktora o pojemności 5 dm³. Na kanwie pierwszych doświadczeń w naszym zespole modyfikowaliśmy konstrukcję urządzenia, aby zoptymalizować warunki wzrostu dla rosnących w nim korzeni (możliwość zmiany położenia dyszy rozpylającej podłoże). Został także zaprojektowany nowy bioreaktor o pojemności zwiększonej do 10 dm³ i o nieco zmienionej budowie. Pierwsza faza doświadczeń wiązała się z dopracowaniem rozwiązań technicznych z jednoczesnymi próbami hodowli korzeni włośnikowatych w powiększonej skali. Mój udział w tych eksperymentach polegał głównie na przygotowaniu materiału do hodowli i dopracowywaniu metod sterylnej inokulacji materiału roślinnego do hodowli w bioreaktorze. Badania jakie prowadziłam wraz z zespołem macierzystego Zakładu oraz z dr inż. Beatą Pawłowską z Katedry Inżynierii Bioprocusowej Politechniki Łódzkiej nad kulturami uprawianymi w bioreaktorze obejmowały hodowle korzeni transformowanych *Paulownia tomentosa*, *Hyssopus officinalis* i *Arnica montana*. Rezultaty prac z moim udziałem, dotyczące produkcji biomasy korzeni w powiększonej skali zostały opublikowane w 2 artykułach i zaprezentowane na 1 konferencji.

Publikacje

1. Aleksander Chmiel, Beata Pawłowska, Ewa Kochan. Bioreaktor rozpyłowy do kultur korzeni transformowanych . Zesz. Nauk. PL, Inżynieria Chemiczna i Procesowa, 26, 265-270

2. Aleksander Chmiel, Beata Pawłowska, **Ewa Kochan**, Stanisław Ledakowicz. Kultury korzeni transformowanych *Paulownia tomentosa* Steudt. w kolbach wstrząsanych i bioreaktorze rozpyłowym. Ann. UMCS Sec. EEE 2001, 9 suppl., 287-293

Konferencje

1. Aleksander Chmiel, Beata Pawłowska, **Ewa Kochan**. Bioreaktor rozpyłowy do kultur korzeni transformowanych. VII Konferencja Naukowa Postępy Inżynierii Bioreaktorowej, I Krajowy Kongres Biotechnologii, Wrocław 20-25 września 1999
2. Beata Pawłowska, **Ewa Kochan**, Aleksander Chmiel. Kinetyka wzrostu korzeni transformowanych *Paulownia tomentosa* w kolbach wstrząsanych. W: XXXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego Toruń 10-14 września 2001: streszczenia. Adres wydawniczy: Toruń, 2001, 174-175.B

Odrębnym kierunkiem prowadzonej przeze mnie działalności naukowej były badania fitochemiczne roślin gruntowych żeńszenia pięciolistnego, które odbywały się w ramach współpracy z Katedrą Roślin Przemysłowych i Leczniczych Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. W tym czasie dopracowałam metodę wydajnej izolacji saponin triterpenowych. Początkowo do wyodrębniania metabolitów zastosowałam metodę farmakopealną DAB10 oraz z użyciem aparatu Soxleta. Uzyskane frakcje dodatkowo oczyszczałam mieszaniną n-butanolu, 0,1N kwasu solnego i chloroformu lub nanosiłam na kolumnienki Extrelut NT3. W uzyskanych ekstraktach oznaczałam żeńszeniowe saponiny zarówno jakościowo, metodą chromatografii cienkowarstwowej, jak i ilościowo stosując metodę spektrofotometryczną oraz metodą HPLC. Analizowanym przeze mnie materiałem roślinnym były korzenie, liście, łodygi i nasiona 1, 2, 3 i 4 letnich *P. quinquefolium*. Badane rośliny rosły na różnych typach gleb. Podczas uprawy poddawano je różnym zabiegom agrotechnicznym, na przykład stosowano nawozy różniące się zawartością fosforu, potasu, magnezu czy traktowano regulatorami wzrostu (kinetyna, daminozyd, IP-1, miesznina GA3 i kNNA) w wielu kombinacjach i dawkach. Wyniki analiz ilościowych prowadzonych z moim udziałem zostały upowszechnione w 2 publikacjach.

1. Barbara Kołodziej, **Ewa Kochan**, Jerzy Kaźmierczak, Aleksander Chmiel. The effect of growth regulators on quality parameters and ginsenosides accumulation in *Panax quinquefolium* L. Roots. Plant Growth Regul. 2006, 48, 1, 13-19
2. **Ewa Kochan**, Barbara Kołodziej, Grażyna Gadomska, Aleksander Chmiel. Content of ginsenosides in *Panax quinquefolium* from field cultivation. Herba Pol 2004, 50, 1, 20-27

Równoległe z omówionymi powyżej badaniami podjęłam prace nad wprowadzeniem żeńszenia pięciolistnego *Panax quinquefolium* (syn. *Panax quinquefolius*, *Aralia quiquefolia*) w poczet roślin hodowanych metodami *in vitro*. Analiza ówczesnej światowej literatury wskazywała, że otrzymywanie saponin triterpenowych metodą biotechnologiczną nie zostało jeszcze dokładnie dopracowane, stąd też ta tematyka stała się przedmiotem mojej pracy doktorskiej. W wyniku pierwszych doświadczeń uzyskałam niezróżnicowane kultury kalusowe, pochodzące z różnych eksplantatów oraz różniące się warunkami wzrostu. Otrzymałam również linie kalusów embriogennych i tworzących korzenie. W kolejnym etapie wyprowadziłam kilka linii zawiesinowych, spośród których jedna, charakteryzująca się wysokim przyrostem biomasy i najwyższą produktywnością saponin, została przeze mnie wybrana do dalszych badań, w tym do oznaczenia dynamiki przyrostu biomasy i poziomu produkcji - akumulacji metabolitów wtórnych w trakcie cyklu hodowlanego. Podjęłam udane próby uzyskania kultur pędowych na drodze embriogenezy pośredniej. We wszystkich badanych kulturach oznaczyłam produkcję saponin triterpenowych, głównych związków biologicznie czynnych żeńszenia. Wśród nich znalazły się pochodne protopanaxadiolu (metabolity Rb1, Rb2, Rc, Rd) i pochodne protopanaxatriolu (Rg1 i Re). Tłem do oceny zawartości uzyskanych metabolitów w wyżej wymienionych kulturach był poziom saponin w materiale, pochodzącym z gruntu. Wyniki powyższych badań zostały szczegółowo opisane w mojej rozprawie doktorskiej pod tytułem „Hodowla *in vitro* i badania fitochemiczne *Panax quinquefolium*”. Zostały one także zamieszczone w 6 publikacjach i przedstawione na 12 konferencjach naukowych.

Publikacje

1. Ewa Kochan, Grażyna Gadomska, Halina Wysokińska, Aleksander Chmiel. Zawartość ginsenozydów w kulturach komórkowych *Panax quiquefolium*. *Biotechnologia*: 2004, 1, 236-243
2. Ewa Kochan, Grażyna Szymańska, Izabela Grzegorzczak-Karolak. The extracts from *Panax quinquefolium* shoots derived from somatic embryos accumulate ginsenosides and have the antioxidant properties. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 2015, 51(6), 696-701 DOI: [10.1007/s11627-015-9730-9](https://doi.org/10.1007/s11627-015-9730-9).
3. Ewa Kochan, Aleksander Chmiel. Callus of American ginseng (*Panax quinquefolius*) as a source of ginsenosides - medicinal secondary metabolites. *Biol Lett* 2013, 50(1), 27-34 DOI: [10.2478/biolet-2013-0002](https://doi.org/10.2478/biolet-2013-0002).

4. Grażyna Szymańska, **Ewa Kochan**, Piotr Szymczyk. Field cultivation and *in vitro* cultures, root-forming callus cultures and adventitious root cultures, of *Panax quinquefolium* as a source of ginsenosides. *Z Naturforsch C* 2013, 68, 11-12, 482-488
5. **Ewa Kochan**, Aleksander Chmiel. Dynamics of ginsenoside biosynthesis in suspension culture of *Panax quinquefolium*. *Acta Physiol Plant* 2011, 33, 911- 915
6. **Ewa Kochan**, Barbara Kołodziej, Grażyna Gadomska, Aleksander Chmiel. Ginsenoside contents in *Panax quinquefolium* organs from field cultivation. *Z. Naturforsch. C* 2008, 63, 1/2, 91-95
7. **Ewa Kochan**, Aleksander Chmiel. Callus of American ginseng (*Panax quinquefolius*) as a source of ginsenosides - medicinal secondary metabolites. *Biol Lett* 2013, 50(1), 27-34 DOI: [10.2478/biolet-2013-0002](https://doi.org/10.2478/biolet-2013-0002) Adres url: <http://www.degruyter.com/view/j/biolet>

Konferencje

1. **Ewa Kochan**, Halina Wysokińska, Aleksander Chmiel. Hodowla *in vitro* *Panax quinquefolium*. W: XVII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego "Farmacja w perspektywie XXI w." Kraków, 10-13.09.1998 Adres wydawniczy: Kraków, 1998, 282
2. **Ewa Kochan**, Stanisław Berbec, Barbara Klimek, Halina Wysokińska, Aleksander Chmiel. Saponin contents in roots of *Panax quinquefolium* cultivated in Poland and in its *in vitro* cultures. W: Saponins in food feedstuffs and medicinal plants Puławy, Poland 6-8 September 1999, book of abstracts. Adres wydawniczy: Puławy, 1999, 25
3. **Ewa Kochan**, Halina Wysokińska, Beata Pawłowska, Aleksander Chmiel. Dynamika kultury zawieszinowej *Panax quinquefolium*. W: XVIII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego "Farmacja w XXI wieku" Poznań, 19-22 września 2001: streszczenia. T. 1. Adres wydawniczy: Poznań, 2001
4. **Ewa Kochan**, Halina Wysokińska, Grażyna Gadomska, Aleksander Chmiel. *In vitro* culture of *Panax quinquefolium* for biomass and ginsenosides production. W: International Symposium on Promotion of International cooperation in Eastern and Southern Europe in the field of medicinal biotechnology Lodz, Poland October 12-15, 2002 : book of abstracts. Adres wydawniczy: Lodz, 2002, 35
5. **Ewa Kochan**, Halina Wysokińska, Aleksander Chmiel. Morfogeneza w kulturze *in vitro* *Panax quinquefolium*. W: Sympozjum Sekcji Hodowli i Nasiennictwa PTNO "Hodowla i nasiennictwo roślin ogrodniczych" 5. Ogólnopolska Konferencja "Zastosowanie kultur *in vitro* w fizjologii roślin" Kraków, 21-2 maja 2002. Adres wydawniczy: Kraków, 2002, 79-80
6. **Ewa Kochan**, Grażyna Gadomska, Halina Wysokińska, Aleksander Chmiel. Zawartość ginsenozydów w kulturach komórkowych *Panax quinquefolium*. W: X Ogólnopolska Konferencja Kultur *In Vitro* i Biotechnologii Roślin 15-17 września 2003 r. Bydgoszcz Biotechnologia roślinna w biologii, farmacji i rolnictwie. Adres wydawniczy: Bydgoszcz, 2003, 98
7. **Ewa Kochan**, Grażyna Gadomska, Halina Wysokińska, Aleksander Chmiel. Ginsenozydy w kulturach komórkowych *Panax quinquefolium*. W: II Krajowy Kongres Biotechnologii Łódź, 23-27 czerwca 2003 r. : materiały konferencyjne. Adres wydawniczy: Łódź, 2003, 140
8. Aleksander Chmiel, Beata Pawłowska, **Ewa Kochan**. Dynamika wzrostu biomasy i biosyntezy metabolitów w wybranych kulturach roślin leczniczych. W: XIX Naukowy Zjazd Polskiego

Towarzystwa Farmaceutycznego Farmacja - tradycja i nowoczesność Wrocław 22-24 września 2004 : streszczenia. T. 1. Adres wydawniczy: Wrocław, 2004, 89

9. Ewa Kochan, Aleksander Chmiel. Biosynteza ginsenozydów w kulturach *in vitro* *Panax quinquefolium*. W: XIX Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego Farmacja - tradycja i nowoczesność Wrocław 22-24 września 2004 : streszczenia. T. 1. Adres wydawniczy: Wrocław, 2004, 88-89
10. Ewa Kochan, Sylwia Caban, Grażyna Gadomska, Aleksander Chmiel. Biosynteza ginsenozydów w kulturach *in vitro* *Panax quinquefolium*. W: XI Ogólnopolska Konferencja Kultur *in vitro* i Biotechnologii Roślin Kultury *in vitro* podstawą biotechnologii roślin 6-9 września 2006 roku Międzyzdroje. Adres wydawniczy: Międzyzdroje, 2006, 66
11. Ewa Kochan, Grażyna Gadomska, Sylwia Caban, Aleksander Chmiel. Analiza zawartości ginsenozydów Rg1 i Rb1 w żeń-szeniu *Panax quinquefolium*. W: VII Konferencja Chromatograficzna Chromatografia i techniki pokrewne a zdrowie człowieka Białystok 10-13 IX 2006. Adres wydawniczy: Białystok, 2006, 128
12. Ewa Kochan, Aleksander Chmiel. Kultury *in vitro* *Panax quinquefolium* do biosyntezy ginsenozydów. W: Bio-Forum VII Środkowoeuropejskie Targi Biotechnologii i Biobiznesu 15-16 maja 2008 Łódź. Poland. Adres wydawniczy: Łódź, 2008, 184

b) działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Tematyka naukowa, którą zajmowałam się po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych dotyczyła kilku kierunków.

Nadal prowadziłam badania z wykorzystaniem roślinnych kultur *in vitro*, zarówno w małej, jak i w powiększonej skali. Wyprowadziłam kultury korzeni zwykłych *Panax quinquefolium*, a także zapoczątkowałam nową linię zawieszinową. Ze względu na obiecujące rezultaty przyrostów biomasy kultury komórkowej w kolbach wstrząsanych oznaczyłam w nich zawartość triterpenowych saponin, a następnie podjęłam próby zwiększenia wydajności ich produkcji stosując zabiegi elicytacji. Dla zwiększenia skali procesu uzyskania żeńszeniowej biomasy, kultury te hodowałam również w bioreaktorze mieszadłowym.

Jednocześnie kontynuowałam prace z wykorzystaniem bioreaktora rozpyłowego prowadząc hodowle korzeni transformowanych: *Agastache rugosa*, *Rehmannia elata*, *R. glutinosa* oraz pędów zwykłych *Dracocephalum forrestii* i pędów transformowanych: *Rehmannia elata* i *R. glutinosa*, będących bogatym źródłem związków fenolowych. Część rezultatów powyższych badań została już

upowszechniona w poniższych artykułach i zaprezentowana na konferencjach naukowych. Kolejne wyniki prac są w trakcie przygotowywania do publikacji.

Publikacje

1. Grażyna Szymańska, Ewa Kochan, Piotr Szymczyk. Field cultivation and *in vitro* cultures, root-forming callus cultures and adventitious root cultures, of *Panax quinquefolium* as a source of ginsenosides. Z Naturforsch C, 2013, 68, 11-12, 482-488 DOI: [10.1515/znc-2013-11-1207](https://doi.org/10.1515/znc-2013-11-1207).
2. Ewa Kochan, Sylwia Caban, Grażyna Szymańska, Piotr Szymczyk, Anna Lipert, Paweł Kwiatkowski, Monika Sienkiewicz. Ginsenoside content in suspension cultures of *Panax quinquefolium* L. cultivated in shake flasks and stirred-tank bioreactor Ann UMCS Sect C 2017, 72, 1, 15-26 DOI: [10.17951/c.2016.72.1.15-26](https://doi.org/10.17951/c.2016.72.1.15-26).
3. Ewa Kochan, Sylwia Caban, Grażyna Szymańska, Piotr Szymczyk, Anna Lipert, Paweł Kwiatkowski, Monika Sienkiewicz. Influence of methyl jasmonate on ginsenoside biosynthesis in suspension cultures of *Panax quinquefolium* L. Ann UMCS Sect C Biologia 2017, LXXII, 1, 27-35 DOI: [10.17951/c.2016.72.1.27-35](https://doi.org/10.17951/c.2016.72.1.27-35)
4. Izabela Weremczuk-Jeżyna, Ewa Kochan, Łukasz Kuźma, Paweł Lisiecki, Izabela Grzegorzczuk-Karolak. The antioxidant and antimicrobial properties of phenol-rich extracts of *Dracocephalum forrestii* W. W. Smith shoot cultures grown in the nutrient sprinkle bioreactor. Phytochemistry Letters 2019, 30, 254-260

Konferencja

1. Izabela Weremczuk-Jeżyna, Ewa Kochan, Piotr Szymczyk, Łukasz Kuźma, Izabela Grzegorzczuk-Karolak. Rosmarinic acid and salvianolic acid B in shoot of *Dracocephalum forrestii* W. W. Smith cultured in the nutrient sprinkle bioreactor. W: 11th International Symposium on Chromatography of Natural Products Lublin (Poland) June 4th-7th, 2018. Book of abstracts Adres wydawniczy: Lublin : Medical University of Lublin, 2018, 188 P-124. Konferencja: Medical University of Lublin, Polish Academy of Sciences, Austrian Drug Screening Institute, Department of Pharmacognosy with Medicinal Plant Unit, Lublin, 2018.06.04

Do dalszych badań wykorzystałam również materiał roślinny uzyskany w doświadczeniach opisanych w doktoracie. Moją uwagę skupiłam na badaniach fitochemicznych oraz określeniu potencjału biologicznego badanych ekstraktów. Z racji waloru nowości dotyczyło to kultur pędowych, pozyskanych w drodze embriogenezy pośredniej. W wyciągach z tych kultur oraz kultur embrioidów oznaczyłam całkowitą zawartość związków fenolowych oraz ich właściwości antyoksydacyjne. Badania te zaprezentowałam w poniższym artykule.

1. Ewa Kochan, Grażyna Szymańska, Izabela Grzegorzczak-Karolak. The extracts from *Panax quinquefolium* shoots derived from somatic embryos accumulate ginsenosides and have the antioxidant properties. In Vitro Cell Dev Biol Plant 2015, 51(6), 696-701 doi: [10.1007/s11627-015-9730-9](https://doi.org/10.1007/s11627-015-9730-9).

Nowym kierunkiem moich zainteresowań, rozwijanym po obronie pracy doktorskiej, było badanie przeciwdrobnoustrojowego działania związków naturalnych pochodzenia roślinnego. Poszukiwanie tego typu fitoskładników wydaje się być koniecznością w dobie szerzącego się problemu oporności drobnoustrojów na antybiotyki. Z jednej strony metabolity te powinny być skuteczne i bezpieczne dla pacjenta, ale jednocześnie nie powinny indukować oporności wśród drobnoustrojów. Jak wskazują doniesienia literaturowe wyciągi z olejkami eterycznymi posiadają aktywność bakteriostatyczną i bakteriobójczą, a także immunostymulującą oraz przeciwzapalną i mogłyby stać się alternatywą lub dodatkiem dla terapii referencyjnymi lekami przeciwdrobnoustrojowymi. Stąd też włączyłam się w doświadczenia, które pozwoliły ocenić właściwości przeciwbakteryjne, a także zwiększające aktywność referencyjnych leków przeciwdrobnoustrojowych szeregu wybranych olejków eterycznych (bazyliowego, cynamonowego, geraniowego, goździkowego, lawendowego, pelargoniowego, rozmarynowego, szalwiowego, tymiankowego) lub ich składników (*trans*-anetol) wobec wielolekoopornych szczepów klinicznych bakterii należących do gatunków: *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*. Do realizacji powyższych badań musiałam zaznajomić się z metodami pozwalającymi ocenić aktywność przeciwdrobnoustrojową roślinnych metabolitów. Do wrażliwości szczepów wykorzystałam metodę dyfuzyjno-krażkową według EUCAST oraz referencyjną metodę mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym i metodę rozcieńczeń w podłożu agarowym. Dla określenia rodzaju oddziaływania użytego olejku i referencyjnego antybiotyku zastosowałam metodę dyfuzyjno-krażkową oraz metodę szachownicy. Ocenie efektywności przeciwbakteryjnej poddałam również wyciągi korzeni transformowanych *P. quinquefolium*, a także ekstrakty, pochodzące z organów rośliny gruntowej. Efekty powyższych prac zostały opublikowane w 8 artykułach, w tym w czterech z Listy Filadelfijskiej i zaprezentowane w 3 doniesieniach konferencyjnych.

Publikacje:

1. **Ewa Kochan**, Małgorzata Wasieła, Monika Sienkiewicz. The production of ginsenosides in hairy root cultures of American Ginseng, *Panax quinquefolium* L. and their antimicrobial activity. In Vitro Cell Dev Biol Plant 2013., 49, 1, 24-29 DOI: [10.1007/s11627-012-9469-5](https://doi.org/10.1007/s11627-012-9469-5).
2. Monika Sienkiewicz, Anna Głowacka, Edward Kowalczyk, **Ewa Kochan**. The activity of different extracts from *Panax quinquefolium* L. cultures against pathogenic *Staphylococcus aureus* with respect to ginsenoside content. Arch Biol Sci. 2015, 67, 4, DOI: [10.2298/ABS150330104S](https://doi.org/10.2298/ABS150330104S).
3. Michał Dąbrowski, Monika Sienkiewicz, Hanna Zielińska-Bliźniewska, Marta Dąbrowska, Małgorzata Sereżyńska, **Ewa Kochan**. Antibiotic resistance among *Escherichia coli* urinary isolates and their susceptibility to clove essential oil. Ann UMCS Sect C 2016, 71(2), 42-48, DOI: [10.17951/c.2016.71.2.41](https://doi.org/10.17951/c.2016.71.2.41).
4. Monika Sienkiewicz, Monika Łysakowska, Edward Kowalczyk, Grażyna Szymańska, **Ewa Kochan**, Jolanta Krukowska, Jurek Olszewski, Hanna Zielińska-Bliźniewska. The ability of selected plant essential oils to enhance the action of recommended antibiotics against pathogenic wound bacteria. Burns 2017, 43(2), 310-317, DOI: [10.1016/j.burns.2016.08.032](https://doi.org/10.1016/j.burns.2016.08.032).
5. Paweł Kwiatkowski, Agata Pruss, Bartłomiej Grygorcewicz, Bartosz Wojciuk, Barbara Dołęgowska, Stefania Giedrys-Kalemba, **Ewa Kochan**, Monika Sienkiewicz. Preliminary study on the antibacterial activity of essential oils alone and in combination with gentamicin against Extended-spectrum Beta-Lactamase-Producing and New Delhi Metallo-Beta-Lactamase-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. Microb Drug Resist 2018, 24(9), 1368-1375 DOI: [10.1089/mdr.2018.0051](https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0051).
6. Monika Sienkiewicz, Hanna Zielińska-Bliźniewska, Jurek Olszewski, Paweł Kwiatkowski, **Ewa Kochan**. Aktywność olejków eterycznych przeciwko lekoopornym patogenom odpowiedzialnym za zakażenia dermatologiczne. W: Mikrobiologia medyczna i środowiskowa - wybrane zagadnienia Praca zbiorowa pod redakcją Moniki Maciąg i Kamila Maciąga, Lublin: Wydawnictwo Naukowe Tygiel, 2017
7. **Ewa Kochan**, Grażyna Szymańska, Paweł Kwiatkowski, Monika Sienkiewicz. *Panax quinquefolium* hairy root extracts and their effect in connection with antibiotics against pathogenic bacteria – preliminary study. Annales (w druku)
8. Paweł Kwiatkowski, Bartłomiej Grygorcewicz, Agata Pruss, Bartosz Wojciuk, Stefania Giedrys-Kalemba, Barbara Dołęgowska, Hanna Zielińska-Bliźniewska, Jurek Olszewski, Monika Sienkiewicz, **Ewa Kochan**. Prevention of the *Staphylococcus aureus* biofilm formation by synergistic effect of fennel essential oil and hydrogen peroxide. Advances in Dermatology and Allergology (w druku)

Konferencje

1. Monika Sienkiewicz, **Ewa Kochan**, Małgorzata Wasieła. „Aktywność przeciwdrobnoustrojowa ginsenozydów obecnych w korzeniach transformowanych American Ginseng, *Panax quinquefolium*”. - XXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów „Drobnoustroje bez granic”, Lublin, 5-8 września 2012
2. Monika Sienkiewicz, Hanna Zielińska-Bliźniewska, Jurek Olszewski, Paweł Kwiatkowski, Anna Wąjs-Bonikowska, Radosław Bonikowski, Grażyna Szymańska, **Ewa Kochan**. Badania

aktywności przeciwbakteryjnej połączeń olejków eterycznych z referencyjnymi związkami przeciwbakteryjnymi. VII Sympozjum „Naturalne i syntetyczne produkty zapachowe i kosmetyczne” 2-4 lipca, Łódź 2018. Instytut Podstaw Chemii Żywności Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechnika Łódzka

3. Paweł Kwiatkowski, Bartłomiej Grygorcewicz, Agata Pruss, Maciej Kaczmarek, Bartosz Wojciuk, Stefania Giedrys-Kalemba, Barbara Dołęgowska, **Ewa Kochan**, Monika Sienkiewicz. Wpływ *trans*- anetolu na aktywność przeciwbakteryjną mupirocyny wobec szczepów *Staphylococcus aureus*. VII Sympozjum „Naturalne i syntetyczne produkty zapachowe i kosmetyczne” 2-4 lipca, Łódź 2018. Instytut Podstaw Chemii Żywności Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechnika Łódzka
4. Paweł Kwiatkowski, Bartłomiej Grygorcewicz, Agata Pruss, Bartosz Wojciuk, Stefania Giedrys-Kalemba, Barbara Dołęgowska, **Ewa Kochan**, Monika Sienkiewicz. Wpływ olejku z kopru włoskiego i wody utlenionej na aktywność antybiofilmową *Staphylococcus aureus*. VII Sympozjum „Naturalne i syntetyczne produkty zapachowe i kosmetyczne” 2-4 lipca, Łódź 2018. Instytut Podstaw Chemii Żywności Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechnika Łódzka

Wpisując się w nowe nurty badań prowadzonych w wielu polskich i zagranicznych jednostkach naukowych zdecydowałam się na podjęcie ciekawej dla mnie tematyki badań molekularno-genetycznych. Do swojego warsztatu naukowego włączyłam metodę izolacji DNA, RNA, technikę łańcuchowej reakcji polimerazy - PCR oraz metodę klonowania genów przy pomocy wektorów ekspresyjnych w kompetentnych komórkach *Escherichia coli*. Nabyłam umiejętność korzystania z platform bioinformatycznych (np. PlantPAN, PlantPAN 2.0, PlantCARE, TSSP software oraz RegSite Plant DB), dostarczających informacji do wykrywania czynników transkrypcji (TFs) i miejsc ich wiązania (TFBS), oraz innych ważnych elementów regulatorowych (wyspy CpG i powtórzenia tandemowe) w promotorze lub zestawie promotorów w roślinach. Podjęcie powyższych badań wiązało się również z zdobyciem biegłości w posługiwaniu się programami czy aplikacjami komputerowymi, wykorzystywanymi w badaniach molekularnych (t.j. Serial Cloner, Oligocalc, Sequence Scanner Software 2, Snap Gene Viewer 4.2.1 i nowsze wersje). Opanowanie powyższych technik i obeznanie się z bioinformatycznymi zasobami jest niezbędne do wyodrębnienia, zsekwencjonowania i charakterystyki promotorów genów kodujących kluczowe enzymy w szlakach biosyntezy biologicznie czynnych metabolitów. Rezultatem moich badań było uzyskanie promotorów reduktazy 3-hydroksy-3-

metylglutarylo-koenzymu A oraz syntazy 2,4-cyklodifosforano-2-C-metylo-D-erytritolu, biorących udział w biosyntezie tanszidonów w *Salvia miltiorrhiza*. Wynikiem moich prac molekularno-genetycznych była również izolacja promotorów 4 genów kodujących enzymy: syntazę stryktozydiny, β -glukozydazę stryktozydiny, 4-hydroksylazę desacetoksywindoliny, 16-hydroksylazę tabersoniny - które uczestniczą w syntezie alkaloidów idolowych barwinka różowego *Catharanthus roseus*. Poznanie sekwencji promotorów pozwala w następnej kolejności na przeanalizowanie ich pod kątem występowania wysp CpG, powtórzeń tandemowych czy obecności *cis* i *trans* czynników wpływających na regulację ekspresji promotora, a przez to regulację ekspresji odpowiedniego genu. Tego typu analizy wykonałam metodą *in silico*, korzystając z baz danych zdeponowanych na platformach bioinformatycznych PlantPAN, PlantPAN 2.0, PlantCARE, TSSP software oraz RegSite Plant DB. Doniosłość tych badań ma związek z możliwością indukowania lub inhibowania aktywności enzymów, biorących udział w szlakach metabolicznych, a tym samym regulacji biosyntezy metabolitów wtórnych na poziomie genetycznym. Efektem przeprowadzonych przeze mnie prac są zgłoszenia do GenBanku (baza NCBI) sekwencji promotorów kilku genów, kodujących wybrane enzymy szlaków biosyntezy tanszidonów i alkaloidów idolowych metabolitów roślinnych, występujących w szalwii czerwonokorzeniowej i barwinka różowym. Część wyników zaprezentowałam również na konferencji w Warszawie.

Zgłoszenie do bazy NCBI sekwencji DNA promotorów:

1. GenBank KT921337.1." *Salvia miltiorrhiza* HMGR4 (HMGR4) gene, promoter region and partial cds." Szymczyk Piotr , Grabkowska Renata , **Kochan Ewa**, Szymanska Grażyna
2. GenBank KT935425 "*Salvia miltiorrhiza* 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase gene. promoter region and partial cds." Szymczyk Piotr , Grabkowska Renata , **Kochan Ewa**, Szymanska Grażyna
3. GenBank: KU214864.1" *Catharanthus roseus* strictosidine synthase gene, promoter region and partial cds" Szymanska Grażyna, **Kochan Ewa**, Szymczyk Piotr
4. GenBank: KU214863.1 *Catharanthus roseus* tabersonine 16-hydroxylase gene, promoter region and partial cds Szymanska Grażyna, **Kochan Ewa**, Szymczyk Piotr
5. GenBank: KU214862.1 *Catharanthus roseus* strictosidine beta-glucosidase gene, promoter region and partial cds Szymanska Grażyna, **Kochan Ewa**, Szymczyk Piotr
6. GenBank: KX534080.1 *Catharanthus roseus* desacetoxyvindoline 4-hydroxylase-like (CRSD4H) gene, partial sequence Szymanska Grażyna. **Kochan Ewa**, Szymczyk Piotr

Konferencje

Małgorzata Majewska, **Ewa Kochan**, Grażyna Szymańska, Halina Wysokińska, Piotr Szymczyk. Struktura i klonowanie promotora genu 4 reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A z szałwii czerwonorzeniowej - *Salvia miltiorrhiza* (SmHMGR4) W: I Biotechnologiczna Konferencja Naukowa "Biotechnologia roślin-perspektywy i wyzwania", poświęcona pamięci profesor Mirosławy Goleniewskiej-Furmanowej. Warszawa 9 czerwca 2017r. : materiały konferencyjne. Adres wydawniczy: Warszawa : Wydawnictwo Uniwersytetu Medycznego w Warszawie, 2017, poz. P16 Konferencja: Zakład Biologii Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin Lecznicych WF WUM. Komitet Terapii i Nauk o Leku PAN. Komisja Leku Naturalnego i Biotechnologii PAN., Warszawa, 09.06.2017r https://konfbiotechnologia.wum.edu.pl/sites/konfbiotechnologia.wum.edu.pl/files/materiały_konferencyjne.pdf

Od 2014 roku zaangażowałam się w prace badawcze prowadzone na Wydziale Wojskowo-Lekarskim oraz na Wydziale Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Stało się to możliwe dzięki nawiązaniu nowych kontaktów i realizacji wspólnych projektów w ramach studiów podyplomowych. Udałe przedsięwzięcia z tego okresu zaowocowały propozycją podjęcia dalszych zespołowych działań. Włączyłam się w prowadzenie badań ankietowych, dotyczących: aktywności fizycznej sportowców, występowania urazów związanych z uprawianą dyscypliną oraz rehabilitacji w procesie dochodzenia do zdrowia i formy sportowej. Równoległym nurtem prac badawczych, podjętych w wyniku powyższego współdziałania, była analiza znaczenia suplementów diety w diecie sportowców oraz amatorów, podejmujących aktywność fizyczną. Efektem przeprowadzonych badań sondażowych są 2 doniesienia z konferencji American Congress of Rehabilitation Medicine, która odbyła się w Dallas. Zebrane dane pozwoliły na przygotowanie 3 publikacji, które obecnie są w trakcie procedowania w redakcjach.

1. Anna Lipert, Małgorzata Stępień, **Ewa Kochan**. Characteristic of Injuries and Rehabilitation to Professional Rugby Players. Arch Phys Med Rehabil 2015, 96 (10), e19-e20 Konferencja: American Congress of Rehabilitation Medicine, Dallas, 2015.10.25 ISSN: 0003-9993 17/32
2. Anna Lipert, Ewelina Mroczkowska, **Ewa Kochan**. Injuries and rehabilitation to professional players of team sports. Arch Phys Med Rehabil. 2015, 96 (10), e. 18 Konferencja: American Congress of Rehabilitation Medicine, Dallas, 2015.10.25 ISSN: 0003-9993

6. Współpraca naukowa

1. współpraca z dr inż. Beatą Pawłowską z Katedry Inżynierii Bioprosesowej Politechniki Łódzkiej w zakresie hodowli bioreaktorowych korzeni transformowanych różnych gatunków leczniczych (*Paulownia tomentosa*, *Hyssopus officinalis*, *Arnica montana*)
2. współpraca z prof. dr hab. Stanisławem Berbeciem i prof. dr hab. Barbarą Kołodziej z Katedry Roślin Przemysłowych i Leczniczych Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie w zakresie uzyskania materiału do badań i dotycząca oznaczeń zawartości saponin triterpenowych w korzeniach gruntowych żeńszenia północnoamerykańskiego
3. współpraca z dr hab. inż. Aleksandrą Królicką z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed w zakresie potwierdzenia transformacji korzeni żeńszenia *P. quinquefolium*
4. współpraca z dr hab. Anną Wajs-Bonikowską oraz z dr hab. Radosławem Bonikowskim z Instytutu Podstaw Chemii Żywności Politechniki Łódzkiej dotycząca możliwości zastosowania związków naturalnych w elicytacji kultur korzeni transformowanych oraz składu olejku eterycznego produkowanego w korzeniach transformowanych żeńszenia pięciolistnego
5. współpraca z dr hab. Adrianą Nowak z Zakładu Mikrobiologii Technicznej Politechniki Łódzkiej, w zakresie badań cyto- i genotoksyczności wyciągów z korzeni transformowanych *P. quinquefolium* oraz ich wpływu na apoptozę wybranych linii komórkowych
6. współpraca z mgr inż. Pawłem Kwiatkowskim z Katedry Mikrobiologii, Immunologii i Medycyny Laboratoryjnej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, w zakresie prowadzenia badań mikrobiologicznych, dotyczących aktywności metabolitów roślinnych
7. współpraca z prof. dr hab. Haliną Wysokińską z Zakładu Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w zakresie wielokierunkowych badań kultur hyzopu lekarskiego (*Hyssopus officinalis*), w tym kultur kalusowych, zawieszinowych, pędów i korzeni transformowanych, z dr hab. Izabelą Grzegorz-Karolak z Zakładu Botaniki Farmaceutycznej

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w zakresie analizy właściwości przeciwutleniających ekstraktów z żeńszenia oraz z dr hab. Łukaszem Kuźmą z Zakładu Biologii i Botaniki Farmaceutycznej w zakresie udostępnienia aparatu HPLC do wykonania oznaczeń metabolitów wtórnych

8. współpraca z prof. dr hab. Barbarą Klimek, Zakład Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi dotycząca sposobów izolacji saponin triterpenowych
9. współpraca z prof. dr hab. Ewą Balcerczak z Zakładu Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w zakresie badań ekspresji genów
10. współpraca z dr Anną Lipert z Zakładu Medycyny Sportowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w zakresie badań aktywności fizycznej, procesów rehabilitacji i opisu statystycznego uzyskanych wyników
11. współpraca z dr hab. Moniką Sienkiewicz z Zakładu Alergologii i Rehabilitacji Oddechowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w zakresie badań właściwości przeciwdrobnoustrojowych roślinnych metabolitów wtórnych oraz olejków eterycznych i ich składników
12. współpraca z prof. dr hab. Edwardem Kowalczykiem, dr hab. Anną Wiktorowską-Owczarek, oraz dr Martą Józwiak-Bębenistą z Zakładu Farmakologii i Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w zakresie badań cytotoksyczności wybranych metabolitów wtórnych roślin leczniczych
13. współpraca z mgr Dominiką Kulczycką-Wojdala z Centralnego Laboratorium Naukowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (CoreLab) w zakresie sekwencjonowania wyizolowanych promotorów.

7. Udział w projektach badawczych

1. Grant MNiSW/KBN NR 3P05F01523 „Badania kultur *in vitro* *Panax quinquefolium*” - wykonawca (2002-2004)
2. Badania fitochemiczne żeńszenia *Panax quinquefolium* z upraw polowych 502-13-754 – wykonawca
3. Biosynteza ginsenozydów w kulturach korzeni transformowanych *Panax quinquefolium* 502-13-771 kierownik (2008-2010)

4. Projekty badawcze finansowane z funduszy statutowych Zakładu Biotechnologii Farmaceutycznej UM w Łodzi (503/3-012-02/503-31, 503/3-012-02/503-31-1/2/3/4 (2014-2018) – wykonawca

8. Nagrody i stypendia za działalność naukową

1. 2013r - Wizyta studyjna w Szwecji za wyróżniające się wyniki osiągnięte na studiach podyplomowych „Komercjalizacja nauki i technologii”.
2. Za osiągnięcia w 2015r - nagroda naukowa zespołowa III stopnia przyznawana przez JM Rektora UM w Łodzi za współautorstwo cyklu publikacji „Aktywność przeciwdrobnoustrojowa metabolitów roślinnych”.
3. Za osiągnięcia w 2016r – nagroda naukowa zespołowa III stopnia przyznawana przez JM Rektora UM w Łodzi za współautorstwo cyklu publikacji „Wpływ składników podłoża na zawartość ginsenydów w kulturach korzeni transformowanych *Panax quinquefolium*”.
4. Za osiągnięcia w 2017r - nagroda naukowa zespołowa III stopnia przyznawana przez JM Rektora UM w Łodzi za publikację: “Yeast extract stimulates ginsenoside production in hairy root cultures of American ginseng cultivated in shake flasks and nutrient sprinkle bioreactors”.
5. Za osiągnięcia w 2017r - nagroda naukowa zespołowa III stopnia przyznawana przez JM Rektora UM w Łodzi za współautorstwo cyklu publikacji „Wpływ olejków eterycznych na zwiększenie aktywności antybiotyków”.

9. Kursy i szkolenia

- Kurs ”Interherba 2006 „Wino w medycynie – tradycja i współczesność” Akademia Medyczna im. Karola Marcinkiewicza w Poznaniu w roku 2006
- Intensywny kurs języka angielskiego dla kadry naukowej organizowany przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi, rok 2010

- Podstawy metodyki nauczania dyscyplin biomedycznych organizowany przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi, rok 2010
- uczestnictwo w projekcie „Menager BioTechScience – studia podyplomowe w zakresie zarządzania projektami badawczymi i komercjalizacji ich wyników”, 16.10.2012-9.11.2013
- Szkolenie „Zarządzanie innowacjami w nanotechnologii”, 11-12 marca 2016
- Metodyka Nauczania w Dyscyplinach Biomedycznych, 2017/2018
- uczestnictwo w projekcie „Ready to Teach! Innowacyjny Program Rozwoju Kadry Dydaktycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.” (POWR.03.04.00-00-D039/16) współfinansowany ze środków Unii Europejskiej, z Europejskiego Funduszu Społecznego, w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój.
- Prezentacje i wystąpienia publiczne -2017-11-15, 2017-11-24, 2018-02-09, szkolenie z projektu Ready to Teach.
- Aktywizacja studentów metodą SCL szkolenie z projektu Ready to Teach.
- Zasady przygotowywania sylabusów 2018-06-25 szkolenie z projektu Ready to Teach.
- Techniki prowadzenia zajęć szkolenie z projektu Ready to Teach.
- Koncentracja - skuteczny trening skupiania uwagi. 2017-12-05 - Akademia Rozwoju Talentów Uniwersytetu Medycznego.
- Kreatywne metody edukacyjne 2017-12-06 - Akademia Rozwoju Talentów Uniwersytetu Medycznego.
- Are you talking to me? - czyli o informacji zwrotnej słów kilka. 2017-12-05 - Akademia Rozwoju Talentów Uniwersytetu Medycznego.
- „Typy spod ciemnej gwiazdy”– czyli jak dogadać się z innymi na podstawie diagnozy typów osobowości. 2017-12-06 - Akademia Rozwoju Talentów Uniwersytetu Medycznego.
- Konferencja UMED - Profilaktyka raka piersi i raka szyjki macicy 2018-01-23

10. Członkostwo w towarzystwach naukowych

Od 2016 r jestem Członkiem Polskiego Towarzystwa Botanicznego.

11. Działalność organizacyjna

Pełnię funkcję koordynatora w programie Wirtualnej Uczelni UXP od początku jego wprowadzenia na naszej Uczelni.

12. Recenzje prac naukowych

Występowałam w roli recenzenta prac naukowych złożonych do publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym tj.

Protoplasma

Studies in Natural Products Chemistry

Industrial Crops and Products

Plant Physiology and Biochemistry

Burns

Plant Gene

Applied Microbiology and Biotechnology

Plant Cell Reports

13. Podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych:

Mój dorobek naukowo-badawczy obejmuje:

•29 oryginalnych pełnotekstowych prac opublikowanych w czasopismach, w tym 19 w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). W 18 pracach jestem pierwszym autorem

- 1 pracę przeglądową, której jestem pierwszym autorem
- 1 monografię, której jestem pierwszym autorem
- 29 streszczeń z doniesień zjazdowych prezentowanych na ogólnopolskich i międzynarodowych konferencjach naukowych
- udział w 1 projekcie badawczym finansowanych przez MNiSW/KBN
- sumaryczny współczynnik Impact Factor według listy JCR zgodnie z rokiem opublikowania: **32,825**; łączna punktacja MNiSW: **479** (w tym na 7 publikacji wchodzących w skład postępowania habilitacyjnego przypada IF – **17,985** oraz **205** pkt MNiSW)

- liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science TM Core Collection: 84, wg bazy Scopus: 96
- index Hirsha (h-index) według Web of Science TM Core Collection 6 i wg bazy Scopus: 6

14. Działalność dydaktyczna

I. Przygotowywałam i prowadziłam następujące zajęcia dydaktyczne:

1. Ćwiczenia laboratoryjne z przedmiotu: Biotechnologia farmaceutyczna, III rok Farmacji
2. Seminaria magisterskie, IV rok Dietetyka
3. Ćwiczenia specjalistyczne i metodologia badań, V rok Farmacji
4. Seminarium z biotechnologii molekularnej, V rok Farmacji
5. Seminarium z biotechnologii farmaceutycznej - zajęcia fakultatywne, IV rok Farmacji
6. Biotechnologia dla zdrowia i urody – zajęcia fakultatywne, IV rok Farmacji
7. Biotechnologia żywności - zajęcia fakultatywne, IV rok Farmacji
8. Lek biotechnologiczny - zajęcia fakultatywne, V rok Farmacji
9. Procesy otrzymywania bioleków i ich walidacja - zajęcia fakultatywne, V rok Farmacji
10. Pełnię funkcję opiekuna naukowego Studenckiego Koła Naukowego, działającego przy Zakładzie Biotechnologii Farmaceutycznej

II. Ponadto

1. Byłam opiekunem naukowym 20 prac magisterskich na Wydziale Farmaceutycznym, Kierunku Farmacja Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
2. Byłam promotorem 20 prac magisterskich (w tym 9 na Wydziale Farmacji, 9 na Wydziale Wojskowo-Lekarskim (Kierunek: Fizjoterapia) i 2 na Wydziale Nauk o Zdrowiu Kierunek: Ratownictwo Medyczne, Dietetyka) i 2 prac licencjackich (Wydział Nauk o Zdrowiu, kierunek Fizjoterapia i Ratownictwo Medyczne)
3. Ogółem zrecenzowałam 46 prac magisterskich i 8 prac licencjackich.
4. Uczestniczyłam w 94 egzaminach dyplomowych, w tym w 54 w roli recenzenta, w 20 jako opiekun pracy i w 22 jako promotor.

5. Pełniłam rolę promotora pomocniczego w zakończonym przewodzie doktorskim lek. med. Michała Dąbrowskiego, rozprawa doktorska pt. *„Ocena lekooporności oraz wrażliwości na wybrane olejki eteryczne szczepów bakterii Escherichia coli uzyskanych od pacjentów z przewlekłym zakażeniem układu moczowego”*, promotor dr hab. Monika Sienkiewicz. Praca doktorska została złożona, planowany termin obrony – 20 maj 2019.

