GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ

mgr farm. Anna Jesionek

Otrzymywanie olejku eterycznego, o przewidywanej aktywności biologicznej, w kulturach *in vitro* *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*)

Rozprawa doktorska

Promotor pracy:
prof. dr hab. n. farm. Maria Łuczkiewicz

Katedra i Zakład Farmakognozji
z Ogrodem Roślin Leczniczych

Gdańsk, 2020

Składam serdeczne podziękowania

Pani Profesor Marii Łuczkiewicz
za opiekę naukową, poświęcony czas, życzliwość, cierpliwość oraz nieocenioną pomoc w przygotowaniu manuskryptu oraz prowadzeniu badań

Pani Profesor Mirosławie Krauze-Baranowskiej
kierownikowi Katedry i Zakładu Farmakognozji w Gdańsku, za zapewnienie warunków dla realizacji projektu badawczego

Koleżankom i Kolegom z Katedry i Zakładu Farmakognozji
za pomoc oraz przyjazną atmosferę

Rodzicom oraz Teściom
za wsparcie oraz wyrozumiałość

Córkom Jagódce i Malince
za lekcje godzenia pracy naukowej z macierzyństwem

Niniejszą pracę pragnę dedykować

Ukochanemu Mężowi
bez którego ciągłej motywacji i nigdy niegasnącej wiary we mnie praca by nie powstała,
a który pracy przeczytać nie zdążył

„Pan stworzył z ziemi lekarstwa,
a człowiek mądry nie będzie nimi gardził.
Dzięki nim się leczy i ból usuwa,
z nich aptekarz sporządza leki."
(Syr 38, 4.7)

Praca powstała w wyniku realizacji grantu badawczego przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach programu PRELUDIUM 8 (nr 2014/15/N/NZ7/03027).

Ponadto, autorka niniejszej pracy została objęta wsparciem w ramach projektu dofinansowanego w III Osi priorytetowej „Szkolnictwo wyższe dla gospodarki i rozwoju", Działanie 3.2 Studia doktoranckie, Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego (POWR.03.02.00-00-I026/17-00 – Power 2).

Wyjazdy na konferencje naukowe oraz szkolenia podczas realizacji projektu doktorskiego sfinansowane zostały częściowo ze środków Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) przyznanych przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla Wydziału Farmaceutycznego z OML Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego na lata 2012-2017, na podstawie decyzji nr MNiSW-DS-6002-4693-23/WA/12 z dnia 12 lipca 2012 r.

NARODOWE CENTRUM NAUKI

Krajowy Naukowy
Ośrodek Wiodący

SPIS TREŚCI

LISTA PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ PRACY DOKTORSKIEJ.....5
WYKAZ SKRÓTÓW.....8
I. WPROWADZENIE.....10
II. CEL PRACY.....14
III. KOMENTARZ DO UZYSKANYCH WYNIKÓW.....16
III.1. Inicjacja kultur *in vitro Rhododendron tomentosum* oraz ich adaptacja do wzrostu w warunkach ciągłych.....16
III.2. Dobór metody otrzymywania oraz analizy chromatograficznej olejków eterycznych z biomas *Rhododendron tomentosum* wraz z wykorzystaniem opracowanych procedur w porównawczych badaniach frakcji lotnych izolowanych z matryc roślinnych.....23
III.3. Kultury pędów *Rhododendron tomentosum* prowadzone w bioreaktorach jako źródło aktywnych biologicznie związków terpenowych.....35
III.4. Mikrorozmnażanie *Rhododendron tomentosum* Harmaja – gatunku zagrożonego wyginięciem.....43
III.5. Aktywność biologiczna frakcji lotnych z *Rhododendron tomentosum* – bezpośrednia bioautografia metodą TLC oraz badanie aktywności proapoptotycznej w obrębie limfocytów i synowiocytów ludzkich.....49
IV. WNIOSKI.....55
STRESZCZENIE.....60
SUMMARY.....66
PIŚMIENNICTWO.....72

LISTA PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ PRACY DOKTORSKIEJ

Prace przeglądowe:

- Dampc, A., Łuczkiewicz, M. (2013) *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*): a review of traditional use based on current research. Fitoterapia, 85: 130-143.
  DOI: 10.1016/j.fitote.2013.01.013
  IF: 2.216, punkty MNiSW: 25
  https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0367326X13000166?via%3Dihub
- Dampc, A., Łuczkiewicz, M. (2015) Labrador tea: the aromatic beverage and spice: a review of origin, processing and safety. J Sci Food Agric, 95: 1577-1583.
  DOI: 10.1002/jsfa.6889
  IF: 2.076, punkty MNiSW: 35
  https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.6889

Oryginalne prace doświadczalne:

- Jesionek, A., Kokotkiewicz, A., Włodarska, P., Filipowicz, N., Bogdan, A., Ochocka, R., Szreniawa-Sztajnert, A., Zabiegała, B., Buciński, A., Łuczkiewicz, M. (2016) *In vitro* propagation of *Rhododendron tomentosum*: an endangered essential oil bearing plant from peatland. Acta Biol Crac Ser Bot, 58: 29-43.
  DOI: 10.1515/abcsb-2016-0019
  IF: 0.491, punkty MNiSW: 15
  http://journals.pan.pl/dlibra/publication/118674/edition/103244/content
- Jesionek, A., Kokotkiewicz, A., Włodarska, P., Zabiegała, B., Buciński, A., Łuczkiewicz, M. (2017) Bioreactor shoot cultures of R*hododendron tomentosum* (*Ledum palustre*) for a large-scale production of bioactive volatile compounds. Plant Cell Tiss Org Cult, 131: 51-64.
  DOI: 10.1007/s11240-017-1261-0
  IF: 2.004, punkty MNiSW: 35
  https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-017-1261-0
- Jesionek, A., Pobłocka-Olech, L., Zabiegała, B., Buciński, A., Krauze-Baranowska, M., Łuczkiewicz, M. (2018) Validated HPTLC method for determination of ledol and alloaromadendrene in the essential oil fractions of *Rhododendron tomentosum* plants and *in vitro* cultures and bioautography for their activity screening. J Chromatogr B, 1086: 63-72.
  DOI: 10.1016/j.jchromb.2018.04.006
  IF: 2.813, punkty MNiSW: 30
  https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023217318056?via%3Dihub

- Jesionek, A., Kokotkiewicz, A., Królicka, A., Zabiegała, B., Łuczkiewicz, M. (2018) Elicitation strategies for the improvement of essential oil content in *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*) bioreactor-grown microshoots. Ind Crops Prod, 123: 461-469.
  DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.07.013
  IF: 4.191, punkty MNiSW: 40
  https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669018306137
- Jesionek, A., Zabiegała, B., Buciński, A., Łuczkiewicz, M. (2019) From harvesting to distillation – effect of analytical procedures on the yield and chemical composition of *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*) essential oil. Acta Pol Pharm – Drug Res, 76: 83-92.
  DOI: 10.32383/appdr/93932
  IF: 0.447, punkty MNiSW: 40
  https://www.ptfarm.pl/wydawnictwa/czasopisma/acta-poloniae-pharmaceutica/110/-/27925
- Jesionek, A., Kokotkiewicz, A., Mikosik-Roczyńska, A., Ciesielska-Figlon, K., Łuczkiewicz, P., Buciński, A., Daca, A., Witkowski, J.M., Bryl, E., Zabiegała, B., Łuczkiewicz, M. (2019) Chemical variability of *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*) essential oils and their pro-apoptotic effect on lymphocytes and rheumatoid arthritis synoviocytes. Fitoterapia, 139: 104402.
  DOI: 10.1016/j.fitote.2019.104402
  IF: 2.431, punkty MNiSW: 100
  https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X19317575?via%3Dihub

Prace popularnonaukowe:

- Jesionek, A. (2019) Aromat bagna. Forum Akademickie, 3: 61-63; przedruk w Gazeta GUMed, 29 (7): 53-56. III nagroda w XIV edycji konkursu „Skomplikowane i proste. Młodzi uczeni o swoich badaniach", organizowanego przez miesięcznik „Forum Akademickie" pod honorowym patronatem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego
  https://prenumeruj.forumakademickie.pl/fa/2019/03/aromat-bagna/

Udział w konferencjach naukowych:

- 45th International Symposium on Essential Oils, 7-10.09.2014, Stambuł, Turcja (poster: *Phytochemical analysis of essential oil produced by intact plant and in vitro cultures of Rhododendron tomentosum*),
- XIII International Conference on Conservation of Native Plants and Natural Habitats, 14-15.03.2015, Londyn, Wielka Brytania (wystąpienie ustne: *Micropropagation of Rhododendron tomentosum (Ledum palustre), an endangered plant of scientific interest, as the example of ex situ conservation*),
- International Conference Plant Cells in Vitro: Theory and Practice, 8-9.02.2016, Wiedeń, Austria (wystąpienie ustne: *Liquid shoot cultures of Rhododendron tomentosum (Ledum palustre) for a large-scale production of volatile compounds in bioreactor systems*),

- 6th International Congress of Aromatic and Medicinal Plants, 29.05 - 01.06.2016, Coimbra, Portugalia (poster: *Biotechnological production of biologically active essential oil in Rhododendron tomentosum (Ledum palustre) microshoots in large-scale installations*),
- 47th International Symposium on Essential Oils, 11-14.09.2016, Nicea, Francja (poster: *Variation of ledol content in essential oil from in vivo and in vitro biomasses of Rhododendron tomentosum (Ledum palustre)*),
- International Symposium for High-Performance Thin-Layer Chromatography, 4-8.07.2017, Berlin, Niemcy (poster: *Quantitative analysis of ledol and alloaromadendrene by HPTLC with densitometric detection in Rhododendron tomentosum (Ledum palustre) plants and in vitro cultures*)

WYKAZ SKRÓTÓW

2,4-D – kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy

2iP – 2-izopentenyloadenina

A – podłoże wg Andersona (Anderson, 1978)

AD – adenina

COX-1, COX-2 – cyklooksygenaza 1 i 2

DMARD – leki modyfikujące przebieg choroby

DMSO – dimetylosulfotlenek

DPPH – 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl

DW – sucha masa *(ang. dry weight)*

FP – Farmakopea Polska

FW – świeża masa *(ang. fresh weight)*

GC/MS – chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas *(ang. gas chromatography / mass spectrometry)*

GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów

GSK – glikokortykosteroidy

GUMed – Gdański Uniwersytet Medyczny

HLA – ludzki antygen leukocytarny

HPTLC – wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa *(ang. high-performance thin layer chromatography)*

IAA – kwas indolilo-3-octowy

IBA – kwas indolilo-3-masłowy

IFN-γ – interferon γ

IL-(1-23) – interleukiny 1-23

MAPK – kinazy białkowe aktywowane mitogenami

MCP-1 – białko chemotaktyczne monocytów 1

MIF – czynnik hamujący migrację makrofagów

MMP – metaloproteinazy

NAA – kwas naftylo-1-octowy

NF-κB – jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B

NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne

OE – olejek eteryczny

PL – fosfolipaza

R – receptor

RAPD – polimorfizm losowo powielonych fragmentów DNA (*ang. Random Amplification of Polymorphic DNA)*

Rf – współczynnik retencji *(ang. retardation factor)*

RNS – reaktywne formy azotu

ROS – reaktywne formy tlenu

RZS – reumatoidalne zapalenie stawów

SDE – jednoczesna destylacja z parą wodną i ekstrakcja *(ang. simultaneous distillation-extraction)*

SH – podłoże wg Schenk-Hildebrandta (Schenk i Hildebrandt, 1972)

TDZ – tidiazuron, 1-fenylo-3-(1,2,3-tiadiazol-5-ilo)mocznik

TF – czynniki transkrypcyjne

TGF-β – transformujący czynnik wzrostu β

TLC – chromatografia cienkowarstwowa *(ang. thin layer chromatography)*

TNF-α – czynnik martwicy nowotworów α

Wp – współczynnik przyrostu masy

WP – podłoże dla roślin drzewiastych (*ang. Woody Plant Medium*) (Lloyd i McCown, 1981)

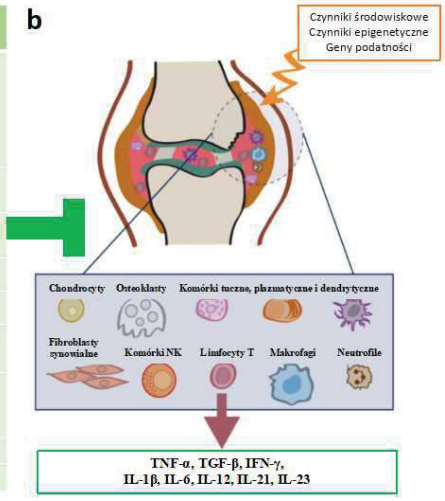
I. WPROWADZENIE

W Polsce schorzenia reumatyczne, zaliczane do chorób społecznych, stanowią jedną z głównych przyczyn absencji chorobowych w pracy i ubiegania się o rentę inwalidzką (Jędryka-Góral i Łastowiecka, 2003). Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) dotyka ok. 1% populacji dorosłych, dwukrotnie częściej kobiety niż mężczyzn. Niniejsza choroba przewlekła, o podłożu autoimmunologicznym, jest diagnozowana zazwyczaj u osób między 40. a 50. rokiem życia, choć może ujawnić się także wcześniej, już u dwudziestolatków (Jura-Półtorak i Olczyk, 2011; Kłak i in., 2016). Szacuje się, że po upływie dziesięciu lat od wystąpienia RZS, tylko połowa pacjentów pozostaje zdolna do pracy (Kłak i in., 2016). Postępująca degradacja chrząstki stawowej i kości oraz współistniejące zmiany patologiczne poza układem ruchu (m.in. zapalenie mięśnia sercowego i włóknienie płuc) prowadzą do niepełnosprawności, obniżenia jakości życia i problemów emocjonalnych (Bączyk, 2008; Bryl i Witkowski, 2008). Nie bez znaczenia jest także negatywny wpływ postępowania terapeutycznego, o niepełnej skuteczności, obarczonego również poważnymi działaniami niepożądanymi, na funkcjonowanie chorych (Bączyk, 2008) (Ryc. 1). Aktywność szerokiego spektrum farmaceutyków, stosowanych dotychczas w terapii RZS (niesteroidowe leki przeciwzapalne, syntetyczne i biologiczne leki modyfikujące przebieg choroby oraz glikokortykosteroidy), ogranicza się bowiem do zmniejszania już istniejącego stanu zapalnego i spowolnienia progresji choroby, bez oddziaływania na jej wciąż nie do końca poznaną etiologię (Kumar i in., 2016).

a

Leki	Przykłady	Mechanizm działania	Wybrane skutki uboczne
Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ)	Kwas acetylosalicylowy	Inhibicja COX-1 i COX-2	Choroba wrzodowa, zawał serca, biegunka, nudności, pokrzywka, astma, zaburzenia słuchu, krwawienia z przewodu pokarmowego
	Celekoksyb		
	Ibuprofen		
	Diklofenak		
Leki modyfikujące przebieg choroby (DMARD)	Metotreksat	Immunosupresja	Wysypka, hepatotoksyczność, nefrotoksyczność
	Azatiopryna	Immunosupresja	Nudności, małopłytkowość, zapalenie trzustki, zastój żółci
	Sulfasalazyna	Inhibicja NF-κB	Ból głowy i brzucha, gorączka, rumień
	Etanercept	Inhibicja TNF-α	Zakażenia, reakcje alergiczne, gorączka
	Anakinra	Antagonizm receptorów IL-1	Ból głowy, nudności, biegunka, zakażenia
Glikokortykosteroidy (GSK)	Deksametazon	Immunosupresja, hamowanie uwalniania cytokin	Zatrzymanie wody, nadciśnienie tętnicze, osłabienie mięśniowe, osteoporoza, choroba wrzodowa, zaniki skóry
	Metyloprednizolon		
Leki roślinne	*Glycyrrhiza glabra*	Działanie przeciwzapalne	Nadciśnienie tętnicze, hipokaliemia
	Mangifera indica		Brak

b



Ryc. 1. a) Współczesne metody farmakoterapii RZS oraz ich skutki uboczne (Kumar i in., 2016; Yang i in., 2013); b) schemat patogenezy RZS (rycina zmodyfikowana, Mellado i in., 2015).

Wziąwszy pod uwagę, daleką od satysfakcjonującej, efektywność leków syntetycznych w leczeniu RZS, alternatywą wydają się być preparaty roślinne, charakteryzujące się znacznie szerszym profilem bezpieczeństwa, potwierdzonym przez wielowiekową tradycję stosowania w medycynie ludowej, przy jednoczesnej wysokiej aktywności biologicznej, często udokumentowanej współczesnymi badaniami naukowymi (Yang i in., 2013). Potencjalnych leków przeciwreumatycznych poszukuje się zwłaszcza wśród substancji pochodzenia roślinnego, o zdolności modulowania ekspresji sygnałów prozapalnych, takich jak polifenole (wśród nich bioflawonoidy), chinony, czy też terpeny (Laev i Salakhutdinov, 2015). W przeciwieństwie do leków syntetycznych, wpływających wybiórczo na poszczególne komórki lub mediatory zapalenia, mieszaniny związków naturalnych zawarte w roślinach działają na przebieg choroby kompleksowo i wielokierunkowo (Kumar i in., 2016).

Spośród wielu surowców o ugruntowanym tradycją zastosowaniu w leczeniu schorzeń reumatycznych (ostryż długi, imbir lekarski, janowiec barwierski, lukrecja gładka, pokrzywa zwyczajna) (Laev i Salakhutdinov, 2015; Yang i in., 2013), na uwagę zasługuje bagno zwyczajne, *Rhododendron tomentosum* Harmaja, przed 1990 r. klasyfikowane jako *Ledum palustre* L. (Ryc. 2), nieprzebadane szczegółowo w tym względzie (Dampc i Łuczkiewicz, 2013, IV.1). Ten zimozielony krzew, o charakterystycznych skórzastych, wąskolancetowatych, pokrytych od spodu rdzawym kutnerem, liściach i białych pięciokrotnych kwiatach zebranych w baldachy, występuje w borach bagiennych i na torfowiskach wysokich oraz przejściowych półkuli północnej (Ryc. 3) (Snowarski, 2002). W Europie i w Azji bagno zwyczajne przez wiele wieków stanowiło remedium na reumatyzm, choroby płuc, infekcje bakteryjne i dolegliwości trawienne, a jego właściwości repelentne były znane już od czasów średniowiecza (Dampc i Łuczkiewicz, 2013, IV.1). W Ameryce Północnej do tej pory przygotowuje się, wywodzący się z tradycji rdzennej ludności, tonizujący napar z *R. tomentosum*, *R. groenlandicum* i *R. neoglandulosum*, znany jako „Labrador tea" (Dampc i Łuczkiewicz, 2015, IV.2).

Współczesne badania naukowe, weryfikując etniczne przesłanki odnośnie stosowania bagna zwyczajnego w chorobach stawów, potwierdzają jego aktywność przeciwzapalną (Baananou i in., 2015; Black i in., 2011; Tunon i in., 1995), przeciwbólową (Zhang i in., 2010), przeciwdrobnoustrojową (Fokina i in., 1991; Kim i Nam, 2006) i antyoksydacyjną (Black i in., 2011; Fraser i in., 2007), co wskazuje na obiecujący potencjał omawianej rośliny w leczeniu RZS. Obok związków flawonoidowych i kwasu ursolowego, za właściwości farmakologiczne *R. tomentosum* odpowiada przede wszystkim olejek eteryczny, bogaty w monoterpeny (*p*-cymen, sabinen, limonen, *β*-myrcen, *γ*-terpineol) oraz seskwiterpeny o szkielecie aromadendranu (ledol, palustrol) (Dampc i Łuczkiewicz, 2013, IV.1; Jesionek i in., 2019, V.6). Mechanizm jego działania nie został jednak do tej pory dokładnie rozpoznany.

a

❖ **Królestwo**:	*Plantae* Haeckel (1866)	(Rośliny)
❖ **Podkrólestwo**:	*Viridiplantae* Cavalier-Smith (1981)	(Rośliny zielone)
❖ **Infrakrólestwo**:	*Streptophyta* Jeffrey (1967)	(Rośliny lądowe)
❖ **Nadgromada**:	*Embryophyta* Endlicher (1836)	(Rośliny zarodkowe)
❖ **Gromada**:	*Tracheophyta* Sinnott (1935) ex Cavalier – Smith (1998)	(Rośliny naczyniowe)
❖ **Podgromada**:	*Magnoliophyta* Takhtajan (1964)	(Okrytonasienne)
❖ **Klasa**:	*Magnoliopsida* Brongn. (1843)	(Dwuliścienne)
❖ **Nadrząd**:	*Asteranae* Takht. (1967)	(Astrowce)
❖ **Rząd**:	*Ericales* Bercht. & J.Presl (1820)	(Wrzosowce)
❖ **Rodzina**:	*Ericaceae* Juss. (1789)	(Wrzosowate)
❖ **Rodzaj**:	*Rhododendron* L. (1753)	(Różanecznik)
❖ **Gatunek**:	*R. tomentosum* Harmaja (1990), syn. *Ledum palustre* L. (1753)	(Bagno zwyczajne)

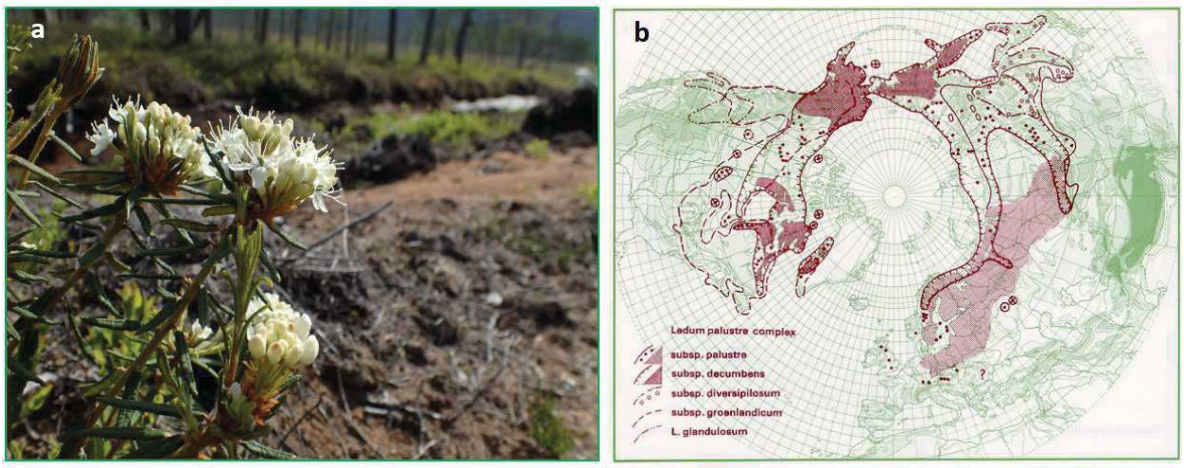
b

Nazwy zwyczajowe i obcojęzyczne:
bagno pospolite, bagniak, świńskie bagno, dziki rozmaryn, rozmaryn leśny (pl.); marsh tea, marsh Labrador tea, northern Labrador tea, wild rosemary (ang.); suopursu (fin.); Sumpfporst (niem.); Багульник болотный (ros.)

c

Ryc. 2. a) Stanowisko systematyczne*, b) nazwy zwyczajowe i obcojęzyczne** oraz c) morfologia *Rhododendron tomentosum****.

* ITIS: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=894434#null (dostęp maj 2018)
** pl. - po polsku, ang. - po angielsku, fin. - po fińsku, niem. - po niemiecku, ros. - po rosyjsku
*** Thomé, O.W., Flora von Deutschland Österreich und der Schweiz, Tafeln, vol. 4: t. 466 (1885)



Ryc. 3. a) Stanowisko naturalne w Północnej Finlandii* oraz b) zasięg występowania *Rhododendron tomentosum* (dawniej *Ledum palustre*) na świecie**.

* Fot. Anna Jesionek
** http://linnaeus.nrm.se/flora/di/erica/rhodo/rhodtomv.jpg (dostęp maj 2018)

W tym miejscu należy zaznaczyć, iż duża zmienność składu chemicznego frakcji lotnej z bagna zwyczajnego, którą obserwuje się w zależności nie tylko od miejsca i czasu zbioru, ale także od fazy okresu wegetacyjnego, genotypu, wieku czy części morfologicznej rośliny (Belousova i in., 1990; Butkiene i in., 2008; Butkiene i Mockute, 2011; Gretsusnikova i in., 2010; Jesionek i in., 2019, V.6; Judzentiene i in., 2012; Zhang i in., 2017), może prowadzić do braku powtarzalnych i wiarygodnych wyników badań biologicznych nad opisywanym surowcem, jak

również uniemożliwić stosowanie wyciągu z *R. tomentosum* w nowoczesnej fitoterapii np. schorzeń reumatoidalnych. Co więcej, na skutek nadmiernego osuszania zasiedlonych m.in. przez *R. tomentosum* terenów podmokłych dla celów rolniczych, niniejszy gatunek w Polsce został objęty ochroną częściową (poz. 2.271 wg Rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014 r. w sprawie ochrony gatunkowej roślin). Fakt ten uniemożliwia zbiór, na potrzeby przemysłu farmaceutycznego oraz do badań naukowych, materiału roślinnego ze środowiska naturalnego, z uwagi na ryzyko naruszenia bioróżnorodności.

Ze względu na powyższe, metodą z wyboru do otrzymywania biomas *R. tomentosum*, syntezujących aktywne biologicznie frakcje lotne, przeznaczone do prowadzenia zakrojonych na szerszą skalę badań fitochemicznych oraz farmakologicznych, których ostatecznym celem jest otrzymanie nowego i bezpiecznego leku przeciw RZS, wydają się być kultury *in vitro*. Już od końca lat 60. ubiegłego wieku stanowią one obiecujące źródło roślinnych metabolitów wtórnych, cennych dla przemysłu farmaceutycznego i spożywczego, gwarantując ciągły dostęp do biomasy, niezależnie od warunków środowiskowych, geograficznych i sezonowych (Bourgaud i in., 2001). Jednocześnie zapewniają powtarzalną jakość materiału roślinnego pod względem zawartości substancji czynnych, częstokroć przekraczającej produktywność roślin macierzystych (Rao i Ravishankar, 2002). Dotychczas nie prowadzono badań biotechnologicznych nad bagnem zwyczajnym. Otrzymanie kultur *in vitro R. tomentosum*, zoptymalizowanych pod względem intensywnego wzrostu oraz produktywności w zakresie wybranej grupy wtórnych metabolitów, pozwoliłoby uzyskać alternatywne źródło stabilnego chemicznie olejku eterycznego, zawierającego zespół związków terpenowych o potencjalnym działaniu przeciwzapalnym. Opisane strategie stworzyłyby perspektywy na dokładne określenie profilu aktywności biologicznej rośliny, a w następstwie umożliwiłyby praktyczne zastosowanie powyższego surowca w nowoczesnym lecznictwie. Oboczną korzyść z badań biotechnologicznych, przeprowadzonych również w zakresie mikrorozmnażania, stanowiłaby możliwość reintrodukcji *R. tomentosum*, gatunku zagrożonego wyginięciem, do środowiska naturalnego.

II. CEL PRACY

W świetle przedstawionej we wstępie problematyki oraz zakresu wiedzy, sformułowano podstawowy cel pracy doktorskiej, którym było otrzymanie, w oparciu o gatunek *Rhododendron tomentosum* Harmaja (*Ledum palustre* L.) stabilnego, pod względem parametrów wzrostowych i poziomu biosyntezowanych lotnych metabolitów wtórnych, niezależnego od warunków środowiskowych, roślinnego systemu *in vitro*, zdolnego do ciągłej produkcji olejku eterycznego, wykazującego m.in. aktywność przeciwzapalną, i tym samym mogącego znaleźć zastosowanie w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów.

Podstawowy cel projektu realizowano na poziomie *up*- i *downstream*, w trzech obszarach badawczych: biotechnologicznym, fitochemicznym oraz biologicznym.

W ramach obszaru biotechnologicznego zamierzano:

– wyprowadzić z części wegetatywnych *R. tomentosum* kultury *in vitro* o zróżnicowanym stopniu morfogenezy (kalus, pędy, korzenie: transgeniczne oraz *de novo*),

– zaadaptować wybrane biomasy, zdolne do biosyntezy lotnych terpenów, do wzrostu w systemie ciągłym (otrzymanie kultur kolekcyjnych), z zastosowaniem zmiennych warunków eksperymentalnych (zróżnicowany skład pożywek i oświetlenie) oraz typów doświadczeń *in vitro* (kultury stacjonarne: agarowe i płynne oraz wytrząsane: płynne),

– zwiększyć skalę kultywacji wysokoprodukcyjnych biomas bagna zwyczajnego z wykorzystaniem bioreaktorów komercyjnych i prototypowych, skonstruowanych w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, uwzględniając wpływ konstrukcji naczyń hodowlanych na wzrost oraz produktywność kultur *in vitro* (opracowanie procedur *upstream*),

– zwiększyć poziom akumulacji olejku eterycznego w wybranych biomasach *R. tomentosum*, stosując strategię stresu środowiskowego – elicytacja biotyczna i abiotyczna (opracowanie wysokoprodukcyjnego roślinnego systemu *in vitro*),

– opracować kompletny protokół mikrorozmnażania bagna zwyczajnego jako gatunku chronionego – reintrodukcja rośliny do środowiska naturalnego (ochrona bioróżnorodności).

W ramach obszaru fitochemicznego postanowiono:

– określić optymalne warunki suszenia materiału gruntowego i biomas *in vitro R. tomentosum* z uwagi na ograniczoną trwałość związków terpenowych we frakcjach lotnych (I etap procedur *downstream*),

– zoptymalizować metodę izolacji olejku eterycznego z badanych surowców oraz ustalić zawartość frakcji lotnych w poszczególnych matrycach roślinnych – wykorzystanie techniki destylacji z parą wodną oraz symultanicznej destylacji z parą wodną oraz ekstrakcji do organicznego płynu receptorowego, w skali wielkolaboratoryjnej (II etap procedur *downstream*),
– określić skład chemiczny olejków eterycznych z materiału gruntowego i z kultur *in vitro* bagna zwyczajnego (analiza jakościowa i ilościowa), z wykorzystaniem technik chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC/MS) oraz wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC) z detekcją densytometryczną, po uprzednim opracowaniu warunków rozdzielenia frakcji lotnych,
– przeprowadzić testy skryningowe materiału gruntowego *R. tomentosum*, zebranego z różnych stanowisk, oraz biomas otrzymywanych na poszczególnych etapach doświadczeń *in vitro*, w zakresie zawartości w olejkach eterycznych związków terpenowych o przewidywanej aktywności przeciwzapalnej, za pomocą zoptymalizowanej w toku badań metody HPTLC, poddanej walidacji.

W ramach obszaru biologicznego zamierzano:

– określić wstępnie wybrane kierunki aktywności frakcji lotnych z badanych matryc roślinnych za pomocą bezpośredniej bioautografii metodą TLC (działanie antyoksydacyjne oraz inhibicja oksydazy ksantynowej),
– ocenić wstępnie aktywność proapoptotyczną olejków eterycznych z materiału gruntowego i z kultur *in vitro R. tomentosum* w obrębie ludzkich limfocytów T oraz wobec ludzkich synowiocytów, z wykorzystaniem cytometrii przepływowej.

Podsumowując, zrealizowanie wymienionych powyżej zadań badawczych, mieszczących się w trzech obszarach przedstawionego projektu, powinno umożliwić realizację podstawowego celu naukowego, którym było opracowanie roślinnego systemu *in vitro* (procedury *up-* i *downstream*), będącego stabilnym i niezależnym od środowiska źródłem lotnych terpenów z przeznaczeniem do szczegółowych badań farmakologicznych, w zakresie aktywności biologicznych wyznaczonych w toku doktoratu.

III. KOMENTARZ DO UZYSKANYCH WYNIKÓW

III.1. Inicjacja kultur *in vitro Rhododendron tomentosum* oraz ich adaptacja do wzrostu w warunkach ciągłych

Zgodnie z celem pracy doktorskiej, pierwszy etap doświadczeń biotechnologicznych, zawartych w opisywanym projekcie, stanowiło wyprowadzenie kultur *in vitro Rhododendron tomentosum*, a następnie adaptacja otrzymanych biomas do wzrostu w warunkach ciągłych (założenie kultury kolekcyjnej). Dotychczas bagna zwyczajnego nie badano w tym zakresie. Szczegółowa kwerenda literaturowa wykazała, że *R. tomentosum* Harmaja, dawniej *Ledum palustre* L., charakteryzuje wysoka zawartość olejku eterycznego, bogatego w specyficzne połączenia terpenowe, w tym ledol oraz palustrol, wyróżniające się wielokierunkową i unikatową aktywnością biologiczną, co łącznie z długą tradycją stosowania rośliny w medycynie ludowej (leczenie stanów zapalnych oraz bólowych w przebiegu schorzeń reumatoidalnych) plasuje niniejszy gatunek jako potencjalny fitoterapeutyk (Baananou i in., 2015; Black i in., 2011; Dampc i Łuczkiewicz, 2013, IV.1, Tunon i in., 1995; Zhang i in., 2010). W tym miejscu należy jednak zaznaczyć, że skład jakościowy oraz ilościowy frakcji lotnej w omawianym surowcu jest zmienny i zależy bezpośrednio od warunków środowiskowych oraz fazy wzrostu rośliny, co przypuszczalnie uniemożliwia otrzymanie, na bazie olejku eterycznego z *R. tomentosum,* leku spełniającego standardy dla nowoczesnego preparatu allopatycznego. Ponadto, jak już wspomniano we wstępie, zbiór bagna zwyczajnego ze stanowisk naturalnych jest problematyczny, z uwagi na objęcie gatunku ochroną częściową (Jesionek i in., 2016, V.1), zaś kontrolowane uprawy omawianego surowca są trudne w prowadzeniu ze względu na specyficzne wymagania środowiskowe rośliny (kwaśne i wilgotne gleby torfowe, duże zacienienie) (Dampc i Łuczkiewicz, 2013, IV.1). Chemiczna synteza unikatowych dla bagna zwyczajnego połączeń terpenowych o przewidywanym działaniu leczniczym, uwzględniająca ich struktury stereoizomeryczne, składa się z wielu etapów (Gijsen i in., 1995; Tran i Cramer, 2014) i może okazać się nieopłacalna, a laboratoryjne odtworzenie olejku eterycznego o składzie identycznym jak w surowcu naturalnym jest niemożliwe. Wobec powyższego, opracowanie roślinnego systemu wzrostowego, na bazie kultur *R. tomentosum* w warunkach *in vitro,* wydaje się być jedynym sposobem pozyskiwania biomas niniejszego gatunku na większą skalę, z uwzględnieniem wydajnej oraz stabilnej produkcji frakcji lotnej, jak i poszczególnych jej komponentów, z przeznaczeniem do badań biomedycznych nad ich zastosowaniem w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS).

Na wstępnych etapach badań biotechnologicznych postanowiono otrzymać z *R. tomentosum* biomasy o różnym stopniu zróżnicowania morfogenicznego. Jako że olejki eteryczne są syntezowane, a następnie magazynowane w wyspecjalizowanych strukturach komórkowych (Mulder-Krieger i in., 1988), zlokalizowanych w przypadku omawianego gatunku w częściach nadziemnych rośliny (Dampc i Łuczkiewicz, 2013, IV.1), skoncentrowano się przede wszystkim na wyprowadzeniu biomas mikropędowych. Dodatkowo, podjęto próbę otrzymania tkanki przyrannej oraz korzeni odciętych i transgenicznych celem określenia pełnego potencjału metabolicznego kultur *in vitro* bagna zwyczajnego w zakresie biosyntezy frakcji lotnej. Szczególny nacisk położono na wyprowadzenie biomas korzeni włośnikowatych, które mogą wydajnie produkować związki naturalne występujące nie tylko w częściach podziemnych roślin macierzystych, ale również w pędach badanych gatunków (Kuzovkina i in., 2009; Rao i Ravishankar, 2002; Santos i in., 2002).

Kwerenda literaturowa wykazała, że dotychczas nie prowadzono eksperymentów związanych z kulturami *in vitro R. tomentosum*. Stąd w realizowanym projekcie konieczny był empiryczny dobór *inoculum* roślinnego oraz podłoża doświadczalnego, pozwalającego na uzyskanie juwenilnych biomas inicjalnych o szybkim przyroście (Jesionek i in., 2016, V.1).

Biorąc pod uwagę opisane cele badawcze, jako eksplantaty inicjalne zastosowano części organów wegetatywnych dziko rosnącego bagna zwyczajnego, tj.: liści i węzłów z fragmentami łodyg (pobrane z pędów wieloletnich, aby zminimalizować ryzyko zakażenia eksplantatów) oraz pączków szczytowych (Ryc. 4 a,b). Nie posłużono się natomiast materiałem nasiennym, który choć łatwiejszy do wyjałowienia, mógłby prowadzić, ze względu na generatywny charakter, do wystąpienia niepożądanych zmian genetycznych w otrzymanych biomasach, a następnie w zregenerowanych roślinach, uniemożliwiając prawidłowe przeprowadzenie procesu mikrorozmnażania oraz uzyskanie materiału *in vitro* o potencjale produkcyjnym, w zakresie frakcji lotnej, charakterystycznym dla *R. tomentosum*. Zbioru surowca gruntowego dokonano w czerwcu 2014 r., ze stanowiska w Miszewku, niedaleko Gdańska, po uzyskaniu zezwolenia Regionalnego Dyrektora Ochrony Środowiska (RDOŚ-Gd-PNII.6400.19.2014.MŚ.1).

W wykonywanych doświadczeniach przetestowano trzy podstawowe pożywki wzrostowe, różniące się zawartością soli mineralnych (m.in. azotanów i fosforanów), węglowodanów, aminokwasów oraz witamin. Posłużono się podłożem Andersona (A) (Anderson, 1978), stosowanym uprzednio w kulturach *in vitro* rodzaju *Rhododendron,* pożywką Woody Plant Medium (WP), przeznaczoną dla roślin drzewiastych (Lloyd i McCown, 1981), oraz medium Schenk-Hildebrandta (SH) (Schenk i Hildebrandt, 1972), które wykorzystano w przypadku eksperymentów biotechnologicznych nad *Vaccinium corymbosum* (*Ericaceae*), gatunkiem spokrewnionym z bagnem zwyczajnym, badanym w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (Dembińska-Migas i in., 1998). Zasadniczą rolę w determinowaniu kierunku procesów morfogenezy w otrzymanych biomasach inicjalnych pełniły zmienne kompozycje regulatorów wzrostu z klasy cytokinin oraz auksyn (m.in. 2-izopentenyloadenina – 2iP, adenina – AD, tidiazuron – TDZ, kwas indolilo-3-masłowy – IBA, kwas indolilo-3-octowy – IAA, kwas naftylo-1-octowy – NAA, kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy – 2,4-D) (Jesionek i in., 2016, V.1).

Ryc. 4. *Rhododendron tomentosum*:* a) roślina macierzysta rosnąca na terenie podmokłym w Miszewku, niedaleko Gdańska**; b) liściowe eksplantaty inicjalne (pożywka SH z 9,84 µM 2iP i 1,00 µM TDZ); c) i d) stacjonarne kultury pędowe (pożywki odpowiednio SH z 9,84 µM 2iP i 1,00 µM TDZ oraz SH z 24,60 µM 2iP); e) wytrząsane kultury pędowe (pożywka SH z 24,60 µM 2iP i 592,02 µM AD); f) wytrząsane kultury korzeniowe (pożywka SH z 9,84 µM IBA, w ciemności); g) fragmenty mikropędów, poddane transformacji szczepem *Agrobacterium rhizogenes* GFP 105 (pożywka SH bez fitohormonów, z dodatkiem 250 mg/l karbenicyliny i 250 mg/l cefotaksymu, w ciemności); h) kultury kalusowe (pożywka SH z 2,27 µM 2,4-D i 2,85 µM IAA).

* Jeżeli nie wskazano inaczej, eksperymenty prowadzono w temp. 23 ± 1°C i oświetleniu 88 ± 8 $mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$

** Fot. Wiktor Jesionek

Ostatecznie, z fragmentów liści bagna zwyczajnego (Ryc. 4 a,b), wysterylizowanych za pomocą chlorku rtęci (II), wyprowadzono inicjalne kultury pędowe (9,84 µM 2iP i 1,00 µM

TDZ; Jesionek i in., 2016, V.1) i kalusowe (2,27 μM 2,4-D i 2,85 μM IAA; dane niepublikowane) (Ryc. 4 c,h), jedynie na medium SH należącym do tzw. pożywek bogatych w źródła azotu i węgla oraz znaczną zawartość mio-inozytolu (500 mg) (Malepszy, 2012). O ile biomasy kalusowe wykazywały tendencję do stopniowego zamierania, niezależnie od zastosowanej kompozycji fitohormonów, o tyle mikropędy, stymulowane dodatkiem 2iP oraz TDZ, okazały się być zdolne do intensywnego wzrostu, o czym świadczył zadowalający współczynnik przyrostu masy (Wp) wynoszący 343,72%, tworzenie wielu nowych primordiów pędowych na eksplantatach inicjalnych oraz morfologia powstałych pędów zbliżona do rośliny macierzystej (Ryc. 4). Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że zgodnie ze specyfiką fizjologiczną omawianego gatunku (przynależność do rodziny *Ericaceae*, preferencja gleb torfowych), kultury *in vitro* bagna zwyczajnego wykazały duże zapotrzebowanie na azotany i fosforany (pożywka SH) oraz wymagały zastosowania silnych cytokinin do wystąpienia pędogenezy (Migas i in., 2006; Smólczyński i Orzechowski, 2009; Sapek, 2014).

Dalsze eksperymenty biotechnologiczne polegały na uzyskaniu wytrząsanych kultur korzeni odciętych *R. tomentosum*, regenerowanych bezpośrednio z matryc pędowych ukorzenionych na stacjonarnym (0,6% *w/v* agaru) podłożu SH, wzbogaconym 9,84 μM IBA (Ryc. 4 f). W celu indukcji ryzogenezy, obok pożywek modyfikowanych regulatorami wzrostu, wykorzystano zmienne warunki oświetleniowe. Eksperymenty prowadzono w ciemności bądź przy dostępie światła (88 ± 8 mol·m^{-2}·s^{-1}) oraz bez lub z zastosowaniem filtra czerwonego (106 primary red, Lee Filters, Wielka Brytania), zalecanego w danych literaturowych jako czynnik stymulujący powstawanie korzeni (Rout i in., 2000). Niestety, eksplantaty korzeniowe nie wydłużały się oraz nie wykazywały przyrostu wtórnego, w przypadku wszystkich testowanych pożywek i warunków wzrostowych, ulegając stopniowej nekrozie (ujemny Wp; dane niepublikowane).

Podjęto również kilkukrotnie próbę otrzymania korzeni włośnikowatych *R. tomentosum*, z wykorzystaniem bakterii *Agrobacterium rhizogenes*, znajdujących się w kolekcji prof. dr hab. inż. Aleksandry Królickiej z Katedry Biotechnologii Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed. Agresywna metoda transformacji, polegająca na wstrzykiwaniu wirulentnych szczepów bakteryjnych (ATCC 15834, A4 i GFP 105) bezpośrednio do zmężniałych tkanek mikropędowych badanego gatunku, nie przyniosła jednak oczekiwanych rezultatów. Na eksplantatach nie zaobserwowano indukcji primordiów korzeniowych (Ryc. 4 g) (dane niepublikowane), co może świadczyć o braku podatności bagna zwyczajnego na agroinfekcję (Hnatuszko-Konka i in., 2009). Ostatecznie, w wyniku przeprowadzonych doświadczeń, uzyskano jedynie juwenilne mikropędy badanego gatunku.

Jak wspomniano na wstępie, kolejnym, po inicjacji kultur *in vitro R. tomentosum*, etapem doświadczeń biotechnologicznych było opracowanie warunków do ich namnażania w sposób ciągły, warunkujący pozyskanie stabilnej kolekcji matryc roślinnych do prowadzenia zaawansowanych eksperymentów, zmierzających do otrzymania systemu wzrostowego, biosyntezującego olejek eteryczny o cennych własnościach biologicznych. Założenia eksperymentalne realizowano w obrębie pierwotnej, stacjonarnej kultury pędów bagna zwyczajnego. Wprawdzie podłoże SH wzbogacone 9,84 μM 2iP i 1,0 μM TDZ, skuteczne na etapie inicjacji mikropędów, zapewniało wystarczającą, do zachowania puli genetycznej badanej rośliny, ilość struktur primordialnych, jednak uzyskane mikroroślinki osiągały zaledwie jednocentymetrową długość (Jesionek i in., 2016, V.1). Biorąc pod uwagę konieczność powstania w kulturze jak największej ilości zróżnicowanych histologicznie struktur, zdolnych do biosyntezy oraz magazynowania olejków eterycznych (przeznaczenie biomas w projekcie), oraz dalszą adaptację mikropędów do wzrostu w pożywkach płynnych (kolejno kultury wytrząsane oraz bioreaktorowe), a także uwzględniając efektywne wykorzystanie całej objętości naczynia hodowlanego, za cel opisywanego doświadczenia postawiono nie tylko uzyskanie mikropędów o wysokim Wp, ale także maksymalne wydłużenie struktur primordialnych (Jesionek i in., 2017, V.2). Założenie badawcze postanowiono osiągnąć, modyfikując media wzrostowe w zakresie stosowanych regulatorów wzrostu (2iP, IBA) i ich stężeń (Jesionek i in., 2017, V.2).

Spośród testowanych wariantów podłoży eksperymentalnych (Jesionek i in., 2016, V.1), największą ilość mikropędów bagna zwyczajnego, przypadającą na jeden eksplantat, przy jednoczesnej ich elongacji do ponad 2 cm, zaobserwowano na agarowej pożywce SH, bez dodatku TDZ i z ponad dwukrotnie zwiększonym stężeniem cytokininy 2iP, w stosunku do medium inicjalnego (Ryc. 4 d). Otrzymane matryce roślinne odznaczały się ponadto mniejszą tendencją do szklenia oraz redukcją tkanki przyrannej przy podstawie kultury, w porównaniu z mikropędami pierwotnymi (Jesionek i in., 2016, V.1). Zmiany te można tłumaczyć rezygnacją z zastosowania w medium wzrostowym TDZ, cytokininy silnie stymulującej proliferację mikropędów roślin drzewiastych, ale hamującej ich wydłużanie (Huetteman i Preece, 1998). Z kolei, zaobserwowany korzystny wpływ 2iP na przyrost (Wp = 205,77%) i elongację kultur pędowych bagna zwyczajnego potwierdza zasadność stosowania niniejszego regulatora wzrostu w kulturach *in vitro* gatunków z rodziny *Ericaceae* (Norton i Norton, 1985).

W dalszym toku eksperymentów biotechnologicznych, mikropędy *R. tomentosum*, namnażane na stacjonarnym (0,6% *w*/*v* agaru) podłożu SH, suplementowanym 24,6 μM 2iP, przystosowano do wzrostu w warunkach płynnych kultur wytrząsanych, które, według danych literaturowych, zapewniają lepsze natlenienie biomas i efektywniejszy, bardziej równomierny przepływ składników odżywczych w systemie. Ponadto, stanowią one etap przygotowawczy

do wprowadzenia materiału roślinnego do instalacji o charakterze bioreaktorów (Grzegorczyk i Wysokińska, 2008; Watt, 2012). W opisywanych doświadczeniach zastosowano dwanaście wariantów medium SH, wzbogaconego nie tylko różnymi, pod względem jakościowym oraz ilościowym, zestawami fitohormonów z grupy auksyn i cytokinin (IBA, 2iP, AD, TDZ, triakontanol, zeatyna), ale także przesączem z torfu, będącym źródłem bliżej niezdefiniowanych składników mineralnych oraz mikroflory grzybowo-bakteryjnej i produktów jej metabolizmu, występujących specyficznie w rejonie pozyskania rośliny macierzystej. Dodatkowo, obniżono pH pożywki wzrostowej oraz ograniczono zakres światła dziennego poprzez użycie niebieskiego filtra (116 dark blue, Lee Filters, Wielka Brytania), w celu imitacji warunków panujących w środowisku naturalnym bagna zwyczajnego (Jesionek i in., 2017, V.2). Wpływ dokonanych modyfikacji na przyrost kultury *in vitro* bagna zwyczajnego oceniono na podstawie parametrów wzrostowych oraz morfologii otrzymanych mikropędów. W następnej kolejności, dla wytrząsanych kultur pędowych, rosnących w zoptymalizowanych warunkach ciągłych, opracowano profil wzrostowy, wykreślony w oparciu o wartości Wp oraz świeżej (FW) i suchej (DW) masy, mierzone w trakcie 63-dniowego eksperymentu, co siedem dni, uzyskując w ten sposób indywidualną charakterystykę badanych tkanek w zakresie pierwotnego metabolizmu (Jesionek i in., 2017, V.2).

W wyniku przeprowadzonych badań, za podłoże płynne, optymalne do prowadzenia wytrząsanej kultury pędowej *R. tomentosum,* uznano pożywkę SH suplementowaną 24,6 μM 2iP, 592,02 μM adeniny (AD) i 30 g l^{-1} sacharozy. Warunkowała ona uzyskanie biomasy o wysokim Wp (323,64%), podobnie jak w przypadku kultur stacjonarnych (inicjalne 343,72%, wydłużone 205,77%), przy równoczesnym braku powstawania tkanki przyrannej. Profil wzrostowy mikropędów bagna zwyczajnego charakteryzowała obecność fazy wzrostu logarytmicznego (0 – 14 dzień) i liniowego (14 – 28 dzień), *plateau* (28 – 49 dzień) oraz obumierania (49 – 63 dzień) (Jesionek i in., 2017, V.2). Jak wskazują dane literaturowe (Malepszy, 2012) oraz doświadczenie własne, otrzymana kultura wykazuje średnie tempo przyrostu. Ponadto, cechuje ją dość dobre wykorzystanie podłoża (Malepszy, 2012), co zapewnia stosunkowo szybkie (28 dni) osiągnięcie maksimum produkcji biomasy roślinnej (FW = 272,52 g l^{-1}; Wp = 323,64%; DW = 18,34 g l^{-1}). Należy wspomnieć, że dodatek AD do medium eksperymentalnego zredukował ilość witryfikujących mikropędów oraz wyraźnie poprawił ich morfologię, w porównaniu z kulturami namnażanymi na pożywce z innymi kompozycjami regulatorów wzrostu (Ryc. 4 e) (Jesionek i in., 2017, V.2). Chociaż zastosowanie, jako składnika podłoża, przesączu z torfu poprawiło parametry wzrostowe mikropędów *R. tomentosum* o ok. 7%, to obserwowane różnice były nieistotne statystycznie (Jesionek i in., 2017, V.2). Zrezygnowano więc z niniejszej strategii doświadczalnej z powodu spodziewanych problemów z uzyskaniem

stałego składu dodawanego przesączu w trakcie wieloletniej kultywacji biomas *in vitro* w systemie ciągłym.

Na podstawie uzyskanych wyników, należy stwierdzić, że możliwe jest przeniesienie mikropędów *R. tomentosum* z podłoża stacjonarnego do warunków kultur płynnych, a narażenie biomas na stres mechaniczny, spowodowany napowietrzaniem medium poprzez wytrząsanie naczynia wzrostowego, nie wpływa znacząco na żywotność materiału roślinnego.

Podsumowując, zgodnie z celem pracy, do dalszych eksperymentów biotechnologicznych, na poziomie kultur bioreaktorowych, wyselekcjonowano, w oparciu o opisane powyżej rezultaty, mikropędy *R. tomentosum*, namnażane na agarowym podłożu SH (0,6% *w/v*) z 9,84 µM 2iP i 1,0 µM TDZ bądź z 24,6 µM 2iP, oraz biomasy wytrząsane w medium płynnym SH z dodatkiem 24,6 µM 2iP i 592,02 µM AD. Jak wskazały przeprowadzone badania fitochemiczne, obok znacznej juwenilności, zachowały one zdolność do biosyntezy olejku eterycznego (Rozdz. III.2; Jesionek i in., 2016, V.1, Jesionek i in., 2017, V.2). Tym samym, były odpowiednie jako tkanki inokularne do opracowania roślinnego systemu wzrostowego *in vitro* z przeznaczeniem do produkcji frakcji lotnej zawierającej terpeny o określonej lub spodziewanej aktywności przeciwzapalnej i przeciwbólowej.

III.2. Dobór metody otrzymywania oraz analizy chromatograficznej olejków eterycznych z biomas *Rhododendron tomentosum* wraz z wykorzystaniem opracowanych procedur w porównawczych badaniach frakcji lotnych izolowanych z matryc roślinnych

Integralną część projektu doktorskiego, obok doświadczeń biotechnologicznych, stanowiła analiza fitochemiczna olejków eterycznych, uzyskanych z materiału gruntowego oraz z kultur *in vitro Rhododendron tomentosum*. Ze względu na brak doniesień literaturowych dotyczących wpływu procedur badawczych na ocenianą zawartość i skład chemiczny frakcji lotnej z bagna zwyczajnego, na pierwszym etapie eksperymentów postanowiono określić optymalne warunki suszenia omawianego surowca oraz najbardziej korzystny sposób izolacji z matryc roślinnych olejku eterycznego, biorąc pod uwagę lotność i różną trwałość zawartych w nim związków terpenowych. Następnie zoptymalizowano warunki chromatografowania (GC/MS – chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas oraz HPTLC – wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa), pozwalające na analizę jakościową oraz ilościową składu chemicznego frakcji lotnych z *R. tomentosum*. Opracowane procedury badawcze wykorzystano finalnie do przeprowadzenia testów skryningowych zarówno materiału gruntowego z bagna zwyczajnego, zebranego z różnych stanowisk, jak i biomas otrzymanych w trakcie doświadczeń biotechnologicznych, w zakresie zawartości olejku eterycznego oraz obecności we frakcjach lotnych połączeń terpenowych o przewidywanej aktywności przeciwzapalnej. W przypadku HPTLC, zoptymalizowaną metodę chromatografowania poddano walidacji.

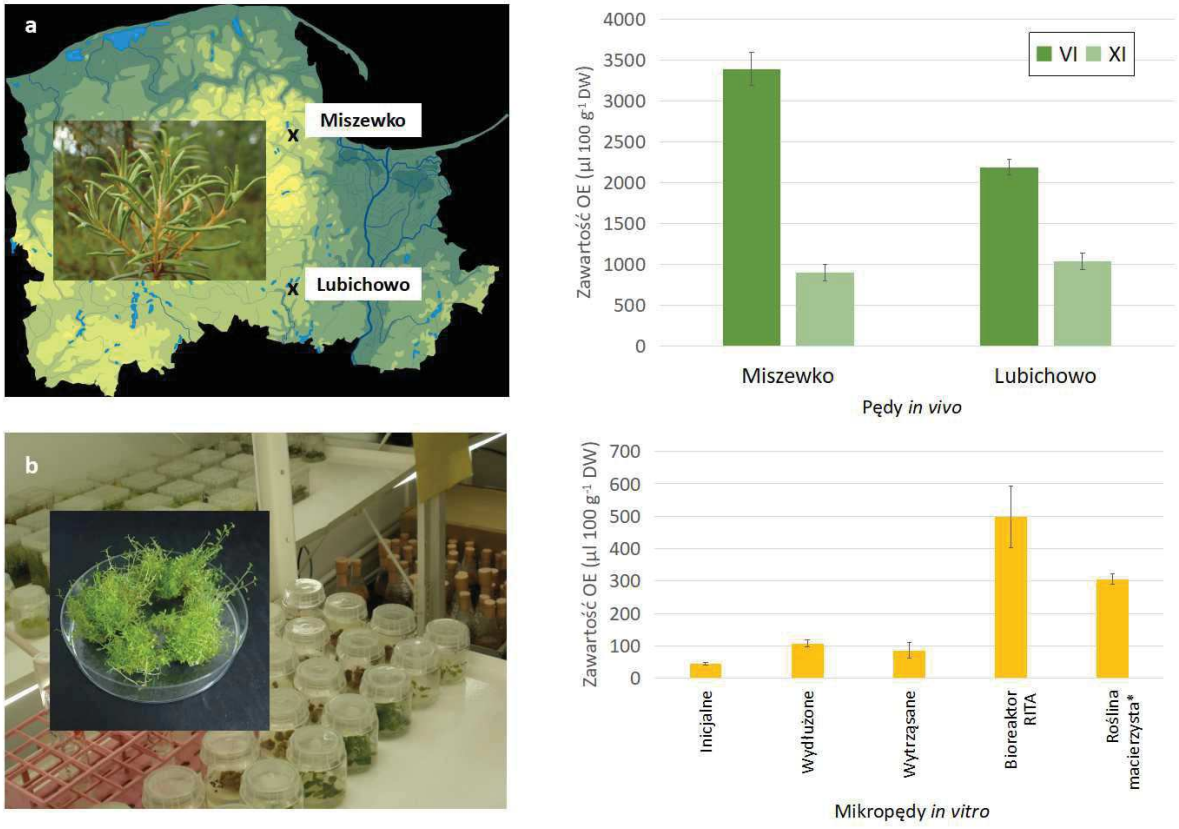
Jak wspomniano powyżej, w ramach podjętych eksperymentów fitochemicznych, określono po raz pierwszy wpływ warunków suszenia pędów *R. tomentosum*, zebranych latem w Lubichowie, oraz mikropędów bagna zwyczajnego rosnących jako kultura kolekcyjna na agarowym (0,6% *w*/*v*) podłożu SH z 24,60 μM 2iP, na ilość i skład chemiczny frakcji lotnych, pozyskanych z analizowanych surowców (Jesionek i in., 2019, V.5; dane niepublikowane). Przeprowadzenie optymalizacji procesu suszenia jest dla roślin olejkowych szczególnie istotne, ponieważ stosowanie zbyt wysokiej lub niskiej temperatury, ciśnienia oraz przedłużającej się procedury usuwania wody może doprowadzić do rozkładu lub ulotnienia się szeregu związków terpenowych. Pozostawiona w surowcu woda może przyczynić się natomiast do rozpadu hydrolitycznego składników olejku eterycznego, m.in. o charakterze estrów (Rahimmalek i Goli, 2013; Sarosi i in., 2012). Jak wykazała analiza GC/MS, w przypadku bagna zwyczajnego nie doszło do znaczących zmian w składzie chemicznym badanych frakcji lotnych, niezależnie

od testowanego sposobu suszenia (temp. pokojowa 24 ± 2°C – w przewiewnym miejscu, temp. 30°C – w suszarce z wymuszonym obiegiem powietrza, bądź po zamrożeniu w temp. -10°C – liofilizacja przy zastosowaniu próżni 1 x 10^{-1} mbar; Jesionek i in., 2019, V.5). Zawartość olejków eterycznych w matrycach roślinnych *R. tomentosum*, poddanych wyżej omówionym procedurom usuwania wody, także nie podlegała istotnym wahaniom (po hydrodestylacji w aparacie Derynga: ok. 2000 µl 100 g^{-1} DW – roślina gruntowa; ok. 100 µl 100 g^{-1} DW – kultury *in vitro*). Uzyskane rezultaty były prawdopodobnie efektem zastosowania, na wszystkich etapach eksperymentu, niskich temperatur, nieprzekraczających 30°C, oraz krótkiego okresu liofilizacji. Ze względu na możliwość szybkiego całkowitego usunięcia wilgoci z biomas (trzy dni), za najbardziej korzystny wariant suszenia matryc *R. tomentosum* uznano umieszczenie surowca w suszarce z wymuszonym obiegiem powietrza. W tym wypadku, w przeciwieństwie do suszenia próżniowego, nie obserwowano również ubytku ilościowego charakterystycznych dla badanego gatunku terpenów, takich jak ledol czy palustrol.

Kwerenda literaturowa dotycząca zawartości frakcji lotnej w częściach nadziemnych bagna zwyczajnego, pochodzącego z różnych stanowisk geograficznych (rejony Eurazji), wykazała znaczną zmienność poszczególnych surowców zarówno w zakresie stężenia syntezowanych olejków eterycznych, jak i ich składu. Obserwowane zróżnicowanie, niezwykle istotne ze względu na wykorzystanie terapeutyczne *R. tomentosum*, wynika prawdopodobnie, w dużej mierze, z rozmieszczenia roślin w charakterystycznym biotopie, ale również może być związane z niejednorodnymi procedurami pozyskiwania frakcji lotnych. Dotychczas brak jednolitego podejścia badaczy do kwestii izolacji olejku eterycznego z omawianego gatunku (Baananou i in., 2015; Gretsusnikova i in., 2010; Jesionek i in., 2016, V.1; Judzentiene i in., 2012; Raal i in., 2014). Z tego względu w dalszych pracach fitochemicznych, stanowiących istotny element projektu doktorskiego, postanowiono zaproponować optymalną metodę otrzymywania frakcji lotnych z biomas *R. tomentosum*. W eksperymencie zastosowano technikę hydrodestylacji, najbardziej powszechnie wykorzystywaną w badaniach nad olejkiem eterycznym z bagna zwyczajnego (Baananou i in., 2015; Butkiene i in., 2008; Judzentiene i in., 2012). W celu pozyskania frakcji lotnych, w doświadczeniach posłużono się klasycznym aparatem Clevengera (wg FP X) oraz jego modyfikacją (aparat Derynga – wg FP VI). Do prac badawczych włączono ponadto aparat Likens-Nickersona, umożliwiający hydrodestylację olejku eterycznego z surowca wraz z jednoczesną ekstrakcją destylatu do cieczy receptorowej (SDE), w tym przypadku dichlorometanu (Jesionek i in., 2019, V.5). Powyższe urządzenie, pozwalające na m.in. wydajne pozyskiwanie frakcji lotnych z surowców o niewielkiej ich zawartości, wydało się odpowiednie do fitochemicznych badań skryningowych kultur *in vitro* bagna zwyczajnego, mogących, w różnych wariantach pożywek wzrostowych, wykazywać niskie, zmienne stężenia olejku

eterycznego. Skuteczność testowanej metody izolacji frakcji lotnych z biomas roślinnych oceniano na podstawie ilości pozyskanego olejku eterycznego oraz jego składu jakościowego i ilościowego (GC/MS) w zakresie poszczególnych terpenów, ze szczególnym uwzględnieniem połączeń dominujących, wykazujących określoną aktywność biologiczną. Eksperymenty przeprowadzono w oparciu o części nadziemne bagna zwyczajnego, zebrane jesienią w Lubichowie (Jesionek i in., 2019, V.5). Ze względu na dysponowanie niewystarczającą ilością biomas badanego gatunku z kultur *in vitro*, nie włączono ich do badań na etapie optymalizacji procedur izolacyjnych, lecz jedynie potwierdzono przydatność ostatecznie wybranej metody do pozyskiwania frakcji lotnych z mikropędów bagna. Przeprowadzone doświadczenie wykazało, że obydwie farmakopealne metody hydrodestylacji (w aparacie Derynga oraz Clevengera z dodatkiem ksylenu) prowadziły do otrzymania podobnej objętości olejku eterycznego z pędów rośliny gruntowej *R. tomentosum* (ok. 1000 µl 100 g^{-1} DW), w przeciwieństwie do SDE, w aparacie Likens-Nickersona, w którym pozyskano znacznie niższą ilość frakcji lotnej (ok. 790 µl 100 g^{-1} DW). Skład otrzymanych olejków eterycznych był również zbliżony, choć w przypadku zastosowania aparatu Clevengera zaobserwowano w destylacie wzrost zawartości *p*-cymenu (o 50%) oraz *γ*-terpineolu (o 20%), tj. związków decydujących, jak wykazano w dalszych badaniach, o chemotypie rośliny (Jesionek i in., 2019, V.6). Obserwowanemu zjawisku towarzyszyło jednoczesne nieznaczne zmniejszenie poziomu innych badanych terpenów, w tym ledolu i palustrolu. Wspomniane różnice mogły być częściowo skutkiem zastosowania podczas hydrodestylacji, w aparacie Clevengera, dodatku ksylenu (zalecenie FP X). Ostatecznie, w celu uzyskania z bagna zwyczajnego olejku eterycznego o stabilnym składzie, można polecić przeprowadzenie hydrodestylacji biomas roślinnych w aparacie Derynga (3 h), bez użycia dodatkowych rozpuszczalników.

Zoptymalizowaną metodę otrzymywania frakcji lotnych z *R. tomentosum* wykorzystano do oznaczenia ich zawartości w badanych matrycach roślinnych, jak również do prowadzenia w tym zakresie analiz porównawczych biomas pochodzących ze stanu naturalnego oraz ze wszystkich etapów eksperymentów biotechnologicznych (Jesionek i in., 2016, V.1; 2017, V.2; 2018, V.3, V.4; 2019, V.5, V.6). Ocenie poddano stężenia olejku eterycznego w pędach bagna zwyczajnego rosnącego na wybranych stanowiskach w województwie pomorskim, tj. na torfowisku nad jeziorem w Miszewku oraz na terenie podmokłym niedaleko Lubichowa, wczesnym latem i jesienią (Ryc. 5 a) (Jesionek i in., 2019, V.5). Najbardziej efektywnym producentem frakcji lotnej (tzw. „superproducentem") okazał się materiał gruntowy z Miszewka, zebrany w czerwcu (ok. 3500 µl 100 g^{-1} DW), co potwierdziło zasadność wyboru surowca z niniejszego stanowiska jako biomasy wyjściowej do inicjacji kultur *in vitro*, z przeznaczeniem do wydajnej biosyntezy olejku eterycznego (Rozdz. III.1.).



Ryc. 5. Zawartość olejku eterycznego z *Rhododendron tomentosum:* a) w pędach roślin gruntowych (wieloletnie i młode razem), rosnących w Miszewku i w Lubichowie, w województwie pomorskim, zebranych w czerwcu (VI) oraz w listopadzie (XI) 2016 r. (Jesionek i in., 2019, V.5); b) w kulturach pędowych *in vitro:* inicjalnych, na agarowym (0,6% *w/v*) podłożu SH z 9,84 µM 2iP i 1,00 µM TDZ; wydłużonych, na agarowym (0,6% *w/v*) podłożu SH z 24,60 µM 2iP; wytrząsanych, w płynnym podłożu SH z 24,60 µM 2iP i 592,02 µM AD; w bioreaktorze okresowo-zalewowym RITA®, w płynnym podłożu SH z 24,60 µM 2iP i 592,02 µM AD; w roślinie macierzystej* (pędy wieloletnie, zebrane w Miszewku w czerwcu 2014 r.) (Jesionek i in., 2016, V.1; 2017, V.2).

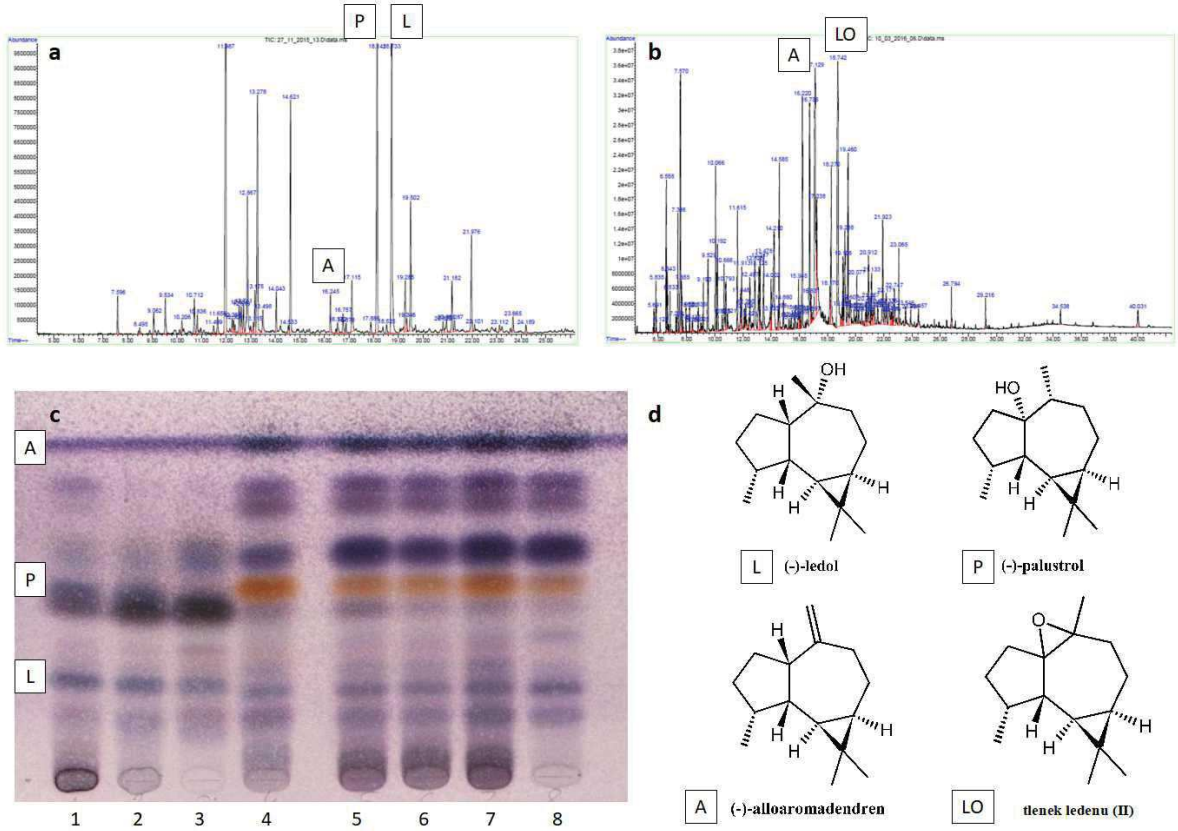
* *inoculum*, materiał referencyjny

OE - olejek eteryczny

W wyniku przeprowadzonych badań fitochemicznych, stwierdzono, że otrzymane mikropędy bagna zwyczajnego zachowały zdolność do produkcji frakcji lotnej, charakteryzowały się natomiast mniejszą wydajnością w tym zakresie niż rośliny macierzyste. Należy przy tym zaznaczyć, że stężenie olejku eterycznego w biomasach pozyskanych metodami biotechnologicznymi zależało od stopnia cytodyferencjacji tkanek oraz typu kultury (Ryc. 5 b) (Jesionek i in., 2016, V.1; 2017, V.2). Zgodnie z powyższym, wydłużenie primordiów pędowych skutkowało dwukrotnym zwiększeniem zawartości frakcji lotnej w kulturze względem biomasy inicjalnej (ok. 100 µl 100 g^{-1} DW *vs* ok. 50 µl 100 g^{-1} DW), podobnie jak zmiana systemu wzrostowego ze stacjonarnego na wytrząsany (ok. 50 µl 100 g^{-1} DW *vs* ok. 80 µl 100 g^{-1} DW).

Najwyższą zawartość olejku eterycznego oznaczono w mikropędach kultywowanych w bioreaktorze (Rozdz. III.3). Zwiększenie skali eksperymentu spowodowało aż dziesięciokrotny wzrost akumulacji terpenów w tkankach (ok. 500 µl 100 g^{-1} DW) (Ryc. 5 b). Choć niższy poziom biosyntezy frakcji lotnej w mikropędach w porównaniu do części nadziemnych materiału gruntowego zwraca uwagę, według danych literaturowych jest to zjawisko często spotykane w przypadku kultur *in vitro* roślin olejkowych (Gounaris, 2010). Nie wyklucza ono wykorzystywania biomas otrzymanych metodami biotechnologicznymi do pozyskiwania olejku eterycznego, gdyż ich szybki wzrost kompensuje mniejszą produktywność tkanek. Uzyskane *status quo* uznano ponadto jako wyjściowe do prowadzenia zaawansowanych doświadczeń w kulturach *in vitro*, których celem była intensyfikacja produkcji frakcji lotnych w opracowanych roślinnych systemach wzrostowych (Rozdz. III.3).

W celu rozpoznania pełnego profilu metabolicznego badanych matryc roślinnych w zakresie lotnych połączeń terpenowych, przeprowadzono analizę jakościową i ilościową olejków eterycznych, wyizolowanych z roślin gruntowych oraz z biomas *in vitro R. tomentosum*, za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC/MS). GC/MS, metoda z wyboru do oznaczania składu mieszanin substancji lotnych, umożliwia separację związków terpenowych, ich identyfikację na podstawie porównania widm masowych i indeksów retencji Kovatsa z bibliotekami danych oraz wyznaczenie zawartości procentowej poszczególnych metabolitów roślinnych podczas jednego rozdzielenia chromatograficznego (Marriott i in., 2001; Rubiolo i in., 2010). Powyższy etap badań realizowano we współpracy z prof. dr hab. inż. Bożeną Zabiegałą, w Katedrze Chemii Analitycznej Politechniki Gdańskiej, gdzie zoptymalizowano metodę GC/MS do analizy olejku eterycznego z biomas bagna zwyczajnego poprzez dobór rodzaju kolumny (DB-5ms 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) oraz parametrów chromatografowania, takich jak: prędkość przepływu gazu nośnego (hel, 1,1 ml min^{-1}) oraz programu temperaturowego (50 − 280°C, 7°C min^{-1}) (Jesionek i in., 2016, V.1; 2017, V.2; 2018, V.4; 2019, V.5). Przeprowadzone prace badawcze umożliwiły określenie wpływu warunków środowiskowych, w przypadku materiału gruntowego, oraz procedur biotechnologicznych, przeprowadzanych w kulturach *in vitro,* na skład chemiczny frakcji lotnych z bagna zwyczajnego, co omówiono dokładnie w poszczególnych publikacjach (Jesionek i in., 2016, V.1; 2017, V.2; 2018, V.3, V.4; 2019, V.5, V.6). Poniżej zasygnalizowano jedynie podstawowe różnice w kompozycjach olejków eterycznych, pozyskanych z materiału gruntowego oraz z mikropędów *R. tomentosum* (Ryc. 6 a,b).

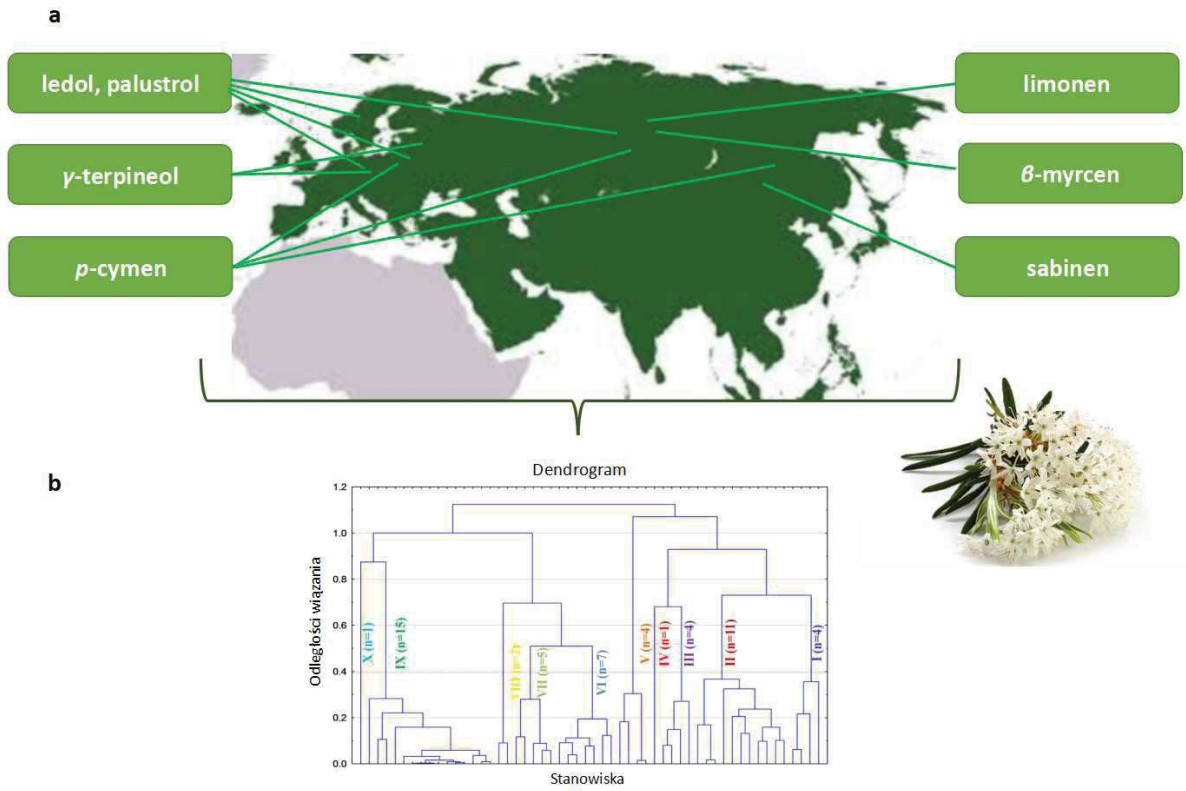


Ryc. 6. Chromatogramy GC/MS olejków eterycznych z *Rhododendron tomentosum:* a) z młodych pędów roślin gruntowych, rosnących w Miszewku, oraz b) z kultur pędowych *in vitro*, kultywowanych w bioreaktorze RITA® przez 28 dni; c) chromatogram HPTLC olejków eterycznych z surowców gruntowych (1-3) oraz z pędowych kultur *in vitro R. tomentosum* (4-8) – analiza jakościowa (faza stacjonarna: HPTLC Platten Kieselgel 60, faza ruchoma: heksan : octan etylu 9:1 *v/v*, odczynnik derywatyzujący: aldehyd anyżowy w kwasie siarkowym (VI); olejki eteryczne: 1, 2 – odpowiednio z jednorocznych i wieloletnich pędów z Miszewka; 3 – z pędów z Lubichowa; 4 – z pędowych kultur stacjonarnych (0,6% *w/v* agaru) rosnących na podłożu SH z 24,60 µM 2iP; 5, 6, 7 – z pędowych kultur namnażanych w bioreaktorach okresowo-zalewowych: RITA® (5), Plantform (7), prototypowym szklanym (6); 8 – z pędowych kultur namnażanych w pojemniku Magenta™); d) wybrane związki o szkielecie aromadendranu, znajdujące się w olejkach eterycznych z *R. tomentosum* (L – ledol, P – palustrol, A – alloaromadendren, LO – tlenek ledenu (II)).

Wyniki oznaczeń chromatograficznych metodą GC/MS frakcji lotnych z pędów bagna zwyczajnego, zebranych z kilku wybranych stanowisk (Polska: Miszewko i Lubichowo, Finlandia: Turku, Kazachstan: produkt komercyjny − „Kazanak bagulnik", Zerde-Fito, Szymkent, 39654522-08-2010), w odmiennej fazie okresu wegetacyjnego (czerwiec, listopad) oraz różniących się wiekiem morfologicznym (jednoroczne, wieloletnie) (Jesionek i in., 2016, V.1; 2018, V.3; 2019, V.5) potwierdziły doniesienia literaturowe na temat znacznego zróżnicowania składu chemicznego olejków eterycznych z omawianego surowca, tak pod względem

jakościowym, jak i ilościowym (Belousova i in., 1990; Butkiene i in., 2008; Butkiene i Mockute, 2011; Gretsusnikova i in., 2010; Judzentiene i in., 2012; Zhang i in., 2017). Zaobserwowano, że biotop wpływa w sposób istotny na zawartość głównych związków terpenowych w badanym zespole metabolitów wtórnych: *p*-cymenu, *γ*-terpineolu, palustrolu oraz ledolu, stanowiących o chemotypie *R. tomentosum* (Jesionek i in., 2019, V.6). Podstawowym składnikiem frakcji lotnej z bagna zwyczajnego, pozyskanego ze stanowisk pomorskich, był γ-terpineol (11,8-22,2% – Lubichowo i 8,5-9,1% – Miszewko), podobnie jak w przypadku pędów zebranych w Estonii (Raal i in, 2014), przy czym stwierdzono, że ilość powyższego metabolitu zależała od wieku rośliny (Jesionek i in., 2016, V.1). Seskwiterpeny o szkielecie aromadendranu (Ryc. 6 d), specyficzne dla europejskiego chemotypu omawianego gatunku, stanowiły także istotny składnik testowanych olejków eterycznych (ledol: 2,3-3,5% – Lubichowo i 8,1-14,4% – Miszewko; palustrol: 0,8-3,8% – Lubichowo i 6,9-13,0% – Miszewko; alloaromadendren: 1,3-1,8% – Lubichowo i 2,0% – Miszewko; Ryc. 6 a), choć ich zawartość była dużo niższa niż, przykładowo, w surowcu pochodzącym z Finlandii (Jesionek i in., 2018, V.3). Ponadto, podlegała ona fluktuacjom w zależności od pory roku (Jesionek i in., 2019, V.5).

Znaczne zróżnicowanie stężeń głównych komponentów frakcji lotnych z bagna zwyczajnego, pochodzącego z różnych biotopów, potwierdziła także statystyczna analiza porównawcza, przeprowadzona we współpracy z prof. dr hab. Adamem Bucińskim, kierownikiem Katedry i Zakładu Biofarmacji Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy. Obejmowała ona dane literaturowe i wyniki badań własnych, dotyczące surowców zebranych łącznie z 54 stanowisk w Europie i Azji, odmiennych pod względem współrzędnych geograficznych, warunków środowiskowych i czynników klimatotwórczych (Jesionek i in., 2019, V.6). Za pomocą hierarchicznej analizy klastrów wykazano istnienie aż dziesięciu chemotypów *R. tomentosum*. Uogólniając, rośliny pochodzące z Europy charakteryzowały się dużą zawartością ledolu i palustrolu. Na terenie Rosji przeważały osobniki bogate w *p*-cymen i limonen, podczas gdy chińskie odmiany cechował wysoki poziom sabinenu (Ryc. 7) (Jesionek i in., 2019, V.6). Niejednorodny skład chemiczny olejków eterycznych z części nadziemnych *R. tomentosum* wskazuje na konieczność każdorazowego rozpoznawania ich profilu metabolicznego przy zbiorze roślin przeznaczonych do badań oraz ewentualnego zastosowania terapeutycznego, ze względu na możliwe rozbieżności w wykazywanej aktywności biologicznej, warunkowanej obecnością poszczególnych związków terpenowych oraz ich ilością. Rozwiązaniem prowadzącym do uzyskania przewidywalnej zawartości substancji czynnych we frakcjach lotnych z bagna zwyczajnego wydają się być pędowe kultury *in vitro* omawianego gatunku, syntezujące pożądane połączenia chemiczne na stałym poziomie, niezależnie od warunków środowiskowych.



Ryc. 7. a) Wybrane związki terpenowe, dominujące w kompozycjach olejków eterycznych, pozyskanych z *R. tomentosum* zebranego z różnych stanowisk w Europie i Azji; b) dendrogram otrzymany na podstawie hierarchicznej analizy klastrów, będący podstawą do wyróżnienia dziesięciu chemotypów *R. tomentosum* ze względu na skład chemiczny frakcji lotnej (Jesionek i in., 2019, V.6).

Na podstawie przeprowadzonej analizy GC/MS stwierdzono, że kultury *in vitro* wyprowadzone z fragmentów liści *R. tomentosum* (Rozdz. III.1) różniły się istotnie od rośliny macierzystej w zakresie kompozycji syntezowanego olejku eterycznego (Jesionek i in., 2016, V.1; 2017, V.2; 2018, V.3; 2019, V.5). W mikropędach bagna zwyczajnego nie odnotowano obecności ledolu, alkoholu seskwiterpenowego charakterystycznego dla materiału gruntowego. W kulturach *in vitro* pojawiła się natomiast jego pochodna, tlenek ledenu (II) (Ryc. 6 d), przypuszczalnie stanowiąca etap pośredni szlaku metabolicznego przemiany alloaromadendrenu w palustrol (Jesionek i in., 2018, V.3). Obserwowane zjawisko może wiązać się z innym wykorzystaniem wczesnych prekursorów terpenowych przez szlaki metaboliczne obecne w mikropędach *R. tomentosum* (konkurencja równoległych szlaków biochemicznych wobec substratów; Gijsen i in., 1995). Poziom alloaromadendrenu, który we frakcjach lotnych z pędów bagna zwyczajnego nie przekraczał 2,5%, w biomasach *in vitro* wzrósł nawet czterokrotnie (Ryc. 6 b). Z kolei, w odróżnieniu od rośliny macierzystej, w mikropędach stwierdzono jedynie śladowe ilości palustrolu i γ-terpineolu, a głównymi składnikami olejku eterycznego były, oprócz

alloaromadendrenu i tlenku ledenu (II), *p*-cymen, sziobunon, 6-episziobunon i ewerninan metylu, który nie został zidentyfikowany w materiale gruntowym z *R. tomentosum*. W przypadku mikropędów pozyskanych na różnych etapach doświadczeń biotechnologicznych (biomasy inicjalne, wydłużone primordia pędowe, kultury wytrząsane, mikropędy kultywowane w bioreaktorach; Rozdz. III.3) zmienność matryc roślinnych w zakresie składu chemicznego frakcji lotnych była niewielka i dotyczyła przede wszystkim różnic ilościowych. Specyfika profilu metabolicznego olejków eterycznych w biomasach *in vitro R. tomentosum* wydaje się być interesująca ze względu na podobieństwo do rośliny macierzystej, pod kątem obecności terpenów o właściwościach przeciwzapalnych i przeciwbólowych, takich jak: *p*-cymen (Bonjardim i in., 2012; Santana i in., 2011; Xie i in., 2012), *δ*-2-karen (Miguel, 2010), sabinen (Valente i in., 2013), octan citronelylu (Rios i in., 2013), przeciwnowotworowych: alloaromadendren (Mah i in., 2013), *γ*-terpineol (Wu i in., 2014) oraz repelentnych: 4-terpineol (Guo i in. 2016), *δ*-2-karen (Chu i in., 2011), sziobunon (Chen i in., 2015). Ponadto, z uwagi na obecność unikatowych, różniących się od roślin gruntowych, szlaków biochemicznych (zmienny skład frakcji lotnej), mikropędowy system wzrostowy *R. tomentosum* można uznać za całkiem nowy materiał roślinny o nieprzebadanym i obiecującym potencjale biotechnologicznym.

Jak stwierdzono, zastosowana metoda GC/MS pozwoliła na precyzyjne rozpoznanie składu chemicznego olejków eterycznych z omawianych surowców *R. tomentosum*, jej mankamentem jednak jest wysoki koszt pojedynczej analizy oraz możliwość przebadania w trakcie eksperymentu tylko jednej matrycy biologicznej. Do wielu próbek, otrzymywanych w toku prac biotechnologicznych, jak również podczas doświadczeń mających na celu określenie chemotypu surowca lub zawartości w nim związków terpenowych o wybranych właściwościach farmakologicznych bądź toksycznych, potrzebna jest analiza prosta w wykonaniu, szybka i tania, a zarazem umożliwiająca jednoczesne oznaczenie jak największej ilości frakcji lotnych, bez dysponowania specjalistyczną aparaturą. Powyższe założenia spełnia chromatografia cienkowarstwowa (TLC), która wydaje się być efektywnym narzędziem do prowadzenia testów skryningowych materiałów roślinnych, także w zakresie olejków eterycznych. Pomimo że technika ta uważana jest za wstępny sposób separacji i oznaczania analitów, może również stanowić samodzielne źródło informacji na temat ich tożsamości, a także pozwolić na sprawne wytypowanie surowca o wysokim potencjale w zakresie biosyntezy związków terpenowych (Attimarad i in., 2011).

W związku z powyższym, w toku doświadczeń fitochemicznych, realizowanych w ramach projektu doktorskiego, przeprowadzono optymalizację warunków rozdzielenia chromatograficznego składników frakcji lotnych z roślin gruntowych oraz mikropędów bagna zwyczajnego za pomocą TLC, w celu analizy jakościowej badanych próbek, ze szczególnym

uwzględnieniem identyfikacji związków o szkielecie aromadendranu (kochromatografia z substancjami wzorcowymi; Jesionek i in., 2018, V.3). Następnie opracowano metodę ilościowego oznaczania ledolu i alloaromadendrenu, tj. głównych komponentów olejków eterycznych z roślin gruntowych i z kultur *in vitro R. tomentosum*, korzystając z wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC) z detekcją densytometryczną. Ostatecznie, zoptymalizowaną metodę chromatografowania poddano walidacji, w celu matematycznego potwierdzenia jej przydatności pod kątem powtarzalnych i dokładnych analiz skryningowych biomas bagna zwyczajnego, ukierunkowanych na ocenę zawartości w matrycach roślinnych omawianych związków terpenowych (Jesionek i in., 2018, V.3).

Przeprowadzona, metodą prób i błędów, optymalizacja warunków rozdzielenia olejków eterycznych z *R. tomentosum* za pomocą TLC obejmowała dobór fazy stacjonarnej (płytki TLC i HPTLC z żelem krzemionkowym) i ruchomej (12 wariantów mieszanin rozpuszczalników o odmiennej sile elucji), dystansu migracji analitów (4 – 7 cm), sposobu rozwijania chromatogramów (prekondycjonowanie płytek, różny stopień nasycenia komory fazą ruchomą) oraz derywatyzacji rozdzielonych terpenów celem ich wizualizacji (5 odczynników kompleksujących, z uwzględnieniem obserwacji w świetle VIS i UV). Modyfikowano również sposób wywoływania chromatogramów, stosując technikę spryskiwania lub zanurzania płytek w mieszaninie derywatyzującej. Uzyskane podczas powyższych eksperymentów rozdzielenia chromatograficzne wraz ze szczegółowym opisem wyników analiz zawarto w suplemencie do manuskryptu opublikowanego w *Journal of Chromatography B* (Jesionek i in., 2018, V.3). Najbardziej optymalną separację analizowanych frakcji lotnych na ok. 14 pasm, charakteryzujących się dobrą koncentracją oraz symetrycznym rozmieszczeniem na chromatogramie, odnotowano na wysokosprawnych płytkach żelowych, przy użyciu mieszaniny heksan : octan etylu (9:1 *v/v*) jako fazy ruchomej i dystansie migracji wynoszącym 5 cm, stosując 10-minutową saturację komory bez prekondycjonowania płytek. Z kolei, odczynnik anyżowy (aldehyd anyżowy rozpuszczony w mieszaninie kwasu siarkowego (VI) i octowego) (Borkowski, 1973), wyselekcjonowany do wywoływania terpenów metodą spryskiwania, warunkował pojawienie się pasm badanych związków o najbardziej zróżnicowanych barwach, co ułatwiało analizę jakościową metabolitów roślinnych w świetle widzialnym (λ=520 nm; Ryc. 6 c). Na otrzymanych chromatogramach zaobserwowano niejednakową intensywność pasm poszczególnych analitów w próbkach, co świadczyło o zmiennych stężeniach terpenowych składników w olejkach eterycznych z bagna zwyczajnego w zależności od miejsca zbioru surowca gruntowego oraz jego wieku, a także, w przypadku kultur *in vitro*, od zastosowanego systemu wzrostowego. Dodatkowo, wyniki analiz HPTLC wykazały znaczną różnicę jakościową między frakcjami lotnymi pozyskanymi z kultur *in vitro* a olejkami

wyizolowanymi z rośliny macierzystej. W tkankach mikropędów *R. tomentosum* przeważały związki terpenowe o większej polarności (Rf > 0,5), a ponadto, w omawianym przypadku, pojawiło się charakterystyczne, nowe, niezidentyfikowane połączenie o intensywnie pomarańczowej barwie (Rf = 0,6; Ryc. 6 c).

Jak wspomniano, oznaczeniom ilościowym za pomocą metody HPTLC z detekcją densytometryczną poddano, w matrycach roślinnych, ledol i alloaromadendren. Szybkie określenie zawartości głównych składników olejków eterycznych w badanym materiale gruntowym i biomasach mikropędowych *R. tomentosum* z poszczególnych etapów eksperymentów biotechnologicznych w założeniu mogłoby ułatwić określenie potencjału produkcyjnego roślinnych systemów wzrostowych w zakresie frakcji lotnych oraz pozwoliłoby na ustalenie skuteczności przeprowadzonych doświadczeń *in vitro*. Należy również zaznaczyć, że ledol, dawniej stosowany w medycynie tradycyjnej jako czynnik przeciwkaszlowy, dziś ma przede wszystkim znaczenie toksykologiczne, ze uwagi na swoje właściwości odurzające (Dampc i Łuczkiewicz, 2013, IV.1). Z tego względu monitorowanie stężenia niniejszych metabolitów w surowcach przeznaczonych do stosowania terapeutycznego ma znaczenie kluczowe.

Jako że w układzie chromatografowania, zaproponowanym do analizy jakościowej frakcji lotnych z *R. tomentosum,* alloaromadendren migrował z czołem fazy ruchomej (Rf = 1,0) (Ryc. 6 c), do oznaczeń ilościowych niniejszego terpenu zmieniono warunki rozdzielenia, stosując 20-minutowe prekondycjonowanie płytek, 4-centymetrowy dystans rozwijania oraz, na etapie wizualizacji, zanurzenie chromatogramów w odczynniku wanilinowym (wanilinie rozpuszczonej w kwasie *o*-fosforowym) (Waksmundzka-Hajos i in., 2008). Zmienione warunki analizy umożliwiły obniżenie współczynnika Rf dla omawianego metabolitu (Rf = 0,8), a jednocześnie zapewniły dobrą integrację pasm, reprezentujących badane terpeny. Po dobraniu odpowiednich parametrów detekcji densytometrycznej, zoptymalizowaną metodę oznaczania ledolu i alloaromadendrenu techniką HPTLC poddano kompletnej walidacji, obejmującej wyznaczenie selektywności, limitu oznaczalności i detekcji, zakresu liniowości, powtarzalności, precyzji wewnątrz- i międzygrupowej, dokładności oraz odporności (Jesionek i in., 2018, V.3). Opracowane warunki chromatografowania wykorzystano do przeprowadzenia testów skryningowych badanych matryc roślinnych z gruntu oraz z kultur *in vitro* w zakresie niniejszych metabolitów. Potwierdziły one poczynione wcześniej, na podstawie wyników GC/MS, obserwacje, na temat dużego zróżnicowania zawartości ledolu w surowcu gruntowym, w zależności od jego wieku i pochodzenia, a także stwierdzenie braku obecności w mikropędach *R. tomentosum* powyższego połączenia przy jednoczesnej wysokiej zawartości alloaromadendrenu. Zbieżność wyników analiz porównawczych (GC/MS i HPTLC), dotyczących składu ilościowego podstawowych terpenów w olejkach eterycznych z bagna zwyczajnego (Jesionek i in., 2018, V.3),

wykazała skuteczność, zoptymalizowanej w toku prac eksperymentalnych, metody HPTLC z detekcją densytometryczną w fitochemicznych badaniach skryningowych biomas *R. tomentosum*, w zakresie frakcji lotnych.

Podsumowując, w wyniku przeprowadzonych doświadczeń fitochemicznych zoptymalizowano procedury suszenia matryc roślinnych z bagna zwyczajnego oraz pozyskiwania z nich olejku eterycznego techniką hydrodestylacji. Miały one charakter ochronny w stosunku do terpenowych składników badanych frakcji lotnych i umożliwiały jednoetapowe otrzymywanie czystego olejku eterycznego wraz z oznaczeniem jego zawartości w biomasach. Ponadto, wykonano jakościowe oraz ilościowe analizy chromatograficzne frakcji lotnych z bagna zwyczajnego za pomocą dwóch metod: GC/MS i HPTLC z detekcją densytometryczną. W warunkach opracowanych w toku prowadzonych badań stwierdzono, że chromatografia gazowa, dedykowana do ustalania składu jakościowego oraz ilościowego mieszanin terpenów, powinna być stosowana do precyzyjnego określania profilu chemicznego olejków eterycznych izolowanych z biomas *R. tomentosum*, podczas gdy chromatografia cienkowarstwowa, umożliwiająca porównanie wielu próbek w tym samym czasie, może być, jak wykazały obliczone parametry walidacji, z powodzeniem wykorzystana do przeprowadzenia rutynowych, szybkich testów skryningowych badanego materiału roślinnego pod kątem związków dominujących. W związku z tym, w toku zaawansowanych eksperymentów biotechnologicznych, ciągły monitoring skuteczności zabiegów doświadczalnych, mających na celu podwyższenie poziomu biosyntezy olejku eterycznego w namnażanych matrycach bagna zwyczajnego, prowadzono metodą HPTLC, zaś szczegółowe profilowanie metaboliczne wysokoprodukcyjnych roślinnych systemów *in vitro* (analizy jakościowe i ilościowe olejków eterycznych) wykonywano techniką GC/MS.

III.3. Kultury pędów *Rhododendron tomentosum* prowadzone w bioreaktorach jako źródło aktywnych biologicznie związków terpenowych

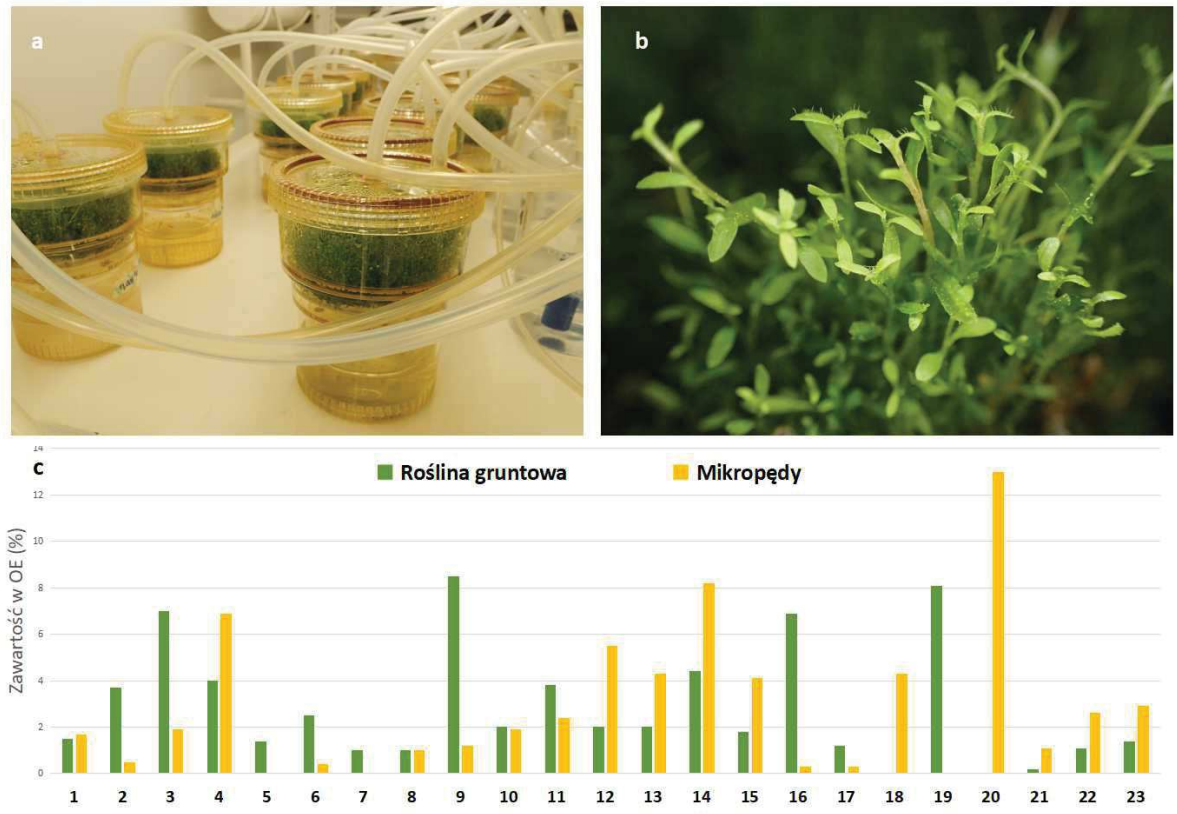
Po zoptymalizowaniu procedur analitycznych, umożliwiających monitorowanie zawartości i składu chemicznego olejku eterycznego w biomasach *R. tomentosum*, przystąpiono do dalszych badań biotechnologicznych, mających na celu opracowanie roślinnego systemu wzrostowego z przeznaczeniem do produkcji lotnych terpenów aktywnych biologicznie. Jak wspomniano uprzednio, kultury *in vitro* bagna zwyczajnego, podobnie jak rośliny gruntowe niniejszego gatunku, charakteryzuje stosunkowo niewielkie stężenie frakcji lotnej (ok. 50-100 µl 100 g^{-1} DW) (Rozdz. III.2; Jesionek i in., 2016, V.1). By umożliwić pozyskanie mierzalnej objętości olejku eterycznego z matryc roślinnych metodą hydrodestylacji, konieczne jest więc dostarczenie dużej ilości surowca, czego nie zapewnia eksperyment biotechnologiczny wykonywany w standardowej, 250 ml kolbie Erlenmeyera, wykorzystywanej powszechnie do prowadzenia kultur płynnych wytrząsanych. Z tego względu postanowiono zwiększyć skalę kultywacji mikropędów bagna zwyczajnego z wykorzystaniem instalacji wielkolaboratoryjnych. Przeniesienie biomas roślinnych do bioreaktorów stanowi ponadto końcowy etap opracowywania procedur biotechnologicznego otrzymywania produktów pochodzenia naturalnego (Bourgaud i in., 2001). Warto w tym miejscu wspomnieć o udanym wdrożeniu produkcji, w warunkach *in vitro*, na skalę przemysłową, następujących roślinnych metabolitów wtórnych o działaniu leczniczym: szikoniny (*Lithospermum erythrorhizon*, zawiesina komórkowa), paklitakselu (*Taxus* spp., zawiesina komórkowa) oraz ginsenozydów (*Panax ginseng*, zawiesina komórkowa i korzenie odcięte) (Bourgaud i in., 2001; Ruffoni i in., 2010; Verpoorte i in., 1999). Doniesień dotyczących pozyskiwania olejków eterycznych z kultur pędów, namnażanych w bioreaktorach, odnotowano jednak do tej pory niewiele (Fulzele i in., 1995; Hilton i in., 1995; Tisserat i Vaughn, 2008). Być może jest to spowodowane obniżoną produktywnością biomas w zakresie lotnych połączeń terpenowych, wynikającą z braku naturalnych czynników stresogennych w kulturach *in vitro*, zapoczątkowujących biosyntezę olejków eterycznych (Gorelick i Bernstein, 2014). Zgodnie zatem z założeniem pracy doktorskiej, w dalszej kolejności podjęto również próbę stymulacji akumulacji aktywnej farmakologicznie frakcji lotnej w mikropędach *R. tomentosum*, rosnących w wybranym typie bioreaktora, stosując stres środowiskowy w postaci elicytorów biotycznych i abiotycznych, dodanych do podłoży wzrostowych.

W celu efektywnego zwiększenia skali kultywacji pędów bagna zwyczajnego w warunkach *in vitro*, zbadano wpływ konstrukcji pięciu typów naczyń hodowlanych na przyrost biomas oraz zawartość i skład chemiczny wyizolowanych z nich olejków eterycznych (Jesionek

i in., 2017, V.2). Według danych literaturowych, do namnażania mikropędów nie są wskazane instalacje z wymuszonym mieszaniem mechanicznym, w których może dojść do rozerwania, pod wpływem sił tnących, struktur tkankowych, a tym samym do ich nekrozy. Lepszym rozwiązaniem w omawianym przypadku wydaje się być napowietrzanie i mieszanie kultury na drodze pneumatycznej lub natryskowej (Malepszy, 2012). Ze względu na specyfikę bagna zwyczajnego, preferującego glebę podmokłą, do badań włączono przede wszystkim systemy okresowo-zalewowe, zapewniające mikropędom warunki najbardziej zbliżone do naturalnych (Georgiev i in., 2014). Wykorzystano zarówno bioreaktory komercyjne, z tworzywa sztucznego, wyposażone w wewnętrzny rezerwuar pożywki (RITA®, Vitropic, Francja; PLANTFORM, Plant Form AB, Irlandia), jak i prototypową instalację szklaną z zewnętrznym zbiornikiem podłoża wzrostowego. Dodatkowo, przetestowano także szklany bioreaktor natryskowy oraz pojemnik Magenta™ (Sigma-Aldrich, US-MO), reprezentujący system zalewowy, zaopatrzony w, służącą do immobilizacji biomasy, siatkę ze stali nierdzewnej. Wykorzystane w eksperymencie bioreaktory szklane zostały skonstruowane w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, w grupie badawczej prof. dr hab. Marii Łuczkiewicz, przez dr. Adama Kokotkiewicza (Jesionek i in., 2017, V.2). We wszystkich wariantach doświadczalnych zastosowano płynne medium SH z dodatkiem 24,60 μM 2iP i 592,02 μM AD, zapewniające najlepszy przyrost biomasy *R. tomentosum* na etapie kultur wytrząsanych (Rozdz. III.1; Jesionek i in., 2017, V.2). Na podstawie oceny parametrów wzrostowych (FW, DW, Wp) oraz makroskopowej obserwacji morfologii namnażanych mikropędów, a także oznaczonej ilości i składu chemicznego zawartych w nich olejków eterycznych, dokonano wyboru roślinnego systemu *in vitro*, zdolnego do wydajnej i ciągłej produkcji frakcji lotnej, charakterystycznej dla badanego gatunku (Jesionek i in., 2017, V.2).

W wyniku przeprowadzonej serii doświadczeń, stwierdzono istotny wpływ konstrukcji naczynia wzrostowego zarówno na metabolizm pierwotny, jak i wtórny kultury pędowej bagna zwyczajnego (Jesionek i in., 2017, V.2). Uwzględniając otrzymane rezultaty, wybrano bioreaktor RITA® (Ryc. 8 a) jako instalację warunkującą najwyższy przyrost mikropędów (Wp = 280%, DW = 19,98 g l^{-1}) oraz dużą żywotność biomas (Ryc. 8 b), w których stwierdzono zintensyfikowaną biosyntezę olejku eterycznego (ok. 500 μl 100 g^{-1} DW). Uzyskane w omawianym przypadku stężenie frakcji lotnej w matrycach roślinnych przewyższało pięciokrotnie zawartości olejku w kulturach stacjonarnych i wytrząsanych bagna zwyczajnego (Jesionek i in., 2016, V.1; Jesionek i in., 2017, V.2), dorównując w tym względzie roślinom gruntowym (Ryc. 5). Na tej podstawie uznano, że dwufazowy okresowo-zalewowy system kultywacji RITA®, pozwalający na stopniowe osuszanie zroszonych pożywką mikropędów w fazie gazowej, a tym samym umożliwiający uniknięcie efektu podtapiania i hipoksji tkanek, wraz z umiarkowanym stresem mechanicznym

związanym z cyklicznym, intensywnym napowietrzaniem oraz mieszaniem pneumatycznym, a także wysoka wilgotność powietrza, generowana obecnością wewnętrznego zbiornika pożywki, są korzystne dla optymalnego wzrostu i produktywności kultur pędowych *R. tomentosum*. Do zalet omawianego bioreaktora należy także zaliczyć możliwość zwiększenia skali eksperymentu poprzez szeregowe połączenie wielu pojemników RITA® (Ryc. 8 a), a tym samym potencjalnego uzyskania dużej ilości biomasy w czasie trwania pojedynczego doświadczenia, co, jak wspomniano, jest szczególnie istotne w przypadku badań nad bagnem zwyczajnym, gatunkiem syntezującym stosunkowo niewielkie ilości olejku eterycznego.



Ryc. 8. a) 28-dniowe mikropędy *Rhododendron tomentosum* w, połączonych szeregowo, bioreaktorach okresowo-zalewowych RITA®; b) morfologia mikropędów bagna zwyczajnego, kultywowanych w instalacjach wielkolaboratoryjnych; c) zawartość procentowa* głównych związków terpenowych (≥ 1%) w olejkach eterycznych wyizolowanych z rośliny gruntowej, zebranej w czerwcu ze stanowiska w Miszewku, oraz z mikropędów *R. tomentosum*, kultywowanych w bioreaktorach RITA® w podłożu SH z 24,60 µM 2iP i 592,02 µM AD, przez 28 dni (1 – sabinen; 2 – *β*-myrcen; 3 – *δ*-2-karen; 4 – *p*-cymen; 5 – limonen; 6 – *γ*-terpinen; 7 – linalol; 8 – terpinen-4-ol; 9 – *γ*-terpineol; 10 – octan bornylu; 11 – octan geranylu; 12 – alloaromadendren; 13 – 6-episziobunon; 14 – sziobunon; 15 – *δ*-kadinen; 16 – palustrol; 17 – germakren D-4-ol; 18 – ewerninan metylu; 19 – ledol; 20 – tlenek ledenu (II); 21 – dehydroksy-izokalamendiol; 22 – τ-kadinol; 23 – α-kadinol).

* dane stanowią średnie arytmetyczne z dwóch oznaczeń olejków metodą GC/MS; OE - olejek eteryczny

Analizując skład chemiczny frakcji lotnych wyizolowanych z mikropędów *R. tomentosum*, rosnących w różnych bioreaktorach, można zauważyć, że profil związków terpenowych w biomasach namnażanych w poszczególnych instalacjach okresowo-zalewowych był bardzo zbliżony i charakteryzował się niewielkimi różnicami ilościowymi w grupie badanych metabolitów. Z kolei, kultury pochodzące z systemów: zalewowego i natryskowego wyróżniały się olejkami eterycznymi wyraźnie uboższymi pod względem występujących w nich składników terpenowych, co mogło sugerować negatywny wpływ konstrukcji bioreaktora na kompozycję frakcji lotnych (Jesionek i in., 2017, V.2). W olejkach otrzymanych z mikropędów *R. tomentosum*, namnażanych w systemie RITA®, zapewniającym najbardziej korzystne warunki do wzrostu badanych kultur, zidentyfikowano ok. 43 związki terpenowe, występujące również w roślinach macierzystych, choć w nieco innych proporcjach ilościowych (Ryc. 8 c). Ponadto, w biomasach pozyskanych z instalacji wielkolaboratoryjnych, podobnie jak w kulturach stacjonarnych czy wytrząsanych, pojawiły się nowe połączenia, nieobecne w warunkach gruntowych, takie jak: ewerninan metylu oraz tlenek ledenu (II), przy jednoczesnym braku ledolu, limonenu czy linalolu, zidentyfikowanych w pędach rośliny macierzystej, zebranych z okolic Miszewka (Ryc. 8 c). Obserwowane zjawisko może wskazywać na odmienny przebieg lub aktywność, w warunkach *in vitro*, niektórych szlaków biochemicznych dotyczących biosyntezy lotnych terpenów, które zdawały się być w większym stopniu ukierunkowane na biosyntezę seskwiterpenów niż związków monoterpenowych, w odróżnieniu od materiału roślinnego zebranego ze stanu naturalnego.

Zważywszy na to, że bioreaktor RITA® okazał się najbardziej odpowiedni do realizacji założeń badawczych, w ramach niniejszej instalacji, postanowiono określić pełny profil wzrostowy oraz produkcyjny mikropędów *R. tomentosum* z uwagi na zawartość lotnych terpenów (Jesionek i in., 2017, V.2). Ustalenie potencjału biosyntetycznego kultur *in vitro* bagna zwyczajnego w zakresie produkcji olejku eterycznego, charakteryzującego się specyficzną aktywnością biologiczną, jest szczególnie istotne z perspektywy późniejszego wykorzystania opracowanego systemu roślinnego w celach komercyjnych. Określenie parametrów wzrostowych biomasy (FW, DW, Wp), podczas 63-dniowego okresu kultywacji, pozwoliło na wyznaczenie przedziałów czasowych, w których następowały poszczególne stadia rozwojowe pędów, takich jak: faza spoczynkowa (0 – 7 dni), wzrostu logarytmicznego (7 – 21 dni) i liniowego (21 – 28 dni), *plateau* (28 – 56 dni) oraz słabo zaznaczona faza obumierania (56 – 63 dni). Ponadto, stwierdzono, że już po czterech tygodniach inkubacji matryc roślinnych w bioreaktorze można otrzymać kulturę syntezującą olejek na wysokim poziomie (ok. 500 µl 100 g^{-1} DW). Uzyskana zawartość frakcji lotnej w tkankach utrzymywała się w tym samym zakresie przez kolejny miesiąc eksperymentu. Ze względu na powyższe wydaje się, że roślinny system wzrostowy opracowany

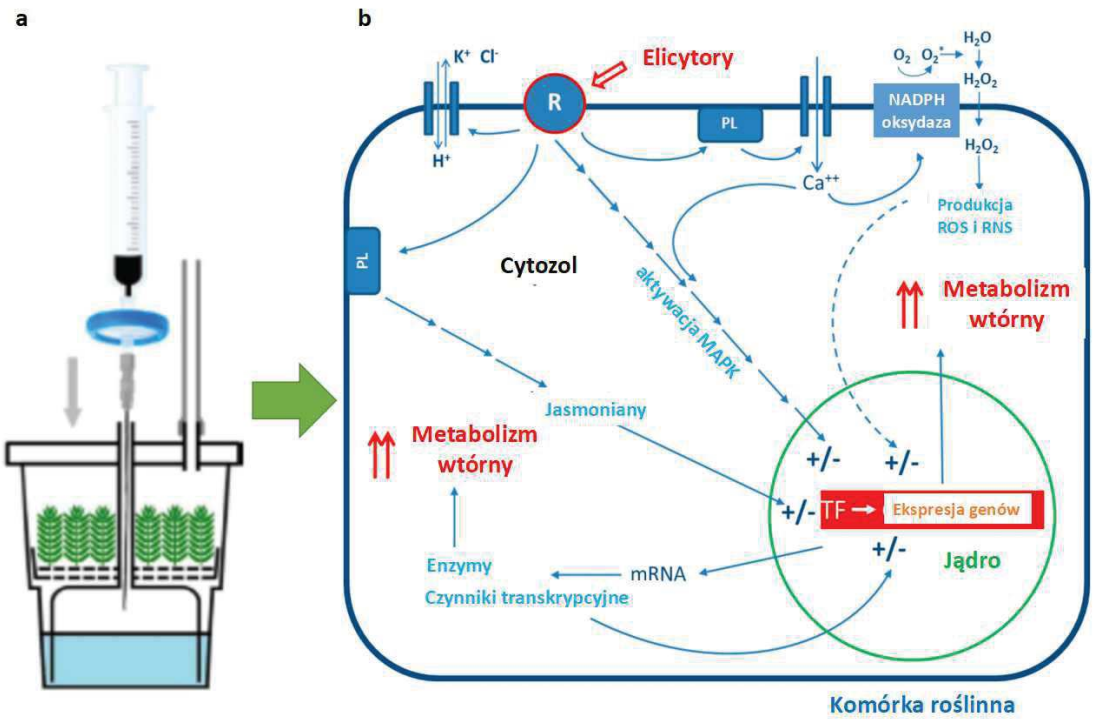
dla biomas bagna zwyczajnego stwarza podstawy do dalszych badań nad jego wykorzystaniem na skalę techniczną. Warto również zaznaczyć, że choć zawartość głównych związków terpenowych w tkankach podlegała niewielkim fluktuacjom w trakcie trwania eksperymentu, to ogólny profil jakościowy frakcji lotnej z mikropędów *R. tomentosum* pozostał niezmieniony (Jesionek i in., 2017, V.2).

Zgodnie z założeniami projektu (Rozdz. II), kolejne strategie biotechnologiczne, mające na celu stymulację produkcji olejku eterycznego w mikropędach bagna zwyczajnego, testowano na biomasach kultywowanych w bioreaktorze RITA®, traktowanym jako docelowa instalacja wielkolaboratoryjna.

Jak już wcześniej wspomniano, w toku dalszych doświadczeń, z zakresu kultur *in vitro*, w celu podwyższenia zawartości frakcji lotnej w pędach *R. tomentosum*, zastosowano technikę elicytacji. Pomimo wielu lat badań, nie wyjaśniono ostatecznie mechanizmów molekularnych dotyczących relacji między stresem środowiskowym a biosyntezą fitofarmaceutyków w kulturach *in vitro* (Zhao i in., 2005) (Ryc. 9 b). Liczni biotechnolodzy wskazują natomiast na znaczną skuteczność stosowania szeroko rozumianej elicytacji w celu indukcji bądź zwiększenia poziomu biosyntezy wtórnych metabolitów, uczestniczących w odpowiedziach obronnych testowanych gatunków (Giri i Zaheer, 2016; Gorelick i Bernstein, 2014; Ramirez-Estrada i in., 2016). Jednocześnie, w modelach eksperymentalnych, obejmujących różne rośliny i typy kultur (*in vitro*, gruntowe oraz hydroponiczne), a także odmienne czynniki stresogenne (biotyczne i abiotyczne), przeprowadzone procedury, w większości przypadków, okazywały się efektywne w kontekście stymulacji akumulacji terpenowych składników olejków eterycznych, prowadząc nawet do kilkukrotnego wzrostu, w badanych matrycach, zawartości procentowej frakcji lotnej (Deschamps i in., 2008; Dolatabadi i in., 2011; Fard i in., 2012; Ghanati i in, 2014; Złotek i in., 2016).

Do przeprowadzenia elicytacji mikropędów *R. tomentosum*, kultywowanych w bioreaktorze RITA® (Ryc. 9 a), wykorzystano jasmonian metylu, czynnik stresogenny najczęściej stosowany w kulturach *in vitro* (Giri i Zaheer, 2016). Ponadto, posłużono się wybranymi elicytorami abiotycznymi, takimi jak: sole miedzi i niklu, oraz biotycznymi, tj.: chitosanem, ergosterolem, lizatami patogenów roślinnych oraz ludzkich: *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sakazaki*, *Pectobacterium carotovorum* i *Dickeya dadanti*, przygotowanymi we współpracy z prof. dr hab. inż. Aleksandrą Królicką z Katedry Biotechnologii Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i GUMed. Do eksperymentu włączono również nie testowany wcześniej etanolowy ekstrakt z mszyc (*Aphididae*), który wzięto pod uwagę ze względu na dobrze udokumentowane właściwości repelentne bagna zwyczajnego (Ignatowicz i Wesołowska, 1996; Jaenson i in., 2005,

2006; Kuusik i in., 1995). W tym miejscu należy zaznaczyć, że zgodnie z wiedzą autorów, do tej pory, w doświadczeniach *in vitro*, nie stosowano nigdy elicytorów zawierających białka oraz węglowodany pochodzenia owadziego. Z tego względu opisywaną strategię traktowano jako priorytetową. Substancje mające wywołać reakcję obronną biomas roślinnych dodawano do pożywki płynnej SH z 24,60 µM 2iP i 592,02 µM AD w 21. dniu eksperymentu, w fazie intensywnego wzrostu, w stężeniach dobranych na podstawie dostępnych danych literaturowych (Jesionek i in., 2018, V.4). Po trwającej 7 dni kokultywacji mikropędów z elicytorami, kultury zbierano w 28. dniu cyklu wzrostowego, w którym stwierdzono uprzednio najwyższy poziom akumulacji frakcji lotnej (ok. 500 µl 100 g^{-1} DW; Jesionek i in., 2017, V.2). Szczegóły dotyczące przebiegu doświadczeń z zakresu elicytacji, w tym dobór rozpuszczalników dla czynników stresogennych oraz stosowane próby kontrolne omówiono szczegółowo w manuskrypcie opublikowanym w *Industrial Crops & Products* (Jesionek i in., 2018, V.4).



Ryc. 9. Schemat a) dodawania elicytora do podłoża płynnego, znajdującego się w zbiorniku wewnętrznym bioreaktora RITA®, zawierającego mikropędy *Rhododendron tomentosum* (Jesionek i in., 2018, V.4); b) aktywacji mechanizmów obronnych w komórce roślinnej, w odpowiedzi na elicytor (rycina zmodyfikowana, Ramirez-Estrada i in., 2016).

R – receptor; PL – fosfolipaza; MAPK – kinazy białkowe aktywowane mitogenami; ROS – reaktywne formy tlenu; RNS – reaktywne formy azotu; TF – czynniki transkrypcyjne

Wyniki eksperymentu wykazały, że na metabolizm pierwotny kultur pędowych *R. tomentosum* wpłynęły znacząco jedynie lizaty patogenów oraz ekstrakt z mszyc, spowalniając przyrost tkanek (Wp = ok. 180%) w porównaniu z grupą kontrolną (Wp = 270%), przy czym tylko dodatek *C. albicans* obniżył DW w sposób istotny (o 15%; Jesionek i in., 2018, V.4). W przypadku metabolizmu wtórnego, zaobserwowano, że ekstrakt z mszyc oraz lizat z *P. carotovorum* zwiększyły stężenie olejku eterycznego w mikropędach badanego gatunku o 14% (ok. 570 µl 100 g^{-1} DW), podczas gdy sole niklu i ergosterol przyczyniły się do wzrostu akumulacji frakcji lotnej o 8% (ok. 540 µl 100 g^{-1} DW). Działanie pozostałych elicytorów nie było istotne statystycznie. W tym miejscu należy zaznaczyć, że w przypadku zastosowania dimetylosulfotlenku (DMSO), jako rozpuszczalnika jasmonianu metylu, stwierdzono znaczny spadek zawartości związków terpenowych w mikropędach, być może na skutek permeabilizacji tkanek (Meravy i in., 1988). Z uwagi na powyższe, podobnie jak dla szeregu innych czynników stresogennych (ergosterol, ekstrakt z mszyc), do przygotowania niniejszego elicytora posłużono się alkoholem etylowym (Jesionek i in., 2018, V.4).

Przedstawione wyniki wskazują, że, w stosowanym zakresie stężeń, bardzo zróżnicowane czynniki stresogenne przyczyniły się jedynie w niewielkim stopniu do zwiększenia produkcji olejku eterycznego w kulturach pędów *R. tomentosum.* Ze względu na brak w projekcie zaawansowanych badań molekularnych, trudno wyjaśnić naturę obserwowanego zjawiska na danym etapie doświadczeń. Uzyskane pozytywne wyniki w przypadku elicytora pochodzenia owadziego oraz bakteryjnego (*P. carotovorum*) zachęcają, w dalszej perspektywie, do kontynuacji prac eksperymentalnych, zawężonych do powyższych elicytorów, stosując je w szerokim zakresie stężeń oraz w zróżnicowanych przedziałach czasowych.

Wpływ badanych elicytorów na kompozycję olejku eterycznego pozyskanego z biomas *in vitro R. tomentosum* zaznaczył się w szczególności w przypadku monoterpenów. Dodatek, do pożywki wzrostowej, soli metali skutkował znacznym, prawie czterokrotnym, zwiększeniem we frakcji lotnej poziomu *p*-cymenu i sabinenu. Produkcja związków monoterpenowych w tkankach była stymulowana także przez ekstrakt z mszyc i lizaty z patogenów. Z kolei, w badanym zespole wtórnych metabolitów, niemal nie zauważono różnicy w zawartości procentowej seskwiterpenów o szkielecie aromadendranu, niezależnie od zastosowanego czynnika stresogennego. Szczegółową analizę zmian ilościowych, zachodzących pod wpływem elicytacji, w składzie chemicznym frakcji lotnej z bagna zwyczajnego, z uwzględnieniem 22 głównych terpenów, przedstawiono w publikacji wydrukowanej w *Industrial Crops & Products* (Jesionek i in., 2018, V.4). Uzyskane wyniki wskazują, że dodatek elicytora do namnażanych mikropędów *R. tomentosum* może być skuteczną strategią biotechnologiczną,

mającą na celu zwiększenie biosyntezy wybranego związku naturalnego w zespole, pożądanego ze względu na cenne właściwości biologiczne.

Podsumowując, w wyniku cyklu eksperymentów biotechnologicznych, przeprowadzonych na mikropędach bagna zwyczajnego, kultywowanych w bioreaktorach, stwierdzono istotny wpływ konstrukcji instalacji wielkolaboratoryjnej na pierwotny oraz wtórny metabolizm omawianej kultury *in vitro*. Na podstawie zadowalających parametrów wzrostowych i produkcyjnych, do ciągłego namnażania biomasy oraz do przeprowadzenia procedur elicytacyjnych wybrano bioreaktor okresowo-zalewowy typu RITA®, gwarantujący stabilną akumulację frakcji lotnej w mikropędach *R. tomentosum*, na poziomie zbliżonym do zawartości olejku w wieloletnich pędach rośliny gruntowej. Ponadto, szerokie spektrum zastosowanych w doświadczeniu czynników elicytujących, zarówno nieorganicznych (sole miedzi i niklu), jak i organicznych (jasmonian metylu), pochodzenia bakteryjnego, stawonogowego, a także grzybowego, pozwoliło na ocenę możliwości zintensyfikowania, w wyniku wywołania reakcji obronnej rośliny, metabolizmu wtórnego kultury pędów bagna zwyczajnego, z uwagi na produkcję lotnych terpenów. Ze względu na specyficzną kompozycję olejku eterycznego, otrzymanego w zaproponowanym systemie wzrostowym, oraz potencjalne właściwości biologiczne (przeciwzapalne, przeciwbólowe, antyoksydacyjne i przeciwdrobnoustrojowe) poszczególnych składników zespołu, dalsze badania zostały ukierunkowane na określenie, w testach *in vitro*, wybranych kierunków działania farmakologicznego matryc roślinnych (mikropędy oraz części nadziemne *R. tomentosum*, zebrane ze stanu naturalnego).

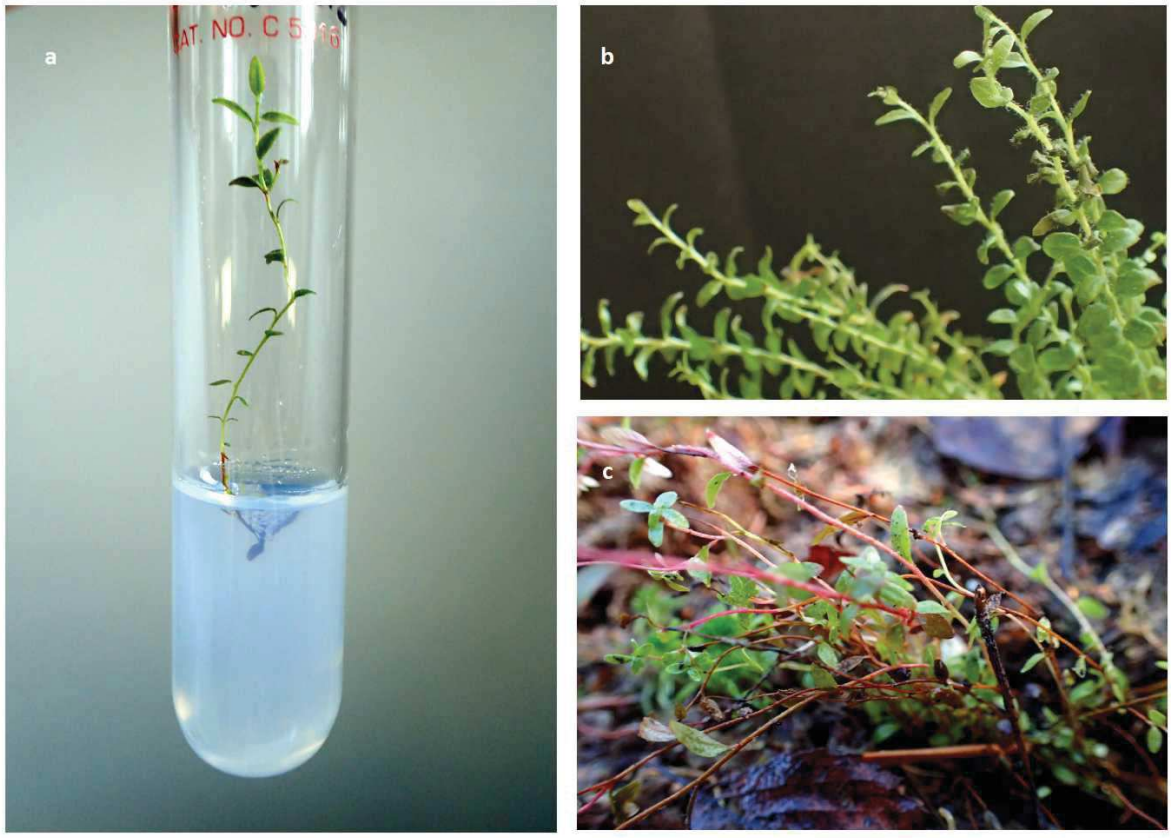
III.4. Mikrorozmnażanie *Rhododendron tomentosum* Harmaja – gatunku zagrożonego wyginięciem

Obocznym, lecz również istotnym, zamierzeniem prowadzonych eksperymentów biotechnologicznych było opracowanie kompletnego protokołu mikrorozmnażania bagna zwyczajnego. W Polsce, badany gatunek od 1983 r. pozostaje pod ustawową ochroną, początkowo częściową (poz. 5.5, Rozporządzenie Ministra Leśnictwa i Przemysłu Drzewnego z dnia 30 kwietnia 1983 r. w sprawie wprowadzenia gatunkowej ochrony roślin), następnie ścisłą (poz. 1.330, Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 lipca 2004 r. w sprawie gatunków dziko występujących roślin objętych ochroną), a od 2014 r. ponownie częściową (poz. 2.271, Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014 r. w sprawie ochrony gatunkowej roślin), ze względu na wysychanie oraz przekształcanie, w wyniku działalności rolniczej człowieka, terenów podmokłych i torfowisk, stanowiących naturalne siedlisko *R. tomentosum*, a także nadmierny zbiór omawianego surowca, stosowanego tradycyjnie jako repelent (Dampc i Łuczkiewicz, 2013, IV.1).

Jednym ze sposobów ochrony *ex situ* gatunków zagrożonych wyginięciem, a tym samym zachowania ich puli genetycznej, jest mikropropagacja w warunkach *in vitro*, która prowadzi do pełnej regeneracji rośliny nawet z niewielkiego fragmentu tkanki, a ponadto umożliwia szybkie namnażanie biomasy niezależnie od warunków środowiskowych (Pietrosiuk i Furmanowa, 2016), co jest szczególnie istotne dla surowców olejkowych z uwagi na niewielką zawartość frakcji lotnych w materiale roślinnym. Opracowanie metody wegetatywnego rozmnażania bagna zwyczajnego w warunkach *in vitro* wydaje się być zatem uzasadnione, zarówno ze względu na szeroko pojętą ochronę bioróżnorodności, jak i pozyskanie alternatywnego źródła olejku eterycznego, cechującego się powtarzalnym składem chemicznym, z przeznaczeniem do eksperymentów biologicznych. Należy przy tym podkreślić, że, jak wykazała kwerenda literaturowa, dotychczas nie podejmowano niniejszego problemu badawczego.

W wyniku zastosowanych procedur doświadczalnych, zaproponowano kompletny protokół mikrorozmnażania *R. tomentosum*, obejmujący następujące etapy: inicjację primordialnych kultur pędowych *in vitro*, multiplikację biomasy primordialnej w celu uzyskania odpowiedniej ilości surowca, przygotowanie mikropędów do kultywacji *in vivo* (elongacja, ukorzenienie i hartowanie) (Ryc. 10 a) oraz adaptację otrzymanych sadzonek do wzrostu w warunków gruntowych (Ryc. 10 b). Ponadto, podjęto także wstępną próbę reintrodukcji zregenerowanych roślin do środowiska naturalnego (Ryc. 10 c), jednak ze względu na ograniczone ramy czasowe projektu doktorskiego nie ukończono badań w tym zakresie. W prowadzonych równolegle eksperymentach fitochemicznych, oceniono zawartość i skład

chemiczny olejku eterycznego z bagna zwyczajnego, pochodzącego z poszczególnych stadiów mikropropagacji. Ostatecznie, we współpracy z Katedrą i Zakładem Biologii i Botaniki Farmaceutycznej GUMed (dr Natalia Filipowicz, dr Adam Bogdan, prof. dr hab. J. Renata Ochocka), porównano genomy rośliny macierzystej i potomnej za pomocą metody RAPD (polimorfizm losowo powielonych fragmentów DNA), celem oceny skuteczności zaproponowanych procedur mikrorozmnażania (Jesionek i in., 2016, V.1).



Ryc. 10. a) Sadzonka *Rhododendron tomentosum* uzyskana w procesie mikrorozmnażania, na etapie wzmacniania, na podłożu SH bez dodatku regulatorów wzrostu; b) zregenerowane bagno zwyczajne podczas aklimatyzacji do warunków *ex vitro*, prowadzonej w doniczkach; c) *R. tomentosum* reintrodukowane do środowiska naturalnego (torfowisko w Miszewku), trzy miesiące po wysadzeniu (listopad 2016 r.).

Surowiec gruntowy do prowadzenia prac biotechnologicznych zebrano w czerwcu 2014 r., ze stanowiska w Miszewku niedaleko Gdańska, po uzyskaniu zezwolenia Regionalnego Dyrektora Ochrony Środowiska (RDOŚ-Gd-PNII.6400.19.2014.MŚ.1). Procedury dotyczące trzech pierwszych etapów mikrorozmnażania, tj. wyprowadzenie primordialnych kultur pędowych *R. tomentosum*, ich ciągłe namnażanie oraz wydłużanie, realizowanych na drodze modyfikacji podłoży wzrostowych w zakresie składników mineralnych oraz regulatorów wzrostu, z klasy

auksyn i cytokinin (23 warianty eksperymentalne), opisano szczegółowo w rozdziale III.1. Za pożywkę umożliwiającą rozwój tkanki inicjalnej z fragmentów liści, a jednocześnie zapewniającą optymalną, ciągłą proliferację powstałych primordiów pędowych, uznano medium SH (0,6% *w/v* agaru), wzbogacone 9,84 μM 2iP i 1,0 μM TDZ (FW biomas = 276,28 g l^{-1}; Wp = 343,72%). Jednocześnie wykazano, że na stacjonarnym podłożu SH (0,6% *w/v* agaru) z 24,60 μM 2iP, po usunięciu pochodnej mocznika, ponad 75% mikropędów ulegało elongacji, zachowując przy tym morfologię charakterystyczną dla roślin macierzystych, bez cech szklenia (FW = 243,18 g l^{-1}; Wp = 205,77%) (Jesionek i in., 2016, V.1). Uzyskane wyniki wskazują, że cytokininy z grupy pochodnych adeniny oraz mocznika (2iP i TDZ), stosowane często w mikropropagacji zarówno gatunków z rodzaju *Rhododendron* (Eeckhaut i in., 2010), jak i innych reprezentantów rodziny *Ericaceae* (Debnath, 2007), również wywierają korzystny wpływ na parametry wzrostowe oraz morfologię namnożonych w warunkach *in vitro* pędów bagna zwyczajnego (Jesionek i in., 2016, V.1). W tym miejscu należy zwrócić szczególną uwagę na tidiazuron, który w przypadku badanego gatunku wpływał bezpośrednio na ilość powstających primordiów pędowych, przyczyniając się, w niskich stężeniach, do zwiększenia wydajności kultury w zakresie ilości mikroroślinek uzyskanych z jednego eksplantatu. Równocześnie, jedynie rezygnacja z dodatku auksyn w pożywce, na etapie indukcji biomas primordialnych, warunkowała brak obecności w kulturze struktur kalusowych, niekorzystnych w przypadku opisywanego doświadczenia.

Wydłużone mikropędy bagna zwyczajnego poddano procesowi ukorzeniania, wykorzystując, zgodnie z doniesieniami literaturowymi odnośnie mikrorozmnażania roślin z rodzaju *Rhododendron* (Bojarczuk, 1989; Briggs i in., 1994), podłoża wzrostowe o różnej zawartości składników mineralnych (SH, WP, A) oraz sacharozy, zestalone agarem lub płynne (nasączające warstwę perlitu), bez regulatorów wzrostu bądź jedynie z dodatkiem auksyn (Jesionek i in., 2016, V.1). Najwyższy procent ryzogenezy (100%) mikropędów badanego gatunku odnotowano na pożywce WP, opracowanej dla krzewów i roślin drzewiastych (Lloyd i McCown, 1981), zawierającej 4,92 μM IBA, z dwukrotnie zmniejszonym stężeniem soli mineralnych i sacharozy względem standardowego składu medium. Zaobserwowano wówczas indukcję średnio ok. dziesięciu korzeni, u wszystkich badanych sadzonek (Jesionek i in., 2016, V.1). Dodatkowo ustalono, że na wspomnianym podłożu aż 83% mikroroślinek uległo dalszej elongacji, przekraczając wysokość 20 mm, dzięki czemu wydawały się bardziej odporne na uszkodzenia mechaniczne podczas dalszych etapów mikropropagacji. Zastosowanie perlitu, substratu wzmagającego ryzogenezę, oraz zmiana typu medium ze stałego na płynne skutkowało zwiększeniem o 25% liczby korzeni przypadających na jeden eksplantat, wskazując na zasadność

ujęcia niniejszej modyfikacji w protokole mikrorozmnażania *R. tomentosum* (Jesionek i in., 2016, V.1).

Jako kolejną fazę mikropropagacji bagna zwyczajnego, zaproponowano wzmocnienie roślin potomnych poprzez ich dwutygodniową kultywację na pożywce SH pozbawionej regulatorów wzrostu, gdyż, jak zaobserwowano, warunkowała ona większą wysokość sadzonek niż podłoże WP (Ryc. 10 a). Znaczne wydłużenie roślin (średnio z 36 do 54 mm) mogło przypuszczalnie zwiększyć szansę ich przetrwania w środowisku naturalnym. Poziom przeżywalności otrzymanych sadzonek, podczas aklimatyzacji w warunkach *ex vitro,* przy zapewnieniu wysokiej wilgotności powietrza i zastosowaniu mieszaniny torfu, perlitu i żwiru jako podłoża (3:1:1) (Debnath, 2007), wynosił blisko 100% (Ryc. 10 b), świadcząc o wysokiej skuteczności opracowanego protokołu mikrorozmnażania.

Przeprowadzona, we współpracy z Katedrą i Zakładem Biologii i Botaniki Farmaceutycznej GUMed, analiza sekwencji DNA rośliny macierzystej (program BLAST), stanowiącej źródło tkanek inicjalnych służących do wyprowadzenia kultur mikropędowych, wykazała 99% podobieństwa materiału gruntowego, zebranego w Miszewku, do *R. tomentosum*, pozyskanego na południu Syberii, w Rosji, i *R. hypoleucum* z Japonii, tj. gatunków siostrzanych (Goetsch i in., 2005), potwierdzając tym samym prawidłową identyfikację bagna zwyczajnego. Za pomocą analizy RAPD oszacowano również genetyczne podobieństwo rośliny macierzystej i zregenerowanych sadzonek, które określono, w oparciu o indeks podobieństwa Jaccarda, jako wysokie (Jesionek i in., 2016, V.1). Niewielkie zróżnicowanie genetyczne, stwierdzone na podstawie obecności kilku polimorficznych prążków, może być traktowane jako zmienność somaklonalna, powstała podczas procedury mikropropagacji przez czynniki takie jak regulatory wzrostu, składniki odżywcze czy stres (Guo i in., 2006).

Po kilku miesiącach kultywacji zregenerowanych roślin w doniczkach, w temperaturze pokojowej, po uzyskaniu zezwolenia Regionalnego Dyrektora Ochrony Środowiska (RDOŚ-Gd-PNII.6400.36.2016.AOL.1), w sierpniu 2016 r. podjęto próbę reintrodukcji badanego gatunku do siedliska naturalnego bagna zwyczajnego (tereny bagienne w okolicy Miszewka). Po trzech miesiącach od wysadzenia trzech egzemplarzy o wysokości ok. 20 cm, stwierdzono, że dwie sadzonki zachowały żywotność, charakteryzując się zielonym ulistnieniem i czerwonawym zabarwieniem łodyg (Ryc. 10 c), jedna zaś obumarła. Być może wybór innej pory roku, np. początku okresu wegetacyjnego, na wprowadzenie do środowiska naturalnego zregenerowanego *R. tomentosum* przyniósłby bardziej spektakularne rezultaty. Nie kontynuowano jednak opisanego doświadczenia ze względu na ograniczenia czasowe projektu doktorskiego.

Analiza fitochemiczna biomas *R. tomentosum* wykazała zależność zawartości frakcji lotnej i jej składu chemicznego od wieku rośliny gruntowej oraz statusu morfogenicznego

mikropędów pochodzących z różnych etapów mikropropagacji (Jesionek i in., 2016, V.1). Najbogatsze źródło olejku eterycznego w warunkach naturalnych stanowiły jednoroczne pędy bagna zwyczajnego (2400 µl 100 g^{-1} DW), co potwierdziło w tym względzie doniesienia literaturowe (Butkiene i in., 2008). W wieloletnim materiale roślinnym stężenie frakcji lotnej było niemal ośmiokrotnie niższe (306 µl 100 g^{-1} DW). Podczas mikrorozmnażania zawartość olejku eterycznego wzrastała wraz z wydłużaniem się mikropędów oraz coraz większym zróżnicowaniem morfologicznym biomas, od ok. 50 µl 100 g^{-1} DW w przypadku struktur primordialnych, do ponad 700 µl 100 g^{-1} DW w zregenerowanych sadzonkach, co przewyższało dwukrotnie stężenie frakcji lotnej w wieloletnich pędach rośliny macierzystej. Obserwowane zjawisko może wskazywać na znaczny potencjał opracowanej metody mikropropagacji w pozyskaniu odmiany bagna zwyczajnego wydajnej pod względem biosyntezy lotnych metabolitów wtórnych.

Jak stwierdzono, w wyniku analizy GC/MS, skład chemiczny olejku eterycznego otrzymanego ze zregenerowanych osobników *R. tomentosum*, z uwagi na przeważający w nim udział alloaromadendrenu (8,5%), nieznaczne stężenie palustrolu i γ-terpineolu (odpowiednio 0,3 i 1,9%) oraz brak ledolu, okazał się bardziej zbliżony do kompozycji frakcji lotnych z kultur *in vitro* niż z roślin macierzystych (Jesionek i in., 2016, V.1). Powodem opisywanych różnic mogły być odmienne warunki kultywacji (szklarniowe *vs* panujące w środowisku naturalnym) (Thiem i in., 2011). Można także przypuszczać, iż w trakcie procesu mikrorozmnażania nastąpiło zatrzymanie szlaku metabolicznego, prowadzącego do biosyntezy seskwiterpenów o szkielecie aromadendranu, na jednym z etapów pośrednich (Jesionek i in., 2018, V.3). Uwagę zwraca ponadto obecność w regeneratach ewerninanu metylu, związku niewystępującego w roślinach gruntowych *R. tomentosum*, a pojawiającego się w kulturach *in vitro*, którego zawartość w badanych olejkach eterycznych maleje wraz ze wzrostem zróżnicowania morfotycznego sadzonek (od 7,6% do 0,7%). Z kolei, stężenie γ-terpineolu i octanu bornylu wyraźnie zwiększało się w mikropędach na dalszych etapach mikropropagacji, co sugeruje ścisłą zależność występowania niniejszych połączeń terpenowych w matrycach roślinnych od stopnia organogenezy mikropędów bagna zwyczajnego.

Podsumowując, w wyniku przeprowadzonych badań podano, po raz pierwszy, kompletny protokół mikrorozmnażania *R. tomentosum*, w którego skład wchodziły następujące etapy: inicjacja oraz ciągłe namnażanie primordiów pędów, elongacja i ukorzenianie mikropędów, wzmacnianie mikroroślinek i adaptacja pojedynczych sadzonek do warunków gruntowych. Opisana procedura może znaleźć zastosowanie nie tylko w ochronie puli genetycznej gatunku zagrożonego wyginięciem, lecz również w pozyskiwaniu nowych odmian rośliny, wydajnych

pod względem produkcji związków terpenowych. Ponadto, mikropropagacja umożliwia otrzymywanie, w stosunkowo krótkim czasie i niezależnie od sezonu, dużej ilości surowca, tj. bagna zwyczajnego, będącego źródłem olejku eterycznego w stężeniach pozwalających na prowadzenie szeroko rozumianych badań biologicznych, mających na celu określenie wartości terapeutycznej wspomnianej frakcji lotnej.

III.5. Aktywność biologiczna frakcji lotnych z *Rhododendron tomentosum* – bezpośrednia bioautografia metodą TLC oraz badanie aktywności proapoptotycznej w obrębie limfocytów i synowiocytów ludzkich

Ostatni cel szczegółowy doświadczeń prowadzonych w ramach projektu doktorskiego stanowiło wstępne określenie potencjalnie korzystnych, w leczeniu RZS, kierunków aktywności biologicznej olejków eterycznych z materiału gruntowego i z kultur *in vitro R. tomentosum*. Chociaż współczesne badania wskazują na właściwości przeciwzapalne zarówno pędów z bagna zwyczajnego (Black i in., 2011; Tunon i in., 1995), jak i wyizolowanej z nich frakcji lotnej (Baananou i in., 2015) oraz poszczególnych jej składników (Ryc. 11 a), potwierdzając zasadność tradycyjnego zastosowania surowca w chorobach reumatycznych (Ryc. 11 b), to dokładny mechanizm opisywanego działania wciąż pozostaje nieznany. Co więcej, dane dotyczące aktywności biologicznej związków terpenowych o szkielecie aromadendranu, charakterystycznych dla gatunku (ledol, palustrol, tlenek ledenu (II), alloaromadendren), są bardzo ograniczone lub niedostępne (Ryc. 11 a).

a

Terpen	Aktywność [lit.]
γ-terpineol	przeciwnowotworowa wobec komórek ludzkiego wątrobiaka [Wu i in., 2014]
ledol	przeciwnowotworowa wobec ludzkich limfoblastoidalnych komórek Raji [Spiridonov i in., 2005]
	przeciwgrzybicza wobec *Coriolus ronatus* i *Cladosporium cucumerinum* [Duran-Pena i in., 2015]
***p*-cymen**	przeciwbólowa [Bonjardim i in., 2012; Santana i in., 2011]
	przeciwzapalna (inhibicja migracji leukocytów [Bonjardim i in., 2012] oraz produkcji cytokin prozapalnych: TNF-α, IL-1β i IL-6; inaktywacja NF-κB i MAPK [Xie i in., 2012])
sabinen	przeciwzapalna (inhibicja produkcji NO [Valente i in., 2013])
β-myrcen	przeciwzapalna (inhibicja produkcji NO, IFN-γ i IL-4 [Souza i in., 2003])
	antyoksydacyjna [Ciftci i in., 2011]
sziobunon	owadobójcza [Chen i in., 2015]
palustrol, tlenek ledenu (II), alloaromadendren, δ-2-karen	?

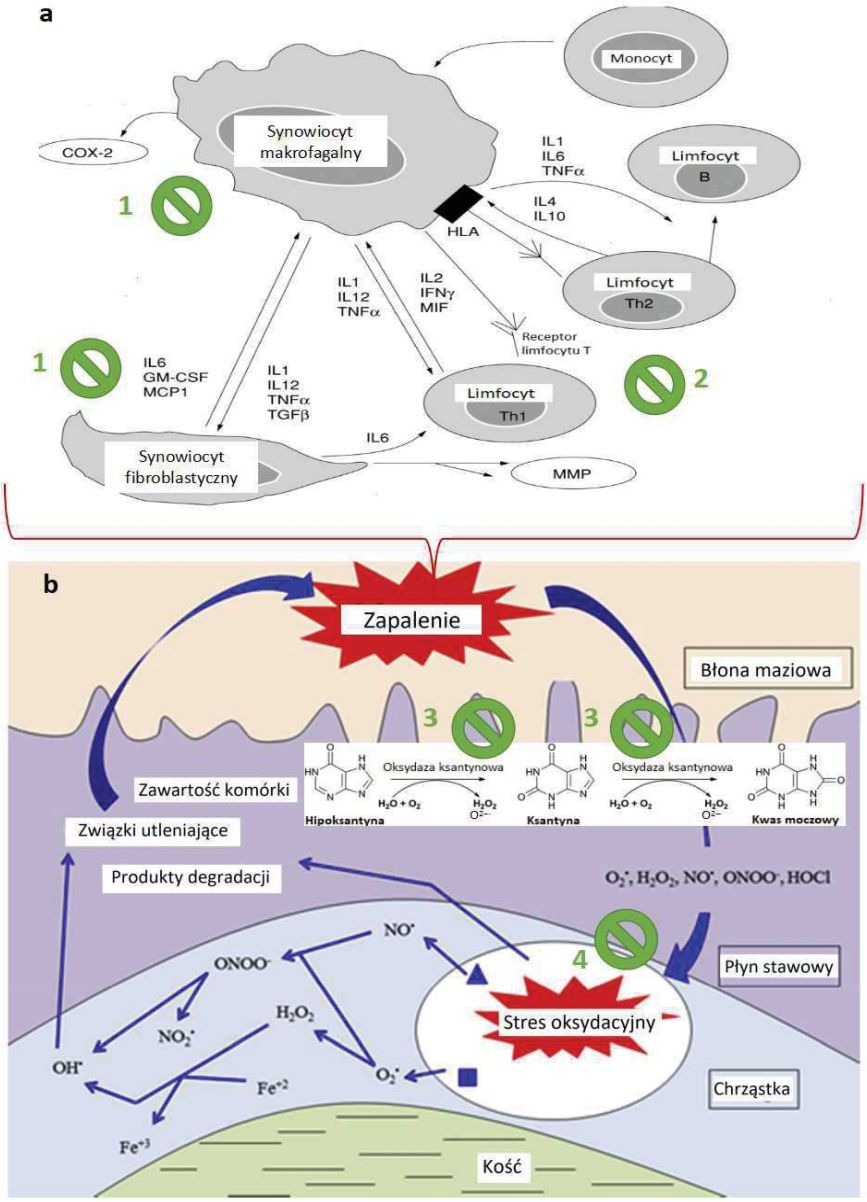
b

Ryc. 11. a) Aktywność biologiczna wybranych terpenów wchodzących w skład olejków eterycznych z materiału gruntowego i kultur *in vitro R. tomentosum*, potwierdzona we współczesnych badaniach; b) zastosowanie pędów bagna zwyczajnego w medycynie tradycyjnej (Dampc i Łuczkiewicz, 2013, IV.1; rycina Paula Hogartha „Woman Herbalist", z poł. XX w., po modyfikacji).

Ze względu na wieloczynnikową patogenezę RZS (Ryc. 12) (Zampeli i in., 2015), olejki eteryczne mogą hamować proces zapalny w obrębie stawów, oddziałując na różne jego składowe (Miguel, 2010). Biorąc pod uwagę fakt, że podejmowano już próby określenia wpływu *R. tomentosum* na szlaki sygnałowe cytokin (Black i in., 2011) oraz na inhibicję prostaglandyn, syntezowanych przez cyklooksygenazę typu 2 (Tunon i in., 1995), w projekcie doktorskim skupiono się na dotychczas niebadanych mechanizmach aktywności przeciwreumatycznej frakcji lotnych, tj. działaniu proapoptotycznym (ludzkie limfocyty T i synowiocyty), hamującym oksydazę ksantynową, a także efekcie antyoksydacyjnym (Ryc. 12).

Znaczenie limfocytów T w patogenezie RZS nie zostało do końca rozpoznane, choć ich udział w procesie zapalnym oraz naciekaniu błony maziowej nie ulega wątpliwości (Mellado i in., 2015). Wiadomo, że aktywowane antygenem komórki CD4+ wykazują zdolność do różnicowania się w wyspecjalizowane komórki efektorowe (Th1, Th2), regulujące miejscowy stan zapalny (Ryc. 12 a). Z kolei, limfocyty CD8+ mogą przyczyniać się do uszkodzenia tkanek i wysokiej produkcji cytokin, takich jak TNF-α i IFN-γ (Skapenko i in., 2005; Pawłowska i in., 2009). Dotychczasowe terapie, mające na celu zredukowanie liczby i aktywności limfocytów T (drenaż przewodu piersiowego, napromienianie tkanki limfatycznej, leki immunosupresyjne), prowadzą do poprawy stanu chorych na RZS, niestety często krótkotrwałej (Ponchel i in., 2012; Skapenko i in., 2005). W ramach projektu doktorskiego, we współpracy z Katedrą i Zakładem Fizjopatologii oraz Zakładem Patologii i Reumatologii Doświadczalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, kierowanymi przez prof. dr hab. Jacka Witkowskiego i prof. dr hab. Ewę Bryl, przeprowadzono badanie dotyczące działania antyproliferacyjnego olejków eterycznych z *R. tomentosum*, pozyskanych z roślin gruntowych, zebranych w Miszewku (Polska) i w Turku (Finlandia), oraz z finalnej, wysokoprodukcyjnej, biomasy *in vitro*, kultywowanej w bioreaktorze RITA®, wobec subpopulacji CD4+ i CD8+ limfocytów T, wyizolowanych z krwi zdrowych ochotników (6 osób), z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (Jesionek i in., 2019, V.6). W oparciu o uzyskane wyniki ustalono, że wszystkie badane frakcje lotne spowodowały wzrost apoptozy ludzkich limfocytów T, niezależnie od chemotypu materiału roślinnego. Ponadto stwierdzono, że testowane olejki eteryczne w większości wykazywały podobne działanie supresyjne zarówno wobec komórek CD4+, jak i CD8+. Najsilniejszą aktywnością charakteryzował się zespół lotnych terpenów pochodzący z materiału roślinnego zebranego w Miszewku, pod wpływem którego ilość podzielonych komórek w populacji CD4+ zmniejszyła się z ok. 70% (grupa kontrolna) do 10% po 72 h i 5% po 120 h, oraz do 8% w populacji komórek CD8+ (72 i 120 h), przy zastosowaniu rozcieńczenia 1: 400 (Jesionek i in., 2019, V.6). Olejek eteryczny z kultur *in vitro*, w omawianym stężeniu, także wykazywał istotne statystycznie działanie antyproliferacyjne we wszystkich wariantach doświadczalnych, nieznacznie tylko słabsze od rośliny macierzystej. Wstępnie,

uzyskane rezultaty wskazują na wysoki potencjał frakcji lotnych z bagna zwyczajnego w ograniczaniu proliferacji limfocytów T, w przebiegu RZS, a tym samym możliwość zahamowania postępu choroby.



Ryc. 12. a) Proces zapalny w synowium (rycina zmodyfikowana, Cutolo i in., 2001); b) Stres oksydacyjny podczas degradacji chrząstki stawowej (rycina zmodyfikowana, Phull i in., 2018); 1-4 testowana aktywność olejków eterycznych z z materiału gruntowego i z kultur *in vitro R. tomentosum*: 1 – proapoptotyczna w obrębie ludzkich synowiocytów, 2 – proapoptotyczna w obrębie ludzkich limfocytów T, 3 – hamująca oksydazę ksantynową, przekształcającą hipoksantynę / ksantynę w kwas moczowy, 4 – antyoksydacyjna;
– miejsce blokowania przez substancje aktywne

COX-2 – cyklooksygenaza-2, GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów, HLA – ludzki antygen leukocytarny, IFN-γ – interferon-γ, IL(1-12) – interleukiny (1-12), MCP-1– białko chemotaktyczne monocytów-1, MIF – czynnik hamujący migrację makrofagów, MMP – metaloproteinazy, TGFβ – transformujący czynnik wzrostu β, TNFα – czynnik martwicy nowotworów α

Kluczowa rola synowiocytów, zwłaszcza fibroblastycznych, w etiologii RZS, została dostrzeżona dopiero na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat (Bottini i Firestein, 2013; Mor i in., 2005; Neumann i in., 2010; Zampeli i in., 2015). Stwierdzono, że niniejsze komórki, niegdyś uważane za biernego uczestnika procesu zapalnego istniejącego w stawach, same wykazują wysoki potencjał prozapalny, angiogenny i inwazyjny, m.in. dzięki niekontrolowanej proliferacji (Ryc. 12 a) (Li i Wan, 2013). Sugeruje się, że zastosowanie w RZS leku, celującego w synowiocyty fibroblastyczne, może mieć hamujący wpływ zarówno na nadmierną aktywację układu immunologicznego, jak i zapalenie błony maziowej oraz niszczenie tkanki chrzęstnej (Mor i in., 2005; Neumann i in., 2010; Zampeli i in., 2015). Wobec powyższego, we współpracy z Katedrą i Zakładem Fizjopatologii GUMed, Zakładem Patologii i Reumatologii Doświadczalnej GUMed oraz II Kliniką Ortopedii i Traumatologii Narządu Ruchu GUMed podjęto badania, mające na celu określenie aktywności proapoptotycznej wybranych olejków eterycznych z *R. tomentosum* w obrębie synowiocytów fibroblastycznych, limfocytów oraz monocytów i makrofagów, wyizolowanych od pacjentów chorych na RZS, którzy zostali poddani zabiegowi synowektomii stawu ręki (3 osoby; Jesionek i in., 2019, V.6). Analiza przeprowadzona za pomocą cytometrii przepływowej wykazała, że wszystkie frakcje lotne, w testowanych stężeniach, zwiększały ilość późno-apoptycznych limfocytów T, co było widoczne zwłaszcza w przypadku olejków eterycznych z bagna zwyczajnego pozyskanego ze stanowiska naturalnego w Polsce (Miszewko) i z kultur *in vitro* (odpowiednio o ok. 60% i 70%; Jesionek i in., 2019, V.6). Może to wskazywać, że właśnie poprzez wywieranie efektu proapoptycznego, frakcje lotne z *R. tomentosum* działają antyproliferacyjnie wobec subpopulacji CD4+ i CD8+ limfocytów T, co stwierdzono w poprzednio opisanym eksperymencie. Podobny rezultat zaobserwowano także wobec populacji CD14+ monocytów / makrofagów (wzrost ilości późno-apoptycznych komórek o 20-60%) (Jesionek i in., 2019, V.6). Z kolei, wysokie stężenia olejków eterycznych z bagna zwyczajnego (1:400) prowadziły do nekrozy znacznych ilości synowiocytów fibroblastycznych (ok. 60%) (Jesionek i in., 2019, V.6). Powyższe wyniki, wskazujące na zróżnicowany i kompleksowy mechanizm działania zespołu terpenoidów z *R. tomentosum* na nadmiernie proliferujące komórki w synowium dotkniętym RZS, choć obiecujące, wymagają potwierdzenia na szerszej grupie badanych pacjentów.

Kolejne, wybrane kierunki działania olejków eterycznych z *R. tomentosum* oceniono za pomocą bezpośredniej bioautografii, łączącej testy aktywności biologicznej z technikami separacyjnymi, metodą TLC (Jesionek i in., 2018, V.3). Omawiane narzędzie analityczne umożliwia szybkie, względnie tanie i jednoczesne porównanie licznych próbek, zawierających nawet niewielkie ilości złożonych mieszanin połączeń naturalnych, oraz jest z powodzeniem stosowane do określania ich efektu antyoksydacyjnego, przeciwbakteryjnego i hamującego liczne

enzymy, w tym acetylocholinoesterazę, glukozydazę czy oksydazę ksantynową (Bram i Wolfram, 2016; Marston, 2011). Według danych literaturowych, u pacjentów z RZS stwierdza się, w płynie maziowym, podwyższony poziom oksydazy ksantynowej (Hanachi i in., 2009). Wydaje się zatem, że inhibicja tego enzymu, prowadząca do zmniejszonej biosyntezy kwasu moczowego, odkładającego się w stawach, oraz wywołująca redukcję wytwarzania reaktywnych form tlenu, mogłaby przynieść ulgę nie tylko w dnie moczanowej, ale także w RZS (Ryc. 12 b) (Pacher i in., 2006). Wobec skutków ubocznych allopurynolu (wysypka, reakcje nadwrażliwości), najczęściej stosowanego obecnie, w dnie moczanowej, inhibitora oksydazy ksantynowej, zasadne jest poszukiwanie nowych leków o podobnych właściwościach i niższej toksyczności (Bram i Wolfram, 2016). Eksperyment, w którym wykorzystano wcześniej opracowany system chromatografowania (Rozdz. III.2; metoda zanurzeniowa), przeprowadzono w zaproponowanym przez Ramallo i in. (2006) układzie (oksydaza ksantynowa – błękit nitrotetrazolowy – ksantyna). Niestety, wyniki testu świadczyły jednoznacznie o braku działania hamującego badanych olejków eterycznych z *R. tomentosum* oraz ich składników o szkielecie aromadendranu na oksydazę ksantynową (Jesionek i in., 2018, V.3). Może to sugerować, że redukcja poziomu kwasu moczowego u pacjentów z dną moczanową, obserwowana pod wpływem wyciągu z *R. tomentosum* przez Ahmad i in. (2013), wynikała z obecności w surowcu innej grupy połączeń naturalnych, np. polifenoli. Frakcja lotna z bagna zwyczajnego wykazuje prawdopodobnie inny mechanizm ograniczania procesu zapalnego.

W kolejnym doświadczeniu, za pomocą bezpośredniej bioautografii metodą TLC, przetestowano właściwości przeciwutleniające olejków eterycznych z różnych biomas *R. tomentosum* (Jesionek i in., 2018, V.3). W szeregu badań stwierdzono, że stres oksydacyjny wywołany nadmiernym generowaniem reaktywnych form tlenu aktywuje szlaki sygnałowe, odgrywające istotną rolę w powstawaniu reakcji zapalnych, w patofizjologii RZS (Phull i in., 2018; Quinonez-Flores i in., 2016). Ponadto, wolne rodniki tlenowe poprzez utlenianie i nitrozylację powodują strukturalne i funkcjonalne modyfikacje białek komórkowych oraz składników zewnątrzkomórkowych, takich jak kolagen i proteoglikany, co może przyczyniać się do degradacji chrząstki i jednocześnie nasilać odpowiedź zapalną (Ryc. 12 b) (Phull i in., 2018). Ze względu na to, że leki stosowane w leczeniu RZS jedynie w ograniczony sposób zapobiegają skutkom niszczenia stawów, prowadzi się badania nad skutecznością różnych substancji przeciwutleniających we wspomaganiu terapii (Khojah i in., 2016; Phull i in., 2018). W olejkach eterycznych z bagna zwyczajnego, testy TLC, przeprowadzone z użyciem odczynnika DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl) oraz w układzie ryboflawina – światło – błękit nitrotetrazolowy, w opracowanym wcześniej systemie chromatografowania (Rozdz. III.2; metoda zanurzeniowa), ujawniły obecność pięciu terpenów o potencjalnej aktywności antyoksydacyjnej, w tym dwa

występujące jedynie we frakcjach lotnych z kultur *in vitro* (Jesionek i in., 2018, V.3). Niestety, na niniejszym etapie badań, brak możliwości porównania wytypowanych na chromatogramie pasm z odpowiednimi substancjami referencyjnymi uniemożliwił ich identyfikację. Co interesujące, nie zaobserwowano właściwości przeciwutleniających ledolu i palustrolu, związków specyficznych dla bagna zwyczajnego. Najwyższym potencjałem antyoksydacyjnym spośród badanych próbek charakteryzował się materiał roślinny zebrany ze stanu naturalnego w Kazachstanie (produkt komercyjny), w przeciwieństwie do *R. tomentosum* pochodzącego z Turku w Finlandii, w którym ledol i palustrol stanowiły ponad 50% wszystkich składników olejku eterycznego (Jesionek i in., 2018, V.3). Warto zaznaczyć, że działanie antyoksydacyjne frakcji lotnych z kultur *in vitro* bagna zwyczajnego wzrosło ponad dwukrotnie w porównaniu z rośliną macierzystą (Jesionek i in., 2018, V.3). Według danych literaturowych, aktywność przeciwutleniająca została również stwierdzona w przypadku olejku eterycznego z bagna zwyczajnego pozyskanego z Korei, w którego frakcji lotnej przeważał sabinen (Kim i Nam, 2006). Świadczy to o silnej zależności właściwości antyoksydacyjnych *R. tomentosum* od chemotypu rośliny.

Wstępne badania biologiczne, przeprowadzone w ramach projektu doktorskiego, wykazały, że bagno zwyczajne może charakteryzować się interesującą aktywnością przeciwreumatyczną ze względu na mnogość punktów uchwytu działania związków terpenowych. Potencjał przeciwzapalny olejków eterycznych z *R. tomentosum*, stwierdzony zarówno w eksperymentach biologicznych w obrębie limfocytów i synowiocytów ludzkich, jak również w testach bioautograficznych, udowadnia zasadność stosowania omawianego surowca w lecznictwie ludowym. Jednakże jednym z warunków, który materiał roślinny musiałby spełniać jako kandydat do sporządzenia leku dla chorych na RZS, jest stałość składu chemicznego frakcji lotnej, zapewniająca skuteczność, powtarzalność i bezpieczeństwo jej stosowania. W obliczu wpływu na kompozycję olejków eterycznych w surowcu tak wielu czynników środowiskowych, jak: miejsce i czas zbioru materiału roślinnego oraz jego zmienność genetyczna, niniejszy problem mogą rozwiązywać kultury *in vitro R. tomentosum*, będące nie tylko stałym źródłem biomasy, ale także gwarantujące stabilność składu chemicznego frakcji lotnej, zachowującej aktywność biologiczną rośliny macierzystej.

IV. WNIOSKI

Przedstawiona rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie zbiór publikacji, dotyczących otrzymania na bazie mikropędów *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*) stabilnego oraz niezależnego od warunków środowiskowych roślinnego systemu *in vitro*, zdolnego do ciągłej produkcji lotnych związków terpenowych o aktywności przeciwzapalnej, mogących znaleźć zastosowanie w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów. Założony cel badawczy został zrealizowany w ramach doświadczeń biotechnologicznych, fitochemicznych oraz biologicznych. Uzyskane wyniki umożliwiły sformułowanie następujących wniosków:

Badania biotechnologiczne:

- Zgodnie ze specyfiką rodziny *Ericaceae* oraz wymaganiami badanego gatunku, w celu wyprowadzenia kultur *in vitro* mikropędów *R. tomentosum* wymagane jest zastosowanie eksplantatów liściowych rośliny gruntowej, a także pożywki wzrostowej bogatej w azotany i fosforany (SH) oraz silne cytokininy, pochodne adeniny (2iP) i fenylomocznika (TDZ), bez udziału auksyn, warunkujących powstawanie tkanki przyrannej. Po okresie stabilizacji biomas inicjalnych, w trakcie kolejnych pasaży, do zapewnienia wysokiej wydajności mikropędów, namnażanych w systemie ciągłym jako kultura kolekcyjna, zachowujących morfologię rośliny macierzystej, wystarczy dodatek do podłoża eksperymentalnego tylko jednego fitohormonu – 2iP, stosowanego w wysokim stężeniu.
- Klasyczne modyfikacje pożywek wzrostowych w zakresie podstawowego składu soli mineralnych, aminokwasów, witamin, oraz stosowanie zmiennych regulatorów wzrostu w kompozycjach zaproponowanych w projekcie nie umożliwia wyprowadzenia kultur korzeni odciętych oraz kalusów z fragmentów wegetatywnych badanego gatunku.
- Bagno zwyczajne można zaliczyć do gatunków opornych na transformacje genetyczne, przy zastosowaniu wysoce wirulentnych szczepów *Agrobacterium rhizogenes* (ATCC 15834, A4 i GFP 105), w warunkach wykorzystanych w prowadzonym cyklu prac eksperymentalnych.
- Otrzymane agarowe kultury pędów *R. tomentosum* wykazują zdolność do biosyntezy olejku eterycznego, jednakże jego profil chemiczny różni się od frakcji lotnej wyizolowanej z rośliny macierzystej. Prawdopodobnie w warunkach *in vitro* następuje zatrzymanie szlaku metabolicznego, prowadzącego do biosyntezy seskwiterpenów o szkielecie aromadendranu (ledol, palustrol), na jednym z etapów pośrednich.

- Zastosowanie pożywki SH z 24,60 µM 2iP i 592,02 µM AD umożliwia przystosowanie mikropędów *R. tomentosum* do namnażania w warunkach płynnych kultur wytrząsanych. Na podstawie wyznaczonego profilu wzrostowego o klasycznym przebiegu, można stwierdzić, iż opisywana biomasa charakteryzuje się średnim tempem przyrostu (28-dniowy cykl hodowlany), dobrym wykorzystaniem medium (Wp_{max} = 323,64%) oraz akumulacją olejku eterycznego na poziomie 80 µl 100 g^{-1} DW (po 28 dniach kultywacji).

- Kultury pędowe bagna zwyczajnego dobrze adaptują się do wzrostu w instalacjach wielkolaboratoryjnych o charakterze bioreaktorów zalewowych, okresowo-zalewowych oraz natryskowych. Duży stopień wilgotności w zbiorniku eksperymentalnym, okresowy dostęp do płynnego podłoża oraz intensywne napowietrzanie mikropędów wywierają korzystny wpływ na metabolizm pierwotny (ilość uzyskanych pędów) i wtórny (biosynteza olejku eterycznego) badanej biomasy, prowadząc do uzyskania w systemie wzrostowym wysokiej zawartości frakcji lotnej, dorównującej wieloletniej roślinie macierzystej (ok. 500 µl $100g^{-1}$ w bioreaktorze RITA®). W związku z ochroną gatunkową bagna zwyczajnego, opracowany system *in vitro*, dostarczający w sposób ciągły znacznych ilości materiału roślinnego (Wp = 280%, DW = 19,98 g l^{-1}), może stanowić alternatywne i niezależne od środowiska źródło pędów, służące do pozyskiwania na skalę komercyjną lotnych związków terpenowych, interesujących pod względem farmakologicznym.

- Słaba odpowiedź metaboliczna (poziom biosyntezy olejku eterycznego) mikropędów *R. tomentosum* na szerokie spektrum zastosowanych czynników stresogennych (nieorganicznych, organicznych, pochodzenia bakteryjnego, stawonogowego i grzybowego) sugeruje oporność omawianego gatunku na klasyczne (jasmonian metylu, sole miedzi i niklu, chitosan, ergosterol, lizaty patogenów roślinnych i ludzkich) oraz nowatorskie (etanolowy ekstrakt z mszyc) techniki elicytacyjne, których celem jest uzyskanie wzmożonej produkcji frakcji lotnej w systemie wzrostowym. Być może badane metabolity terpenowe uczestniczą jedynie w reakcji obronnej bagna zwyczajnego na bardzo specyficzne, dotychczas nieokreślone, czynniki środowiskowe, bądź biosynteza związków lotnych na oznaczonym wyjściowo poziomie jest wystarczająca do skutecznej „obrony", a tym samym przetrwania, gatunku. W oparciu o powyższe, otrzymane wyniki, zwłaszcza uzyskane pod wpływem, stosowanego po raz pierwszy w kulturach *in vitro*, wyciągu etanolowego z mszyc, zachęcają do kontynuowania eksperymentów w tym zakresie.

- Empiryczny dobór podłoża wzrostowego w zakresie soli mineralnych, aminokwasów, węglowodanów oraz regulatorów wzrostu wraz z selekcją eksplantatów wegetatywnych badanego gatunku umożliwił po raz pierwszy opracowanie skutecznego protokołu

mikrorozmnażania *R. tomentosum*. Opisana w projekcie wieloetapowa strategia rozmnażania wegetatywnego *in vitro*, złożona z: pozyskiwania struktur primordialnych (pożywka SH z 9,84 μM 2iP i 1,0 μM TDZ), ich elongacji (pożywka SH z 24,60 μM 2iP), ukorzeniania mikroroślinek (pożywka WP z dwukrotnie zmniejszonym stężeniem soli mineralnych i sacharozy względem standardowego składu medium, z dodatkiem 4,92 μM IBA) oraz ich adaptacji do wzrostu w naturalnym habitacie (wzmocnienie mikroroślinek na podłożu SH bez regulatorów wzrostu, a następnie zastosowanie mieszanki odkwaszonego torfu, perlitu i żwiru w proporcji 3:1:1 w warunkach *in vivo*), pozwala na ochronę puli genetycznej i odnowę populacji gatunku zagrożonego wyginięciem. Wydaje się, że w świetle trudności z wyprowadzeniem kultur korzeniowych bagna zwyczajnego, dla powodzenia mikropropagacji rośliny kluczowy jest etap ryzogenezy na podłożu zubożonym w składniki mineralne i sacharozę oraz suplementowanym auksyną, co umożliwia otrzymanie sadzonek o cechach morfologicznych właściwych dla badanego gatunku.

Badania fitochemiczne:

- Zoptymalizowana, w toku prac badawczych, metoda pozyskiwania frakcji lotnej z matryc roślinnych bagna zwyczajnego, zebranego z warunków naturalnych (części nadziemne) oraz namnożonego w kulturach *in vitro*, polegająca na suszeniu surowców w suszarce z wymuszonym obiegiem powietrza, w temp. 30^{o}C, oraz ich ekstrakcji w aparacie Derynga przez 3 h, pozwala na najbardziej wydajne otrzymanie olejków eterycznych o stałym, pod względem jakościowym oraz ilościowym, składzie związków terpenowych, charakterystycznych dla wyjściowych biomas. Zaproponowana procedura jest odpowiednia do prowadzenia badań porównawczych kultur *in vitro R. tomentosum*, pochodzących z różnych etapów doświadczeń biotechnologicznych (kontrola skuteczności strategii eksperymentalnych w zakresie zwiększenia akumulacji frakcji lotnej) oraz jako etap procesów *downstream* podczas biotechnologicznego otrzymywania olejku eterycznego, w skomercjalizowanym systemie roślinnym.
- Zastosowanie metody hydrodestylacji w aparacie Derynga lub Clevengera do otrzymywania frakcji lotnych z matryc roślinnych, w przeciwieństwie do procedury symultanicznej destylacji oraz ekstrakcji z użyciem organicznej cieczy receptorowej (aparat Likens-Nickersona), pozwala na ilościowe oznaczenie zawartości olejku eterycznego w biomasach bagna zwyczajnego na etapie ich pozyskiwania.
- Zastosowana metoda chromatograficzna GC/MS umożliwia całkowitą separację, precyzyjną identyfikację (porównanie widm masowych i indeksów retencji Kovatsa metabolitów

z bibliotekami danych) oraz oznaczenie zawartości procentowej związków terpenowych we frakcjach lotnych z biomas *R. tomentosum.* Tym samym, może ona służyć do szerokiego i dokładnego rozpoznania profilu metabolicznego olejków eterycznych z bagna zwyczajnego, pochodzącego zarówno ze stanowisk naturalnych, jak i otrzymanego metodami biotechnologicznymi.

- Zoptymalizowana, po raz pierwszy, metoda analizy HPTLC, z detekcją densytometryczną, dotycząca składu chemicznego frakcji lotnych, pozyskanych z matryc *R. tomentosum* (faza stacjonarna: żel krzemionkowy HPTLC 60, faza ruchoma: heksan : octan etylu – 9:1 *v/v*, odczynnik wywołujący: aldehyd anyżowy bądź wanilina w kwasie fosforowym) jest odpowiednia do prowadzenia badań jakościowych związków terpenowych, występujących w olejkach eterycznych, syntezowanych w pędach bagna zwyczajnego, pochodzących ze stanu naturalnego oraz kultur *in vitro* (określenie ogólnego profilu metabolicznego rośliny). Ponadto, może być, na równi z techniką GC/MS, dedykowana do oznaczania ilościowej zawartości ledolu i alloaromadendrenu, czyli głównych komponentów frakcji lotnych, obecnych w badanych biomasach. Obliczone parametry walidacyjne potwierdzają skuteczność opracowanej metody i wskazują na jej przydatność do stosowania w szybkich testach skryningowych materiału roślinnego z bagna zwyczajnego z uwagi na obecność powyższych seskwiterpenów, mając na względzie określenie toksyczności oraz aktywności biologicznej surowca, a także ocenę aplikacyjnej wartości uzyskanych systemów roślinnych *in vitro*.
- Zoptymalizowana metoda analizy HPTLC olejków eterycznych z *R. tomentosum* jest odpowiednia do prowadzenia testów z zakresu bioautografii bezpośredniej, mających na celu wstępne określenie aktywności antyoksydacyjnej oraz hamującej oksydazę ksantynową frakcji lotnych badanych surowców, pochodzących z kultur *in vitro* oraz ze stanowisk naturalnych.
- Analiza statystyczna (hierarchiczna analiza klastrów) części nadziemnych bagna zwyczajnego, pochodzących z różnych stanowisk, w zakresie składu chemicznego olejków eterycznych (dane pochodzące z fitochemicznych badań własnych oraz kwerendy literaturowej), pozwoliła na wyróżnienie, po raz pierwszy, dziesięciu chemotypów *R. tomentosum* w obrębie populacji europejsko-azjatyckich.
- Potwierdzone statystycznie zróżnicowanie bagna zwyczajnego, pochodzącego z różnych habitatów, w zakresie składu jakościowego i ilościowego frakcji lotnych, uzasadnia konieczność dysponowania do celów farmaceutycznych surowcem o stałej zawartości olejku eterycznego, co umożliwiają metody biotechnologiczne.

Badania biologiczne:

- Wstępna ocena aktywności proapoptotycznej olejków eterycznych z roślin gruntowych i z kultur *in vitro R. tomentosum* w obrębie limfocytów T oraz synowiocytów ludzkich, przeprowadzona za pomocą cytometrii przepływowej, wskazuje na wysoki potencjał badanego zespołu połączeń terpenowych w terapii RZS. Frakcje lotne z bagna zwyczajnego, dzięki działaniu ograniczającemu nadmierną, niekontrolowaną proliferację wyżej wymienionych komórek, mogą hamować nadmierną aktywację układu immunologicznego, zapalenie błony maziowej oraz proces niszczenia tkanki chrzęstnej.
- Bezpośrednia bioautografia metodą TLC jest narzędziem przydatnym do szybkiego i jednoczesnego porównywania olejków eterycznych pochodzących z różnych matryc *R. tomentosum* w zakresie wybranych aktywności biologicznych. Stwierdzenie właściwości antyoksydacyjnych oraz braku inhibicji oksydazy ksantynowej przez testowane frakcje lotne wyznacza kierunki dalszych badań biomedycznych nad profilem działania przeciwzapalnego bagna zwyczajnego.

STRESZCZENIE

Bagno zwyczajne (*Rhododendron tomentosum* Harmaja, dawniej *Ledum palustre* L.), zimozielony krzew rosnący w Europie, Azji i Ameryce Północnej, stosowano w medycynie ludowej w leczeniu chorób płuc, infekcji bakteryjnych oraz schorzeń reumatycznych. Wyniki współczesnych badań biologicznych potwierdzają zasadność tradycyjnej aplikacji *R. tomentosum*, wskazując na istotną rolę olejku eterycznego w determinowaniu działania przeciwzapalnego, przeciwbólowego, przeciwdrobnoustrojowego oraz repelentnego surowca. Ze względu na powyższe, zespół lotnych związków terpenowych występujących w bagnie zwyczajnym wydaje się być odpowiedni do prowadzenia badań nad potencjalnym preparatem, mogącym znaleźć zastosowanie w terapii reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS), stanowiąc alternatywę wobec dotychczas wykorzystywanych, lecz nie w pełni skutecznych i obarczonych wieloma działaniami niepożądanymi, leków syntetycznych. Pozyskiwanie frakcji lotnej z materiału gruntowego *R. tomentosum,* do szczegółowych badań farmakologicznych, mających na celu ustalenie działania olejku eterycznego, wraz z precyzyjnym określeniem mechanizmów jego aktywności biologicznej, jest jednak problematyczne, z uwagi na objęcie omawianego gatunku ochroną. Z tego względu oraz w związku z niemożnością pozyskiwania bagna zwyczajnego z upraw polowych, metodą z wyboru do otrzymywania biomas *R. tomentosum*, będących źródłem lotnych metabolitów terpenowych, wykazujących działanie przeciwzapalne oraz naprawcze w obrębie stawów zmienionych w toku procesu chorobowego związanego z RZS, wydają się być roślinne kultury *in vitro*.

Wobec powyższego, za główny cel projektu doktorskiego przyjęto otrzymanie, w oparciu o *R. tomentosum*, roślinnego systemu *in vitro*, stabilnego pod względem parametrów wzrostowych, zdolnego do ciągłej produkcji lotnych terpenów, wykazujących m.in. działanie przeciwzapalne i mogących tym samym znaleźć zastosowanie w leczeniu RZS. Przedstawiony cel realizowano w obszarze badań biotechnologicznych, fitochemicznych oraz biologicznych.

Eksperymenty biotechnologiczne, zawarte w projekcie doktorskim, dotyczyły wprowadzenia bagna zwyczajnego do kultur *in vitro*, zoptymalizowania warunków do ciągłego wzrostu otrzymanych biomas oraz ocenę ich morfologii, tempa przyrostu i zdolności w zakresie biosyntezy olejku eterycznego. Następnie, prace badawcze ukierunkowano na zwiększenie skali kultywacji mikropędów *R. tomentosum*, jedynej z pozyskanych biomas, charakteryzującej się wysokim potencjałem produkcyjnym w zakresie frakcji lotnej, wykorzystując w tym celu wybrane naczynia hodowlane oraz instalacje bioreaktorowe, komercyjne i prototypowe, skonstruowane w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Ponadto, stosując strategię elicytacji, podjęto się próby zintensyfikowania produkcji lotnych

związków terpenowych w kulturach namnażanych w skali wielkolaboratoryjnej. Ze względu na objęcie w Polsce *R. tomentosum* ochroną gatunkową, zdecydowano się także na opracowanie procedury mikrorozmnażania niniejszej rośliny.

W ramach badań biotechnologicznych, po raz pierwszy, stosując szereg podłoży inicjalnych, podjęto próbę wyprowadzenia z eksplantatów liściowych, pochodzących z części nadziemnych bagna zwyczajnego, wysterylizowanych za pomocą chlorku rtęci (II), kultur *in vitro* o różnym stopniu zróżnicowania morfogenicznego, tj. biomas kalusowych, korzeniowych (korzenie odcięte i transformowane) oraz pędowych. Z powodu niskiej żywotności otrzymanej tkanki przyrannej oraz korzeni odciętych (brak odpowiedzi tkanek na transformację wektorami bakteryjnymi), w dalszych pracach badawczych skupiono się na mikropędach, charakteryzujących się korzystną morfologią oraz intensywnym przyrostem, uzyskanych na agarowym (0,6% *w*/*v*) podłożu Schenka-Hildebrandta (SH) z dodatkiem 9,84 µM 2-izopentenyloadeniny (2iP), 1,00 µM tidiazuronu (TDZ) i sacharozy (30 g l^{-1}). Modyfikując warunki eksperymentu (oświetlenie) i skład pożywek doświadczalnych w zakresie regulatorów wzrostu oraz pH (ok. 20 wariantów), uzyskano zarówno stacjonarne, jak i wytrząsane, płynne kultury mikropędów *R. tomentosum*, zdolne do wzrostu i biosyntezy olejku eterycznego w systemie ciągłym. Otrzymane biomasy zostały następnie adaptowane do kultywacji w komercyjnych i prototypowych bioreaktorach (instalacje zalewowe, okresowo-zalewowe oraz natryskowe), w skali wielkolaboratoryjnej. Na podstawie obliczonych parametrów wzrostowych oraz makroskopowej obserwacji morfologii namnażanych mikropędów, a także oznaczonej w nich zawartości i składu chemicznego frakcji lotnych, za najbardziej odpowiedni do realizacji założeń badawczych uznano komercyjny bioreaktor okresowo-zalewowy RITA®. Przy zastosowaniu medium SH z 24,60 µM 2iP, 592,02 µM adeniny oraz 30 g l^{-1} sacharozy, niniejsza instalacja warunkowała najwyższy przyrost tkankowy (Wp_{max} = 280%) oraz dużą żywotność namnażanych mikropędów. Ponadto, w opisanych biomasach stwierdzono zintensyfikowaną biosyntezę olejku eterycznego (ok. 500 µl 100 g^{-1} suchej masy – DW), zbliżoną do produktywności w tym względzie wieloletnich części nadziemnych rośliny macierzystej (ok. 300 µl 100 g^{-1} DW). Profil wzrostowy oraz produkcyjny kultury pędowej *R. tomentosum*, określony w ramach niniejszej instalacji, charakteryzowała, w kolejnych pasażach, zadowalająca powtarzalność. Co najistotniejsze, opracowany system roślinny stosunkowo szybko osiągał maksimum biosyntezy frakcji lotnej (w 28 dniu 500 µl 100g^{-1} DW), co może świadczyć o jego opłacalności ekonomicznej i stwarza podstawy do kontynuacji badań w zakresie wykorzystania kultur mikropędów bagna zwyczajnego na skalę komercyjną. Na kolejnym etapie doświadczeń biotechnologicznych, w celu podwyższenia zawartości olejku eterycznego w biomasach *R. tomentosum*, rosnących w bioreaktorach RITA®, zastosowano strategię generowania warunków stresowych za pomocą jasmonianu metylu oraz wybranych

elicytorów abiotycznych i biotycznych (pochodzenia bakteryjnego, stawonogowego i grzybowego). W odpowiedzi na stres, akumulacja frakcji lotnej w badanych kulturach wzrosła o 14% pod wpływem ekstraktu z mszyc oraz lizatu z *Pectobacterium carotovorum*, wynosząc ok. 570 µl 100 g^{-1} DW, oraz o 8% po poddaniu tkanek działaniu soli niklu i ergosterolu (ok. 540 µl 100 g^{-1} DW). Ostatni etap eksperymentów biotechnologicznych polegał na opracowaniu, po raz pierwszy, pełnego protokołu mikrorozmnażania *R. tomentosum*, obejmującego inicjację (pożywka SH z 9,84 µM 2iP i 1,0 µM TDZ), multiplikację (pożywka SH z 9,84 µM 2iP i 1,0 µM TDZ), elongację (pożywka SH z 24,60 µM 2iP), ukorzenienie (pożywka Woody Plant Medium z dwukrotnie zmniejszonym stężeniem soli mineralnych i sacharozy względem standardowego składu podłoża, z 4,92 µM kwasu indolilo-3-masłowego – IBA) i hartowanie (pożywka SH bez regulatorów wzrostu) mikropędów badanego gatunku, a także adaptację otrzymanych sadzonek do warunków *ex vitro* (zastosowanie mieszanki odkwaszonego torfu, perlitu i żwiru w proporcji 3:1:1), w celu czynnej ochrony bagna zwyczajnego, zagrożonego wyginięciem na skutek zmniejszania się powierzchni torfowisk, stanowiących jego środowisko naturalne.

Integralną część projektu doktorskiego stanowiła analiza fitochemiczna olejków eterycznych pozyskanych z kultur *in vitro* oraz roślin gruntowych *R. tomentosum*. W ramach prowadzonych badań postanowiono wyznaczyć optymalne warunki suszenia surowców (warunki naturalne: temp. 24 ± 2°C, suszarka: temp. 30°C oraz liofilizacja: po zamrożeniu w temp. -10°C, przy zastosowaniu próżni 1 x 10^{-1} mbar) oraz ustalić metodę izolacji frakcji lotnej z biomas (hydrodestylacja: aparat Derynga lub Clevengera oraz jednoczesna destylacja z parą wodną i ekstrakcja do organicznej cieczy receptorowej: aparat Likens-Nickersona), w celu uzyskania z matryc roślinnych jak największej ilości olejku eterycznego o niezmienionym, pod wpływem zastosowanych procedur fitochemicznych, składzie chemicznym. W następnej kolejności, zamierzano zoptymalizować warunki analizy chromatograficznej (chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas – GC/MS i wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa – HPTLC), umożliwiające ocenę jakościową oraz ilościową składu chemicznego olejków eterycznych z biomas bagna zwyczajnego. Ostatni etap eksperymentów fitochemicznych polegał na przeprowadzeniu testów skryningowych materiału gruntowego, zebranego z różnych stanowisk, oraz biomas *R. tomentosum,* pochodzących z poszczególnych etapów doświadczeń biotechnologicznych, w zakresie zawartości wybranych lotnych związków terpenowych, za pomocą zoptymalizowanej metody HPTLC, poddanej w toku badań walidacji. Dodatkowo, postanowiono przeprowadzić statystyczną analizę porównawczą (hierarchiczna analiza klastrów) zawartości głównych połączeń terpenowych w olejkach eterycznych z *R. tomentosum*, obejmującą dane z fitochemicznych badań własnych oraz pochodzące z kwerendy literaturowej. Omawiane prace analityczne dotyczyły bagna zwyczajnego rosnącego na 54 stanowiskach w Europie

oraz Azji, i pozwoliły na ocenę, w obrębie omawianego gatunku, zróżnicowania chemicznego surowców, rosnących w różnych habitatach.

Z uwagi na ograniczoną trwałość lotnych terpenów, występujących w *R. tomentosum*, za optymalne uznano suszenie badanych surowców w suszarce z wymuszonym obiegiem powietrza, w temp. 30^{o}C, co, w przeciwieństwie do liofilizacji, ograniczało ubytek poszczególnych metabolitów z olejków eterycznych. Zastosowanie klasycznej hydrodestylacji matryc roślinnych w aparacie Derynga (3 h) okazało się najbardziej wydajną metodą ekstrakcji frakcji lotnych z biomas bagna zwyczajnego oraz, w przeciwieństwie do systemu Likens-Nickersona, umożliwiło precyzyjne określenie zawartości olejków eterycznych w poszczególnych surowcach roślinnych na etapie prowadzonych prac izolacyjnych. Dodatkowo, w wyniku zastosowanej procedury uzyskiwano frakcje lotne o stałym, pod względem jakościowym i ilościowym, składzie w zakresie połączeń terpenowych. Za pomocą GC/MS, metody z wyboru do oznaczania składu chemicznego mieszanin związków lotnych, rozpoznano precyzyjnie profile metaboliczne olejków eterycznych z badanych matryc *R. tomentosum.* Na podstawie przeprowadzonych analiz jakościowych i ilościowych określono wpływ warunków środowiskowych (w przypadku materiału gruntowego) oraz procedur biotechnologicznych (dla kultur *in vitro*) na zawartość oraz skład frakcji lotnych w biomasach bagna zwyczajnego. W zespołach metabolitów terpenowych, wyizolowanych z roślin zebranych ze stanowisk naturalnych na terenie Pomorza i służących do wyprowadzenia kultur *in vitro R. tomentosum,* dominował *γ*-terpineol (8,5% – 11,8%), a w dalszej kolejności ledol (2,3% – 8,1%), palustrol (0,8% – 6,9%) i *p*-cymen (4,0% – 5,3%). Z kolei, w mikropędach badanego gatunku podstawowym składnikiem olejku eterycznego był tlenek ledenu (II) (13,0%), sziobunon (8,2%), *p*-cymen (6,9%) i alloaromadendren (5,5%). Nie odnotowano natomiast w omawianym przypadku obecności ledolu, stwierdzając w roślinnym systemie *in vitro* wysoki poziom jego pochodnej, tlenku ledenu (II), oraz alloaromadendrenu, związków powstających przypuszczalnie na etapie pośrednim szlaku metabolicznego seskwiterpenów o szkielecie aromadendranu.

W toku prowadzonych badań fitochemicznych, zoptymalizowano warunki rozdzielenia składników olejków eterycznych, otrzymanych z pędów oraz mikropędów bagna zwyczajnego, za pomocą HPTLC (faza stacjonarna: żel krzemionkowy HPTLC 60, faza ruchoma: heksan : octan etylu – 9:1 *v/v*, dystans migracji: 5 cm, 10-minutowa saturacja komory bez prekondycjonowania, odczynnik wywołujący: aldehyd anyżowy w kwasie siarkowym (VI)), uzyskując narzędzie do szybkiej analizy jakościowej lotnych terpenów, umożliwiające jednoczesne oznaczenie wielu próbek matryc roślinnych. Po zmodyfikowaniu parametrów analitycznych (dystans migracji: 4 cm, 20-minutowe prekondycjonowanie płytek, odczynnik wywołujący: wanilina w kwasie *o*-fosforowym), opracowaną metodę HPTLC, z detekcją

densytometryczną, poddano walidacji (wyznaczenie selektywności, limitu oznaczalności i detekcji, zakresu liniowości, powtarzalności, precyzji wewnątrz- i międzygrupowej, dokładności oraz odporności) i ustalono jej przydatność pod kątem powtarzalnego i dokładnego określenia zawartości ilościowej wybranych związków terpenowych (ledol, alloaromadendren), występujących we frakcjach lotnych *R. tomentosum*. Zoptymalizowane metody chromatografowania (GC/MS i HPTLC) wykorzystano do testów skryningowych biomas z kultur *in vitro* w zakresie zawartości i składu olejków eterycznych, określając skuteczność zastosowanych strategii biotechnologicznych, zmierzających do uzyskania mikropędów bagna zwyczajnego, będących bogatym źródłem frakcji lotnych. Dodatkowo, wyżej opisaną metodę HPTLC przeznaczono do przeprowadzenia wybranych testów z zakresu bioautografii bezpośredniej (aktywność przeciwzapalna i antyoksydacyjna) dla wyselekcjonowanych biomas badanego gatunku.

W wyniku statystycznej analizy porównawczej bagna zwyczajnego z kontynentu euroazjatyckiego (dane pochodzące z badań własnych oraz kwerendy literaturowej), stwierdzono, że otrzymany dendrogram może stanowić podstawę do wyróżnienia dziesięciu chemotypów *R. tomentosum*, ze względu na skład chemiczny olejku eterycznego. Fakt ten potwierdza trudność w bezpośrednim wykorzystaniu omawianej rośliny do celów leczniczych.

Istotną część projektu doktorskiego stanowiły doświadczenia dotyczące określenia aktywności biologicznej wybranych frakcji lotnych, pochodzących z roślin macierzystych oraz z kultur *in vitro R. tomentosum*, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów działania olejków eterycznych, mogących ograniczać proces zapalny. Po raz pierwszy dokonano oceny właściwości proapoptotycznych frakcji lotnych z bagna zwyczajnego względem limfocytów T i synowiocytów ludzkich, nadmiernie proliferujących u chorych na RZS. Dodatkowo, za pomocą bezpośredniej bioautografii metodą TLC, przeprowadzono wstępne rozpoznanie olejków eterycznych z biomas *R. tomentosum* w zakresie ich aktywności antyoksydacyjnej oraz hamującej oksydazę ksantynową.

W toku badań biologicznych, stwierdzono, że wszystkie analizowane frakcje lotne z roślin gruntowych i z kultur *in vitro* bagna zwyczajnego przyczyniły się do ograniczenia proliferacji ludzkich limfocytów T poprzez wzrost ich apoptozy, niezależnie od chemotypu materiału roślinnego, wykazując działanie supresyjne zarówno wobec komórek CD4+, jak i CD8+. Z kolei, zastosowanie wysokich stężeń (1:400) olejków eterycznych z *R. tomentosum* prowadziło do znacznej nekrozy synowiocytów fibroblastycznych. Frakcje lotne z kultur *in vitro* bagna zwyczajnego charakteryzował podobny do rośliny macierzystej profil działania wobec badanych komórek. Ponadto, za pomocą bezpośredniej bioautografii metodą TLC, potwierdzono właściwości antyoksydacyjne olejków eterycznych z *R. tomentosum* (wyższa aktywność

mikropędów w porównaniu z materiałem gruntowym), a także wykluczono udział inhibicji oksydazy ksantynowej w mechanizmie ograniczania zapalenia, wykazywanym przez badane metabolity terpenowe.

Podsumowując, badania biotechnologiczne, fitochemiczne oraz biologiczne, przeprowadzone w ramach projektu doktorskiego, umożliwiły realizację celu pracy, którym było otrzymanie, w oparciu o gatunek *R. tomentosum*, stabilnego oraz niezależnego od warunków środowiskowych systemu roślinnego *in vitro*, zdolnego do ciągłej produkcji związków terpenowych, wykazujących aktywność przeciwzapalną.

Mikropędy bagna zwyczajnego, rosnące w bioreaktorze okresowo-zalewowym RITA® (etap *upstream*), w pożywce Schenka-Hildebrandta z 24,60 µM 2-izopentenyloadeniny, 592,02 µM adeniny oraz 30 g l^{-1} sacharozy, zdolne są do produkcji olejku eterycznego w ilości ok. 500 µl 100 g^{-1} DW, osiąganej po 28 dniach kultywacji. Tym samym, uzyskano w biomasie 67% wzrost zawartości lotnych terpenów w stosunku do wieloletniej rośliny macierzystej (ok. 300 µl 100 g^{-1} DW). Głównymi składnikami otrzymanych frakcji lotnych był tlenek ledenu (II) (ok. 13%), sziobunon (ok. 8%), *p*-cymen (ok. 7%) oraz alloaromadendren (ok. 6%). Wysoka produktywność niniejszego systemu, utrzymująca się na poziomie 0,36 ml olejku eterycznego/l/dzień, wiąże się z ciągłą oraz stabilną biosyntezą lotnych metabolitów wtórnych z przeznaczeniem do badań farmakologicznych, a w przyszłości także do wykorzystania w celach terapeutycznych.

Wyniki projektu doktorskiego zostały w całości opublikowane w dwóch pracach poglądowych i sześciu eksperymentalnych o sumarycznym współczynniku oddziaływania IF=16,669. Ponadto, przedstawiono je w formie zagranicznych doniesień konferencyjnych jako referaty ustne (2) i posterowe (4). Z inspiracji prowadzonych badań powstał artykuł popularnonaukowy, nagrodzony w konkursie „Skomplikowane i proste. Młodzi uczeni o swoich badaniach", organizowanym przez miesięcznik „Forum Akademickie" pod honorowym patronatem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

SUMMARY

Rhododendron tomentosum Harmaja (marsh tea, formerly *Ledum palustre* L.), the evergreen shrub growing in Europe, Asia and North America, has been used in folk medicine to treat lung diseases, bacterial infections and rheumatism. The results of modern biological research confirm the validity of the traditional application of *R. tomentosum*, indicating an important role of the essential oil in determining anti-inflammatory, analgesic, antimicrobial and repellent properties of the plant material. Due to the above, volatile terpenoids from marsh tea seem to be suitable for the development of a potential medicine that can be used in the treatment of rheumatoid arthritis (RA) as an alternative to the previously used, but not fully effective synthetic drugs with many side effects. However, the essential oil obtainment from *R. tomentosum* ground material for specific pharmacological studies, which aimed at determining the action of essential oil together with a precise defining of the mechanisms of its biological activity, is problematic because of the fact that this endangered species is protected. Therefore and due to the inability to obtain marsh tea from field crops, the plant *in vitro* cultures can be considered as the method of choice for receiving the biomass of *R. tomentosum*, which is presumably the complex source of volatile terpenoids showing anti-inflammatory and therapeutic activity towards the joints destroyed in the course of the RA related disease process.

The main objective of the doctoral thesis is to obtain the stable, in terms of growth parameters, *in vitro* plant system based on *R. tomentosum* species, which produces continuously volatile terpene compounds with i.a. anti-inflammatory activity, thereby suitable for RA treatment. The goal was pursued in the biotechnological, phytochemical and biological research area.

The biotechnological experiments, contained in the doctoral thesis, included the introduction of marsh tea to *in vitro* cultures, optimization of the conditions for continuous growth of the obtained biomass and assessment of its morphology, growth rate and capacity of the essential oil biosynthesis. Next, the study was directed at increasing the scale of cultivation of *R. tomentosum* shoot cultures, the only received biomass characterized by high production potential in the field of volatile fraction, using for this purpose the selected culture vessels and bioreactor installations, commercial as well as prototype ones, constructed at the Department of Pharmacognosy of the Medical University of Gdańsk. Moreover, by applying the elicitation strategy, it was an attempt to intensify the production of volatile terpene compounds in *in vitro* cultures grown on a large laboratory scale. In addition, due to the fact that *R. tomentosum* is an endangered species in Poland, it was decided to develop a micropropagation procedure for this plant.

As part of biotechnological research, for the first time, using a number of initial media, *in vitro* cultures were initiated, with varying degrees of morphogenesis, including callus, root (excised and transformed) and shoot biomass, from leaf explants of aboveground parts of marsh tea, sterilized with mercury chloride (II). Due to the low viability of the obtained callus tissue and excised roots (lack of plant response to transformation with bacterial vectors), further research focused on microshoots characterized by favorable morphology and intensive growth, obtained on agar (0.6% *w*/*v*) Schenk-Hildebrand (SH) medium with the addition of 9.84 μM 2-isopentenyloadenine (2iP), 1.00 μM thidiazuron (TDZ) and 30 g l^{-1} saccharose. Then, after modifying the cultivation conditions (lighting) and the composition of experimental media in the scope of growth regulators and pH (approx. 20 variants), both stationary and shaken liquid shoot cultures of *R. tomentosum*, capable of continuous growth and biosynthesis of essential oil, were obtained. The studied microshoots were subsequently adapted for large laboratory scale cultivation in commercial and prototype bioreactors (immersion, temporary immersion and spray systems). On the basis of the calculated growth parameters and the macroscopic observation of the propagated microshoots' morphology as well as the determined content and chemical composition of volatile fraction, the commercial RITA® temporary immersion bioreactor was considered as the most suitable for realizing the research objective. The above plant system, using SH medium with 24.60 μM 2iP, 592.02 μM adenine and 30 g l^{-1} saccharose, provided the highest tissue growth (Gi_{max} = 280%) and the great vitality of the propagated microshoots. In addition, the intensified biosynthesis of essential oil (approx. 500 μl 100 g^{-1} dry weight – DW) was found in the described biomass, close in this respect to the productivity of the perennial aerial parts of the mother plant (approx. 300 μl 100 g^{-1} DW). The growth and production profiles of the *R. tomentosum* shoot culture, which were defined within the aforementioned installation, were characterized in subsequent passages by satisfactory repeatability. Most importantly, the developed plant system relatively quickly reached the maximum level of the volatile fraction biosynthesis (on 28 day, 500 μl 100 g^{-1} DW), which may be evidence of its economic viability and thus creates the basis for continuing research in the use of microshoot cultures of marsh tea on a commercial scale. In the course of further biotechnological experiments, in order to improve the essential oil content in the *R. tomentosum* biomass, growing in RITA® bioreactors, strategy for generating stress conditions with methyl jasmonate and selected abiotic and biotic elicitors (of bacterial, arthropod and fungal origin) was applied. In response to stress, the volatile fraction accumulation in the studied *in vitro* cultures increased by 14% under the influence of the aphid extract and the *Pectobacterium carotovorum* lysate (approx. 570 μl 100 g^{-1} DW), and by 8% after treatment with nickel salt and ergosterol (approx. 540 μl 100 g^{-1} DW). The last stage of biotechnological experiments was to develop, for the first time, the full protocol

for *R. tomentosum* micropropagation, including initiation (SH medium with 9,84 μM 2iP and 1,0 μM TDZ), multiplication (SH medium with 9,84 μM 2iP and 1,0 μM TDZ), elongation (SH medium with 24,60 μM 2iP), rooting (Woody Plant Medium with the twice reduced concentration of mineral salts and saccharose relative to the standard composition of the medium, with 4,92 μM indole-3-butyric acid – IBA) and hardening (SH medium without growth regulators) of microshoots of the studied species, as well as adaptation of the obtained seedlings to *ex vitro* conditions (mixture of deacidified peat, perlite and gravel in a 3: 1: 1 ratio), for active protection of marsh tea, which is endangered due to the loss of its natural habitat as a result of peatland area degradation.

An integral part of the doctoral thesis was the phytochemical analysis of the essential oils obtained from *R. tomentosum in vitro* cultures and ground plants. As part of the research, it was decided to choose the optimal conditions for drying the plant material (natural conditions: 24°C ± 2°C, the drying chamber with forced convection: 30°C and freeze drying: after freezing at -10°C, using a vacuum of 1 x 10^{-1} mbar) and to determine the method of isolating the volatile fraction from biomass (hydrodistillation: Deryng or Clevenger apparatus and simultaneous distillation and extraction into organic receptor liquid: Likens-Nickerson apparatus), in order to obtain from plant matrices as much of the essential oil as possible, characterized with unchanged, under the influence of phytochemical procedures, chemical composition. Next, it was intended to optimize the conditions of chromatographic analysis (gas chromatography coupled with mass spectrometry – GC/MS and high performance thin layer chromatography – HPTLC), enabling qualitative and quantitative assessment of the chemical composition of the volatile fractions from marsh tea biomass. The last stage of phytochemical experiments consisted in conducting screening tests of ground plant material, collected from various habitats, and *R. tomentosum* biomass, from individual stages of biotechnology experiments, in the range of the content of the selected volatile terpene compounds, using the optimized and validated HPTLC method. Moreover, it was decided to carry out a statistical comparative analysis (hierarchical cluster analysis) of the contents of the main terpenes in the *R. tomentosum* essential oils, including data from own phytochemical research and found in a literature. The discussed analytical publications concerned marsh tea growing in 54 sites in Europe and Asia, and allowed for the assessment of the chemical diversity within the studied species, among plants growing in various habitats.

Taking into account the limited stability of volatile terpenes in *R. tomentosum*, drying of plant material in a forced air oven at 30°C, which, in contrast to freeze-drying, limited the loss of individual metabolites from essential oils, was proposed as the optimal analytical procedure. The application of classical hydrodistillation of plant matrices in the Deryng apparatus (3 h) turned out to be the most efficient method of extracting volatile fractions from marsh tea biomass

and, in contrast to the Likens-Nickerson system, enabled precise determination of the essential oils' content in all studied plant materials at the stage of isolation. In addition, as a result of the used procedure, volatile fractions with consistent qualitative and quantitative composition, in the field of terpene compounds, were obtained. By GC/MS, which is the method of choice for defining the chemical composition of mixtures of volatiles, the metabolic profiles of the essential oils from the tested *R. tomentosum* matrices were recognized precisely. On the basis of the obtained qualitative and quantitative results, the influence of environmental conditions (in the case of ground material) as well as biotechnological procedures (for *in vitro* cultures) on the content and constitution of the volatile fractions in marsh tea biomass was determined. Among terpene compounds, isolated from plants collected from natural habitats in Pomerania, which served for *R. tomentosum in vitro* cultures initiation, *γ*-terpineol (8.5% – 11.8%) predominated, followed by ledol (2.3% – 8.1%), palustrol (0.8% – 6.9%) and *p*-cymene (4.0% – 5.3%). On the other hand, in the microshoots of the studied species, the prevalent constituents of the essential oil were ledene oxide (II) (13.0%), shyobunone (8.2%), *p*-cymene (6.9%) and alloaromadendrene (5.5%). However, in the discussed case, no presence of ledol was noted, but a high level of its derivative, ledene oxide (II), and alloaromadendrene was stated in the *in vitro* plant system, the compounds that presumably formed at the intermediate stage of the metabolic pathway of sesquiterpenes containing the aromadendrane skeleton.

In the course of phytochemical research, the conditions for HPTLC separation of essential oils' constituents from shoots and microshoots of marsh tea were optimized (stationary phase: HPTLC Silica gel 60, mobile phase: hexane : ethyl acetate – 9:1 *v/v*, migration distance: 5 cm, 10-minute chamber saturation without preconditioning, derivatization agent: anisic aldehyde in sulfuric acid (VI)), obtaining a tool for rapid qualitative analysis of volatile terpenes, enabling the simultaneous determination of multiple samples of plant matrices. After modifying the analytical parameters (migration distance: 4 cm, 20-minute preconditioning of plates, derivatization agent: vanillin in *o*-phosphoric acid), the developed HPTLC method with densitometric detection was subjected to validation studies (determination of selectivity, limit of quantification and detection, range of linearity, repeatability, intra- and intergroup precision, accuracy and resistance) in order to evaluate its suitability for repeatable and accurate quantification of the selected terpene compounds (ledol, alloaromadendrene) in the *R. tomentosum* volatile fractions. Optimized chromatographic methods (GC/MS and HPTLC) were used for screening tests of biomass from *in vitro* cultures in the field of the essential oils' content and composition, determining the effectiveness of the biotechnological strategies used to obtain marsh tea microshoots, which would be a rich source of volatile fractions. In addition, the HPTLC

method described above was designed to perform selected tests with direct bioautography (anti-inflammatory and antioxidant activity) for biomass of the studied species.

As a result of the statistical comparative analysis of marsh tea from the Eurasian continent (data derived from own research and literature sources), it was found that the obtained dendrogram may be the basis for distinguishing ten chemotypes of *R. tomentosum*, due to the chemical composition of the essential oil. This fact confirms the difficulty in using the studied plant for medicinal purposes directly.

An important part of the doctoral thesis were experiments aimed at determining the biological activity of the selected volatile fractions from ground plants and *in vitro* cultures of *R. tomentosum*, with particular attention to the mechanisms of action of the essential oils that may limit the inflammatory process. For the first time, it was decided to evaluate the pro-apoptotic properties of the marsh tea volatile fractions targeting human T lymphocytes and synoviocytes, which excessively proliferate in patients with RA. Additionally, by means of TLC-direct bioautography, an initial assessment of antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of the essential oils from *R. tomentosum* biomass was performed.

In the course of biological tests, it was stated that all analyzed volatile fractions, from ground plants and *in vitro* cultures, contributed to limiting the proliferation of human T lymphocytes by increasing their apoptosis, regardless of the plant material chemotype, and showed a similar suppressive effect on both CD4+ and CD8+ cells. In turn, the application of high concentrations (1:400) of *R. tomentosum* essential oils led to the significant necrosis of fibroblast synoviocytes. The volatile fractions from *in vitro* cultures of marsh tea were characterized by the similar to the mother plant activity profile against the tested cells. In addition, using TLC-direct bioautography, the antioxidant properties of the *R. tomentosum* essential oils were confirmed (higher activity of microshoots compared to ground material), and the contribution of xanthine oxidase inhibition to the mechanism of inflammation reduction, exhibited by the studied terpene metabolites, was excluded.

To sum up, biotechnological, phytochemical and biological research, carried out as part of the doctoral project, enabled the achievement of the objective of the work, that is to obtain, based on the species *R. tomentosum*, the stable *in vitro* plant system, which is independent of environmental conditions and capable of continuous production of terpene compounds, exhibiting anti-inflammatory activity.

The *R. tomentosum* microshoots growing in the RITA® temporary immersion bioreactor, in Schenk-Hildebrandt medium with 24.60 µM 2-isopentenyloadenine, 592.02 µM adenine and 30 g l^{-1} saccharose, are capable of producing the essential oil in the amount of approx. 500 µl 100 g^{-1}

DW, achieved after 28 days of cultivation. Thus, a 67% increase in the content of volatile terpenes was obtained in the biomass compared to the perennial mother plant (approx. 300 μl 100 g^{-1} DW). The main components of the obtained volatile fractions were ledene oxide (II) (approx. 13%), shyobunone (approx. 8%), *p*-cymene (approx. 7%) and alloaromadendrene (approx. 6%). The high productivity of the plant system, maintained at the level of 0.36 ml of essential oil / l / day, is associated with the continuous and stable biosynthesis of volatile secondary metabolites, intended for pharmacological research, and in the future also for therapeutic purposes.

The results of the doctoral project have been fully published in two review articles and six experimental papers with a total impact factor IF=16.669. In addition, they were presented at international conferences as oral (2) and poster (4) reports. The popular science article, inspired by the research, was awarded in the competition „Complicated and Simple. Young scholars about their research", organized by the monthly „Forum Akademickie", under the honorary patronage of the Minister of Science and Higher Education.

PIŚMIENNICTWO

Ahmad, M., Faraazi, A.A., Aamir, M.N. (2013) The effect of *Ocimum sanctum* and *Ledum palustre* on serum uric acid level in patients suffering from gouty arthritis and hyperuricaemia. B Chem Soc Ethiopia, 27: 469-473.

Anderson, W. (1978) Tissue culture propagation of *Rhododendrons*. In Vitro, 14: 334.

Attimarad, M., Ahmed, K.K.M., Aldhubaib, B.E., Harsha, S. (2011) High-performance thin layer chromatography: A powerful analytical technique in pharmaceutical drug discovery. Pharm Methods, 2: 71-75.

Baananou, S., Bagdonaite, E., Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Boughattas, N.A. (2015) Supercritical CO_2 extract and essential oil of aerial part of *Ledum palustre* L. - Chemical composition and anti-inflammatory activity. Nat Prod Res, 29: 999-1005.

Bączyk, G. (2008) Przegląd badań nad jakością życia chorych na reumatoidalne zapalenie stawów. Reumatologia, 46: 372-379.

Belousova, N.I., Khan, V.A., Berezovskaya, T.P. (1990) Intraspecies chemical variability of the essential oil of *Ledum palustre*. Chem Nat Compd, 26: 398-405.

Black, P., Saleem, A., Dunford, A., Guerrero-Analco, J., Walshe-Roussel, B., Haddad, P., Cuerrier, A., Arnason, J.T. (2011) Seasonal variation of phenolic constituents and medicinal activities of Northern Labrador Tea, *Rhododendron tomentosum ssp. subarcticum*, an Inuit and Cree First Nations traditional medicine. Planta Med, 77: 1655-1662.

Bojarczuk, K. (1989) Micropropagation of *rhododendrons*. Acta Hortic, 251: 241-248.

Bonjardim, L.R., Cunha, E.S., Guimaraes, A.G., Santana, M.F., Oliveira, M.G.B., Serafini, M.R., Araujo, A.A.S., Antoniolli, A.R., Cavalcanti, S.C.H., Santos, M.R.V., Quintans-Junior, L.J. (2012) Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive properties of *p*-cymene in mice. Z Naturforsch, 67c: 15-21.

Borkowski, B. (1973) Chromatografia cienkowarstwowa w analizie farmaceutycznej, PZWL, Warszawa.

Bottini, N., Firestein, G.S. (2013) Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. Nat Rev Rheumatol, 9: 24-33.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Sci, 161: 839-851.

Bram, S., Wolfram, E. (2017) Recent advances in effect-directed enzyme assays based on thin-layer chromatography. Phytochem Anal, 28: 74-86.

Briggs, B.A., McCulloch, S.M., Caton L.A. (1994) *In vitro* propagation of *Rhododendron*. Acta Hortic, 364: 21-26.

Bryl, E., Witkowski, J.M. (2008) Układ odpornościowy a reumatoidalne zapalenie stawów. Forum Med Rodz, 2: 196-207.

Butkiene, R., Mockute, D. (2011) The variability of the essential oil composition of wild *Ledum palustre* L. shoots during vegetation period. J Essent Oil Res, 23: 9-13.

Butkiene, R., Sakociute, V., Latvenaite, D., Mockute, D. (2008) Composition of young and aged shoot essential oils of the wild *Ledum palustre* L. Chemija, 19: 19-24.

Chen, H.-P., Yang, K., Zheng, L.S., You, C.-X., Cai, Q., Wang, C.-F. (2015) Repellant and insecticidal activities of shyobunone and isoshyobunone derived from the essential oil of *Acorus calamus* rhizomes. Pharmacogn Mag, 11: 675-681.

Chu, S.S., Liu, Q.Z., Zhou, L., Du, S.S., Liu, Z.L. (2011) Chemical composition and toxic activity of essential oil of *Caryopteris incana* against *Sitophilus zeamais*. Afr J Biotechnol, 10: 8476-8480.

Ciftci, O., Ozdemir, I., Tanyildizi, S., Yildiz, S., Oguzturk, H. (2011) Antioxidative effects of curcumin, *β*-myrcene and 1,8-cineole against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induced oxidative stress in rats liver. Toxicol Ind Health, 27: 447-453.

Cutolo, M., Sulli, A., Pizzorni, C., Seriolo, B., Straub, R. (2001) Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis, 60: 729-735.

Dampc, A., Łuczkiewicz, M. (2013) *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*). A review of traditional use based on current research. Fitoterapia, 85: 130-143.

Dampc, A., Łuczkiewicz, M. (2015) Labrador tea – the aromatic beverage and spice: a review of origin, processing and safety. J Sci Food Agric, 95: 1577-1583.

Debnath, S.C. (2007) Propagation of *Vaccinium in vitro*: A review. Int J Fruit Sci, 6: 47-71.

Dembińska-Migas, W., Łuczkiewicz, M., Migas, P., Cisowski, W. (1998) Conditions for efficient induction and maintenance of callus cultures *Vaccinium corymbosum* var. Bluecrop and its accumulation of polyphenolic compounds. Biotechnologia, 2: 174-185.

Deschamps, C., Raskin, I., Simon, J.E. (2008) Regulation of essential oil accumulation in basil (*Ocimum basilicum* L.) in response to elicitation. Int J Plant Sci, 169: 981-986.

Dolatabadi, H.K., Goltapeh, E.M., Moieni, A., Jaimand, K., Sardrood, B.P., Varma, A. (2011) Effect of *Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera* on plant growth and essential oil yield in *Thymus vulgaris in vitro* and *in vivo* experiments. Symbiosis, 53: 29-35.

Duran-Pena, M.J., Botubol, J.M., Hanson, J. R., Collado, I.G., Hernandez-Galan, R. (2015) Biological activity of natural sesquiterpenoids containing a gem-dimethylcyclopropane unit. Nat Prod Rep, 32: 1236-48.

Eeckhaut, T., Janssens, K., De Keyser, E., De Riek, J. (2010) Micropropagation of *Rhododendron*. In: Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants, eds. Jain, S.M., Ochatt, S. J., Humana Press: 141-152.

Fard, F.R., Omidbaigi, R., Sharifi, M., Sefidkon, F., Behmanesh, M. (2012) Effect of methyl jasmonate on essential oil content and composition of *Agastache foeniculum*. J Med Plants Res, 6: 5701-5705.

Fokina, G.I., Frolova, T.V., Roikhel, V.M., Pogodina, V.V. (1991) [Experimental phytotherapy of tick-borne encephalitis]. Vopr Virusol, 36: 18-21.

Fraser, M.H., Cuerrier, A., Haddad, P.S., Arnason, J.T., Owen, P.L., Johns, T. (2007) Medicinal plants of Cree communities (Quebec, Canada): antioxidant activity of plants used to treat type 2 diabetes symptoms. Can J Physiol Pharmacol, 85: 1200-1214.

Fulzele, D., Heble, M., Rao, P. (1995) Production of terpenoid from *Artemisia annua* L. plantlet cultures in bioreactor. J Biotechnol, 40: 139-143.

Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., Bley, T. (2014) Temporary immersion systems in plant biotechnology. Eng Life Sci, 14: 607-621.

Ghanati, F., Bakhtiarian, S., Parast, B.M., Behrooz, M.K. (2014) Production of new active phytocompounds by *Achillea millefolium* L. after elicitation with silver nanoparticles and methyl jasmonate. Biosci Biotech Res Asia, 11: 391-399.

Gijsen, H., Wijnberg, J., de Groot, A. (1995) Structure, occurrence, biosynthesis, biological activity, synthesis, and chemistry of aromadendrane sesquiterpenoids. Fortschr Chem Org Naturst, 64: 149-193.

Giri, C.C., Zaheer, M. (2016) Chemical elicitors *versus* secondary metabolite production *in vitro* using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. Plant Cell Tiss Organ Cult, 126: 1-18.

Goetsch, L., Eckert, A.J., Hall, B.D. (2005) The molecular systematics of *Rhododendron* (*Ericaceae*): A phylogeny based upon RPB2 gene sequences. Syst Bot, 30: 616-626.

Gorelick, J., Bernstein, N. (2014) Elicitation: an underutilized tool in the development of medicinal plants as a source of therapeutic secondary metabolites. Adv Agron, 124: 201-230.

Gounaris, Y. (2010) Biotechnology for the production of essential oils, flavours and volatile isolates. A review. Flavour Fragr J, 25: 367-386.

Gretsusnikova, T., Jarvan, K., Orav, A., Koel, M. (2010) Comparative analysis of the composition of the essential oil from the shoots, leaves and stems the wild *Ledum palustre* L. from Estonia. Procedia Chem, 2: 168-173.

Grzegorczyk, I., Wysokińska, H. (2008) Liquid shoot culture of *Salvia officinalis* L. for micropropagation and production of antioxidant compounds; effect of triacontanol. Acta Soc Bot Pol, 77: 99-104.

Guo, S., Zhang, W., Liang, J., You, C., Geng, Z., Wang, C., Du, S. (2016) Contact and repellent activities of the essential oil from *Juniperus formosana* against two stored product insects. Molecules, 21: 504.

Guo, W.L., Gong, L., Ding, Z.F., Li, Y.D., Li, F.X., Zhao, S.P., Liu, B. (2006) Genomic instability in phenotypically normal regenerants of medicinal plant *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. f., as

revealed by ISSR and RAPD markers. Plant Cell Rep, 25: 896-906.

Hanachi, N., Charef, N., Baghiani, A., Khennouf, S., Derradji, Y., Boumerfeg, S., Harzallah, D., Arrar, L. (2009) Comparison of xanthine oxidase levels in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other joint inflammations. Saudi Med J, 30: 1422-1425.

Hilton, M., Jay, A., Rhodes, M., Wilson, P. (1995) Growth and monoterpene production by transformed shoot cultures of *Mentha citrata* and *Mentha piperita* in flasks and fermenters. Appl Microbiol Biotechnol, 43: 452-459.

Hnatuszko-Konka, K., Łuchniak, P., Wiktorek-Smagur, A., Gerszberg, A., Kowalczyk, T., Kononowicz, A.K. (2009) Transformacja roślin za pośrednictwem *Agrobacterium rhizogenes*. Postępy biol komórki, 36: 189-200.

Huetteman, C.A., Preece, J.E. (1993) Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell Tissue Organ Cult, 33: 105-119.

Ignatowicz, S., Wesołowska, B. (1996) Repellency of powdered plant material of the Indian neem tree, the Labrador tea, and the sweet-flag, to some stored product pests. Pol Pis Entomol, 65: 61-67.

Jaenson, T.G., Palsson, K., Borg-Karlson, A.K. (2005) Evaluation of extracts and oils of tick-repellent plants from Sweden. Med Vet Entomol, 19: 345-352.

Jaenson, T.G., Palsson, K., Borg-Karlson, A.K. (2006) Evaluation of extracts and oils of mosquito (*Diptera*: *Culicidae*) repellent plants from Sweden and Guinea-Bissau. J Med Entomol, 43: 113-119.

Jesionek, A., Kokotkiewicz, A., Włodarska, P., Filipowicz, N., Bogdan, A., Ochocka, R., Szreniawa-Sztajnert, A., Zabiegała, B., Buciński, A., Łuczkiewicz, M. (2016) *In vitro* propagation of *Rhododendron tomentosum* - an endangered essential oil bearing plant from peatland. Acta Biol Cracov Bot, 58: 29-43.

Jesionek, A., Kokotkiewicz, A., Włodarska, P., Zabiegała, B., Buciński, A., Łuczkiewicz, M. (2017) Bioreactor shoot cultures of *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*) for a large-scale production of bioactive volatile compounds. Plant Cell Tiss Org Cult, 131: 51-64.

Jesionek, A., Kokotkiewicz, A., Królicka, A., Zabiegała, B., Łuczkiewicz, M. (2018) Elicitation strategies for the improvement of essential oil content in *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*) bioreactor-grown microshoots. Ind Crops Prod, 123: 461-469.

Jesionek, A., Pobłocka-Olech, L., Zabiegała, B., Buciński, A., Krauze-Baranowska, M., Łuczkiewicz, M. (2018) Validated HPTLC method for determination of ledol and alloaromadendrene in the essential oil fractions of *Rhododendron tomentosum* plants and *in vitro* cultures and bioautography for their activity screening. J Chromatogr B, 1086: 63-72.

Jesionek, A., Zabiegała, B., Buciński, A., Łuczkiewicz, M. (2019) From harvesting to distillation – effect of analytical procedures on the yield and chemical composition of *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*) essential oil. Acta Pol Pharm – Drug Res, 76: 83-92.

Jesionek, A., Kokotkiewicz, A., Mikosik-Roczyńska, A., Ciesielska-Figlon, K., Łuczkiewicz, P., Buciński, A., Daca, A., Witkowski, J.M., Bryl, E., Zabiegała, B., Łuczkiewicz, M. (2019.) Chemical variability of *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*) essential oils and their pro-apoptotic effect on lymphocytes and rheumatoid arthritis synoviocytes. Fitoterapia, 139: 104402.

Jędryka-Góral, A., Łastowiecka, E. (2003) Praca zawodowa a choroby reumatyczne. Bezp Pr, 5: 19-21.

Judzentiene, A., Budiene, J., Misiunas, A., Butkiene, R. (2012) Variation in essential oil composition of *Rhododendron tomentosum* gathered in limited population (in Eastern Lithuania). Chemija, 23: 131-135.

Jura-Półtorak, A., Olczyk, K. (2011) Diagnostyka i ocena aktywności reumatoidalnego zapalenia stawów. Diagn Lab, 47: 431-438.

Khojah, H.M., Ahmed, S., Abdel-Rahman, M.S., Hamza, A.-B. (2016) Reactive oxygen and nitrogen species in patients with rheumatoid arthritis as potential biomarkers for disease activity and the role of antioxidants. Free Radic Biol Med, 97: 285-291.

Kim, D.-M., Nam, B.-W. (2006) Extracts and essential oil of *Ledum palustre* L. leaves and their antioxidant and antimicrobial activities. Prev Nutr Food Sci, 11: 100-104.

Kłak, A., Raciborski, F., Samel-Kowalik, P. (2016) Social implications of rheumatic diseases. Reumatologia, 54: 73-78.\

Kumar, L.D., Karthik, R., Gayathri, N., Sivasudha, T. (2016) Advancement in contemporary diagnostic and therapeutic approaches for rheumatoid arthritis. Biomed Pharmacother, 79: 52-61.

Kuusik, A., Harak, M., Hiiesaar, K., Metspalu, L., Tartes, U. (1995) Studies on insect growth regulating (IGR) and toxic effects of *Ledum palustre* extracts on *Tenebrio molitor* pupae (*Coleoptera*, *Tenebrionidae*) using calorimetric recordings. Thermochim Acta, 251: 247-253.

Kuzovkina, I.N., Szarka, S., Hethelyi, E., Lemberkovics, E., Szoke, E. (2009) Composition of essential oil in genetically transformed roots of *Ruta graveolens*. Russ J Plant Physiol, 56: 846-851.

Laev, S.S., Salakhutdinov, N.F. (2015) Anti-arthritic agents: progress and potential. Bioorg Med Chem, 23: 3059-3080.

Li, H., Wan, A. (2013) Apoptosis of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes: possible roles of nitric oxide and the thioredoxin 1. Mediators Inflamm, 2013: 953462.

Lloyd, G., McCown, B.H. (1981) Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot tip culture. Proceedings of the International Plant Propagators' Society, 30: 421-427.

Łuczkiewicz, M., Piotrowski, A. (2005) Two-stage system for micropropagation of several *Genista* plants producing large amounts of phytoestrogens. Z Naturforsch C, 60: 557-566.

Mah, S.H., Ee, G.C.L., Teh, S.S. (2013) Chemistry and cytotoxic activity of essential oil from the stem bark of *Calophyllum soulattri*. Asian J Chem, 25: 8831-8832.

Malepszy, S. (2012) Biotechnologia roślin. Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa, 76-84; 131-144.

Marriott, P.J., Shellie, R., Cornwell, C. (2001) Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. J Chromatogr A, 936: 1-22.

Marston, A. (2011) Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. J Chromatogr A, 1218: 2676-2683.

Mellado, M., Martinez-Munoz, L., Cascio, G., Lucas, P., Pablos, J.L., Rodriguez-Frade, J.M. (2015) T cell migration in rheumatoid arthritis. Front Immunol, 6: 384.

Meravy, L., Cvikrova, M., Hrubcova, M., (1988) The effect of DMSO on excretion of proteins and phenolic substances by *Nicotiana tabacum* cells into culture medium. Biol Plant 30: 241-246.

Migas, P., Łuczkiewicz, M., Cisowski, W. (2006) The influence of auxins on the biosynthesis of isoprene derivatives in callus cultures of *Vaccinium corymbosum* var. bluecrop. Z Naturforsch C, 61: 565-570.

Miguel, M.M. (2010) Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. Molecules, 15: 9252-9287.

Mor, A., Abramson, S.B., Pillinger, M.H. (2005) The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. Clin Immunol, 115: 118-128.

Mulder-Krieger, T., Verpoorte, R., Svendsen, A.B., Scheffer, J.J.C. (1988) Production of essential oils and flavours in plant cell and tissue cultures. A review. Plant Cell Tissue Organ Cult, 13: 85-154.

Neumann, E., Lefevre, S., Zimmermann, B., Gay, S., Muller-Ladner, U. (2010) Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts. Trends Mol Med, 16: 458-468.

Norton, M.E., Norton, C.R. (1985) *In vitro* propagation of *Ericaceae*: A comparison of the activity of the cytokinins N6-benzyladenine and N6-isopentenyladenine in shoot proliferation. Sci Hort, 27: 335-340.

Pacher, P., Nivorozhkin, A., Szabo, C. (2006) Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. Pharmacol Rev, 58: 87-114.

Pawłowska, J., Mikosik, A., Soroczyńska-Cybula, M., Jóźwik, A., Łuczkiewicz, P., Mazurkiewicz, S., Lorczyński, A., Witkowski, J.M., Bryl, E. (2009) Different distribution of CD4 and CD8 T cells in synovial membrane and peripheral blood of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. Folia Histochem Cytobiol, 47: 1-6.

Phull, A.-R., Nasir, B., ul Haq, I., Kim, S.J. (2018) Oxidative stress, consequences and ROS mediated cellular signaling in rheumatoid arthritis. Chem Biol Interact, 281: 121-136.

Pietrosiuk, A., Furmanowa, M. (2006) Biotechnologia roślin w ochronie zdrowia człowieka. Biotechnologia, 4: 116-123.

Ponchel, F., Vital, E., Kingsbury, S.R., El-Sherbiny, Y.M. (2012) CD4+ T-cell subsets in rheumatoid arthritis. Int J Clin Rheumatol, 7: 37-53.

Quinonez-Flores, C.M., Gonzalez-Chavez, S.A., Del Río Najera, D., Pacheco-Tena, C. (2016) Oxidative stress relevance in the pathogenesis of the rheumatoid arthritis: A systematic review. Biomed Res Int, 6097417.

Raal, A., Orav, A., Gretchushnikova, T. (2014) Composition of the essential oil of the *Rhododendron tomentosum* Harmaja from Estonia. Nat Prod Res, 28: 1091-1098.

Rahimmalek, M., Goli, S.A.H. (2013) Evaluation of six drying treatments with respect to essential oil yield, composition and color characteristics of *Thymus daenensis* subsp. *daenensis*. Celak leaves. Ind Crops Prod, 42: 613-619.

Ramallo, I.A., Zacchino, S.A., Furlan, R.L.E. (2006) A rapid TLC autographic method for the detection of xanthine oxidase inhibitors and superoxide scavengers. Phytochem Anal, 17: 15-19.

Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Goleniowski, M., Cusido, R.M., Palazon, J. (2016) Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. Molecules, 21: 1-24.

Rao, S.R., Ravishankar, G.A. (2002) Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnol Adv, 20: 101-153.

Rios, E.R., Rocha, N.F., Carvalho, A.M., Vasconcelos, L.F., Dias, M.L., de Sousa, D.P., de Sousa, F.C., Fonteles, M.M. (2013) TRP and ASIC channels mediate the antinociceptive effect of citronellyl acetate. Chem Biol Interact, 203: 573-579.

Rout, G.R., Samantaray, S., Das, P. (2000) In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. Biotechnol Adv, 18: 91-120.

Rubiolo, P., Sgorbini, B., Liberto, E., Cordero, C., Bicchi, C. (2010) Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review. Flavour Fragr J, 25: 282-290.

Ruffoni, B., Pistelli, L., Bertoli, A., Pistelli, L. (2010) Plant cell cultures: bioreactors for industrial production. W: Bio-farms for nutraceuticals. Advances in experimental medicine and biology, Giardi M.T., Rea G., Berra B., Springer, Boston, 203-221.

Santana, M.F., Quintans-Junior, L.J., Cavalcanti, S.C.H., Oliveira, M.G.B., Guimaraes, A.G., Cunha, E.S., Melo, M.S., Santos, M.R.V., Araujo, A.A.S., Bonjardim, L.R. (2011) p-Cymene reduces orofacial nociceptiveresponse in mice. Braz J Pharmacogn, 21: 1138-1143.

Santos, P.A.G., Figueiredo, A.C., Lourenco, P.M.L., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Oliveira, M.M., Schripsema, J., Deans, S.G., Scheffer, J.J.C. (2002) Hairy root cultures of *Anethum graveolens* (dill): establishment, growth, time-course study of their essential oil and its comparison with parent plant oils. Biotechnol Lett, 24: 1031-1036.

Sapek, B. (2014) Nagromadzanie i uwalnianie fosforu w glebach – źródła, procesy, przyczyny. Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie, 14: 77-100.

Sarosi, S., Sipos, L., Kokai, Z., Pluhar, Z., Szilvassy, B., Novak, I. (2013) Effect of different drying techniques on the aroma profile of *Thymus vulgaris* analyzed by GC–MS and sensory profile methods. Ind Crops Prod, 46: 210-216.

Schenk, R., Hildebrandt, A. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can J Bot, 50: 199-204.

Skapenko, A., Leipe, J., Lipsky, P.E., Schulze-Koops, H. (2005) The role of the T cell in autoimmune inflammation. Arthritis Res Ther, 7: S4-S14.

Smólczyński, S., Orzechowski, M. (2009) Przebieg mineralizacji związków azotu w glebach torfowo-murszowych o różnym stopniu zamulenia w krajobrazie młodoglacjalnym. Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie, 9: 141-150.

Snowarski, M. (2002) *Ledum palustre* L., bagno zwyczajne. W: Atlas roślin Polski, atlas-roslin.pl.

Souza, M.C., Siani, A.C., Ramos, M.F.S., Menezes-de-Lima Jr, O., Henriques, M.G.M.O. (2003) Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two *Asteraceae* species. Pharmazie, 58: 582-586.

Spiridonov, N.A., Konovalov, D.A., Arkhipov, V.V. (2005) Cytotoxicity of some Russian ethnomedicinal plants and plant compounds. Phytother Res, 19: 428-432.

Thiem, B., Kikowska, M., Kurowska, A., Kalemba, D. (2011) Essential oil composition of the different parts and *in vitro* shoot culture of *Eryngium planum* L. Molecules, 16: 7115-7124.

Tisserat, B., Vaughn, S.F. (2008) Growth, morphogenesis, and essential oil production in *Mentha spicata* L. plantlets *in vitro*. In Vitro Cell Dev Biol-Plant, 44: 40-50.

Tran, D.N., Cramer, N. (2014). Biomimetic synthesis of (+)-ledene, (+)-viridiflorol, (−)-palustrol, (+)-spathulenol, and psiguadial A, C, and D via the platform terpene (+)-bicyclogermacrene. Chem Eur J, 20: 10654-10660.

Tunon, H., Olavsdotter, C., Bohlin, L. (1995) Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. Inhibition of

prostaglandin biosynthesis and PAF-induced exocytosis. J Ethnopharmacol, 48: 61-76.

Valente, J., Zuzarte, M., Goncalves, M.J., Lopes, M.C., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., Cruz, M.T. (2013) Antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Oenanthe crocata* L. essential oil. Food Chem Toxicol, 62: 349-354.

Verpoorte, R., van der Heijden, R., ten Hoopen, H.J.G., Memelink, J. (1999) Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. Biotechnol Lett, 21: 467-479.

Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J., Kowalska, T. (2008) Thin layer chromatography in phytochemistry, CRC Press, Boca Raton, USA.

Watt, M.P. (2012) The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. Afr J Biotechnol, 11: 14025-14035.

Wu, Z., Yin, Z., Du, Y., Feng, R., Ye, K., Wei, Q., Hu, Y., He, L., Liao, L., Wang, Y. (2014) γ-Terpineol inhibits cell growth and induces apoptosis in human liver cancer BEL-7402 cells *in vitro*. Int J Clin Exp Pathol, 7: 6524-6533.

Xie, G., Chen, N., Soromou, L.W., Liu, F., Xiong, Y., Wu, Q., Li, H., Feng, H., Liu, G. (2012) p-Cymene protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting inflammatory cell activation. Molecules, 17: 8159-8173.

Yang, C.L., Or, T.C., Ho, M.H., Lau, A.S. (2013) Scientific basis of botanical medicine as alternative remedies for rheumatoid arthritis. Clinic Rev Allerg Immunol, 44: 284-300.

Zampeli, E., Vlachoyiannopoulos, P.G., Tzioufas, A.G. (2015) Treatment of rheumatoid arthritis: unraveling the conundrum. J Autoimmun, 65: 1-18.

Zhang, L.L., Wang, H.X., Wang, Y.M., Xu, M., Hu, X.Y. (2017) Diurnal effects on chinese wild *Ledum palustre* L. essential oil yields and composition. J Anal Sci Meth Instr, 7: 47-55.

Zhang, M., Zhao, J.-j., Wu, W.-b., Zhao, Y., Zhu, X.-l., Qu, W.-j. (2010) Analgesic and anti-inflammatory activities of extracts from *Ledum palustre* L. in mice. Nat Prod Res Dev, 22: 326-329.

Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R. (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnol Adv, 23: 283-333.

Złotek, U., Michalak-Majewska, M., Szymanowska, U. (2016) Effect of jasmonic acid elicitation on the yield, chemical composition, and antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oil of lettuce leaf basil (*Ocimum basilicum* L.). Food Chem, 213: 1-7.