



UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej

**ZAŁĄCZNIK 2**

**AUTOREFERAT**

**ZAWIERAJĄCY OPIS OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH**

**W JEZYKU POLSKIM**

**AGNIESZKA SZOPA**

**Kraków 2018**

## Spis treści

<b>1. Informacje podstawowe .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Imię i nazwisko.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Wskazanie osiągnięcia naukowego, wynikającego z art. 16 ust. 2 Ustawy z dnia 14.03.2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1. Tytuł osiągnięcia naukowego .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2. Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy habilitacyjnej (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa).....</b>	<b>7</b>
<b>2.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania .....</b>	<b>13</b>
<b>2.4. Piśmiennictwo .....</b>	<b>40</b>
<b>3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.....</b>	<b>44</b>
<b>3.1. Aktywność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora.....</b>	<b>44</b>
<b>3.2. Aktywność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora .....</b>	<b>47</b>
<b>3.3. Współpraca z jednostkami naukowymi w kraju i za granicą.....</b>	<b>53</b>
<b>3.4. Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach.....</b>	<b>58</b>
<b>3.5. Międzynarodowe i krajowe nagrody oraz odznaczenia związane z działalnością naukową</b>	<b>60</b>
<b>3.6. Recenzowanie projektów międzynarodowych i krajowych, oraz publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych.....</b>	<b>61</b>
<b>3.7. Staże w zagranicznych lub krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich.....</b>	<b>62</b>
<b>3.9. Działalność organizacyjna.....</b>	<b>66</b>
<b>3.10. Promotorstwo i opieka nad naukowymi pracami studenckimi.....</b>	<b>67</b>
<b>4. Bibliometryczne podsumowanie osiągnięć naukowych .....</b>	<b>Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.</b>

## 1. Informacje podstawowe

### 1.1. Imię i nazwisko

**AGNIESZKA SZOPA**

NAZWISKO RODOWE – KUŚ

### **Dane kontaktowe**

- Adres**
- dom            Maciejowice 76, 32-010 Kocmyrzów, woj. małopolskie
  - praca           Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński, *Collegium Medicum* ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, woj. małopolskie
- Kontakt**
- telefon        +48-504-954-177
  - e-mail         a.szopa@uj.edu.pl; szopa.a@wp.pl

### **Dane personalne**

- **Data i miejsce urodzenia**        27 września 1984, Proszowice
- **PESEL**                                84092712629
- **Numer dowodu osobistego**        ARW316636
- **Stan cywilny; dzieci**                mężatka; syn

## 1.2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

- 25.02.2013. **Doktor Nauk Farmaceutycznych**
  - temat: „Badania nad akumulacją wybranych grup biologicznie aktywnych metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.”
  - rozprawa doktorska o tematyce biotechnologicznej obroniona z wyróżnieniem
  - Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński, *Collegium Medicum*, Kraków
  - promotor: dr hab. Halina Ekiert, Prof. UJ
  - praca zgłoszona do „Nagrody Ministra Zdrowia za osiągnięcia będące podstawą nadania stopnia naukowego doktora, doktora nauk farmaceutycznych”, 2014 r.
  
- 31.01.2009. **Magister Farmacji**
  - temat: „Akumulacja kwasów fenolowych w kulturach *in vitro* *Ruta graveolens* L.”
  - praca magisterska o tematyce biotechnologicznej
  - Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński, *Collegium Medicum*, Kraków
  - promotor: dr hab. Halina Ekiert
  - II miejsce w konkursie na najlepszą pracę magisterską - Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński, *Collegium Medicum*
  - udział w III edycji Ogólnopolskiego Konkursu na Najlepsze Prace Magisterskie z Zakresu Farmacji Przemysłowej - Fundacja Hasco-Lek, Wrocław 2009

### **1.3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu**

- 1.10.13. - obecnie**     **Adiunkt, Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Kraków**
- 1.02.10.-30.09.13.**     **Asystent, Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Kraków**
- 1.07.10.-30.09.11.     Magister farmacji, Apteka mgr Anna Kowalska, mgr Bogdan Kowalski, Kraków
- 15.12.09.-31.01.10.     Magister farmacji, Apteka „Nad Dłubnią” mgr Krystian Morańda, Batowice
- 1.02.09.-31.01.10.     Magister farmacji, Apteka mgr Regina Gawęł, Kocmyrzów

2. Wskazanie osiągnięcia naukowego, wynikającego z art. 16 ust. 2 Ustawy z dnia 14.03.2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.

### 2.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

**Kultury *in vitro* *Schisandra chinensis* oraz *S. chinensis* cv. *Sadova* jako model do badań biotechnologicznych ze szczególnym uwzględnieniem akumulacji lignanów dibenzocyklooktadienowych**

- Podstawę pracy habilitacyjnej stanowi powiązany tematycznie cykl ośmiu publikacji oryginalnych [1H-8H], oraz jedna publikacja pogładowa [9H] powstałe w latach 2015-2018.
- We wszystkich publikacjach stanowiących podstawę habilitacji jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym.
- Mój średni udział % w publikacjach cyklu monotematycznego wynosi **74,44 %**.
- Sumaryczny Impact Factor (IF) prac stanowiących podstawę habilitacji [1H-9H] wynosi **21,548**; łączna suma punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) wynosi **265**.
- Wyniki badań opublikowane w pracach [H1-H9] uzyskałam przy finansowym wsparciu funduszy Programów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego: „Dotacja celowa dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich do 35 roku życia” (K/DSC/000029, lata 2011-2013; K/DSC/001950, lata 2014-2016; K/DSC/004297 od 2017 r.), oraz „Dotacja na utrzymanie potencjału badawczego Wydziałów UJ CM, tzw. „Projekty statutowe” (K/ZDS/003312, lata 2012-2014; K/ZDS/005614 lata 2015-2017) (pkt. 3.4 Autoreferatu).
- Publikacje zgłoszone do postępowania habilitacyjnego powstały we współpracy z: prof. dr hab. Marią Łuczkiwicz, dr Adamem Kokotkiewiczem i mgr Agatą Król z Katedry Farmakognozji Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego; prof. dr hab. Adamem Bucińskim i dr Urszulą Marzec-Wróblewską z Katedry i Zakładu Biofarmacji Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, *Collegium Medicum* im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy; dr Anną Maślanką z Katedry Chemii Nieorganicznej Uniwersytetu Jagiellońskiego, *Collegium Medicum*; oraz dr Radosławem Ekiertem z Krakowskich Zakładów Zielarskich „Herbapol” w Krakowie.

**2.2. Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy habilitacyjnej** (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

*Impact factor (IF) oraz punktację Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) publikacji naukowych podano zgodnie z rokiem ich opublikowania*

**1H. Szopa A, Ekiert H. 2015,** Production of schisantherin A and gomisin G in *in vitro* cultures of *Schisandra chinensis*. **Phytochemistry Letters**, 11: 440-444, DOI:10.1016/j.phytol.2014.12.022.

**IF=1,353; MNiSW=20 pkt**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w zaprojektowaniu pomysłu badań, współudziale w: przeprowadzeniu doświadczeń z zakresu hodowli in vitro, analiz chromatograficznych, ich interpretacji i obliczeń, interpretacji uzyskanych wyników badań, współudziale w napisaniu manuskryptu, przeglądzie literatury, koordynowaniu drogi edytorskiej manuskryptu jako autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na 85%.*

**2H. Szopa A, Kokotkiewicz A, Marzec-Wróblewska U, Bucinski A, Luczkiewicz M, Ekiert H. 2016,** Accumulation of dibenzocyclooctadiene lignans in agar cultures and in stationary and agitated liquid cultures of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 100(9):3965-3977. DOI: 10.1007/s00253-015-7230-9.

**IF=3,420; MNiSW=35**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w zaprojektowaniu koncepcji i metodyki badań, koordynowaniu oraz przeprowadzeniu doświadczeń z zakresu hodowli in vitro, przeprowadzeniu części analiz chromatograficznych, ich interpretacji i obliczeń, interpretacji uzyskanych wyników badań, przeprowadzeniu obliczeń statystycznych, napisaniu manuskryptu, przeglądzie literatury, koordynowaniu drogi edytorskiej manuskryptu jako autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na 60%.*

**3H. Szopa A, Ekiert H. 2016,** The importance of applied light quality on the production of lignans and phenolic acids in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. cultures *in vitro*. **Plant Cell, Tissue & Organ Culture**, 127: 115–121. DOI: 10.1007/s11240-016-1034-1.

**IF=2,002; MNiSW=30pkt**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaprojektowaniu koncepcji i metodyki badań, koordynowaniu oraz przeprowadzeniu doświadczeń z zakresu hodowli in vitro, przeprowadzeniu analiz chromatograficznych, ich interpretacji i obliczeń, interpretacji uzyskanych wyników badań, przeprowadzeniu obliczeń statystycznych, na udziale w napisaniu manuskryptu, przeglądzie literatury, koordynowaniu drogi edytorskiej manuskryptu jako autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na 85%.*

**4H. Szopa A, Kokotkiewicz A, Król A, Luczkiewicz M, Ekiert H. 2018,** Improved production of dibenzocyclooctadiene lignans in the elicited microshoot cultures of *Schisandra chinensis* (Chinese magnolia vine). **Applied Microbiology and Biotechnology**, 102(2): 945-959. DOI: 10.1007/s00253-017-8640-7,

**IF=3,420; MNiSW=35 pkt**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w zaprojektowaniu koncepcji i metodyki badań, koordynowaniu doświadczeń z zakresu hodowli in vitro, przeprowadzeniu analiz chromatograficznych, ich interpretacji i obliczeń, interpretacji uzyskanych wyników badań, przeprowadzeniu obliczeń statystycznych, napisaniu manuskryptu, przeglądzie literatury, koordynowaniu drogi edytorskiej manuskryptu jako autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na 70%.*

**5H. Szopa A, Kokotkiewicz A, Luczkiewicz M, Ekiert H. 2017,** Schisandra lignans production regulated by different bioreactor type. **Journal of Biotechnology**, 14 (247): 11-17. DOI:10.1016/j.jbiotec.2017.02.007.

**IF=2,599; MNiSW=30 pkt**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w zaprojektowaniu koncepcji i metodyki badań, koordynowaniu doświadczeń z zakresu hodowli in vitro, przeprowadzeniu analiz chromatograficznych, ich interpretacji i obliczeń, interpretacji uzyskanych wyników badań, przeprowadzeniu obliczeń statystycznych, napisaniu manuskryptu, przeglądzie literatury, koordynowaniu drogi edytorskiej manuskryptu jako autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na 70%.*

**6H. Szopa A, Kokotkiewicz A, Bednarz M, Luczkiewicz M, Ekiert H. 2017,** Studies on the accumulation of phenolic acids and flavonoids in different *in vitro* culture systems of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. using a DAD-HPLC method. **Phytochemistry Letters**: 20: 306-308. DOI: 10.1016/j.phytol.2016.10.016.

**IF=1,418; MNiSW=20 pkt**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w zaprojektowaniu koncepcji i metodyki badań, koordynowaniu oraz przeprowadzeniu doświadczeń z zakresu hodowli in vitro, przeprowadzeniu analiz chromatograficznych, ich interpretacji i obliczeń, interpretacji uzyskanych wyników badań, przeprowadzeniu obliczeń statystycznych, napisaniu manuskryptu, przeglądzie literatury, koordynowaniu drogi edytorskiej manuskryptu jako autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na 70%.*



**7H. Szopa A, Kwiecień I, Ekiert H. 2017, Biotransformation of hydroquinone and 4-hydroxybenzoic acid in *Schisandra chinensis* (Chinese magnolia vine) *in vitro* cultures. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 16(6), 53–62. DOI: 10.24326/asphc.2017.6.5.**

**IF= 0,523; MNiSW=20 pkt**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w zaprojektowaniu pomysłu badań, udziale w przeprowadzeniu doświadczeń z zakresu hodowli in vitro, analiz chromatograficznych, ich interpretacji i obliczeń, interpretacji uzyskanych wyników badań, napisaniu manuskryptu, przeglądzie literatury, oraz koordynowaniu drogi edytorskiej manuskryptu jako autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na 75%.*

**8H. Szopa A, Klimek-Szczykutowicz M, Kokotkiewicz A, Maślanka A, Luczkiewicz M, Ekiert H. 2018, Phytochemical and biotechnological studies on *Schisandra chinensis* cultivar Sadova No. 1 - a high utility medicinal plant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, DOI: 10.1007/s00253-018-8981-x.**

**IF=3,420, MNiSW=35 pkt**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaprojektowaniu koncepcji i metodyki badań, przeprowadzeniu części doświadczeń z zakresu hodowli in vitro, przeprowadzeniu analiz chromatograficznych, ich interpretacji i obliczeń, interpretacji uzyskanych wyników badań, przeprowadzeniu obliczeń statystycznych, napisaniu manuskryptu, przeglądzie literatury, koordynowaniu drogi edytorskiej manuskryptu jako autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na 70%.*

**9H. Szopa A, Ekiert R, Ekiert H. 2017, Current knowledge of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (Chinese magnolia vine) as a medicinal plant species - a review on the bioactive components, pharmacological properties, analytical and biotechnological studies. *Phytochemistry Reviews*, 16(2): 195-218. DOI: 10.1007/s11101-016-9470-4. (publikacja pogładowa)**

**IF= 3,393; MNiSW=40 pkt**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w zaprojektowaniu koncepcji pracy, przeglądzie i ewaluacji literatury, napisaniu manuskryptu, koordynowaniu drogi edytorskiej manuskryptu jako autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na 85%.*

Wyniki badań wchodzące w skład ww. cyklu zaprezentowałam również na konferencjach naukowych zagranicznych i krajowych w formie wykładów oraz prezentacji posterowych:

▪ **Wygłoszone referaty na międzynarodowych w kraju i krajowych konferencjach tematycznych**

*Konferencje międzynarodowe w kraju:*

1. **Szopa A**, Klimek-Szczykutowicz M, Ekiert H: Accumulation of schisandra lignans in agar microshoot cultures of *Schisandra chinensis* cv. Sadova. **4<sup>th</sup> International Conference of Cell Biology**, Kraków, 11-12.05.2018, Book of abstracts p. 41 (**wystąpienie ustne w języku angielskim**)
2. **Szopa A**, Kokotkiewicz A, Król A, Luczkiewicz M, Ekiert H: Improved production of dibenzocyclooctadiene lignans in elicited microshoot cultures of *Schisandra chinensis*. **6<sup>th</sup> Central European Congress of Life Sciences Eurobiotech**, Kraków, 11-14.09.2017, Abstracts book, p. 77 (**wystąpienie ustne w języku angielskim**)
3. **Szopa A**, Kokotkiewicz A, Łuczkiwicz M, Ekiert H: Trials of *Schisandra* lignans production for pharmaceutical purpose in the different types of bioreactors. **17<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology**, Kraków, 3-6.07.2016, New Biotechnology (Book of abstracts), 33, 2016, suppl. S45-S46 (**wystąpienie ustne w języku angielskim**)

*Konferencje krajowe:*

4. **Szopa A**, Kokotkiewicz A, Luczkiewicz M, Ekiert H: The influence of medium supplementation with permeabilizing agent and elicitors on accumulation of dibenzocyclooctadiene lignans in agitated microshoot cultures of *Schisandra chinensis*. (Wpływ suplementacji mikropędów *Schisandra chinensis* czynnikami permeabilizującymi i elicytorami na akumulację lignanów dibenzocyklooktadienowych w warunkach *in vitro*.) **X Conference In vitro Cultures In Plant Physiology**, Kraków, 7-9.12.2016, Abstract in: Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 2016, 58(2), 32. (**wystąpienie ustne w języku polskim**)
5. **Szopa A**, Ekiert H: *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *in vitro* cultures as an attractive source of dibenzocyclooctadiene lignans. (Kultury *in vitro* *Schisandra chinensis* (turcz.) Baill. jako atrakcyjne źródło pozyskiwania lignanów dibenzocyklooktadienowych.) **IX National Conference In vitro Cultures In Plant Physiology**, Kraków, 4-6.12.2013, Abstracts in: Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 2013, 55 (2), 28. (**wystąpienie ustne w języku polskim**)

*Konferencja zagraniczna:*

6. **Szopa A.**, Kubica P., Ekiert H., *In vitro* cultures of Aronia and Schisandra species as a rich source of antioxidants - a review of biotechnological studies. Le Studium, Loire Institute for Advanced Studies, Conference "Modern aspects of plant *in vitro* technology" Tours, France, 27.06.2018. (**planowane wystąpienie ustne w języku angielskim na zaproszenie organizatorów**)

▪ **Prezentacje posterowe na zagranicznych, międzynarodowych w kraju, oraz krajowych konferencjach naukowych**

*Konferencje zagraniczne:*

1. **Szopa A**, Klimek M, Ekiert H: Bioactive Schisandra lignans in microshoot cultures of *Schisandra chinensis* cv. Sadova No. 1 – perspective for phytotherapy. **21<sup>st</sup> International Congress PHYTOPHARM 2017 and 10<sup>th</sup> Anniversary of the TCM Research Center, Graz (Austria)**, 2-5.07.2017, Abstracts of the Congress, Reviews on clinical pharmacology and drug therapy (Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии) supp. 1, 15 (15), 2017, 66.
2. **Szopa A**, Kokotkiewicz A, Łuczkiwicz M, Ekiert H: Schisandra lignans – the possibility of production in the different types of bioreactors. **The 19<sup>th</sup> International Congress PHYTOPHARM 2015, Bonn (Niemcy)**, 21-24.07.2015, Abstracts Book, Reviews on clinical pharmacology and drug therapy (Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии) 13 (supl.), 2015, 27-28.
3. **Szopa A**, Ekiert H: *Schisandra chinensis in vitro* cultures as a good potential source of therapeutically important lignans: schizantharin A and gomisin G. **62<sup>nd</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research – GA Guimarães (Portugalia)**, 31.08-4.09.2014, Book of Abstracts, Planta Medica, 16 (80), 2014, 415.

*Konferencje międzynarodowe w kraju:*

4. **Szopa A**, Klimek-Szczykutowicz M, Ekiert H: Production of phenolic acids in agitated microshoot cultures of *Schisandra chinensis* cv. Sadova. **4<sup>th</sup> International Conference of Cell Biology**, Kraków, 11-12.05.2018, Book of abstracts p. 89.
5. **Szopa A**, Kokotkiewicz A, Łuczkiwicz M, Ekiert H: Studies on accumulation of phenolic acids and flavonoids in different *in vitro* culture systems of *Schisandra chinensis* with use of RP-HPLC-DAD method. **10<sup>th</sup> International Symposium On Chromatography Of Natural Products. The application of analytical methods for the development of natural products**, Lublin 6-9.06.2016, Book of abstracts, p.178.
6. **Szopa A**, Kokotkiewicz A, Sobczak M, Łuczkiwicz M, Ekiert H: Accumulation of phenolic acids in *Schisandra chinensis in vitro* cultures cultivated in the different types of bioreactors. **4<sup>th</sup> International Conference and Workshop. Plant – the source of research material**, Lublin, 20-23.09.2015, Book of abstracts, p. 198.
7. **Szopa A**, Kwiecień I, Ekiert H: Studies of hydroquinone conversion into arbutin in *Schisandra chinensis* shoot cultures using an HPLC method. **9<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography of Natural Products**, Lublin, 26-29.05.2014, Book of abstracts, p. 190.
8. Ekiert R, **Szopa A**, Ekiert H: Chromatographic methods in analysis of lignans from *Schisandra chinensis*. A review. **9<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography of Natural Products**, Lublin, 26-29.05.2014, Book of abstracts, p. 191.

*Konferencje krajowe:*

9. **Szopa A**, Klimek M, Ekiert H: Wyrzāsane pędowe kultury *in vitro* *Schisandra chinensis* Sadova No. 1 jako potencjalne Źródło lignanów o cennych wlaścnościach kosmetycznych. **Nowoczesna Kosmetologia – od Nauki do Biznesu**, Kraków, 28.05.2016 Książka abstraktów, p. 49.

Ponadto z tematyką osiągnięcia naukowego będącego podstawą habilitacji związane są **prace opublikowane w czasopismach z listy B MNiSZW:**

- **Szopa A**, Ekiert H. **2017**, Cytryniec chiński – mało znany i niedoceniany w Polsce. **Gazeta Farmaceutyczna**, 26 (9/10), 18-20. **MNiSW=3 pkt [4P]**
- **Szopa A**, Klimek M, Ekiert H. **2016**, Cytryniec chiński (*Schisandra chinensis*) – znaczenie lecznicze i kosmetyczne. Chinese magnolia vine (*Schisandra chinensis*) – therapeutic and cosmetic importance. **Polish Journal of Cosmetology**, 19(4), 274-284. **MNiSW= 7 pkt [5P]**

### 2.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

#### WPROWADZENIE W TEMATYKĘ BADAWCZA

*Schisandra chinensis* (*Schizandra chinensis*, Chinese magnolia vine) (Turczaninow) Baillion – Cytryniec chiński, to dwupienne pnącze należące do rodziny *Schisandraceae* (Cytryńcowate). Surowcem są owoce typu jagód, koloru czerwonego, zebrane w gronokształtne owocostany.

Naturalne stanowiska występowania *S. chinensis* znajdują się w północno-wschodnich Chinach, w Korei i Japonii, jak również we wschodniej części Rosji, w Primorsku, na Wyspach Kurylskich, w południowej części wyspy Sachalin. Gatunek ten występuje zazwyczaj na peryferiach lasów mieszanych często przy potokach. Preferuje stanowiska o umiarkowanej wilgotności i naświetleniu, osłonięte od wiatru, a także gleby bogate w wilgotny humus [9H,4P,11P] (Saunders 2000; Ekiert 2005; Wyk and Wink 2008).

W rejonach naturalnego występowania, owoce cytryńca są cenionym surowcem leczniczym. Pierwszy opis tego gatunku można odnaleźć w najcenniejszym dziele starożytnej medycyny chińskiej, autorstwa Li Shih-Chena – „Pên T'shao Kang Mu” z 1596 roku. Stosowany od tysięcy lat w tradycyjnej medycynie chińskiej (TCM), owoc cytryńca chińskiego; chin. Bei-Wuweizi; 五味子, nazywany jest „owocem o pięciu smakach” (Wu et al. 2008). Poszczególne jego części charakteryzują się smakiem: słodkim, słonym, kwaśnym, gorzkim i „cierpkim” („ściąającym”). Wierzono, iż smak słony i kwaśny odpowiadają za poprawę funkcjonowania wątroby i gonad męskich, smak gorzki i cierpki wpływają na serce i płuca, natomiast smak słodki na żołądek. Owoce cytryńca znany jest również w tradycyjnej medycynie rosyjskiej, gdzie opisywany jest jako środek tonizujący, zmniejszający głód, pragnienie i zmęczenie (Panossian and Wikman 2008).

Ze względu na cenne właściwości *S. chinensis* jest uprawiany w Chinach, Korei i Rosji. Właśnie z tych obszarów prowadzony jest import surowca na potrzeby przemysłu farmaceutycznego i kosmetycznego. Uprawa cytryńca chińskiego w Europie, jak również na terenie Ameryki Północnej jest dość trudna. Gatunek ten najczęściej sadzony jest jako roślina ozdobna w parkach, oraz w przydomowych i przyklasztornych ogródkach [9H,4P,11P] (Hancke et al. 1999; Panossian and Wikman 2008). W Europie, w tym w Polsce jedynym dystrybutorem pnączy z rodzaju *Schisandra* jest prywatna szkółka Clematis - Źródło Dobrych Pnączy Spółka z o.o z siedziba w Pruszkowie, założona przez dr inż. nauk rolniczych Szczepana Marczyńskiego, absolwenta Wydziału Ogrodniczego SGGW w Warszawie, z którą współpracuję w sferze badań naukowych.

Gatunek *S. chinensis* zaledwie przed dziesięciu laty został wprowadzony do oficjalnego lecznictwa europejskiego, w tym polskiego. Opis surowca, którym jest owoc cytryńca - *Schisandrae chinensis fructus*, pojawił się po raz pierwszy w 2008 roku w Suplemencie 6.3 do Farmakopei Europejskiej 6 (European Directorate for the Quality of Medicines 2008). W równocennym Suplemencie do VIII wydania Farmakopei Polskiej monografia ta ukazała się w 2009 roku (Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych Wyrobów

Medycznych i Produktów Biobójczych. Rzeczpospolita Polska 2009). W najnowszym 9 wydaniu Farmakopei Europejskiej (European Directorate for the Quality of Medicines 2017), oraz w Farmakopei Polskiej XI (Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych 2018) monografia figuruje w niezmienionej formie. Surowiec od wielu lat wykorzystywany jest w oficjalnym leczeniu krajów azjatyckich, głównie: Japonii (Committee of the Japanese Pharmacopoeia Evaluation and Licensing Division Pharmaceuticals and Food Safety 2006), Korei (Central Pharmaceutical Affairs Council of Korea 2002) i Chinach (Chinese Pharmacopoeia Commission 2005). Znany jest również w Ameryce Północnej, gdzie od 1999 roku figuruje w American Herbal Pharmacopoeia (Upton et al. 2011). Od 2007 roku posiada także swoją monografię w Międzynarodowej Farmakopei wydawanej przez WHO (World Health Organization 2007).

W ostatnim czasie na Ukrainie została wyselekcjonowana, przez Iwana Szajtana (1914-2002) – pracownika Narodowego Ogrodu Botanicznego im. Mikołaja Mikołajewicza Gryszko w Kijowie (ros. Национальный ботанический сад им.Н.Н.Гришко, ang. M. M. Gryshko National Botanic Garden), odmiana hodowlana cytryńca chińskiego – *S. chinensis* cv. Sadova No 1. Odmiana ta różni się od gatunku macierzystego głównie cechami owoców; owoce *S. chinensis* cv. Sadova No 1 są większe, i matowe. Ponadto gatunek ten charakteryzuje się ich większą produktywnością. Co ważne, w odróżnieniu do *S. chinensis*, jego odmiana hodowlana jest gatunkiem jednopiennym, samopylnym i bardziej odpornym na zmiany klimatyczne (Saunders 2000; Shaitan 2005)[8H]. W ramach cyklu prac będących podstawą rozprawy habilitacyjnej, jako dodatkowy obiekt badawczy wybrałam również tę odmianę hodowlaną. W ramach wykonanego przeglądu dostępnego piśmiennictwa naukowego nie odnalazłam informacji na temat analiz fitochemicznych, czy też badań biotechnologicznych odmiany *S. chinensis* cv. Sadova. Prace dotyczące tej odmiany są zatem nowatorskie.

O zainteresowaniach terapeutycznymi walorami owoców *S. chinensis* w naszym kraju świadczą dostępne w polskich aptekach suplementy diety, reklamowane głównie, jako działające adaptogenne, energogennie oraz hepatoprotekcyjnie (np. Hepa balans, Swanson Schizandra, Ulgix ochrona wątroby), oraz na razie pojedyncze preparaty lecznicze (Hugan, Penigra) [4P]. Pojawiają się też coraz bardziej liczne preparaty kosmetyczne bazujące na owocach cytryńca [5P]. Wszystkie wymienione grupy produktów bazują na surowcu pochodzenia naturalnego – na ekstraktach z owoców. Głównym źródłem tego surowca w Polsce jest import z Azji Południowo-Wschodniej, przede wszystkim z Chin. Teoretycznie możliwa synteza chemiczna lignanów cytryńca jest wieloetapowa i bardzo skomplikowana. Dotychczas dostępny jest tylko jeden lek syntetyczny, DDB (bifendate, dimethyl diphenyl bicarboxylate) - pochodna schizandryny C (produkowany w Chinach) wykorzystywana w leczeniu, jako preparat o działaniu hepatoprotekcyjnym (Wang 2008). Surowiec pochodzenia naturalnego – owoce cytryńca pozostają niezastąpione. Alternatywnym źródłem pozyskiwania lignanów dibenzocyklooktadienowych mogą być kultury *in vitro*.

Właściwości lecznicze owoców cytryńca chińskiego, znane z ich tradycyjnego wykorzystania, zostały potwierdzone licznymi badaniami naukowymi. Ponadto współczesne wyniki badań dokumentują nowe kierunki ich aktywności. Udowodniono silne działanie hepatoregenerujące, hepatoprotekcyjne, a także

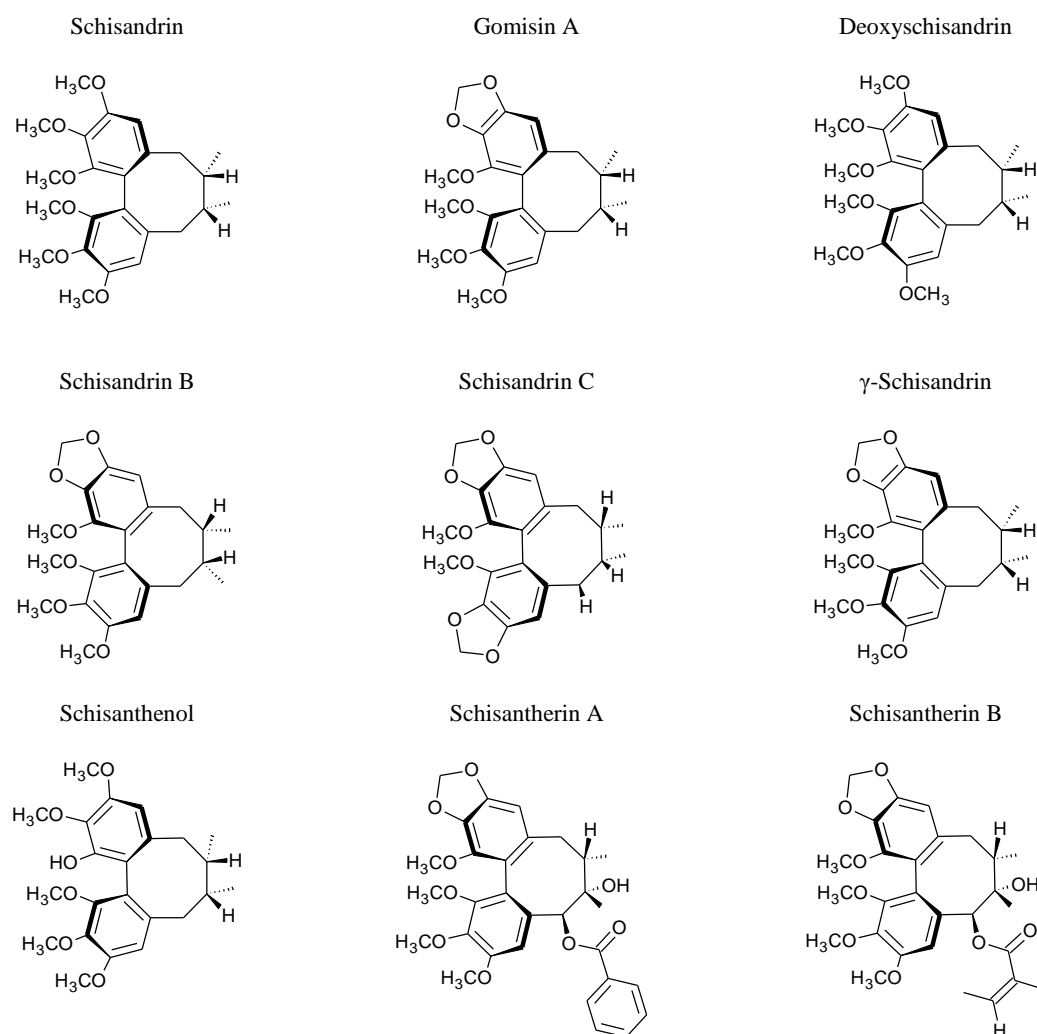
antyoksydacyjne ekstraktów z owoców oraz wyizolowanych związków, m. in. gomisyny A, deoksyszizandryny czy schizandryny C. Z działaniem hepatoregenerującym wiąże się ugruntowana już pozycja *S. chinensis*, w leczeniu chorób wątroby m.in.: chorób zakaźnych i autoimmunologicznych, a także zapalenia, stłuszczenia czy też marskości wątroby (Ip et al. 1996; Cheng et al. 2013; Jiang et al. 2015). Najnowsze badania wskazują na działanie przeciwnowotworowe w raku jelita grubego, oraz pobudzenie apoptozy komórek nowotworowych białaczki, raka skóry, jelita grubego, jajników i wątroby (Smejkal et al. 2010; Hwang et al. 2011; Waiwut et al. 2012; Hou et al. 2015). Wykazano również aktywność immunostymulującą oraz immunomodulującą polisacharydów wyizolowanych z owoców cytryńca (Zhao et al. 2013). Ekstrakty z owoców mają pozytywny wpływ na układ nerwowy; chronią przed neuronalną śmiercią komórki, a także podnoszą stężenie neuroprzekaźników w centralnym systemie nerwowym, dlatego mogą być stosowane, jako środek pomocniczy w chorobie Alzheimera lub Parkinsona. Ponadto poprawiają koncentrację, uwagę, zdolności uczenia się i zapamiętywania. Wykazują działanie przeciwdepresyjne bez wywoływania niekorzystnej senności. Działają adaptogennie, wspomagając odporność organizmu na stres i traumatyczne przeżycia, stosowane są w stanach wyczerpania i niepokoju [9H]. Udowodniono działanie hamujące namnażanie wirusa HIV (Xu et al. 2015). Ekstrakty z owoców wywierają również pozytywny wpływ na układ sercowo-naczyniowy przeciwdziałając zawałom serca oraz regulując podwyższone ciśnienie krwi. Wpływają na zachowanie prawidłowej masy ciała przeciwdziałając otyłości (Hancke et al. 1999; Opletal et al. 2004). Wykazują działanie przeciwastmatyczne zmniejszając nadreaktywność oskrzeli. Działają przeciwosteoporotycznie pobudzając namnażanie osteoblastów, oraz przeciwrzodowo, zablizniając rany wrzodowe w obrębie żołądka i dwunastnicy (Hancke et al. 1999). Ponadto owoce cytryńca chińskiego wykazują silne właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne [9H] (Hwang et al. 2009; Mocan et al. 2014; Zhao et al. 2014).

Właściwościami biologicznymi owoców cytryńca zainteresowały się firmy kosmetyczne wprowadzając ekstrakt z owoców do produkcji różnych kosmetyków. Cenne z kosmetycznego punktu widzenia właściwości ekstraktów z owoców to działanie przeciwutleniające, promieniochronne, tzw. przeciwstarzeniowe, rozjaśniające skórę, łagodzące i przeciwalergiczne [5P] (Henry et al. 2012). Ostatnio udowodniono też, silniejsze niż owoców, właściwości antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze ekstraktów z liści i pędów cytryńca (Mocan et al. 2014)

Cenne właściwości biologiczne i wynikające z nich aplikacje terapeutyczne uwarunkowane są unikalnym składem chemicznym *S. chinensis* [9H] (Hancke et al. 1999). Główną, specyficzną dla tego gatunku, grupą metabolitów wtórnych są lignany dibenzocyklooktadienowe (Hegnauer 1962; Wichtl 2004; Opletal et al. 2004). Ze względu na charakterystyczną, bardzo skomplikowaną strukturę chemiczną tych związków, a także występowanie tylko w gatunkach rodzaju *Schisandra*, nawet w profesjonalnych opracowaniach określane są jako „lignany cytryńca” lub „lignany typu schisandra”. Na tej grupie metabolitów skupiła się większość prowadzonych przeze mnie badań naukowych.

Na zawartość lignanów w owocach ma wpływ stopień ich dojrzałości, czas zbioru, miejsce występowania roślin, oraz ich siedlisko. Zawartość ta waha się w szerokich granicach, od 4 do 19 % s.m.. Dane z 2007 roku

podawane w monografii WHO mówiły o występowaniu w owocach *S. chinensis* trzydziestu związków z tej grupy, jednak liczba nowo zidentyfikowanych struktur ciągle wzrasta (Chang et al. 2005; World Health Organization 2007). Ponadto związki te posiadają liczne synonimowe nazwy, co utrudnia swobodną wymianę wiedzy naukowej. Najwcześniej poznanymi, jednocześnie występującymi w największych ilościach w owocach lignanami są: schizandryna (syn. schizandrol A, wuweizichun A), gomisyna A (syn. schizandrol B, wuweizisu B, wuweizichun B, wuweizi alcohol B), deoksychizandryna (syn. dimethylgomisyne J, schizandryna A, wuweizisu A), oraz schizandryna B (syn. gomisyne N) i schizandryna C (syn. wuweizisu C),  $\gamma$ -schizandryna (syn. wuweizisu B), schizantholol (syn. (+)-gomisyne K3) oraz schizantheryna A (syn. gomisyne C, schizandrer A, wuweizi ester A) i schizantheryna B (syn. gomisyne B, schizandrer B, wuweizi ester B) (Rycina 1) [9H] (Opletal et al. 2004; Shi et al. 2009). Owoce cytryńca wg. wymogów stawianych przez farmakopeę europejską, muszą być standaryzowane na zawartość schizandryny, której stężenie w wysuszonym surowcu nie może być mniejsze niż 0,4% (European Directorate for the Quality of Medicines 2017).



Rycina 1. Struktura chemiczna wybranych lignanów dibenzocykloheptanowych [9H] (Opletal et al. 2004).



Fakt obecności lignanów dibenzocyklooktadienowych, których biogeneza nie jest jeszcze dokładnie poznana, ale są znane jej wstępne etapy - droga kwasu szikimowego, charakterystyczna także dla biogenezy związków polifenolowych; takich jak m.in. kwasy fenolowe i flawonoidy, skłonił mnie do podjęcia analizy także tych dwóch grup związków, zarówno w hodowanej *in vitro* biomasie, jak i w organach rośliny macierzystej (Gottlieb 1972; Ganem 1978; Umezawa 2003).

Wymienione grupy związków posiadają również bardzo liczne, cenne właściwości lecznicze i kosmetyczne. Kwasy fenolowe - zarówno liczne pochodne kwasu cynamonowego, jak i benzoesowego, oraz depsydy, to atrakcyjna farmakologicznie grupa roślinnych metabolitów, ze względu na liczne, cenne właściwości lecznicze m.in., przeciwnowotworowe, żółciopędne, rozkurczowe, hipolipemiczne, przeciwwzakrzepowe, immunostymulujące, jak również silne właściwości przeciwwzapalne i antyoksydacyjne (Rice-Evans et al. 1996; Croft 1998; Santos-Gomes et al. 2002; Matkowski 2008; Khadem and Marles 2010; Ekiert et al. 2013a; Heleno et al. 2015).

Flawonoidy (zarówno aglikony, jak i glikozydy flawonoidowe), to także niezwykle cenna z punktu działania leczniczego grupa roślinnych metabolitów wtórnych. Na uwagę zasługuje ich silna aktywność antyoksydacyjna, przeciwwzapalna, przeciwnowotworowa, diuretyczna, przeciwwrzodowa oraz zdolność uszczelniania ścian naczyń kapilarnych (Rice-Evans et al. 1996; Croft 1998; Nijveldt et al. 2001; Le Marchand 2002; Procházková et al. 2011; Kumar and Pandey 2013; Kumar et al. 2014).

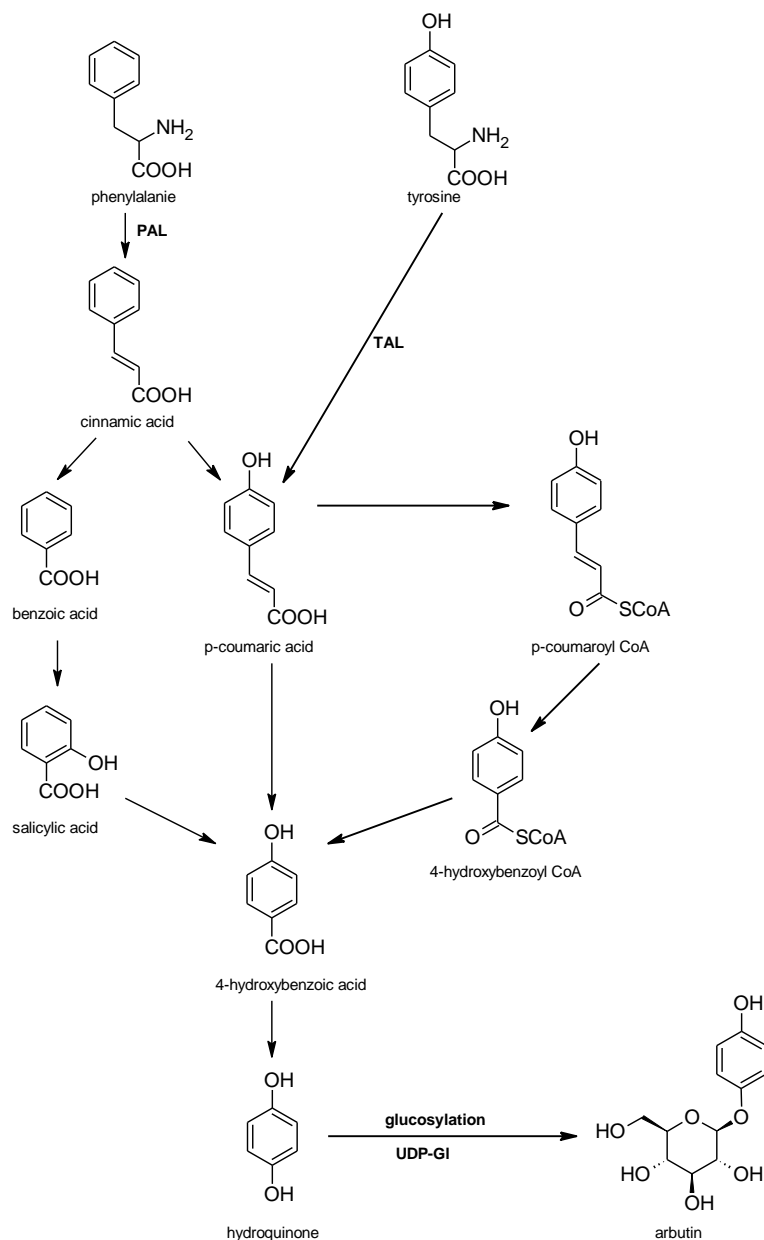
W ramach prowadzonych eksperymentów, zdecydowano również zbadać potencjał biotransformacyjny komórek z kultur *in vitro* do przekształcania (biokonwersji) prostych związków fenolowych (hydrochinon, kwas 4-hydroksybenzoesowy) w arbutynę. Arbutyna ( $\beta$ -D-glikozyd hydrochinonu), to glikozyd fenolowy o cennych, wykorzystywanych w lecznictwie i kosmetologii właściwościach: dezynfekcji dróg moczowych, antyoksydacyjnych, przeciwnowotworowych, przeciwwzapalnych, oraz właściwościach wybielających (inhibicja biosyntezy melaniny) (Ekiert et al. 2013b; Migas and Krauze-Baranowska 2015).

Biotechnologia roślin jest jednym z prężnie rozwijających się działów biotechnologii - nowoczesnego kierunku badań naukowych, którego zadaniem jest ulepszenie dotychczas stosowanych procesów przemysłowych polegających na wykorzystaniu organizmów żywych. Badania prowadzone w ramach biotechnologii roślin mają na celu jak najlepsze wykorzystanie potencjału biochemicznego oraz morfologicznego komórek roślinnych. W badaniach można stosować różne typy roślinnych kultur *in vitro*: kultury kalusowe (bezpociowa masa nieodróżnicowanych komórek), kultury zawieszinowe (zawiesina komórek roślinnych w płynnym podłożu), kultury organów (pędów lub korzeni), ko-kultury (prowadzone w jednym naczyniu hodowlanym kultury dwóch gatunków lub dwa typy kultur jednego gatunku) (Hammond et al. 2000; Kayser et al. 2003; Halford 2006; Ekiert 2009; Malepszy 2009). Biotechnologia roślin obejmuje kilka kierunków badawczych, z których większość koncentruje się na jak najlepszym wykorzystaniu potencjału morfologicznego i biosyntetycznego roślin. Badania przeprowadzane dla przemysłu farmaceutycznego koncentrują się głównie na zwiększeniu możliwości produkcyjnych roślin, zarówno

metabolitów wtórnych w nich występujących, jak i innych substancji, np. hemoglobiny, przeciwciał monoklonalnych, czy szczepionek roślinnych (Verpoorte et al. 2002; Walsh 2002; Mason et al. 2002; Wysokińska and Chmiel 2006; Hefferon 2010).

Roślinne kultury *in vitro*, oraz możliwość kontroli i zwiększania endogennej produkcji metabolitów wtórnych oferowana przez różne techniki stosowane w biotechnologii roślin, stwarzają możliwość ich aplikacji w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym i spożywczym. Do cenionych strategii stosowanych w celu zwiększania endogennej produkcji związków czynnych wykorzystywane są m.in. takie zabiegi jak: selekcja wysokoprodukcyjnych linii komórkowych, optymalizacja warunków prowadzenia hodowli (dobór podstawowego składu podłoża hodowlanego, kompozycja regulatorów wzrostu i rozwoju roślin), stopień zróżnicowania biomasy (kultury kalusowe, pędowe, korzeniowe), typ prowadzonych hodowli (agarowe, płynne stacjonarne, wytrząsane, hodowane w bioreaktorach), warunki świetlne (natężenie oświetlenia, fotoperiod, brak światła), oraz temperatura, zastosowanie elicytorów czy transformacje genetyczne (Wysokińska 2000; Verpoorte et al. 2002; Szpitter and Królicka 2005; Pietrosiuk and Furmanowa 2006; Wysokińska and Chmiel 2006; Ekiert 2009; Ramirez-Estrada et al. 2016; Deepthi and Satheeshkumar 2017). Ponadto możliwość zabezpieczenia przemysłu w cenne surowce na większą skalę stwarza zastosowanie specjalnych bioreaktorów hodowlanych (Walsh 2003; Schneider et al. 2013; Georgiev et al. 2014).

Odmiernym kierunkiem badawczym, również istotnym z farmaceutycznego punktu widzenia są procesy biotransformacyjne (Giri et al. 2001; Wysokińska and Chmiel 2006; Malepszy 2009). Z udziałem enzymów z komórek roślinnych hodowanych *in vitro* mogą zachodzić różne reakcje, m.in. utleniania, redukcji, syntezy. Komórki roślin są zdolne do przekształcania podanych egzogenicznie substratów w oczekiwane produkty. Prowadzone w tym zakresie badania są bardzo istotne ze względu na regio- i stereospecyficzność reakcji przeprowadzanych przez enzymy roślinnych komórek. Stosunkowo łatwo zachodzą z udziałem roślinnych komórek reakcje glikozylacji; przykładem jest reakcja  $\beta$ -D-glikozylacji hydrochinonu w arbutynę ( $\beta$ -D-glikozyd hydrochinonu). W badaniach prowadzonych w tym kierunku wykorzystuje się nawet kultury *in vitro* gatunków roślin, które w naturalnych warunkach nie syntetyzują arbutyny. Możliwość taka wynika z powszechności występowania enzymów z grupy  $\beta$ -glikozylaz w świecie roślin oraz braku specyficzności substratowej tych enzymów (Rycina 3) (Ekiert 2009; Ekiert et al. 2013b; Migas and Krauze-Baranowska 2015).



Rycina 2. Możliwe szlaki biosyntetyczne arbutyny w roślinnych kulturach *in vitro* [7H].

Kultury *in vitro* *S. chinensis* są niezwykle atrakcyjnym obiektem badań biotechnologicznych. Dotychczas badania z tego zakresu realizowane były jedynie w pojedynczych ośrodkach naukowych krajów wschodnioazjatyckich: Chinach, Japonii i Korei Południowej. W Europie problematykę tę, w ostatnim czasie podejmowały tylko dwie placówki czeskie z Brna. Większość dotychczas przeprowadzonych badań była skoncentrowana na opracowaniu metod mikrorozmnażania *S. chinensis* głównie na drodze somatycznej embriogenezy.

Mikrorozmnażanie (mikropropagacja), czyli mnożenie roślin w kulturach *in vitro* ma na celu otrzymane genetycznie jednorodnych roślin, nadających się do dalszego wzrostu w gruncie. Mikropropagacja jest możliwa dzięki zdolności tkanek roślinnych do regeneracji roślin w kulturach *in vitro*. Mikrorozmnażanie

nie jest tylko techniką służącą do namnażania roślin niezależnie od warunków klimatycznych na dużą skalę, ale też metodą pozwalającą na selekcjonowanie linii roślin o odpowiednim fenotypie, czy różnej liczbie chromosomów, oraz służącym ochronie gatunków zagrożonych (Ivan et al. 2010; Madesis et al. 2011).

Zespół naukowców z Zakładu Botaniki i Fizjologii Roślin, Wydziału Rolno - Leśnego, Uniwersytetu Mendla z Brna (Department of Botany and Plant Physiology, Mendel University of Agriculture and Forestry) opracował metodę mikrorozmnażania *S. chinensis* na drodze somatycznej embriogenezy z zygocyticznych embrionów (uzyskanych z nasion tego gatunku) (Smíšková et al. 2005). Inny zespół naukowców, z Korei Południowej, z Laboratorium Leśnych Zasobów Genetycznych, Szkoły Zasobów Leśnych, Narodowego Uniwersytetu Rolniczego w Chungbuku (Lab of Forest Genetic Resources, School of Forest Resources, College of Agriculture, Chungbuk National University) również opracował protokół mikrorozmnażania z zygocyticznych zarodków wyizolowanych z dojrzałych nasion *S. chinensis*. W pierwszym etapie na podłożu Merkla i Sommera, zawierającym regulatory wzrostu i rozwoju roślin: 2,4-D (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy) i zeatynę, rozwinął się kalus. Kolejny etap przeprowadzono na podłożu wg Murashige i Skoog (MS) (Murashige and Skoog 1962) (zawierającym 2,4-D i BA (6-benzyloaminopuryna)), na którym udało się uzyskać somatyczną embriogenezę z wydajnością procesu równą 67 % (Kim et al. 2005). Przedmiotem badań zespołu z Kluczowego Laboratorium Poprawy Zasobów Leśnych i Biotechnologii Ministerstwa Edukacji Północno-Wschodniego Uniwersytetu Leśniczego, (Key Laboratory of Forest Improvement and Biotechnology, Ministry of Education, Northeast Forestry University) z Harbin w Chinach i z Instytutu Naukowego Bioherb, Narodowego Uniwersytetu Kangwon (Bioherb Research Institute, Kangwon National University) z Chuncheon w Korei Południowej było zwiększenie efektywności procesu embriogenezy z kiełkujących zarodków. W tym celu testowano różne stężenia sacharozy, oraz regulatory wzrostu i rozwoju roślin: GA<sub>3</sub> (kwas giberelinowy) i BA, w pożywce MS. Wykazano, że optymalny skład podłoża dla tego procesu (wydajność równa 90%) to: 1% sacharozy i 0,5 mg/l BA (Chen et al. 2010). Opracowana została, także metoda mikrorozmnażania *S. chinensis* z nierozwiniętych pąków kwiatowych okazów żeńskich. W tym celu wykorzystano podłoże MS z różnymi stężeniami 2,4-D i GA<sub>3</sub>, zaś w późniejszym etapie doprowadzono do rozwoju somatycznych zarodków i rozwoju sadzonek. Badania przeprowadził zespół naukowców z dwóch laboratoriów badawczych z Północno - Wschodniego Uniwersytetu Leśniczego z Harbin i z Centrum Badań Molekularnych i Rozwoju Biologii, Kluczowego Laboratorium Fotosyntezy i Fizjologii Molekularnej Środowiska, Instytutu Botaniki z Beijing z Chin (Research Center for Molecular Developmental Biology, Key Lab of Photosynthesis and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany) (Yang et al. 2011).

Oprócz badań dotyczących opracowania protokołów mikrorozmnażania, w ostatnich latach opublikowane zostały też pojedyncze prace skupiające się na endogennej akumulacji najważniejszej grupy aktywnych biologicznie metabolitów wtórnych *S. chinensis* - lignanów dibenzocyklooktadienowych. Możliwości biotechnologicznej produkcji wybranych lignanów cytryńca zostały udokumentowane, poza pracami własnymi, przez zespoły z Republiki Czeskiej i Japonii. Pierwsze badania dotyczące endogennej akumulacji lignanów cytryńca zostały przeprowadzone przez zespół badawczy z ośrodków akademickich

z Brna (Zakład Biologii Roślin, Wydziału Rolno - Leśnego, Uniwersytetu Mendla (Department of Plant Biology, Mendel University of Agriculture and Forestry) i Zakład Biochemii, Wydziału Medycznego Uniwersytetu Masaryka (Department of Biochemistry, Medical Faculty of Masaryk University)). W ramach tych badań przeprowadzono jedynie analizę jakościową tylko trzech związków: deoksychizandryny,  $\gamma$ -schizandryny i schizanteryny A (Havel et al. 2008). Ten sam zespół w roku 2009 rozszerzył problematykę badawczą. Przeprowadzone zostały badania na różnych liniach komórkowych *S. chinensis*: trzech liniach kultur agarowych hodowanych w ciemności oraz pięciu liniach kultur zawiesinowych hodowanych z zachowaniem fotoperiodu (Březinová et al. 2010). Wszystkie linie komórkowe hodowano na pożywce Westvaco (WV5) zawierającej: 2% sacharozy, 2 mM glutaminy oraz różne stężenia BA i 2,4-D. W hodowlach agarowych stwierdzono obecność sześciu lignanów: gomisy A, gomisy N, deoksychizandryny, schizandryny, schizandryny C i  $\gamma$ -schizandryny. W pięciu liniach komórkowych hodowli wytrząsanych także stwierdzono obecność wszystkich sześciu badanych związków; niektóre z nich występowały jednak w śladowych ilościach. Dominującym ilościowo związkiem w kulturach wytrząsanych była  $\gamma$ -schizandryna (maks. 0,550 mg/g s.m.), zaś w kulturach agarowych gomisy A (maks. 0,547 mg/g s.m.). W celach porównawczych przebadano, także zawartość lignanów w liściach i nasionach rośliny rosnącej w warunkach naturalnych. Głównymi lignanami występującymi w ekstraktach z liści były: gomisy A (0,77 mg/g s.m.) i schizandryna (0,64 mg/g s.m.), zaś w ekstraktach z nasion: schizandryna (6,41 mg/g s.m.) i deoksychizandryna (4,43 mg/g s.m.) (Březinová et al. 2010). W 2012 roku pojawiła się kolejna (trzecia i ostatnia, poza pracami własnymi) praca dotycząca endogennej akumulacji lignanów dibenzocyklooktadienowych (Kohda et al. 2012). Badania zostały przeprowadzone w ramach współpracy trzech różnych japońskich ośrodków badawczych z Hiroszimy: Zakładu Farmakognozji Uniwersytetu Yasuda (Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy), Stacji Doświadczalnej Roślin Leczniczych (The Experimental Station of Medicinal Plants) oraz Zakładu Medycyny Sądowej, Szkoły Wyższej Nauk Biomedycznych (Department of Forensic Medicine, Graduate School of Biomedical Sciences). Prace miały na celu zbadanie możliwości produkcji tylko dwóch lignanów: gomisy A i gomisy F, w kulturach kalusowych *S. chinensis* hodowanych na podłożach MS (1962) oraz Woody Plant (WP) zawierających różne stężenia: 2,4-D, BA, IBA (kwas indolilomasłowy) i KIN (kinetyna). Największe zawartości tych związków, uzyskane w kulturach *in vitro* wynosiły odpowiednio: 0,05 i 0,04 g% i były wyższe niż w analizowanych w celach porównawczych liściach (oba związki 0,01 g%) i owocach (odpowiednio 0,04 i 0,01 g%) (Kohda et al. 2012).

W opisanych powyżej pracach uzyskane wydajności produkcji lignanów dibenzocyklooktadienowych były bardzo niskie w porównaniu z wynikami uzyskanymi w ramach realizacji mojego, własnego programu badawczego nad optymalizacją produkcji lignanów typu schisandra w kulturach *S. chinensis*.

W świetle nielicznych światowych badań biotechnologicznych nad gatunkiem *S. chinensis* moje badania mają znaczenie aplikacyjne.

W ramach prac tworzących osiągnięcie naukowe po raz pierwszy przeprowadziłam badania biotechnologiczne na kulturach mikropędowych gatunku *S. chinensis*, jak również na jego odmianie

hodowlanej – *S. chinensis* cv. Sadova (Rycina 3). Przeprowadzone badania biotechnologiczne oraz fitochemiczne obejmujące analizę zawartości lignanów dibenzocyclooctadienowych oraz innych związków - kwasów fenolowych, flawonoidów, a także badania dotyczące możliwości produkcji arbutyny na drodze biotransformacji w kulturach *in vitro*, również są w pełni innowacyjne.



a)



b)

Rycina 3. Kultury mikropędowe hodowane na agarowym podłożu wg. Murashige i Skoog (MS) zawierającym 3 mg/l BA (6-benzyloaminopuryny) i 1 mg/l NAA (kwasu 1-naftylooctowego); a) *Schisandra chinensis*; b) *Schisandra chinensis* cv Sadova.

Swoją pracę nad kulturami *S. chinensis* rozpoczęłam w czasie realizacji pracy doktorskiej pt: „Badania nad akumulacją wybranych grup biologicznie aktywnych metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.”. Wyniki uzyskane w ramach realizacji doktoratu zostały opublikowane w postaci publikacji oryginalnych: trzech opublikowanych przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora [13O,15O,17O] i jednej po uzyskaniu stopnia doktora [8O], ponadto jednej publikacji poglądowej [11P], oraz anglojęzycznej monografii książkowej [1M]:

**8O. Szopa A, Kisiel W, Ekiert H, Szewczyk A 2015**, Isolation of three dibenzocyclooctadiene lignans from *in vitro* cultures of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. – the first report. **Pharmazie**, 70: 337–339. IF=1,264; MNiSW= 15 pkt (publikacja oryginalna opublikowana po obronie doktoratu)

**13O. Szopa A, Ekiert H. 2013**, Production of deoxyschizandrin and  $\gamma$ -schizandrin in shoot-differentiating and undifferentiating callus cultures of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (Chinese magnolia vine). **Journal of Biotechnology** 165: 209-213. DOI:10.1016/j.jbiotec.2013.03.010. IF=3,183; MNiSW=30 pkt (publikacja oryginalna)

**15O. Szopa A, Ekiert H. 2012**, *In vitro* cultures of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (Chinese magnolia vine) - a potential biotechnological rich source of therapeutically important phenolic acids. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 166: 1941–1948. DOI:10.1007/s12010-012-9622-y. IF=1,893; MNiSW=25 pkt (publikacja oryginalna)

- 17O. Szopa A**, Ekiert H. **2011**, Lignans in *Schisandra chinensis in vitro* cultures. **Pharmazie** 66: 633-634, DOI: 10.1691/ph.2011.1520. IF=0,962; MNiSW=15 pkt (publikacja oryginalna)
- 11P. Szopa A.**, Ekiert R., Ekiert H. **2012**, Cytryniec chiński (*Schisandra chinensis*) – nowy farmakopealny gatunek: badania chemiczne, biologiczna aktywność, znaczenie lecznicze, walory kosmetyczne, metody analityczne oraz badania biotechnologiczne. **Farmacja Polska** 68 (12): 832-843. (MNiSW=3) (publikacja pogładowa)
- 1M. Szopa A**, Ekiert H. **2014**, *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (Chinese magnolia vine) *in vitro* cultures In: **Recent Progress in Medicinal Plants. Biotechnology and Genetic Engineering II** (Vol. 39), J.N. Govil (ed.), (Vol. ISBN: 1-933699-99-X; Series ISBN: 0-9656038-5-7) **Studium Press LLC**, USA, Vol.39 (16), pp. 405-434. (rozdział monografii zagranicznej)

W ramach mojej pracy doktorskiej z pąków liściowych żeńskich okazów *S. chinensis* pochodzących z Arboretum SGGW w Rogowie, z powodzeniem założyłam kultury *in vitro* o różnym stopniu dyferencjacji – zróżnicowane kultury kalusowo-pędowe i niezróżnicowane kultury kalusowe. W następnym etapie badań optymalizowałam warunki prowadzenia kultur testując różne warianty podłoży hodowlanych wg Murashige i Skoog (MS) (Murashige and Skoog 1962) różniące się zawartością wybranych regulatorów wzrostu i rozwoju roślin, BA (6-benzyloaminopuryna) – cytokinina i NAA (kwas 1-naftylooctowy) – auksyna, w zakresie stężeń od 0,1 do 3 mg/l oraz różne typy kultur *in vitro* – kultury agarowe (kalusowo-pędowe i kalusowe) oraz płynne wytrząsane (pędowe i zawiesinowe). Następnie przeprowadziłam jakościową i ilościową analizę (metodami UV-HPLC) czterech głównych lignanów cytryńca chińskiego oraz jedenastu kwasów fenolowych, pochodnych kwasu cynamonowego oraz benzooesowego, a także macierzystego związku jednej z podgrup kwasów fenolowych – kwasu cynamonowego. Oznaczyłam wolne kwasy fenolowe, oraz całkowitą zawartość kwasów fenolowych, wolnych i związanych (po hydrolizie w środowisku kwaśnym).

Założone kultury kalusowo-pędowe charakteryzowały się wyraźną zdolnością produkcji deoksychizandryny. W znacznych ilościach produkowały też schizandrynę i gomisyne A, w mniejszych  $\gamma$ -schizandrynę. Wykazałam wyraźny wpływ stężeń testowanych regulatorów wzrostu i rozwoju roślin w podłożach hodowlanych na produkcję lignanów. Ponadto stwierdziłam, że kultury o większym stopniu zróżnicowania produkują wielokrotnie większe ilości tych związków niż niezróżnicowane kultury kalusowe. Maksymalne zawartości lignanów równe odpowiednio: 308,51 mg/100 g s.m. - deoksychizandryna, 86,41 mg/100 g s.m. - gomisyne A, 75,54 mg/100 g s.m. - schizandryna i 22,09 mg/100 g s.m. -  $\gamma$ -schizandryna, uzyskałam w agarowych kulturach kalusowo-pędowych. W niezróżnicowanych kulturach kalusowych maksymalne zawartości tych związków były równe odpowiednio: 18,75 mg/100 g s.m., 2,66 mg/100 g s.m., 2,16 mg/100 g s.m. i 1,03 mg/100 g s.m.. W wytrząsanych kulturach pędowych maksymalne zawartości lignanów były też interesujące z praktycznego punktu widzenia, równe

odpowiednio: 92,37 mg/100 g s.m., 50,69 mg/100 g s.m., 48,16 mg/100 g s.m. i 15,77 mg/100 g s.m.. Natomiast w kulturach zawiesinowych maksymalne uzyskane zawartości lignanów były innego rzędu, równe odpowiednio: 21,75 mg/100 g s.m., 5,54 mg/100 g s.m., 4,07 mg/100 g s.m. oraz 9,42 mg/100 g s.m.. Maksymalna całkowita zawartość lignanów, uzyskana w agarowych kulturach kalusowo-pędowych, równa 486,78 mg/100 g s.m. była odpowiednio 1,3- oraz 3,8-krotnie wyższa niż w ekstraktach z owoców i liści rośliny macierzystej analizowanych w celach porównawczych [13O,17O,1M].

W ramach pracy doktorskiej, ponadto z biomasy kultur kalusowo-pędowych po raz pierwszy wyizolowałam trzy lignany: schizandrynę, gomisybę A i deoksychizandrynę. Ich tożsamość została potwierdzona metodami spektralnymi (widma  $^1\text{H}$  NMR, UV), ponadto polarymetrycznie oznaczono ich skręcalność właściwą (współpraca z prof. dr hab. Wandą Kisiel, Zakład Fitochemii, Instytut Farmakologii PAN). Wymienione lignany nie były wcześniej wyizolowane z kultur *in vitro* tego gatunku. Z biomasy kultur wyizolowałam również  $\beta$ -sitosterol [8O].

W ramach przeprowadzonych badań nad akumulacją lignanów dibenzocyklooktadienowych stwierdziłam, że założone różne typy kultur *in vitro* mogą być potencjalnym, biotechnologicznym źródłem pozyskiwania czterech badanych lignanów (schizandryny, gomisyby A, deoksychizandryny i  $\gamma$ -schizandryny) [8O,13O,17O,1M].

Analizę kwasów fenolowych, związków dotychczas niebadanych w cytryńcu chińskim, podjęłam uwzględniając wspólne z biogenezą lignanów początkowe etapy ich biogenezy – drogę kwasu szikimowego. Argumentem do podjęcia badań w tym kierunku był ponadto szeroki wachlarz zasygnalizowanych wcześniej cennych właściwości biologicznych tych związków; m.in. działanie antyagregacyjne, antyoksydacyjne, immunostymulujące i przeciwnowotworowe (Rice-Evans et al. 1996; Croft 1998; Santos-Gomes et al. 2002; Matkowski 2008; Khadem and Marles 2010; Ekiert et al. 2013a; Heleno et al. 2015).

Wykazałam wpływ stężeń regulatorów wzrostu w testowanych podłożach MS również na produkcję tej grupy związków. Stwierdziłam ponadto, że wolne kwasy fenolowe produkowane są w największych ilościach w agarowych, niezróżnicowanych kulturach kalusowych (maksymalna całkowita zawartość – 78,24 mg/100 g s.m.). W agarowych kulturach kalusowo-pędowych maksymalna całkowita zawartość wolnych kwasów fenolowych była nieco mniejsza, równa 60,05 mg/100 g s.m.. W wytrząsanych kulturach pędowych zawartości tych związków były wyższe (75,57 mg/100 g s.m.) niż w kulturach zawiesinowych, o niższym stopniu zróżnicowania (38,40 mg/100 g s.m.). Maksymalna całkowita zawartość wolnych kwasów fenolowych uzyskana w biomacie z kultur *in vitro*, równa 78,24 mg/100 g s.m. (agarowe kultury kalusowe) była odpowiednio 1,4- oraz 17,2-krotnie większa niż w ekstraktach z owoców i liści rośliny macierzystej. Maksymalna uzyskana zawartość kwasów fenolowych uzyskanych po hydrolizie kwaśnej, równa 213,62 mg/100 g s.m. (kultury zawiesinowe) była odpowiednio 1,77- oraz 15,1-krotnie wyższa niż w ekstraktach z analizowanych organów rośliny. Głównymi produkowanymi *in vitro* kwasami fenolowymi były: kwas chlorogenowy (maks. zawartość 82,10 mg/100 g s.m., agarowe kultury kalusowe), kwas protokatechowy (maks. zawartość 120,16 mg/100 g s.m. - kultury zawiesinowe) i kwas syryngowy (maks. zawartość 40,50 mg/100 g s.m. - kultury zawiesinowe). Wykazano, że założone kultury *in vitro* *S. chinensis* mogą być



również potencjalnym, biotechnologicznym źródłem pozyskiwania wybranych kwasów fenolowych [15O,1M].

Wyniki mojej pracy doktorskiej udowodniły, że kultury *in vitro* *S. chinensis* mogą stanowić bogate, potencjalne, niezależne od pór roku, warunków klimatycznych etc., źródło pozyskiwania cennych w leczeniu metabolitów: lignanów dibenzocyklooktadienowych i kwasów fenolowych. W ramach pracy doktorskiej po raz pierwszy wykonałam analizę kwasów fenolowych w organach roślin gruntowych (owoce i liście), oraz izolację wybranych lignanów z biomasy kultur *in vitro* *S. chinensis*. Wyniki miały nie tylko charakter poznawczy, ale wyraźnie aplikacyjny; stworzyły bogate perspektywy dalszych badań, stąd w ramach mojej późniejszej pracy naukowej entuzjastycznie kontynuowałam realizację powziętych celów badawczych.

Moje prace skupione zostały głównie na produkcji lignanów dibenzocyklooktadienowych, kwasów fenolowych oraz flawonoidów w kulturach *in vitro* *S. chinensis*. Prace nad endogenną akumulacją metabolitów wtórnych zostały znacznie rozszerzone. W ramach funduszy badań własnych oraz badań statutowych zakupione zostały nowe wzorce: lignanów (zwiększenie liczby standardów z 4 do 9 związków), oraz wstępna identyfikacja 5 struktur techniką LC-DAD-ESI-MS i kwasów fenolowych (zwiększenie liczby standardów z 11 do 20 związków), ponadto badania rozszerzyłam o flawonoidy (11 związków). Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej, oraz późniejsze prace opisane w publikacji [H1], udowodniły, że kultury niezróżnicowane – kalusowe i zawiesinowe, akumulują wielokrotnie niższe ilości oznaczanych metabolitów, dlatego moje dalsze prace skupiły się na kulturach o wyższym stopniu organogenezy. W wyniku optymalizacji składu podłoża hodowlanego (MS) w oparciu o zawartość regulatorów wzrostu i rozwoju roślin, wytypowałam wariant „optymalny” dla wzrostu i produkcji metabolitów – zawierający 3 mg/l BA i 1 mg/l NAA. Na tym podłożu w kolejnych pasażach ustabilizowane zostały kultury mikropędowe, które były obiektem moich dalszych doświadczeń biotechnologicznych.

W ramach pracy habilitacyjnej przeprowadziłam badania z zakresu optymalizacji warunków prowadzenia hodowli - dobór systemu hodowli, czasu trwania cyklu hodowlanego, warunków świetlnych oraz różnego rodzaju elicytorów [1H-4H]. Ponadto, zoptymalizowałam proces hodowli kultur mikropędowych *S. chinensis* w różnego typu bioreaktorach [5H]. Uzyskiwane wyniki zawartości lignanów w biomase hodowanej *in vitro* były znaczne, zbliżone do zawartości tych związków w materiale roślinnym rosnącym *in vivo*. W ramach przeprowadzonych doświadczeń biotechnologicznych przetestowałam również możliwość przeprowadzenia procesów biotransformacyjnych w kulturach mikropędowych *S. chinensis* [7H]. Badaniami udowodniłam możliwość biosyntezy arbutyny, w komórkach *S. chinensis* hodowanych *in vitro*. Ważnym aspektem przeprowadzonych przeze mnie prac są doświadczenia na kulturach mikropędowych odmiany hodowlanej *S. chinensis* cv. Sadova No 1. W ramach prac nad odmianą hodowlaną również przeprowadziłam szeroko zakrojoną, pełną optymalizację procesu hodowlanego wraz z zastosowaniem elicytacji i hodowli wielkolaboratoryjnej w bioreaktorach [8H]. Szczegółowe cele i uzyskane wyniki prac przedstawiam poniżej.

## GLÓWNE CELE BADAWCZE ZREALIZOWANE W RAMACH PRZEDSTAWIONEGO DO OCENY OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

- Optymalizacja warunków prowadzenia kultur *in vitro* *S. chinensis* o różnym stopniu organogenezy (kultury kalusowe, kultury mikropędowe) [H1]
- Optymalizacja warunków prowadzenia kultur mikropędowych *S. chinensis* w zakresie typu hodowli (hodowle: agarowe, płynne stacjonarne, wytrząsane), oraz czasu trwania hodowli [H2]
- Zbadanie wpływu warunków świetlnych prowadzenia hodowli kultur *S. chinensis* na akumulację lignanów dibenzocyklooktadienowych, kwasów fenolowych i flawonoidów [H3]
- Opracowanie wydajnych metod elicytacji dla kultur mikropędowych *S. chinensis* w celu uzyskania wysokiej produkcji lignanów dibenzocyklooktadienowych [H4]
- Optymalizacja prowadzenia kultur *in vitro* *S. chinensis* w różnego typu roślinnych bioreaktorach [H5]
- Walidacja metody LC-DAD oznaczania lignanów dibenzocyklooktadienowych [H8]
- Oznaczenie jakościowe i ilościowe związków polifenolowych – kwasów fenolowych oraz flawonoidów w ekstraktach z biomasy kultur *in vitro* oraz z liści i owoców *S. chinensis* [H6]
- Ocena potencjału biotransformacyjnego kultur *in vitro* *S. chinensis* [H7]
- Optymalizacja prowadzenia agarowych i wytrząsanych mikropędowych kultur odmiany hodowanej gatunku *S. chinensis* - *S. chinensis* cv. Sadova w oparciu o dobór, oraz zawartość regulatorów wzrostu i rozwoju roślin w podłożu hodowlanym i czasu trwania cyklu hodowlanego [H8]
- Optymalizacja hodowli, oraz przeprowadzenie procesu elicytacji w mikropędowych kulturach odmiany hodowanej gatunku *S. chinensis* - *S. chinensis* cv. Sadova w bioreaktorze okresowo-zalewowym (Plantform) [H8]
- Ocena możliwości biosyntetycznych mikropędowych kultur odmiany hodowanej gatunku *S. chinensis* - *S. chinensis* cv. Sadova pod względem akumulacji lignanów dibenzocyklooktadienowych [H2-H8]
- Biotechnologiczna ocena uzyskanych wyników [H1-H9]
- Popularyzacja wiedzy na temat właściwości leczniczych, kosmetycznych oraz badań z zakresu biotechnologii roślin gatunku *S. chinensis* [4P,5P]

## WYNIKI BADAŃ ZWIĄZANYCH Z OSIĄGNIĘCIEM NAUKOWYM W POSTĘPOWANIU HABILITACYJNYM

**1H. Szopa A, Ekiert H. 2015, Production of schisantherin A and gomisin G in *in vitro* cultures of *Schisandra chinensis*. *Phytochemistry Letters*, 11: 440-444, DOI:10.1016/j.phytol.2014.12.022. IF=1,353; MNiSW=20 pkt**

W ramach pracy przetestowano wpływ kompozycji regulatorów wzrostu i rozwoju roślin: 6-benzylaminopuryny (cytokinina, BA) oraz kwasu 1-naftylooctowego (auksyna, NAA), w podłożu hodowlanym wg. Murashige i Skoog (MS) (Murashige and Skoog 1962), oraz typu agarowych kultur *in vitro* *S. chinensis* o różnym stopniu organogenezy – kalusowe i kalusowo-pędowe, na zawartość dwóch lignanów dibenzocyklooktadienowych: schizantheryny A i gomisiny G. Podczas początkowych badań, w ramach pracy doktorskiej, dysponowałam tylko czterema wzorcami lignanów dibenzocyklooktadienowych: schizandryny, gomisiny A, deoksyszizandryny i  $\gamma$ -schizandryny (zakupione w firmie Chromadex). W celu przeprowadzenia szerszych analiz chromatograficznych udało mi się zakupić w Niemczech (firma PhytoLab) kolejne standardy: schizantherynę A i gomisynę G.

Kultury kalusowo-pędowe hodowane były na sześciu wariantach podłoża MS zawierających następujące stężenia (mg/l): 0,1 i 2,0; 0,5 i 2,0; 2,0 i 0,5; 2,0 i 1,0; 2,0 i 2,0; 3,0 i 1,0; odpowiednio BA oraz NAA. Z kolei kultury kalusowe hodowano na wariantach podłoża MS zawierających: 2,0 i 2,0 oraz 3,0 i 1,0 mg/l, odpowiednio BA i NAA. Pojedynczy cykl hodowlany trwał 4-tygodnie.

W ekstraktach metanolowych techniką LC-DAD (metodą wg Zhang i in. (Zhang et al. 2009)) oznaczono zawartość badanych związków. Stwierdzono wyraźną zależność stopnia akumulacji lignanów, od zawartości regulatorów wzrostu i rozwoju roślin w podłożu hodowlanym, oraz od stopnia zróżnicowania hodowanej *in vitro* biomasy. Najwyższe przyrosty biomasy, oraz zawartości lignanów stwierdzono w ekstraktach z kultur kalusowo-pędowych hodowanych na podłożu MS zawierającym 3 mg/l BA oraz 1 mg/l NAA. Stwierdzono też, że kultury o niskim stopniu organogenezy – kultury kalusowe, akumulują lignany dibenzocyklooktadienowe w bardzo małych ilościach (maks. 0,08 mg/100 g s.m. – schizantheryna A; maks. 1,2 mg/100 g s.m. – gomisyna G, na podłożu MS zawierającym 3 mg/l BA i 1 mg/l NAA). W kulturach o wyższym stopniu organogenezy, kalusowo-pędowych, maksymalna zawartość schizantheryny A wynosiła - 33,45 mg/100 g s.m., a gomisiny G - 21,89 mg/100 g s.m.. Były one wielokrotnie wyższe niż w kulturach kalusowych.

W ramach przeprowadzonych oznaczeń porównawczych, stwierdzono też 1,3-krotnie więcej schizantheryny A w ekstraktach z kultur kalusowo-pędowych niż w ekstraktach z liści czy owoców roślin macierzystych.

W ramach wstępnych prac przeprowadzonych w zakresie pracy doktorskiej, oraz przeprowadzonych w ramach tej pracy, wytypowałam optymalny skład podłoża hodowlanego, oraz typ kultur *S. chinensis* do dalszych badań. Kultury o wyższym stopniu organogenezy, na podłożu MS zawierającym 3 mg/l BA oraz 1 mg/l NAA, charakteryzowały się wyraźnie wyższymi przyrostami biomasy, oraz wyższą produkcją

lignanów dibenzocyklooktadienowych. Stąd kolejne etapy prac prowadziłam na kulturach hodowanych na tym podłożu. W kolejnych pasażach na tym optymalnym; „uniwersalnym” podłożu, zarówno „produkcyjnym” i „wzrostowym”, kultury kalusowo-pędowe zaczęły rosnąć w formie mikropędów pozbawionych kalusa.

**2H. Szopa A, Kokotkiewicz A, Marzec-Wróblewska U, Bucinski A, Luczkiewicz M, Ekiert H. 2016,** Accumulation of dibenzocyclooctadiene lignans in agar cultures and in stationary and agitated liquid cultures of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 100(9):3965-3977. DOI: 10.1007/s00253-015-7230-9. **IF=3,420; MNiSW=35 pkt**

Celem pracy była optymalizacja warunków prowadzenia kultur mikropędowych *S. chinensis* dotycząca typu hodowli: kultury agarowe, płynne - stacjonarne oraz wytrząsane, w celu uzyskania wysokiej produkcji lignanów dibenzocyklooktadienowych oraz satysfakcjonujących przyrostów biomasy (współpraca z prof. dr hab. Marią Łuczkiewicz, dr Adamem Kokotkiewiczem z Katedry Farmakognozji GUMed) Kultury *in vitro* hodowane były na wytypowanym w ramach badań wstępnych przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej, podłożu „produkcyjnym” - MS zawierającym 3 mg/l BA oraz 1 mg/l NAA [1H]. Testowano ciągle cykle hodowlane: 30 oraz 60 – dniowe, ponadto przetestowano tzw. hodowle półciągle (biomasa dokarmiana porcją świeżego podłoża hodowlanego po 30 dniach, przy 60-dniowych cyklach hodowlanych). Zawartość lignanów dibenzocyklooktadienowych oznaczono w ekstraktach metanolowych ze zliofilizowanej biomasy kultur *in vitro*, pożywek hodowlanych, oraz w celach porównawczych w materiale roślinnym (owoce i liście roślin macierzystych) przy użyciu nowoczesnych technik LC-DAD oraz LC-DAD-ESI-MS (współpraca z prof. dr hab. Adamem Buciąskim i dr Urszulą Marzec-Wróblewską z Katedry i Zakładu Biofarmacji *Collegium Medicum* UMK w Bydgoszczy).

Na tym etapie badań liczba testowanych substancji wzorcowych wzrosła do 9. W celu przeprowadzania szerszych analiz chromatograficznych udało mi się zakupić kolejne standardy w Chinach (firma Chemfaces): schizantherynę B, schizanthanol oraz schizandrynę C. Dzięki temu, w ramach doświadczeń opisanych w tej pracy, z zastosowaniem techniki LC-DAD-ESI-MS, wykonałam potwierdzenie tożsamości wszystkich dziewięciu lignanów. Ponadto, co ważne, techniką LC-DAD-ESI-MS udało mi się wstępnie zidentyfikować, na podstawie porównania z danymi piśmienniczymi, pięć dodatkowych lignanów dibenzocyklooktadienowych: schizandrynę B, benzoylgomisynę P, angeloyl-/tigloylgomisynę H, angeloyl-/tigloylgomisynę Q, oraz schizantherynę D (lub jej stereoisomer: benzoylgomisynę O lub benzoylysogomisynę O). Zawartość wstępnie zidentyfikowanych związków przeliczona została wg krzywej wzorcowej schizandryny (głównego lignanu tej grupy, na który wg wymogów farmakopealnych standaryzowany jest surowiec).

Łącznie w ramach tej pracy, we wszystkich analizowanych ekstraktach, stwierdzono obecność czternastu lignanów. Dominującymi pod względem ilościowym były: schizandryna (maks. 65,62 mg/100 g s.m.), angeloyl-/tigloylgomisyna Q (maks. 49,73 mg/100 g s.m.), deoksyschizandryna (maks. 43,65 mg/100 g s.m.) i gomisyna A (maks. 34,36 mg/100 g s.m.). Najwyższą zawartość lignanów stwierdzono w ekstraktach z biomasy z kultur stacjonarnych po 30-dniowych okresach hodowli; dla kultur agarowych – 237,86 mg/100 g s.m., dla kultur płynnych stacjonarnych – 274,65 mg/100 g s.m.. W ekstraktach z kultur wytrząsanych najwyższą całkowitą zawartość lignanów – 244,80 mg/100 g s.m., stwierdzono w biomacie hodowanych w systemie półciąglym (30/60 dni). Nie stwierdzono obecności lignanów w podłożach hodowlanych.

W ramach pracy po raz pierwszy wykonano analizę lignanów dibenzocyklooktadienowych techniką LC-DAD-ESI-MS w ekstraktach z hodowanych w różnych systemach, mikropędowych kultur *S. chinensis*. Poza lignanami stwierdzonymi w ramach wcześniejszych prac własnych [D1-D6,H1]: schizandryna, gomisyna A i G, schizantheryna A, deoksyschizandryna i  $\gamma$ -schizandryna, oznaczono schizantherynę B, schizanthanol i schizandrynę C, oraz wstępnie oznaczono: schizandrynę B, benzoylgomisynę P, angeloyl-/tigloylgomisynę H, angeloyl-/tigloylgomisynę Q i schizantherynę D. Badania objęły nie tylko biomase różnych typów hodowli *in vitro*, ale też materiał roślinny – owoce i liście rośliny macierzystej. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że kultury *in vitro* są bogatym źródłem lignanów typu schisandra, szczególnie: schizandryny, gomisyny B i deoksyschizandryny, których zawartość była porównywalna z ich zawartością w ekstraktach z liści rośliny macierzystej.

Uzyskane, pozytywne wyniki przydatności testowanych płynnych systemów hodowlanych, stworzyły dobrze rokujące możliwości do dalszych eksperymentów biotechnologicznych mających na celu zwiększenie produkcji lignanów typu schisandra m.in. w hodowlach w bioreaktorach i opartych o proces elicytacji.

**3H. Szopa A, Ekiert H. 2016, The importance of applied light quality on the production of lignans and phenolic acids in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. cultures *in vitro*. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, 127: 115–121. DOI: 10.1007/s11240-016-1034-1. IF=2,002; MNiSW=30pkt**

Celem pracy było zbadanie wpływu warunków świetlnych prowadzonych kultur *in vitro* na akumulację lignanów dibenzocyklooktadienowych i kwasów fenolowych. Agarowe kultury mikropędowe *S. chinensis* hodowane były na podłożu „uniwersalnym” - MS zawierającym 3 mg/l BA oraz 1 mg/l NAA, w obecności monochromatycznego światła fluorescencyjnego: w dalekiej podczerwieni, świetle czerwonym, świetle niebieskim oraz w obecności promieniowania UV-A. Ponadto prowadzono również hodowle w warunkach ciągłej ciemności oraz w świetle białym, jako warunkach kontrolnych. Okres hodowlany trwał 30 dni. W metanolowych ekstraktach z biomasy oznaczono metodą LC-DAD zawartość lignanów dibenzocyklooktadienowych (czternaście związków) (Zhang et al. 2009) oraz kwasów fenolowych (siedem

związków) (Ellnain-Wojtaszek and Zgorka 1999; Sułkowska-Ziaja et al. 2017). Całkowita zawartość badanych grup związków wzrastała odpowiednio 1,71- i 1,98- krotnie, w zależności od zastosowanych warunków świetlnych. Najbardziej sprzyjającym akumulacji metabolitów wtórnych okazało się światło niebieskie - całkowita zawartość lignanów wynosiła 376,41 mg/100 g s.m., a kwasów fenolowych - 46,57 mg/100 g s.m.. Zawartości te były: 1,31- i 1,37-krotnie wyższe niż w ekstraktach z biomasy hodowanej w świetle białym. Zawartości poszczególnych związków wzrastała wyraźnie w zależności od zastosowanych warunków świetlnych; od 1,51- do 1,37-krotnie dla lignanów, oraz od 1,74- do 2,72-krotnie dla kwasów fenolowych.

Dominującymi ilościowo metabolitami były: schizandryna (67,70 mg/100 g s.m.), deoksychizandryna (55,19 mg/100 g s.m.), gomisina A (36,97 mg/100 g s.m.), oraz kwas chlorogenowy (15,33 mg/100 g s.m.) i kwas protokatechowy (13,11 mg/100 g s.m.).

W publikacji po raz pierwszy opisano wpływ warunków świetlnych, w tym światła monochromatycznego, na akumulację lignanów dibenzocyklooktadienowych i kwasów fenolowych w kulturach *in vitro* *S. chinensis*.

**4H. Szopa A, Kokotkiewicz A, Król A, Luczkiewicz M, Ekiert H. 2018, Improved production of dibenzocyclooctadiene lignans in the elicited microshoot cultures of *Schisandra chinensis* (Chinese magnolia vine). *Applied Microbiology and Biotechnology*, DOI: 10.1007/s00253-017-8640-7, 102(2): 945-959. IF=3,420; MNiSW=35 pkt**

Koncepcją pracy było opracowanie wydajnych metod elicytacji kultur mikropędowych *S. chinensis* w celu uzyskania wysokiej produkcji lignanów dibenzocyklooktadienowych (współpraca z prof. dr hab. Marią Łuczkiewicz, dr Adamem Kokotkiewiczem i mgr Agatą Król z Katedry Farmakologii GUMed). W ramach pracy przetestowano różne stężenia oraz różny czas suplementacji podłoży MS (zawierającym 3 mg/l BA oraz 1 mg/l NAA) czterema elicytorami: chlorkiem kadmu ( $\text{CdCl}_2$ ), chitozanem (Ch), jasmonianem metylu (MeJa) i ekstraktem drożdżowym (YeE), oraz czynnikiem permeabilizującym – dimetylosulfotlenkiem (DMSO). Pojedynczy cykl hodowlany trwał 30 dni. Oznaczenia przeprowadzono w ekstraktach metanolowych ze zliofilizowanej biomasy i z pożywek hodowlanych, techniką LC-DAD. Stwierdzono istotny wpływ zastosowanych czynników na akumulację lignanów w biomacie. W ekstraktach z podłoży hodowlanych stwierdzono jedynie śladowe ilości lignanów (< 5 mg/l). W wyniku elicytacji  $\text{CdCl}_2$  uzyskano 2-krotny wzrost akumulacji lignanów (maks. ok. 730 mg/100 g s.m. po aplikacji 1000  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  w 10 dniu cyklu hodowlanego) w porównaniu do kultur kontrolnych (nieelicytowanych). W wyniku elicytacji Ch uzyskano 1,35-krotny wzrost zawartości lignanów (maks. ok. 500 mg/100 g s.m.) po suplementacji 50 mg/l w pierwszym dniu hodowli, oraz 200 mg/l w 10 dniu cyklu hodowlanego). Po zastosowaniu elicytacji YeE również stwierdzono znaczny wzrost produkcji lignanów. Po suplementacji

5000 mg/l w pierwszym dniu hodowli, oraz 1000 and 3000 mg/l w 20 dniu hodowli uzyskano podobny, 1,8-krotny wzrost zawartości lignanów w hodowanej biomacie. Suplementacja 1000 mg/l YeE w 20 dniu cyklu hodowlanego została wytypowana jako optymalna dla testowanych kultur i została zastosowana dla hodowli *S. chinensis* prowadzonych w bioreaktorach okresowo-zalewowych – ‘Plantform’ (dostępne komercyjnie). Uzyskana po elicytacji całkowita produkcja lignanów była równa 831,6 mg/100 g s.m.. Zawartość lignanów uzyskana po elicytacji była o 10% wyższa niż w ekstraktach z owoców i o 39% wyższa niż w ekstraktach z liści rośliny macierzystej, analizowanych w celach porównawczych.

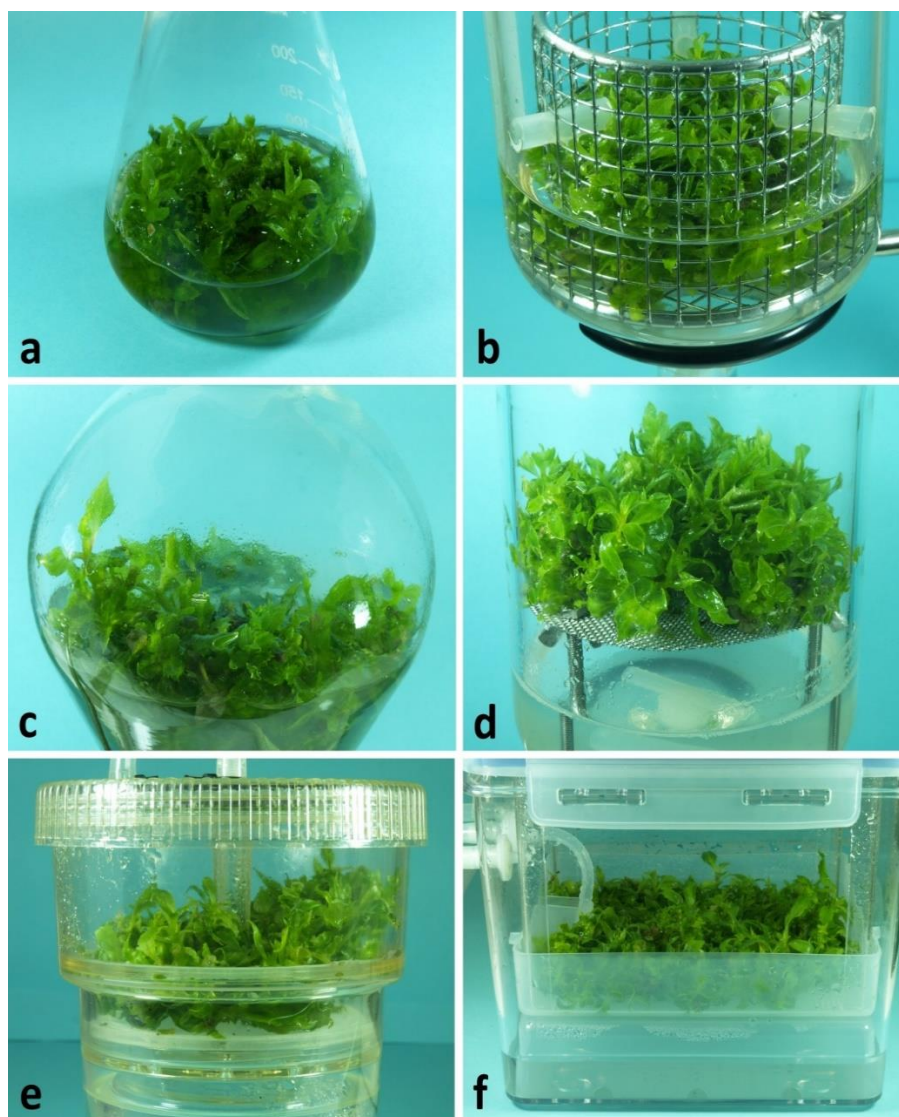
W ramach pracy po raz pierwszy przeprowadzono szeroko zakrojone doświadczenia z zakresu elicytacji w kulturach *in vitro* *S. chinensis*. Pomyślne efekty zastosowania techniki elicytacji w hodowli w bioreaktorach są wyraźnie nowatorskim i aplikacyjnym aspektem pracy.

**5H. Szopa A, Kokotkiewicz A, Luczkiewicz M, Ekiert H. 2017, Schisandra lignans production regulated by different bioreactor type. Journal of Biotechnology, 14 (247): 11-17. DOI:10.1016/j.jbiotec.2017.02.007. IF=2,599; MNiSW=30 pkt**

W ramach pracy zoptymalizowano warunki prowadzenia kultur *in vitro* *S. chinensis* w różnego typu roślinnych bioreaktorach (współpraca z prof. dr hab. Marią Łuczkiwicz, dr Adamem Kokotkiewiczem z Katedry Farmakognozji GUMed). Celem pracy było wytypowanie konstrukcji wielkolaboratoryjnej najbardziej sprzyjającej wzrostowi mikropędów oraz produkcji lignanów dibenzocyklooktadienowych. Kultury hodowane były na wybranym na podstawie poprzednich badań podłożu „produkcyjnym” - MS zawierającym 3 mg/l BA oraz 1 mg/l NAA. Testowano różny czas trwania cykli hodowlanych: 30 oraz 60-dni. W ramach pracy przetestowano pięć różnych konstrukcji bioreaktorów. Trzy prototypy bioreaktorów skonstruowane w Katedrze Farmakognozji Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego: bioraktory balonowe (baloon-type bioreactors), bioreaktory kolumnowe z systemem immobilizacji pędów (bubble-column bioreactors with biomass immobilization) i bioreaktory natryskowe (gas-phase spray bioreactors). Ponadto dwie konstrukcje dostępne komercyjnie, tzw. bioreaktory okresowo zalewowe: RITA<sup>®</sup> i Plantform (Rycina 4). W ekstraktach metanolowych z wyhodowanej biomasy techniką LC-DAD oraz LC-DAD-ESI-MS oznaczono zawartość 14 lignanów typu schisandra. Spośród testowanych bioreaktorów, najlepsze przyrosty biomasy uzyskano dla kultur hodowanych w systemach RITA<sup>®</sup> - 17,86 g s.m./l przez 60 dni. Z kolei najwyższą produkcję lignanów stwierdzono w ekstraktach z mikropędów hodowanych przez 30 dni w bioreaktorach Plantform – całkowita zawartość lignanów wynosiła 546.98 mg/100 g s.m.. Zawartość ta była 1,69-krotnie wyższa niż w ekstraktach z liści i tylko 1,38-krotnie niższa niż w ekstraktach z owoców roślin macierzystych analizowanych w celach porównawczych. Dominującymi ilościowo lignanami w ekstraktach były schizandryna (maks. 118,59 mg/100 g s.m.), deoksychizandryna (maks. 77,66 mg/100 g s.m.) i gomisina A (maks. 67,86 mg/100 g s.m.).

Uzyskane wyniki optymalizacji prowadzenia hodowli kultur *in vitro* *S. chinensis* w bioreaktorach okresowo-zalewowych Plantform mają nowatorski i aplikacyjny charakter. Systemy Plantform, oprócz tego, że są tanie i łatwe w obsłudze, dzięki możliwości ich szeregowego łączenia, mogą być stosowane na skalę przemysłową. Takie rozwiązanie może zapewnić możliwość szerokiej produkcji biomasy mikropędów *S. chinensis* bogatej w lignany.

W pracy po raz pierwszy przeprowadzono szeroko zakrojone doświadczenia z zakresu optymalizacji prowadzenia hodowli kultur *in vitro* *S. chinensis* w pięciu, różnego typu, bioreaktorach. Udowodniono również wysoką produkcję lignanów dibenzocyklooktadienowych w mikropędach hodowanych szczególnie w bioreaktorach okresowo zalewowych Plantform.



Rycina 4. Różne systemy hodowli kultur mikropędowych *S. chinensis*: **a)** kultury wytrząsane; **b)** bioreaktor kolumnowy z systemem immobilizacji pędów (BCB); **c)** bioreaktor balonowy (BB); **d)** bioreaktor natryskowy (SB); **e)** bioreaktor RITA®; **f)** bioreaktor Plantform.



**6H. Szopa A, Kokotkiewicz A, Bednarz M, Luczkiewicz M, Ekiert H. 2017, Studies on the accumulation of phenolic acids and flavonoids in different *in vitro* culture systems of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. using a DAD-HPLC method. *Phytochemistry Letters*: 20: 306-308. DOI: 10.1016/j.phytol.2016.10.016. IF=1,418; MNiSW=20 pkt**

W ramach pracy dokonano oceny zawartości dwóch grup związków polifenolowych: kwasów fenolowych i flawonoidów w ekstraktach z biomasy, oraz z podłoży hodowlanych, z różnych typów kultur *in vitro* oraz w materiale roślinnym *S. chinensis* (współpraca z prof. dr hab. Marią Łuczkiwicz, dr Adamem Kokotkiewiczem z Katedry Farmakognozji GUMed). Kultury mikropędowe hodowane były na podłożu „produkcyjnym” - MS zawierającym 3 mg/l BA oraz 1 mg/l NAA, w cyklach hodowlanych trwających 30 i 60 dni. Testowano kultury agarowe, płynne stacjonarne oraz wytrąsane. Oznaczenia przeprowadzono wg. zwalidowanej w naszym laboratorium, we współpracy z dr Anną Maślanką z Katedry Chemii Nieorganicznej UJ CM, metody LC-DAD (Ellnain-Wojtaszek and Zgorka 1999; Sułkowska-Ziaja et al. 2017). Spośród dwudziestu analizowanych kwasów fenolowych w badanych ekstraktach stwierdzono obecność siedmiu związków: depsydu - kwasu chlorogenowego, oraz sześciu pochodnych kwasu benzoowego: kwasu galusowego, kwasu p-hydroksybenzoowego, kwasu protokatechowego, kwasu salicylowego, kwasu syringowego oraz kwasu wanilinowego. Spośród jedenastu flawonoidów oznaczono: jeden aglikon – kemferol, oraz dwa glikozydy – kwercytrynę i rutozyd. Najwyższą całkowitą zawartość kwasów fenolowych (71,48 mg/100 g s.m.) oraz flawonoidów (29,36 mg/100 g s.m.) stwierdzono w ekstraktach z biomasy kultur agarowych hodowanych w systemie 30-dniowym. Związkami dominującymi ilościowo były: kwas protokatechowy (maks. 35,69 mg/100 g s.m.), kwas chlorogenowy (maks. 13,05 mg/100 g s.m.), oraz kwercytryna (maks. 27,43 mg/100 g s.m.).

Maksymalna całkowita zawartość kwasów fenolowych w ekstraktach z kultur agarowych była 1,5-krotnie wyższa niż w ekstraktach z owoców, oraz 1,35-krotnie niższa niż w ekstraktach z liści roślin macierzystych. Oznaczenia flawonoidów w materiale roślinnym wykazały ich brak w ekstraktach z owoców oraz wysoką zawartość w ekstraktach z liści; porównywalną do zawartości w kulturach *in vitro*. Stwierdzono jednak różnice jakościowe – brak kemferolu, oraz obecność mirycetyny i kwercetyny w ekstraktach z liści.

Badania udowodniły konkurencyjność, pod względem produkcji badanych związków polifenolowych, biomasy hodowanej *in vitro* w stosunku do roślin rosnących w warunkach *in vivo*.

W pracy po raz pierwszy oznaczono zawartość flawonoidów w ekstraktach z biomasy różnych typów kultur *in vitro* *S. chinensis*. Rozszerzono również analizy przeprowadzone w oparciu o pracę w ramach doktoratu [150] o nowe kwasy fenolowe; spośród nowo zakupionych wzorców oznaczono: kwas galusowy i wanilinowy (poza kwasami: chlorogenowym, p-hydroksybenzoowym, protokatechowym, salicylowym i syringowym).

**7H. Szopa A, Kwiecień I, Ekiert H. 2017, Biotransformation of hydroquinone and 4-hydroxybenzoic acid in *Schisandra chinensis* (Chinese magnolia vine) *in vitro* cultures. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 16(6), 53–62, DOI: 10.24326/asphc.2017. IF= 0,523; MNiSW=20 pkt**

Celem pracy była ocena potencjału biotransformacyjnego kultur *in vitro* *S. chinensis*. W ramach pracy przeprowadzono optymalizację procesu biotransformacji hydrochinonu oraz kwasu 4-hydroksybenzoesowego do arbutyny ( $\beta$ -D-glukozydu hydrochinonu) - związku o znanych właściwościach farmakologicznych (dezynfekcja dróg moczowych, działanie antyoksydacyjne, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne) i kosmetycznych (działanie wybielające skórę) (Migas and Krauze-Baranowska 2015) [12P]. Doświadczenie przeprowadzono z wytrząsanymi kulturami pędowymi hodowanymi na podłożu „produkcyjnym” (MS, 3 mg/l BA i 1 mg/l NAA). W ramach optymalizacji procesu przetestowano różne stężenia dodawanych prekursorów: 96, 144, 192, 288, and 384 mg/l pożywki, oraz sposoby ich suplementacji: w 14 dniu cyklu hodowlanego w dawce pojedynczej, lub w dawkach podzielonych na 2 i 3 porcje podawanych w odstępie 24 godzin. Po 24 godzinach od podania ostatniej dawki zbierano biomasę oraz pożywkę hodowlaną. Oznaczenia arbutyny przeprowadzono w ekstraktach metanolowych z wysuszonej biomasy, oraz zliofilizowanych podłoży techniką LC-DAD wg. Štambergová i in. (Štambergová et al. 1985). W wyniku przeprowadzonej optymalizacji procesu biotransformacji z zastosowaniem hydrochinonu, stwierdzono 2,26-krotny wzrost akumulacji arbutyny, zależny od zastosowanego schematu doświadczenia. Najwyższą zawartość arbutyny (3,9 mg/g s.m.) stwierdzono po zastosowaniu suplementacji 384 mg/l hydrochinonu w dwóch dawkach. Arbutyna akumulowana była głównie w biomasie hodowanych kultur (85.2-98.6%).

W wyniku reakcji biotransformacji z zastosowaniem kwasu p-hydroksybenzoesowego, uzyskano inne związki: 4-O- $\beta$ -glukopiranozyd kwasu 4-hydroksybenzoesowego oraz  $\beta$ -glukopiranozyloester kwasu 4-hydroksybenzoesowego. Tożsamość tych związków, jak również arbutyny została potwierdzona techniką  $^1\text{H-NMR}$ .

W ramach pracy po raz pierwszy przeprowadzono szeroką optymalizację procesu biotransformacji kwasu 4-hydroksybenzoesowego w kulturach *S. chinensis*. Wyniki prac udowodniły potencjał biotransformacyjny kultur *in vitro* *S. chinensis*, i mają cenne znaczenie poznawcze.

**8H. Szopa A, Klimek-Szczykutowicz M, Kokotkiewicz A, Maślanka A, Luczkiewicz M, Ekiert H. 2018,** Phytochemical and biotechnological studies on *Schisandra chinensis* cultivar Sadova No. 1 - a high utility medicinal plant. **Applied Microbiology and Biotechnology**, DOI: 10.1007/s00253-018-8981-x. IF=3,420, MNiSW=35 pkt.

Przedmiotem pracy była szeroka optymalizacja warunków prowadzenia, oraz ocena możliwości biosyntetycznych, mikropędowych kultur odmiany hodowanej gatunku *Schisandra chinensis* - *S. chinensis* cv. Sadova. W ramach pracy zainicjowano kultury *in vitro* *S. chinensis* cv. Sadova z pąków liściowych roślin macierzystych pozyskanych, w ramach współpracy, ze szkółki firmy CLEMATIS Źródło Dobrych Pnączy Spółka z o.o. z Pruszkowa. W ramach optymalizacji hodowli *in vitro* przetestowano: różne typy hodowli: kultury agarowe, wytrząsane, oraz hodowane w bioreaktorach okresowo-zalewowych Plantform (Rycina 5) (współpraca z prof. dr hab. Marią Łuczkiewicz, dr Adamem Kokotkiewiczem i mgr Agatą Król z Katedry Farmakognozji GUMed), wpływ różnych czasów trwania hodowli: 10, 20, 30 40, 50 i 60-dniowe okresy hodowlane, oraz różne stężenia regulatorów wzrostu i rozwoju roślin: BA/NAA (mg/l): 0,1/2; 0,5/ 2; 2/0,5; 2/1; 2/2; 3/1 i 0/0-kontrola w podłożu hodowlanym MS. Ponadto w biomacie hodowanej w bioreaktorze na podłożu MS zawierającym 3 mg/l BA i 1 mg/l NAA przeprowadzono również proces elicytacji z zastosowaniem ekstraktu drożdżowego (YeE) w stężeniu 1000 mg/l w 20 dniu, trzydziestodniowego okresu hodowlanego. W ekstraktach z biomasy kultur *in vitro*, jak również w materiale roślinnym – ekstraktach z owoców i liści, po raz pierwszy oznaczono zawartość lignanów dibenzocyklooktadienowych. W ekstraktach metodami LC-DAD, oraz LC-DAD-ESI-MS stwierdzono obecność czternastu lignanów. Dominującymi pod względem ilościowym były: schizandryna (maks. 176,31 mg/100 g s.m.), angeloylogomisyna Q (maks. 85,10 mg/100 g s.m.), gomisyne A (maks. 71,43 mg/100 g s.m.) i angeloylogomisyna H (maks. 67,00 mg/100 g s.m.). Najwyższą całkowitą zawartość lignanów (490,25 mg/100 g s.m.) stwierdzono w ekstraktach z biomasy z kultur agarowych hodowanych 30 dni na wariacie podłoża MS zawierającym 3 mg/l BA i 1 mg/l NAA. Była ona 1,32-krotnie niższa niż w ekstraktach z owoców (645,95 mg/100 g s.m.), oraz 2,04-krotnie wyższa niż w ekstraktach z liści (240,65 mg/100 g s.m.) rośliny macierzystej, analizowanych w celach porównawczych.

Dodatkowo w ramach pracy opisano proces walidacji stosowanej w badaniach metody LC-DAD oznaczania zawartości lignanów dibenzocyklooktadienowych w ekstraktach metanolowych (współpraca z dr Anną Maślanką z Katedry Chemii Nieorganicznej UJ CM).

Uzyskane wyniki optymalizacji procesu biotechnologicznego wykazały wysoką przydatność kultur *in vitro* odmiany hodowanej *S. chinensis* cv. Sadova, jako alternatywnego, w stosunku do *S. chinensis*, źródła pozyskiwania lignanów dibenzocyklooktadienowych.

W ramach pracy dokonano szerokiego porównania możliwości biosyntetycznych *S. chinensis* oraz odmiany hodowanej *S. chinensis* cv. Sadova. Ponadto dokonano po raz pierwszy oceny zawartości lignanów typu schisandra w owocach i liściach odmiany hodowanej. Stwierdzono, że skład jakościowy testowanych

lignanów jest taki sam, jednak różnice ilościowe poszczególnych związków są znaczące. Wyniki badań w pełni mają charakter innowacyjny.



Rycina 5. Mikropędowe kultury *S. chinensis* cv. Sadova (podłoże MS zawierające 3 mg/l BA i 1 mg/l NAA, 30 dzień hodowli): **a)** kultury agarowe; **b)** kultury wytrząsane **c)** kultury hodowane w bioreaktorze Plantform.

**9H. Szopa A**, Ekiert R, Ekiert H. Current knowledge of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (Chinese magnolia vine) as a medicinal plant species - a review on the bioactive components, pharmacological properties, analytical and biotechnological studies. **Phytochemistry Reviews**, 2017; 16(2): 195-218. DOI: 10.1007/s11101-016-9470-4. (publikacja pogładowa) IF= 3,393; MNiSW=40 pkt

W pracy pogładowej dokonano przeglądu najnowszego piśmiennictwa naukowego dotyczącego różnych aspektów badań nad gatunkiem *S. chinensis* oraz lignanami dibenzocyklooktadienowymi (współpraca z dr Radosławem Ekiertem z KZZ „Herbapol” w Krakowie). Praca opisuje aktywność biologiczną ekstraktów z owoców i/lub pędów *S. chinensis*, oraz poszczególnych lignanów. Co ważne, praca oparta jest w dużej części na wynikach badań własnych – fitochemicznych i biotechnologicznych nad gatunkiem *S. chinensis*.

Publikacja podsumowuje przeprowadzone przeze mnie badania i pogłębia wiedzę na temat gatunku *S. chinensis* oraz lignanów typu schisandra.

## **PODSUMOWANIE**

Na podstawie wyników badań, których rezultatem jest osiągnięcie naukowe, będące podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego, zrealizowany został pełen cykl badań biotechnologicznych nad gatunkiem *S. chinensis*. Przeprowadzone doświadczenia dotyczyły endogennej akumulacji metabolitów wtórnych ważnych w lecznictwie: lignanów dibenzocyklooktadienowych [1H-6H], kwasów fenolowych oraz flawonoidów [3H,6H].

Szczególną uwagę poświęcono lignanom dibenzocyklooktadienowym – metabolitom specyficznym nie tylko ze względu na cenne właściwości biologiczne, ale i ich unikatowość strukturalną, oraz występowanie tylko w gatunkach rodzaju Schisandra [9H]. Dla lignanów typu schisandra proces biotechnologiczny został zoptymalizowany w oparciu o testowanie różnych strategii, takich jak: dobór typu kultury [1H,2H], czasu hodowli [2H-5H], różnych warunków świetlnych wzrostu kultur [3H] oraz zastosowanie elicytorów [4H].

W ramach cyklu prac opracowano proces „up-stream” dla odmiany hodowlanej - *S. chinensis* cv. Sadova [8H]. Proces obejmował zainicjowanie kultur *in vitro*, opracowanie i optymalizację składu podłoża hodowlanego, badanie dynamiki wzrostu, warunków hodowli w zakresie suplementacji podłoża elicytorami. Co ważne w ramach prac badawczych został opracowany również wydajny pod względem produkcji lignanów dibenzocyklooktadienowych, proces hodowli mikropędów *S. chinensis* [5H] oraz *S. chinensis* cv. Sadova w bioreaktorach [8H].

Porównanie maksymalnych zawartości lignanów, oznaczonych walidowaną metodą LC-DAD [8H], zidentyfikowanych metodą LC-DAD-ESI-MS [2H], uzyskanych w ramach doświadczeń z kulturami *in vitro* *S. chinensis* i *S. chinensis* cv. Sadova opisanych w pracach [1H], [2H], [4H], [5H] i [8H] przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Porównanie maksymalnych zawartości (mg/100 g s.m.) lignanów dibenzocyklooktadienowych uzyskanych w ekstraktach z biomasy kultur mikropędowych *S. chinensis* i *S. chinensis* cv. Sadova (podłoże MS zawierające 3 mg/l BA i 1 mg/l NAA, czas hodowli-30 dni).

Lignany	<i>S. chinensis</i>			<i>S. chinensis</i> cv. Sadova		
	kultury agarowe	kultury wytrząsane	bioreactor Plattform	kultury agarowe	kultury wytrząsane	bioreactor Plattform
<b>Schisandrin</b>	52,96	37,98	118,59	99,01	112,31	115,34
<b>Gomisin A</b>	25,90	24,37	67,86	49,55	71,43	27,85
<b>Angeloyl-/tigloylgomisin H</b>	26,66	22,00	53,47	54,32	44,83	30,03
<b>Angeloyl-/tigloylgomisin Q</b>	51,24	34,58	100,13	67,68	30,62	18,27
<b>Gomisin G</b>	1,44	1,42	2,73	10,70	6,49	9,48
<b>Schisantherin A</b>	0,42	3,05	2,97	7,99	7,50	4,07
<b>Schisantherin B</b>	0,80	3,37	9,85	33,83	29,87	35,64
<b>Schisanthenol</b>	0,51	0,96	1,26	2,21	8,36	1,05
<b>Deoxyschisandrin</b>	30,27	27,64	77,66	34,02	21,49	9,56
<b>Schisandrin B</b>	14,45	13,56	39,69	22,38	0,38	9,06
<b><math>\gamma</math>-Schisandrin</b>	8,04	7,63	22,43	16,75	5,69	2,27
<b>Benzoylgomisin P</b>	17,50	13,68	37,19	26,97	8,99	12,26
<b>Schisandrin C</b>	2,35	1,95	5,02	12,42	4,89	16,64
<b>Schisantherin D</b>	5,31	2,97	8,15	52,43	22,25	22,00
<b>Total content</b>	<b>237,86</b>	<b>195,15</b>	<b>546,98</b>	<b>574,42</b>	<b>375,11</b>	<b>313,51</b>

W ramach prac przeprowadzono po raz pierwszy analizę LC-DAD zawartości kwasów fenolowych oraz flawonoidów w ekstraktach z biomasy różnych typów kultur *S. chinensis* [6H], oraz zbadano wpływ warunków świetlnych prowadzenia hodowli na ich endogenną akumulację [3H]. Ponadto po raz pierwszy przeprowadzono oznaczenia związków polifenolowych w ekstraktach z owoców i liści roślin rosnących w Polsce [6H].

Interesującym aspektem przeprowadzonych prac, było również wykazanie możliwości przeprowadzania procesów biotransformacyjnych w badanych kulturach *in vitro* *S. chinensis* [7H].

Wyniki zrealizowanych prac z zakresu biotechnologii roślin których rezultatem jest osiągnięcie naukowe, będące podstawą ubiegania, o nadanie stopnia doktora habilitowanego, mają charakter nowatorcki. Prace zostały opublikowane na łamach wiodących czasopism w dziedzinie biotechnologii roślin, oraz zaprezentowane w formie komunikatów ustnych i posterów na konferencjach naukowych w kraju i za granicą.

Badania udowodniły wysoką konkurencyjność badanych kultur *in vitro* w stosunku do surowca farmakopealnego – owoców, jak również liści *S. chinensis* oraz *S. chinensis cv. Sadova*, oraz wykazały ich potencjalną użyteczność, jako alternatywnego, bogatego źródła pozyskiwania lignanów dibenzocyklooktadienowych.

W ramach zrealizowanych prac został poznany skład chemiczny roślin uprawianych w Polsce. Wyniki pozytywnie odpowiedziały na pytanie dotyczące możliwości wykorzystania kultur *in vitro* *S. chinensis* oraz *S. chinensis cv. Sadova*, jako alternatywy dla surowca *ex vivo*.

Uzyskane wyniki przyczyniły się do poszerzenia wiedzy na temat wschodnioazjatyckiego, pnącza – *S. chinensis*, oraz jego odmiany hodowlanej - *S. chinensis cv. Sadova*. W ramach mojej działalności napisałam anglojęzyczną pracę pogładową [9H], oraz dwie prace popularnonaukowe opisujące właściwości lecznicze [4P] oraz kosmetyczne [5P] gatunku.

### **PERSPEKTYWY DALSZYCH BADAŃ**

Ze zrealizowaną tematyką badawczą wiąże szerokie, dalsze perspektywy dla swojej aktywności naukowej. Wysoce aplikacyjne wyniki prac skłaniają do ich kontynuowania. Niezwykle atrakcyjnymi obiektami badawczymi są inne gatunki rodzaju *Schisandra* jak: *S. rubriflora*, *S. henryi* czy *S. sphenanthera*. O słabym poznaniu tych gatunków świadczy fakt niewielkiej liczby publikacji z listy czasopism punktowanych bazy Journal Citation Reports. Dostępna literatura zawęza się głównie do nielicznych prac zespołów badawczych z Chin. Z dostępnych danych wynika, że gatunki te również obfitują w lignany dibenzocyklooktadienowe (Iu et al. 2009; Mu et al. 2011; Song et al. 2013). Brak badań biotechnologicznych, nieliczne badania fitochemiczne, oraz przesłanki o konkurencyjności innych gatunków rodzaju *Schisandra* w stosunku do *S. chinensis* wydają się być niezwykle atrakcyjną perspektywą dla moich badań.

Uzyskane przeze mnie w 2017 roku wsparcie finansowe Narodowego Centrum Nauki - Sonata dla projektu pt. „Badania fitochemiczne, biotechnologiczne oraz ocena aktywności biologicznej gatunku *Schisandra rubriflora* - cytryniec czerwono-kwiatowy” Nr 2016/23/D/NZ7/01316, oraz rozpoczęty projekt badawczy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Dotacja celowa dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich do 35 roku życia” pt.: ”Kultury *in vitro* gatunków rodzaju *Schisandra* jako potencjalne źródło farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych” Nr K/DSC/004297, pozwalają mi na sukcesywną realizację badań.

## 2.4. Piśmiennictwo

- Březinová L, Vlašínová H, Havel L, Humpa O, Slanina J (2010) Validated method for bioactive lignans in *Schisandra chinensis in vitro* cultures using a solid phase extraction and a monolithic column application. *Biomed Chromatogr* 24:954–960 . doi: 10.1002/bmc.1391
- Central Pharmaceutical Affairs Council of Korea (2002) Korean Pharmacopoeia. Seoul
- Chang J, Reiner J, Xie J (2005) Progress on the chemistry of dibenzocyclooctadiene lignans. *Chem Rev* 105:4581–4609 . doi: 10.1021/cr050531b
- Chen AH, Yang JL, Niu Y Da, Yang CP, Liu GF, Yu CY, Li CH (2010) High-frequency somatic embryogenesis from germinated zygotic embryos of *Schisandra chinensis* and evaluation of the effects of medium strength, sucrose, GA<sub>3</sub>, and BA on somatic embryo development. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 102:357–364 . doi: 10.1007/s11240-010-9740-6
- Cheng N, Ren N, Gao H, Lei X, Zheng J, Cao W (2013) Antioxidant and hepatoprotective effects of *Schisandra chinensis* pollen extract on CCl<sub>4</sub>-induced acute liver damage in mice. *Food Chem Toxicol* 55:234–240 . doi: 10.1016/j.fct.2012.11.022
- Chinese Pharmacopoeia Commission (2005) Pharmacopoeia of the People's Republic of China. China Chemical Industry Press, Beijing
- Committee of the Japanese Pharmacopoeia Evaluation and Licensing Division Pharmaceuticals and Food Safety (2006) Japanese Pharmacopoeia. Bureau Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo
- Croft KD (1998) The Chemistry and Biological Effects of Flavonoids and Phenolic Acids. *Ann N Y Acad Sci* 854:435–442 . doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09922.x
- Deepthi S, Satheeshkumar K (2017) Cell line selection combined with jasmonic acid elicitation enhance camptothecin production in cell suspension cultures of *Ophiorrhiza mungos* L. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:545–558 . doi: 10.1007/s00253-016-7808-x
- Ekiert H (2009) Farmaceutyczne aspekty biotechnologii roślin. Część I. Wprowadzenie – metodyka i główne kierunki badawcze. (Pharmaceutical aspects of plant biotechnology. Part I. Introduction – methods and main research directions). *Biotechnologia* 65:69–77
- Ekiert H, Kwiecień I, Szopa A (2013a) Rosmarinic acid production in plant *in vitro* cultures. *Pol J Cosmetol* 16:49–58
- Ekiert H, Kwiecień I, Szopa A, Muszyńska B (2013b) Possibilities of arbutin production using plant biotechnology methods. *Pol J Cosmetol* 15:151–162
- Ekiert RJ (2005) Cytryniec chiński - niedoceniany dar chińskiej medycyny. *Lek w Polsce* 15:88–92
- Ellnain-Wojtaszek M, Zgorka G (1999) High-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography of phenolic acids from *Ginkgo biloba* L. leaves collected within vegetative period. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 22:1457–1471 . doi: 10.1081/JLC-100101744
- European Directorate for the Quality of Medicines (2008) *Schisandrae chinensis fructus*. In: European Pharmacopoeia 6.0. Strasburg
- European Directorate for the Quality of Medicines (2017) Schisandra fruit. In: European Pharmacopoeia 9.0. Strasburg, p 1514
- Ganem B (1978) From glucose to aromatics: recent developments in natural products of the shikimic acid pathway. *Tetrahedron* 34:3353–3383 . doi: 10.1016/0040-4020(78)80222-1
- Georgiev V, Schumann A, Pavlov A, Bley T (2014) Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Eng Life Sci* 14:607–621 . doi: 10.1002/elsc.201300166
- Giri A, Dhingra V, Giri C., Singh A, Ward OP, Narasu ML (2001) Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnol Adv* 19:175–199 . doi: 10.1016/S0734-9750(01)00054-4
- Gottlieb OR (1972) Chemosystematics of the Lauraceae. *Phytochemistry* 11:1537–1570 . doi: 10.1016/0031-9422(72)85001-5
- Halford NG (2006) Plant biotechnology: current and future applications of genetically modified crops. J. Wiley
- Hammond J, McGarvey P, Yusibov V (2000) Plant Biotechnology: New Products and Applications. Springer Berlin Heidelberg
- Hancke JL, Burgos RA, Ahumada F (1999) *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Fitoterapia* 70:451–471 . doi: 10.1016/S0367-326X(99)00102-1
- Havel L, Vlašínová H, Bohatcová I, Trojan V, Slanina J, Březinová L (2008) Dibenzocyclooctadiene lignan



- production in *Schisandra chinensis* embryogenic culture. J Biotechnol 136:S437 . doi: 10.1016/j.jbiotec.2008.07.1012
- Hefferon K (2010) Biopharmaceuticals in Plants: Toward the Next Century of Medicine. Taylor & Francis Group
- Hegnauer R (1962) Chemotaxonomie der Pflanzen. Springer Basel AG
- Heleno SA, Martins A, Queiroz MJRP, Ferreira ICFR (2015) Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds: a review. Food Chem 173:501–513 . doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.057
- Henry F, Danoux L, Pauly G (2012) Cosmetic use of an extract of the fruit of *Schisandra chinensis*
- Hou W, Gao W, Wang D, Liu Q, Zheng S, Wang Y (2015) The protecting effect of deoxyschisandrin and schisandrin B on HaCaT cells against UVB-induced damage. PLoS One 10:1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0127177
- Hwang D, Shin SY, Lee Y, Hyun J, Yong Y, Park JC, Lee YH, Lim Y (2011) A compound isolated from *Schisandra chinensis* induces apoptosis. Bioorganic Med Chem Lett 21:6054–6057. doi: 10.1016/j.bmcl.2011.08.065
- Hwang SY, Lee YJ, Lee YK, Jung SE, Kim JH, Kim HJ, Son BG, Park YH, Lee YG, Choi YW, Hwang DY (2009) Gomisins N isolated from *Schisandra chinensis* significantly induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects in hepatic carcinoma. Mol Med Rep 2:725–732 . doi: 10.3892/mmr\_00000163
- Ip SP, Mak DHF, Li PC, Poon MKT, Ko KM (1996) Effect of a lignan-enriched extract of *Schisandra chinensis* on aflatoxin B1 and cadmium chloride-induced hepatotoxicity in rats. Pharmacol Toxicol 78:413–416 . doi: 10.1111/j.1600-0773.1996.tb00228.x
- Iu HL, Li-jia XU, Eng YP, Ang XY, Iao PX (2009) Two New Lignans from *Schisandra henryi*. Chem Pharm Bull 57:405–407. doi: 10.1248/cpb.57.405
- Ivan I, Libiakova A, Jain S. M. (2010) Plant micropropagation. In: Davey MR, Anthony P (eds) Plant cell culture: essential methods. Wiley-Blackwell, pp 1–23
- Jiang Y, Fan X, Wang Y, Tan H, Chen P, Zeng H, Huang M, Bi H (2015) Hepato-protective effects of six schisandra lignans on acetaminophen-induced liver injury are partially associated with the inhibition of CYP-mediated bioactivation. Chem Biol Interact 231:83–89 . doi: 10.1016/j.cbi.2015.02.022
- Kayser O, Müller RH, Kieć-Kononowicz K, Kononowicz T (2003) Biotechnologia farmaceutyczna. Wydaw. Lekarskie PZWL
- Khadem S, Marles RJ (2010) Monocyclic phenolic acids; hydroxy- and polyhydroxybenzoic acids: occurrence and recent bioactivity studies. Molecules 15:7985–8005 . doi: 10.3390/molecules15117985
- Kim TD, Anbazhagan VR, Park JI (2005) Somatic embryogenesis in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. In Vitro Cell & Dev Biol - Plant 41:253–257. doi: 10.1079/IVP2004630
- Kohda H, Ozaki M, Namera A (2012) Production of lignans in calluses of *Schisandra chinensis*. J Nat Med 66:373–376. doi: 10.1007/s11418-011-0586-y
- Kumar MS, Chaudhury S, Balachandran S (2014) *In vitro* Callus Culture of *Heliotropium indicum* Linn. for Assessment of Total Phenolic and Flavonoid Content and Antioxidant Activity. Appl Biochem Biotechnol 174:2897–2909 . doi: 10.1007/s12010-014-1235-1
- Kumar S, Pandey AK (2013) Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. Sci World J eCollection:162750 . doi: 10.1155/2013/162750
- Kuś A (2008) Akumulacja kwasów fenolowych w kulturach *in vitro* *Ruta graveolens* L. - praca magisterska. Wydział Farmaceutyczny UJ CM, Kraków
- Le Marchand L (2002) Cancer preventive effects of flavonoids—a review. Biomed Pharmacother 56:296–301 . doi: 10.1016/S0753-3322(02)00186-5
- Linsmaier EM, Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol Plant 18:100–127 . doi: 10.1111/j.1399-3054.1965.tb06874.x
- Madesis P, Konstantinidou E, Tsaftaris A, Nianiou-Obeidat I (2011) Micropropagation and shoot regeneration of *Cistus creticus* ssp. *creticus*. J Appl Pharm Sci 1:54–58
- Malepszy S (2009) Biotechnologia roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN
- Mason HS, Warzecha H, Mor T, Arntzen CJ (2002) Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. Trends Mol Med 8:324–329 . doi: 10.1016/S1471-4914(02)02360-2
- Matkowski A (2008) Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants - A review. Biotechnol Adv 26:548–560. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.07.001
- Migas P, Krauze-Baranowska M (2015) The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics. Phytochem Lett 13:35–40. doi: 10.1016/j.phytol.2015.05.015

- Mocan A, Crişan G, Vlase L, Crişan O, Vodnar DC, Raita O, Gheldiu AM, Toiu A, Oprean R, Tilea I (2014) Comparative studies on polyphenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Schisandra chinensis* leaves and fruits. *Molecules* 19:15162–15179. doi: 10.3390/molecules190915162
- Mu H-X, Li X-S, Fan P, Yang G-Y, Pu J-X, Sun H-D, Hu Q-F, Xiao W-L (2011) Dibenzocyclooctadiene lignans from the fruits of *Schisandra rubriflora* and their anti-HIV-1 activities. *J Asian Nat Prod Res* 13:393–399. doi: 10.1080/10286020.2011.565748
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–479
- Nijveldt RJ, Nood E, Hoorn DE, Boelens PG, Norren K, Leeuwen PA (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74:418–425. doi: 10.1093/ajcn/74.4.418
- Opletal L, Sovová H, Bártlová M (2004) Dibenz[*a,c*]cyclooctadiene lignans of the genus *Schisandra*: importance, isolation and determination. *J Chromatogr B* 812:357–371. doi: 10.1016/j.jchromb.2004.07.040
- Panossian A, Wikman G (2008) Pharmacology of *Schisandra chinensis* Bail.: An overview of Russian research and uses in medicine. *J Ethnopharmacol* 118:183–212. doi: 10.1016/j.jep.2008.04.020
- Pietrosiuk A, Furmanowa M (2006) Plant biotechnology in human healthcare. *Biotechnologia* 116–123
- Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N (2011) Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82:513–523. doi: 10.1016/j.fitote.2011.01.018
- Ramirez-Estrada K, Vidal-Limon H, Hidalgo D, Moyano E, Golenioswki M, Cusidó RM, Palazon J (2016) Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules* 21:182–182. doi: 10.3390/molecules21020182
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20:933–956. doi: 10.1016/0891-5849(95)02227-9
- Santos-Gomes PC, Seabra RM, Andrade PB, Fernandes-Ferreira M (2002) Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Sci* 162:981–987. doi: 10.1016/S0168-9452(02)00052-3
- Saunders RMK (2000) Monograph of *Schisandra* (*Schisandraceae*). In: *Systematic Botany Monographs*. American Society of Plant Taxonomists, pp 1–146
- Schneider M, Windbergs M, Daum N, Loretz B, Collnot E-M, Hansen S, Schaefer UF, Lehr C-M (2013) Crossing biological barriers for advanced drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 84:239–241. doi: 10.1016/j.ejpb.2013.03.009
- Shaitan I (2005) Колбасина ЕИ: Актиндия и лимонник (*Actinidia* and Chinese Magnolia vine). Moscow
- Shi P, He Q, Zhang Y, Qu H, Cheng Y (2009) Characterisation and identification of isomeric dibenzocyclooctadiene lignans from *Schisandra chinensis* by high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Phytochem Anal* 20:197–206. doi: 10.1002/pca.1115
- Smejkal K, Slapetova T, Krmencik P, Babula P, Dall'Acqua S, Innocenti G, Vanco J, Casarin E, Carrara M, Kalvarova K, Dvorska M, Slanina J, Kramarova E, Julinek O, Urbanova M (2010) Evaluation of cytotoxic activity of *Schisandra chinensis* lignans. *Planta Med* 76:1672–1677. doi: 10.1055/s-0030-1249861
- Smíšková A, Vlašínová H, Havel L (2005) Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Schisandra chinensis*. *Biol Plant* 49:451–454. doi: 10.1007/s10535-005-0027-4
- Song QY, Zhang CJ, Li Y, Wen J, Zhao XW, Liu ZL, Gao K (2013) Lignans from the fruit of *Schisandra sphenanthera*, and their inhibition of HSV-2 and adenovirus. *Phytochem Lett* 6:174–178. doi: 10.1016/j.phytol.2012.12.008
- Štambergová A, Supčíková M, Leifertová I (1985) Hodnocení fenolických lřtek v *Arctostaphylos uva-ursi*. IV. Stanovení arbutinu, metylarbutinu a hydrochinonu v listech metodou HPLC. *Cesk Farm* 34:179–183
- Sułkowska-Ziaja K, Maślanka A, Szewczyk A, Muszyńska B (2017) Physiologically active compounds in four species of *Phellinus*. *Nat Prod Commun* 12:363–336
- Szopa A (2013) Badania nad akumulacją wybranych grup biologicznie aktywnych metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. - praca doktorska. Wydział Farmaceutyczny UJ CM, Kraków
- Szpitter A, Królicka A (2005) Stymulujący wpływ elicytorów biotycznych na produkcję farmakologicznie

- czynnych metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro*. *Biotechnologia* 4:82–108
- Umezawa T (2003) Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochem Rev* 2:371–390. doi: 10.1023/B:PHYT.0000045487.02836.32
- Upton R, Graff A, Jolliffe G, Länger R, Williamson E (2011) *American Herbal Pharmacopoeia: Botanical Pharmacognosy - Microscopic Characterization of Botanical Medicines*. CRC Press
- Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (2018) *Schisandrae chinensis fructus*. In: *Farmakopea Polska XI*. Rzeczpospolita Polska
- Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych. Rzeczpospolita Polska (2009) *Schisandrae chinensis fructus*. In: *Farmakopea Polska VIII*
- Verpoorte R, Contin A, Memelink J (2002) Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem Rev* 1:13–25 . doi: 10.1023/A:1015871916833
- Waiwut P, Shin M-S, Yokoyama S, Saiki I, Sakurai H (2012) Gomisin A Enhances Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Induced G1 Cell Cycle Arrest via Signal Transducer and Activator of Transcription 1-Mediated Phosphorylation of Retinoblastoma Protein. *Biol Pharm Bull* 35:1997–2003
- Walsh G (2003) Pharmaceutical biotechnology products approved within the European Union. *Eur J Pharm Biopharm* 55:3–10. doi: 10.1016/S0939-6411(02)00165-0
- Walsh G (2002) Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: an issue of nomenclature. *Eur J Pharm Sci* 15:135–138 . doi: 10.1016/S0928-0987(01)00222-6
- Wang C (2008) Diphenyl Dimethyl Bicarboxylate in the Treatment of Viral Hepatitis, Adjuvant or Curative? *Gastroenterol Res* 2–7. doi: 10.4021/gr2008.10.1231
- Wichtl M (2004) *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*. Medpharm, Stuttgart
- World Health Organization (2007) *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants*. vol. 3. *Fructus Schisandrae*. Geneva
- Wu Z, Raven P, Hong DY (2008) *Flora of China*, vol. 7. Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis
- Wyk BE, Wink M (2008) *Rośliny lecznicze świata*. MedPharm Polska
- Wysokińska H (2000) Wytwarzanie metabolitów wtórnych w kulturach korzeni transformowanych. *Biotechnologia* 4:32–39
- Wysokińska H, Chmiel A (2006) Produkcja roślinnych metabolitów wtórnych w kulturach organów transformowanych. *Biotechnologia* 4:124–135
- Xu L, Grandi N, Del Vecchio C, Mandas D, Corona A, Piano D, Esposito F, Parolin C, Tramontano E (2015) From the traditional Chinese medicine plant *Schisandra chinensis* new scaffolds effective on HIV-1 reverse transcriptase resistant to non-nucleoside inhibitors. *J Microbiol* 53:288–293 . doi: 10.1007/s12275-015-4652-0
- Yang JL, Da Niu Y, Yang CP, Liu GF, Li CH (2011) Induction of somatic embryogenesis from female flower buds of elite *Schisandra chinensis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 106:391–399. doi: 10.1007/s11240-011-9935-5
- Zhang H, Zhang G, Zhu Z, Zhao L, Fei Y, Jing J, Chai Y (2009) Determination of six lignans in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. fruits and related Chinese multiherb remedies by HPLC. *Food Chem* 115:735–739. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.12.010
- Zhao T, Mao G, Feng W, Mao R, Gu X, Li T, Li Q, Bao Y, Yang L, Wu X (2014) Isolation, characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Schisandra sphenanthera*. *Carbohydr Polym* 105:26–33 . doi: 10.1016/j.carbpol.2014.01.059
- Zhao T, Mao G, Mao R, Zou Y, Zheng D, Feng W, Ren Y, Wang W, Zheng W, Song J, Chen Y, Yang L, Wu X (2013) Antitumor and immunomodulatory activity of a water-soluble low molecular weight polysaccharide from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Food Chem Toxicol* 55:609–616 . doi: 10.1016/j.fct.2013.01.041

### 3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

#### 3.1. Aktywność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

W czasie studiów farmaceutycznych na Wydziale Farmaceutycznym *Collegium Medicum* Uniwersytetu Jagiellońskiego zainteresowałam się farmaceutycznymi aspektami badań nad roślinami leczniczymi. Szczególnie interesującym dla mnie kierunkiem była biotechnologia roślin. Dlatego na IV roku studiów zaczęłam aktywnie uczestniczyć w pracach badawczych Studenckiego Koła Naukowego związanych z tą tematyką działającym przy Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej UJ CM. Już w tym czasie zdobyłam gruntowną wiedzę teoretyczną oraz praktyczną na temat technik i metod stosowanych w biotechnologii roślin. Z Katedrą związałam również swoje dalsze plany naukowe w kontekście przygotowania pracy magisterskiej. Moja praca związana była z badaniami nad kulturami *in vitro* *Ruta graveolens* (ówczesne badania statutowe Zakładu Botaniki Farmaceutycznej). Tematem mojej pracy magisterskiej była: „Akumulacja kwasów fenolowych w kulturach *in vitro* *Ruta graveolens* L.” (Kuś 2008). W czasie obowiązkowego, 6-miesięcznego stażu w aptece, wciąż związana byłam naukowo z Zakładem Botaniki Farmaceutycznej UJ CM, albowiem moja praca wytypowana została do Wydziałowego Konkursu Prac Magisterskich, na którym zajęła II miejsce (2009 r.). Moja praca magisterska została również wytypowana do udziału w III edycji Ogólnopolskiego Konkursu na Najlepsze Prace Magisterskie z Zakresu Farmacji Przemysłowej organizowanym przez Fundację Hasco-Lek. Ponadto wyniki uzyskane w ramach pracy magisterskiej zostały opublikowane w czasopiśmie *Die Pharmazie* [180]. Najciekawszymi wynikami pracy była optymalizacja prowadzenia kultur *in vitro* *R. graveolens* na podłożach wg. Linsmaier i Skoog (LS) (Linsmaier and Skoog 1965) o różnej zawartości regulatorów wzrostu i rozwoju roślin (BA i NAA), w wyniku której uzyskałam wysokie zawartości kwasów fenolowych, kwasu: p-kumarowego, protokatechowego, wanilinowego i syryngowego (oznaczenia metodą LC-UV). Ponadto, dominujący pod względem ilościowym kwas protokatechowy (maks. 93,24 mg/100 g s.m.) został wyizolowany techniką chromatografii kolumnowej i preparatywnej TLC oraz oczyszczony metodą HP-TLC. Jego struktura została potwierdzona analizą spektralną <sup>1</sup>H-NMR i ESI-MS. Była to pierwsza izolacja tego związku z biomasy hodowanej *in vitro* [180].

W późniejszym okresie pracowałam na pełnym etacie w aptekach ogólnodostępnych zdobywając praktyczną wiedzę aptekarską (do 31.01.2010 r.), potem równoległe z pracą na uczelni; na pół etatu (od 1.07.2010 do 30.09.2011 r.).

W lutym 2010 roku zostałam zatrudniona na pełen etat na stanowisku asystenta w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej UJ CM. Początkowo moje zainteresowania naukowe skupiały się na kontynuowaniu prac związanych z badaniami nad akumulacją kwasów fenolowych, oraz dodatkowo furanokumaryn linearnych w kulturach *in vitro* *R. graveolens* oraz *R. graveolens* ssp. *divaricata*. W ramach prowadzonych doświadczeń testowałam wpływ warunków świetlnych (światło monochromatyczne; światło niebieskie, światło czerwone, daleka czerwień, promieniowanie UV-A, oraz brak światła) prowadzenia

kultur na akumulację badanych grup związków (współpraca z prof. dr hab. Anną Bach, Katedra Roślin Ozdobnych UR Kraków). Uzyskane maksymalne całkowite zawartości kwasów fenolowych i furanokumaryn linearnych (Ellnain-Wojtaszek and Zgorka 1999) wynosiły odpowiednio: 106,50 i 1276,74 mg/100 g s.m. (*R. graveolens*), oraz 106,97 i 262,54 mg/100 g s.m. (*R. graveolens* ssp. *divaricata*), oraz wzrastały od 2,6 do 6,7-krotnie w zależności od warunków świetlnych prowadzenia hodowli. W ramach badań wykazano stymulujący wpływ światła niebieskiego na endogenną produkcję kwasów fenolowych w kulturach *R. graveolens* oraz jej podgatunku. Akumulacji furanokumaryn w biomacie kultur *R. graveolens* sprzyjało światło niebieskie, a w *R. graveolens* ssp. *divaricata* – brak światła [16O].

Równoległe z pracami realizowanymi w ramach programu badań statutowych zaczęłam prowadzić badania własne. Jako mój obiekt badawczy wytypowane zostały następujące gatunki roślin leczniczych: *Schisandra chinensis*, *Aronia melanocarpa* oraz *Anethum graveolens*. Pierwszym etapem prac była inicjacja kultur *in vitro* tych gatunków, oraz wstępna optymalizacja prowadzenia hodowli dotycząca akumulacji kwasów fenolowych. Intensywne prace zaowocowały otwarciem przewodu doktorskiego w grudniu 2010 r. Obiektem mojej pracy doktorskiej zostały kultury *in vitro* *S. chinensis*. Na kulturach *in vitro* tego gatunku skupiła się moja szczególna aktywność naukowa. Prace przeprowadzone w ramach doktoratu szczegółowo przedstawiłam w części „Wprowadzenie w tematykę badawczą” w rozdziale 2.3 Autoreferatu [8O,13O,15O,17O,1M,11P]. Pracę doktorską pt. „Badania nad akumulacją wybranych grup biologicznie aktywnych metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.” obroniłam w lutym 2013 r. z wyróżnieniem (Szopa 2013). Ponadto moja praca doktorska została zgłoszona do konkursu o Nagrodę Ministra Zdrowia za osiągnięcia będące podstawą nadania stopnia naukowego doktora, doktora nauk farmaceutycznych (2014 r.).

W ramach prac nad *S. chinensis* realizowanych w ramach współpracy z dr Radosławem Ekiertem (Katedra Chemii Nieorganicznej UJ CM) dokonano oznaczeń lignanów (schizandryny i gomisy A) w ekstraktach z biomasy kultur *in vitro*, owoców rośliny macierzystej, jak również w wybranych preparatach komercyjnych metodą HP-TLC z detekcją densytometryczną. W ramach pracy została również przeprowadzona walidacja opracowanej metody [12O].

Niezależnie od prac związanych z realizacją pracy doktorskiej, w ramach mojej aktywności naukowej prowadziłam równoległe badania nad kulturami *in vitro* *A. melanocarpa* oraz *A. graveolens*.

Szczególną uwagę poświęciłam badaniom z kulturami kalusowymi oraz pędowymi *A. melanocarpa*. Badania obejmowały dwa kierunki biotechnologii roślin – endogenną akumulację metabolitów wtórnych [14O] oraz procesy biotransformacyjne [11O]. W ramach pracy [14O] udowodniłam wpływ zawartości regulatorów wzrostu i rozwoju roślin w podłożu hodowlanym LS na endogenną akumulację kwasów fenolowych w kulturach kalusowych i pędowych *A. melanocarpa*. Maksymalne całkowite zawartości związków w badanych ekstraktach metanolowych z biomasy kultur *in vitro* wzrastały odpowiednio: od 103,05 do 150,95 mg/100 g s.m. oraz od 50,23 do 81,56 mg/100 g s.m., i były wyższe niż w ekstraktach z owoców rośliny macierzystej (32,43 mg/100 g s.m.) [14O].

W ramach badań zaprezentowanych w publikacji [11O] udowodniono po raz pierwszy możliwość endogennej biotransformacji hydrochinonu do jego  $\beta$ -D-glukozydu – arbutyny w kulturach pędowych *A. melanocarpa*. Na uwagę zasługuje wysoka wydajność (73,80%) przeprowadzonego procesu, oraz ilość uzyskanej arbutyny (8,27 g/100 g s.m.) [11O].

W okresie pracy naukowej przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora byłam kierownikiem programu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Dotacja celowa dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich do 35 roku życia” pt. „Akumulacja biologicznie aktywnych związków w kulturach *in vitro* wybranych gatunków roślin leczniczych” (2011-2013 r.), oraz współwykonawcą badań statutowych pt. „Badania nad możliwościami biotechnologicznego pozyskiwania terapeutycznie ważnych związków z roślinnych kultur *in vitro*” (2010-2011 r.). Swoją wiedzę biotechnologiczną oraz fitochemiczną doskonaliłam przez udział w licznych zjazdach naukowych, szkoleniach oraz stażach naukowych. W okresie przed obroną doktoratu wyniki swoich badań zaprezentowałam w formie 14 komunikatów na zjazdach międzynarodowych w kraju (Gdańsk, Lublin) i zagranicznych (Dortmund, Düsseldorf, Graz) oraz 5 komunikatów na zjazdach krajowych (Gdańsk, Łódź, Lublin).

W tym czasie pod opieką prof. dr hab. Haliny Ekiert poszerzałam swoją wiedzę i warsztat naukowo-badawczy przygotowując publikacje pogładowe [11P, 12P]. Ponadto wrażenia ze swojej pierwszej konferencji zagranicznej – „BioTrends 2010, New Biotrends in green chemistry” w Dortmundzie, wraz z koleżanką z pracy (dr Inga Kwiecień), opisałam w formie artykułu - sprawozdania na łamach Farmacji Polskiej [13P].

W okresie 2012-2013 r. dwukrotnie zostałam wyróżniona nagrodą Dziekana Wydziału Farmaceutycznego za osiągnięcia naukowe.

Poza aktywnością naukową, jako asystent, aktywnie uczestniczyłam w działalności dydaktycznej (w tym w opiece nad pracami magisterskimi), Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej UJ CM.

### 3.2. Aktywność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych, moja działalność naukowa związana była przede wszystkim z badaniami z zakresu biotechnologii roślin leczniczych.

Moim obiektem badań były kultury *in vitro* następujących gatunków: *Aronia melanocarpa*, *Aronia arbutifolia*, *Aronia* × *prunifolia*, *Anethum graveolens*, *Cistus* × *incanus*, *Verbena officinalis*, *Punica granatum*, *P. granatum* var. *nana*, *Sideritis hyssopifolia*, *Citrus limon*, *Nasturtium officinale* oraz *Salvia hispanica*.

Prace badawcze były realizowane w ramach statutowych oraz własnych programów badawczych. W latach 2014-2016 byłam kierownikiem projektu „Roślinne kultury *in vitro* źródłem farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych” (K/DSC/001950). Ponadto byłam współwykonawcą badań statutowych „Roślinne kultury *in vitro*, owocniki grzybów wielkoowocowych i kultury mycelialne jako źródło pozyskiwania ważnych terapeutycznie związków fenolowych” (kierownik: prof. dr hab. Halina Ekiert; K/ZDS/003312; od 2012 do 2014 roku), oraz „Kultury *in vitro* wybranych gatunków roślin leczniczych jako potencjalne, biotechnologiczne źródło pozyskiwania terapeutycznie ważnych związków na drodze endogennej biosyntezy i biotransformacji egzogennych substratów” (kierownik: prof. dr hab. Halina Ekiert; K/ZDS/005614; od 2015 do 2017 roku). Jako promotor pomocniczy nadzoruję i współwykonuję zadania badawcze programu „Kultury *in vitro* wybranych gatunków roślin leczniczych jako bogate, alternatywne źródło pozyskiwania związków bioaktywnych wykorzystywanych w terapii i kosmetyce” (kierownik: mgr Paweł Kubica; K/DSC/003506; od 2016 do 2018 roku).

W ostatnim czasie szczególnie ważnym obiektem moich badań, zarówno biotechnologicznych, jak i fitochemicznych są inne, egzotyczne, endemiczne i mało poznane gatunki z rodzaju *Schisandra*: *S. henryi*, *S. sphenanthera* oraz *S. rubriflora*. Od 2017 roku kieruję projektem „Kultury *in vitro* gatunków rodzaju *Schisandra* jako potencjalne źródło farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych” (K/DSC/004297). W tym samym roku mój projekt badawczy pt. „Badania fitochemiczne, biotechnologiczne oraz ocena aktywności biologicznej gatunku *Schisandra rubriflora* - cytryniec czerwonokwiatowy”, zdobył uznanie i finansowanie w ramach programu Sonata przyznawanego przez Narodowe Centrum Nauki (2016/23/D/NZ7/01316; 4.08.2017 - 3.08.2020 r.).

Szczególnie ważnym z farmaceutycznego punktu widzenia oraz aplikacyjności badań, kierunkiem badawczym biotechnologii roślin, jest endogenna akumulacja metabolitów wtórnych, oraz procesy biotransformacyjne. Moje prace badawcze dotyczą tej tematyki.

Techniki biotechnologii roślin są z leczniczego punktu widzenia niezwykle ważną alternatywą dla pozyskiwania roślinnych, biologicznie aktywnych związków. Produkcja tych związków w kulturach *in vitro* odbywa się niezależnie od warunków edaficznych, klimatycznych, oraz co jest niezwykle ważne, może być kontrolowana oraz efektywnie stymulowana.

Opublikowany, oraz prezentowany na licznych konferencjach tematycznych, cykl prac badawczych nad gatunkami *Aronia*: *A. melanocarpa*, *A. arbutifolia* i *A.* × *prunifolia* przedstawia drogę optymalizacji

procesu biotechnologicznego od inicjacji kultur *in vitro* po zastosowanie różnych technik zwiększania produkcji metabolitów wtórnych, oraz biosyntezę arbutyny na drodze biotransformacji. Badania nad *A. melanocarpa* rozpoczęłam przed uzyskaniem stopnia doktora, potem zainicjowałam dodatkowo kultury *in vitro* *A. arbutifolia* i *A. × prunifolia*. Obrany temat badawczy kontynuuję do chwili obecnej. Z zakresu tych badań opublikowałam prace oryginalne opisujące optymalizację produkcji kwasów fenolowych (w tym depsydów) i flawonoidów w agarowych kulturach pędowych, oraz kalusowych gatunku *A. melanocarpa*, oraz *A. arbutifolia* i *A. × prunifolia*. Optymalizacja dotyczyła doboru jakościowego oraz ilościowego regulatorów wzrostu i rozwoju, roślin oraz czasu trwania cyklu hodowlanego.

W pracy [100] przeprowadzono po raz pierwszy szeroką optymalizację zawartości regulatorów wzrostu i rozwoju roślin (BA i NAA) w agarowym podłożu hodowlanym wg. Murashige i Skoog (MS) w celu uzyskania wysokiej produkcji kwasów fenolowych w kulturach kalusowych i pędowych *A. melanocarpa*. Maksymalne całkowite zawartości związków w badanych ekstraktach z biomasy kultur *in vitro* zmieniały się odpowiednio: od 93,52 do 217,00 mg/100 g s.m. oraz od 47,11 to 83,83 mg/100 g s.m., i były wyższe niż ich w ekstraktach z owoców rośliny macierzystej (32,43 mg/100 g s.m.). Dominującymi ilościowo, oznaczonymi metodą LC-DAD (Ellnain-Wojtaszek and Zgorka 1999), kwasami fenolowymi były: kwas salicylowy (maks. 91,86 mg/100 g s.m.), p-kumarowy (maks. 62,39 mg/100 g s.m.) i p-hydroksybenzoesowy (maks. 50,66 mg/100 g s.m.) [100]. Wyniki przedstawione w pracy [100] korelują z wynikami przedstawionymi w pracy [140]. Porównując zawartości metabolitów wtórnych uzyskane na różnych wariantach podłoża LS [140] oraz podłoża MS [100], jako podłoże optymalne dla kultur *Aronia* sp., na którym zawartości badanych kwasów fenolowych były wyższe, wytypowano podłoże MS.

W ramach prac nad optymalizacją kalusowych i pędowych kultur *in vitro* *A. arbutifolia* i *A. × prunifolia* przetestowano dziesięć wariantów agarowego podłoża MS różniących się zawartością regulatorów wzrostu i rozwoju roślin (BA i NAA; w zakresie 0,1–3 mg/l). W metanolowych ekstraktach ze zliofilizowanej biomasy, metodą LC-DAD (Ellnain-Wojtaszek and Zgorka 1999), oznaczono sześć spośród dwudziestu analizowanych kwasów fenolowych. Maksymalne całkowite zawartości kwasów fenolowych wynosiły odpowiednio około 200 i 600 mg/100 g s.m.. Dominującymi ilościowo były depsydy, kwas: chlorogenowy, rozmarynowy i neochlorogenowy, których maksymalne ilości w kulturach *A. arbutifolia* wynosiły odpowiednio - 91,94, 77,03, 32,57 mg/100 g s.m., a w kulturach *A. × prunifolia* - 131,82, 206,62 i 257,39 mg/100 g s.m. [20].

W ramach wyżej opisanych prac po raz pierwszy przeprowadzono doświadczenia biotechnologiczne z kulturami *in vitro* *A. melanocarpa*, *A. arbutifolia* i *A. × prunifolia* - hybrydzie tych dwóch gatunków. Ponadto, uzyskane w ekstraktach z kultur pędowych *A. × prunifolia*, wysokie zawartości cennych z terapeutycznego punktu widzenia depsydów, mają charakter potencjalnie aplikacyjny [20,100].

Kolejnym etapem prac były doświadczenia na wytrząsanych kulturach pędowych *A. arbutifolia* i *A. × prunifolia*. W tym typie kultur przeprowadziłam również proces optymalizacji produkcji metabolitów wtórnych, oraz udowodniłam możliwość przeprowadzania przez komórki ww. roślin w warunkach *in vitro* procesu biotransformacji egzogenicznie podanych substratów: hydrochinonu i kwasu 4-hydroksybenzoesowego



w arbutynę [2E] (praca po pozytywnej recenzji). Wyniki uzyskane w toku prowadzenia tych doświadczeń wykazały, duży biosyntetyczny potencjał kultur. W ramach pracy metodą LC-DAD oznaczono zawartość kwasów fenolowych oraz flawonoidów w ekstraktach z biomasy oraz z podłoża hodowlanych. Stwierdzono wpływ testowanych wariantów podłoża MS różniących się zawartością regulatorów wzrostu i rozwoju roślin na zawartość metabolitów w biomacie. Maksymalna całkowita zawartość kwasów fenolowych i flawonoidów w kulturach *A. arbutifolia* i *A. × prunifolia* wynosiła odpowiednio 360,80 i 65,26 mg/100 g s.m., oraz 659,51 i 78,34 mg/100 g s.m.. Dominującymi ilościowo związkami były depsydy: kwas chlorogenowy i kwas rozmarynowy, oraz kwercetyna (odpowiednio: 175,94, 147,98 i 41,14 mg/100 g s.m., oraz 260,34, 225,26 and 78,34 mg/100 g s.m.). Maksymalna zawartość arbutyny uzyskana w wyniku biotransformacji hydrochinonu wynosiła odpowiednio 83,55 and 73,62 mg/g s.m.. Praca po raz pierwszy przedstawiła kompleksowe badania nad akumulacją kwasów fenolowych, flawonoidów oraz wykazała możliwość przeprowadzania procesów biotransformacyjnych w komórkach pędowych kultur wytrząsanych *A. arbutifolia* i *A. × prunifolia*.

Dodatkowo interesującym aspektem prac nad badaniem czynników wpływających na przyrosty biomasy oraz akumulację związków czynnych w kulturach *in vitro* *Aronia* sp. były doświadczenia z zakresu wpływu warunków świetlnych (hodowle prowadzone były w laboratorium biotechnologii Katedry Roślin Ozdobnych w ramach współpracy z dr hab. Bożeną Pawłowską). Testowałam wpływ światła monochromatycznego: światło niebieskie, światło czerwone, daleka czerwień, promieniowanie UV-A, oraz braku światła na akumulację wymienionych grup związków. Empirycznie po raz pierwszy udowodniłam stymulujący wpływ światła niebieskiego na wzrost i produkcję kwasów fenolowych oraz flawonoidów w agarowych kulturach pędowych *A. melanocarpa*, *A. arbutifolia* i *A. × prunifolia* [30]. W wyniku przeprowadzonych prac uzyskano szczególnie wysokie zawartości depsydów, kwasów: chlorogenowego, rozmarynowego i neochlorogenowego (maks. odpowiednio: 418,83, 644,68, 548,86 mg/100 g s.m.) oraz kwercetyny (maks. 165,88 mg/100 g s.m.) w ekstraktach z biomasy kultur *A. × prunifolia* [30]. Uzyskane wyniki mają charakter poznawczy i aplikacyjny.

W zakresie prac nad gatunkami *A. melanocarpa* i *A. arbutifolia* oraz hybrydą - *A. × prunifolia* przeprowadziłam również szerokie, porównawcze badania fitochemiczne [60]. Badania obejmowały analizę kwasów fenolowych, flawonoidów i antocyjanów metodami chromatograficznymi: LC-DAD i LC-DAD-ESI-MS (współpraca z prof. dr hab. Adamem Bucieńskim, dr Urszulą Marzec-Wróblewską, mgr Anną Badurą z Katedry i Zakładu Biofarmacji *Collegium Medicum* UMK w Bydgoszczy, oraz dr Adamem Kokotkiewiczem, prof. dr hab. Marią Łuczkiwicz z Katedry Farmakognozji GUMed), ponadto oznaczanie całkowitej zawartości polifenoli metodą spektrofotometryczną z odczynnikami Folina-Ciocalteu'a, oraz badania biologiczne - analiza aktywności antyoksydacyjnej metodami FRAP i DPPH (współpraca z dr hab. Mirosławem Krośniakiem, mgr Agnieszką Wojtanowską-Krośniak i dr hab. Pawłem Zagrodzkiem z Zakładu Bromatologii UJ CM). Analizą były poddane ekstrakty z owoców oraz liści zbieranych w różnych okresach wegetacyjnych *A. melanocarpa*, *A. arbutifolia* i *A. × prunifolia* w Arboretum SGGW w Rogowie (współpraca z dr Piotrem Banaszczakiem z Leśnego Zakładu Doświadczalnego Arboretum SGGW

w Rogowie). Owoce badanych aronii zawierały duże ilości 3-O-galaktozydu cyjanidyny (4,31 - 323,17 mg/100 g s.m.) i depsydów - kwasu chlorogenowego (16,27 - 273,45 mg/100 g s.m.) i kwasu neochlorogenowego (92,26 - 212,56 mg/100 g s.m.). Ekstrakty z liści zawierały duże ilości flawonoli: kwercetyny, kwercytriny i rutyny (62,14 - 366,98 mg/100 g s.m.) oraz depsydów: kwasu chlorogenowego, kwasu neochlorogenowego i kwasu rozmarynowowego (maks. odpowiednio: 724,22, 482,70, 154,66 mg/100 g s.m.). Liście *A. arbutifolia* charakteryzowały się najwyższą całkowitą zawartością polifenoli, wyrażoną jako ekwiwalent kwasu galusowego (918,22 gal. ac. Eq./100 g s.m.) i wykazywały najwyższą aktywność przeciwutleniającą w testach DPPH i FRAP. Wyniki wykazały, że owoce *A. arbutifolia* i *A. × prunifolia* są bogatym źródłem antyoksydantów i mogą być stosowane jako surowce roślinne, alternatywnie do owoców *A. melanocarpa*. Liście badanych gatunków mają potencjalne znaczenie terapeutyczne i dietetyczne ze względu na wysoką zawartość flawonoli i depsydów. Praca jest pierwszą pracą fitochemiczną porównującą zawartość wybranych związków polifenolowych oraz potencjał antyoksydacyjny owoców oraz liści: *A. melanocarpa*, *A. arbutifolia* i *A. × prunifolia* [60].

W ramach szeroko zakrojonych prac biotechnologicznych i fitochemicznych nad rodzajem *Aronia* opublikowana została również praca pogładowa, w dużej mierze oparta na wynikach badań własnych [2P]. W pracy opisane zostały najnowsze badania naukowe nad gatunkiem *A. melanocarpa*, oraz zostały scharakteryzowane mało znane w Polsce rośliny: *A. arbutifolia* i *A. × prunifolia*. Publikacja powinna przyczynić się do promocji prozdrowotnego działania badanych aronii w środowisku farmaceutycznym. Ponadto praca zdobyła uznanie wśród przetwórców aronii w Polsce (współpraca z Krajowym Zrzeszeniem Plantatorów Aronii „*Aronia Polska*”).

W ramach prac nad optymalizacją produkcji metabolitów wtórnych, ze szczególnym uwzględnieniem kwasów fenolowych oraz grupy związków – furanokumaryn linearnych, skupiłam się w badaniach z założonymi kulturami kalusowymi *Anethum graveolens* [70]. W ramach prac biotechnologicznych przetestowałam wpływ zawartości regulatorów wzrostu i rozwoju roślin i podstawowy skład podłoża hodowlanego (LS i MS) na endogenną akumulację kwasów fenolowych oraz furanokumaryn w kulturach kalusowych *A. graveolens*. Najwyższe zawartości (LC-DAD) badanych metabolitów uzyskano na wariacie podłoża MS zawierającym 0,5 mg/l BA i 2 mg/l NAA. Maksymalna całkowita zawartość kwasów fenolowych wynosiła 99,66 mg/100 g s.m., a furanokumaryn 24,26 mg/100 g s.m.. Dominującymi ilościowo metabolitami były: kwas salicylowy (maks. 57,88 mg/100 g s.m.), kwas 4-hydroksybenzoesowy (maks. 36,27 mg/100 g s.m.), oraz bergapten (maks. 15,01 mg/100 g s.m.) i marmezyna (maks. 8,12 mg/100 g s.m.). Całkowita zawartość kwasów fenolowych była porównywalna, a furanokumaryn 1,8-krotnie wyższa niż w ekstraktach z owoców roślin macierzystych analizowanych w celach porównawczych [60].

Z Doktorantem Katedry Botaniki Farmaceutycznej UJ CM - mgr. Pawłem Kubicą, współpracuję od 2014 r. (opiekun pracy magisterskiej) w zakresie realizowanych przez Niego tematów badawczych. Od 30.01.2017 roku jestem promotorem pomocniczym w Jego przewodzie doktorskim. Rezultatem wspólnych prac eksperymentalnych jest szereg doniesień zjazdowych oraz publikacji oryginalnych

i poglądowych. Naszym obiektem badawczym są kultury *in vitro* gatunków: *C. × incanus*, *P. granatum*, *P. granatum var nana*, oraz szczególnie *V. officinalis* - jako główny obiekt pracy doktorskiej.

W ramach dotychczas opublikowanych prac nad gatunkiem *C. × incanus*, przeprowadzona została optymalizacja prowadzenia hodowli dla kultur pędowych - agarowych oraz wytrząsanych, w zakresie produkcji kwasów fenolowych oraz katechiny i jej pochodnych [4O]. Uzyskane wyniki zawartości głównych metabolitów: katechiny, galusanu epikatechiny, kwercytriny i kwasu galusowego w ekstraktach z kultur agarowych hodowanych na podłożu MS zawierającym 3 mg/l BA i 1 mg/l NAA były odpowiednio 24,6-, 6,8-, 2,8- i 33,6-razy wyższe niż w ekstraktach z ziela roślin rosnących *in vivo* [4O].

W ramach prac nad *C. × incanus* powstała również praca poglądowa (współpraca z dr Radosławem Ekiertem z KZZ „Herbapol” w Krakowie) opisująca badania fitochemiczne, biologiczne i biotechnologiczne tego gatunku i innych gatunków rodzaju *Cistus* [6P].

W kulturach kalusowych *V. officinalis* zbadana została produkcja kwasów fenolowych, oraz metabolitów specyficznych dla tego gatunku – werbaskozydu i izowerbaskozydu w ekstraktach z biomasy hodowanej na 12 wariantach podłoża MS, zawierających różne regulatory wzrostu i rozwoju roślin (BA, Kin, NAA, IBA; od 0,5 do 3,0 mg/l) w warunkach ciągłego sztucznego oświetlenia oraz w ciemności [5O]. Oznaczenia przeprowadzone w ekstraktach metanolowych ze zliofilizowanej biomasy kultur, metodą LC-DAD, wykazały ekstremalnie wysoką produkcję werbaskozydu (maks. 2454,12 mg/100 g s.m.); 3,3-krotnie wyższą niż jego zawartość w ekstraktach z ziela roślin macierzystych. Analiza kwasów fenolowych wykazała wysoką ich zawartość w ekstraktach z biomasy poddawanych hydrolizie kwaśnej (maks. całkowita zawartość 141,05 mg/100 g s.m.).

Obecnie w recenzji jest praca oryginalna [5E] opisująca wpływ warunków świetlnych - światła diod elektroluminescencyjnych (LED): czerwonego, niebieskiego, czerwonego z niebieskim (70/30%), na endogenną akumulację: glikozydów fenylopropanoidowych i kwasów fenolowych, oraz zawartość barwników fotosyntetycznych (chlorofile a, b i karotenoidy) w biomacie kultur kalusowych *V. officinalis* (współpraca z dr hab. Bożeną Pawłowską i mgr Barbarą Prokopiuk z Katedry Roślin Ozdobnych UR Kraków).

Ponadto, powstała praca poglądowa obejmująca przegląd badań fitochemicznych, biologicznych i biotechnologicznych gatunku *V. officinalis* [8E] (praca w recenzji).

Od 2016 r. współpracuję z mgr Martą Klimek-Szczykutowicz, moją była Magistrantką i podopieczną w ramach pracy doktorskiej. Realizujemy cykl prac biotechnologicznych nad zainicjowanymi kulturami *in vitro* *S. hyssopifolia*, *C. limon*, oraz *N. officinale*. Prace doświadczalne dotyczą optymalizacji warunków endogennej akumulacji metabolitów wtórnych ze szczególnym uwzględnieniem ich przydatności w farmacji i kosmetologii. W przypadku kultur *in vitro* *S. hyssopifolia* i *C. limon* są one skoncentrowane na akumulacji kwasów fenolowych i flawonoidów. Prace badawcze nad kulturami pędowymi *N. officinale* są rozszerzone o specyficzne dla tego gatunku glukozydolaty oraz doświadczenia z zakresu bioakumulacji pierwiastków prozdrowotnych. Prace dotyczące akumulacji metabolitów wtórnych w biomacie kultur *in vitro* *N. officinalis*

mają charakter nowatorski. Wyniki prac doświadczalnych są na bieżąco prezentowane na zjazdach tematycznych, nie zostały jeszcze opublikowane.

W ramach współpracy z Doktorantką powstały prace poglądowe dotyczące gatunków: *C. limon* [3P] oraz *N. officinale* [7E] (praca anglojęzyczna po pozytywnej recenzji). Ponadto Doktoranta jest współautorką prac dotyczących gatunku *S. chinensis* i *S. chinensis* cv. Sadova [8H] i [5P].

W ramach prac nad kulturami pędowymi *Salvia hispanica*, prowadzonych wspólnie ze Studentką Katarzyną Koc, ze Studenckiego Koła Naukowego działającego przy Katedrze Botaniki Farmaceutycznej UJ CM, wykonana została wstępna optymalizacja warunków hodowli w oparciu o dobór regulatorów wzrostu i rozwoju roślin. Wyniki prac doświadczalnych zaprezentowane były na konferencjach naukowych. Ponadto Studentka jest współautorem pracy poglądowej o charakterze popularnonaukowym [1P].

W ostatnim czasie ukazała się praca zrealizowana w ramach mojej współpracy z prof. Hosamem Elansary z Floriculture, Ornamental Horticulture and Garden Design Department Faculty of Agriculture Alexandria University (Egipt) [1O]. W pracy odpowiedzialna byłam za realizację analiz zawartości metodą LC-DAD: kwasów fenolowych, flawonoidów, kumaryn oraz katechin, w ekstraktach z wybranych, endemicznych roślin stosowanych w tradycyjnym leczeniu w Aleksandrii (Egipt) [1O].

Druga wspólna praca [4E] obecnie jest w recenzji, dotyczy analiz fitochemicznych (kwasy fenolowe i związki katechinowe), oraz badań aktywności biologicznej, ekstraktów z kory trzech gatunków rodzaju *Quercus*: *Q. acutissima*, *Q. macrocarpa* i *Q. robur*.

W ramach mojej dodatkowej aktywności naukowej, w ramach współpracy z dr hab. Bożeną Muszyńską i dr Katarzyną Sułkowską-Zają z mojej macierzystej Katedry oraz dr Anną Maślanką i prof. dr hab. Włodzimierzem Opoką z Katedry Chemii Nieorganicznej UJ CM uczestniczyłam w opracowaniu oraz walidacji metody TLC z detekcją densytometryczną oznaczania związków indolowych: 5-metylotryptaminy, L-tryptofanu, 5-hydriksy-L-tryptofanu i melatoniny w ekstraktach z *Allium sativum* [9O].

W ramach działalności popularnonaukowej po obronie doktoratu uczestniczyłam również w powstawaniu pracy poglądowej dotyczącej możliwości produkcji kwasu rozmarynowego w roślinnych kulturach *in vitro* [7P], oraz pracy popularno-naukowej dotyczącej Nagrody Nobla przyznanej za badania nad artemisyną w 2015 r [9P]. Ponadto jestem współautorem prac popularyzujących działalność badawczo-naukową Katedry Botaniki Farmaceutycznej UJ CM [8P, 10P].

W ostatnim czasie moje prace badawcze koncentrują się na badaniach fitochemicznych i biotechnologicznym rzadkich, występujących endemicznie w różnych rejonach Chin, gatunków Schisandra: *S. henryi*, *S. sphenanthera* i *S. rubriflora*. W ramach prac biotechnologicznych z powodzeniem udało mi się zainicjować kultury *in vitro* tych gatunków. Przeprowadziłam również wstępną optymalizację warunków ich hodowli. Realizacja zadań projektów: NCN - Sonata i Programu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego - „Dotacja celowa dla młodych naukowców oraz uczestników studiów

doktoranckich do 35 roku życia” pt. „Kultury *in vitro* gatunków rodzaju *Schisandra* jako potencjalne źródło farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych”, będzie priorytetem mojej aktywności naukowej na najbliższe lata. W chwili obecnej w recenzji jest praca pogładowa opisująca stan wiedzy na temat wybranych gatunków *Schisandra* [6E].

### 3.3. Współpraca z jednostkami naukowymi w kraju i za granicą

#### a) Współpraca z jednostkami z ośrodków zagranicznych

- **Floriculture, Ornamental Horticulture and Garden Design Department, Faculty of Agriculture, Alexandria University, Alexandria, Egipt** (prof. Hosam O. Elansary)
  - Badania zawartości kwasów fenolowych, flawonoidów, kumaryn oraz katechin metodą DAD-LC w ramach projektu prof. Hosama O. Elansarego “Natural products in medicinal plants and their bioactivities as antioxidant, antibacterial, anticancer and antifungal agents”. Wynikiem dotychczasowej współpracy publikacje oryginalne; jedna opublikowana [10] i w druga recenzji [4E].
- **Institut für Pharmazeutische Biologie, Technische Universität Braunschweig, Niemcy** (prof. Ludger Beerhues, dr Benye Liu) (współpraca nawiązana przez prof. dr hab. Halinę Ekiert w 2008 roku)
  - Badania nad szlakami biosyntetycznymi lignanów dibenzocyklooktadienowych oraz szkolenia z zakresu technik biologii molekularnej.
  - W ramach współpracy trójrotnie odbywałam staże naukowo-badawcze w ww. jednostce:
    - I) od 12.09.16. do 16.09.16. – staż z zakresu biologii molekularnej „Aspekty biosyntetyczne benzoilopochodnych lignanów typu *Schisandra*”,
    - II) od 15.05.17. do 19.05.17. – staż z zakresu biologii molekularnej oraz technik biochemicznych, ze szczególnym uwzględnieniem szlaków biogenetycznych lignanów dibenzocyklooktadienowych (program ERASMUS+, *Mobliwość z krajami programu (KA103) wyjazdy pracowników uczelni w celach szkoleniowych*),
    - III) od 15.09.17. do 15.10.17. - stypendium DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst) Research Stays for University Academics and Scientists – staż z zakresu biologii molekularnej oraz technik enzymatycznych i biochemicznych ukierunkowanych na poznanie szlaków biogenetycznych lignanów dibenzocyklooktadienowych.
  - z współpracą wiążą się perspektywy wspólnych publikacji w najbliższej przyszłości.
- **Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, University of Messina, Włochy** (dr Natalizia Miceli) (współpraca nawiązana przez prof. dr hab. Halinę Ekiert w 2017 roku)

- Współpraca dotyczy realizacji wspólnych projektów badawczych. Obecnie trwają prace nad oznaczeniami aktywności antyoksydacyjnej, antyproliferacyjnej, przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej w ww. Jednostce na ekstraktach z gatunków: *V. officinalis*, oraz *S. chinensis* i *S. rubriflora*. W ramach współpracy planowana jest wymiana osobowa między Jednostkami i wspólne publikacje oryginalne.

## b) Współpraca z jednostkami z ośrodków krajowych

*Ośrodki w Polsce:*

- **Gdański Uniwersytet Medyczny, Katedra i Zakład Farmakognozji, Gdańsk** (prof. dr hab. Maria Łuczkiwicz, dr Adam Kokotkiewicz, mgr Agata Król) (współpraca nawiązana przez prof. dr hab. Halinę Ekiert w 2013 roku)
  - W ramach współpracy naukowej w ww. jednostce odbyłam dwa staże naukowe: od 23.06.14. do 27.06.14. – techniki prowadzenia roślinnych kultur *in vitro* o charakterze wielkolaboratoryjnym, oraz od 27.06.13. do 28.06.13. – techniki prowadzenia eksperymentów biotechnologicznych w instalacjach wielkoskalowych (bioreaktorach), oraz techniki prowadzenia kultur korzeni transformowanych. Współpraca z ww. jednostką obejmuje przede wszystkim wspólną realizację projektów badawczych ze szczególnym uwzględnieniem badań nad kulturami *in vitro* gatunków rodzaju Schisandra. Jej owocami są publikacje oryginalne [1H,2H,3H,4H,7H,6O].
- **Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Biofarmacji, Bydgoszcz** (prof. dr hab. Adam Buciński, dr Urszula Marzec-Wróblewska, mgr Anna Badura) (współpraca nawiązana przez prof. dr hab. Marię Łuczkiwicz)
  - Współpraca obejmuje wykonywanie oznaczeń chromatograficznych m.in. lignanów i antocyjanów, aparaturą LC-DAD-ESI-MS w ww. jednostce. Jej owocami są publikacje oryginalne [7H,6O].
- **Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Leśny Zakład Doświadczalny, Arboretum, ul. Leśna 1, 95-063 Rogów** (mgr inż. Piotr Banaszczyk)
  - Współpraca obejmuje wspólną realizację projektów badawczych. Z ww. Arboretum pozyskany był materiał roślinny do inicjacji kultur *in vitro* Aronia sp. Wynikiem współpracy są wspólne doniesienia zjazdowe oraz publikacja oryginalna [6O].

- **Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin, Poznań** (dr Małgorzata Kikowska, dr. hab. Barbara Thiem, prof. UM) (współpraca nawiązana przez prof. dr hab. Halinę Ekiert w 2017 roku)
  - Współpraca obejmuje realizację projektu badawczego dotyczącego analizy zawartości polifenoli w kulturach *in vitro* *Eryngium alpinum* (publikacja w przygotowaniu). Z zainicjowaną współpracą wiążą się perspektywy wspólnych publikacji.
  
- **Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Katedra Biotechnologii, Pracownia Badania Związków Biologicznie Czynnych, Gdańsk** (dr hab. Aleksandra Królicka, prof. UG) (współpraca nawiązana przez prof. dr hab. Halinę Ekiert w 2007 roku)
  - W ww. jednostce od 24.06.15. do 26.06.15. odbyłam szkolenie z zakresu technik inżynierii genetycznej w roślinnych kulturach *in vitro*. Nawiązałam również współpracę naukową z perspektywą wspólnej realizacji projektów badawczych dotyczących m.in. transformacji genetycznej *S. chinensis*.
  
- **Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Collegium Pharmaceuticum, Zakład Chemii Analitycznej, Lublin** (dr Eliza Blicharska)
  - Współpraca dotyczy wspólnej realizacji projektu nad możliwościami bioakumulacji pierwiastków w kulturach *in vitro*. Obecnie realizowany projekt dotyczy akumulacji pierwiastków prozdrowotnych w biomase kultur pędowych *Nasturtium officinale*. Z zainicjowaną współpracą wiążą się perspektywy wspólnych publikacji.
  
- **Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Żywności, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności** (prof. dr hab. Małgorzata Gniewosz, dr inż. Alicja Synowiec)
  - Współpraca dotyczy przeprowadzania ww. Jednostce oznaczeń aktywności przeciwbakteryjnej. Z zainicjowaną współpracą wiążą się perspektywy wspólnych publikacji.

*Ośrodki w Krakowie:*

- **Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kollątaja w Krakowie, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Katedra Sadownictwa i Pszczelnictwa** (dr hab. Ewa Dziedzic, mgr Izabela Sachryń)
  - W ramach współpracy realizuję oznaczenia chromatograficzne związków polifenolowych w ekstraktach z różnego materiału roślinnego oraz biomasy kultur *in vitro*. Obecnie realizowany projekt badawczy dotyczy gatunku *Chaenomeles japonica* (publikacja w przygotowaniu)

- **Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kollątaja w Krakowie, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Katedra Ogrodnictwa** (prof. dr hab. Anna Bach, dr hab. Bożena Pawłowska, mgr Barbara Prokopiuk) (współpraca nawiązana przez prof. dr hab. Halinę Ekiert w 2011 roku)
  - Współpraca dotyczy możliwości korzystania z pracowni biotechnologii w ww. Jednostce – możliwość przeprowadzania doświadczeń z zakresu wpływu światła monochromatycznego na akumulację metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* [3H, 3O, 16O].
  
- **Zakład Cytologii i Embriologii, Instytut Botaniki, Uniwersytet Jagielloński** (dr hab. Halina Ślesak, mgr Katarzyna Dziedzic) (współpraca nawiązana przez prof. dr hab. Halinę Ekiert w 2017 roku)
  - W ramach współpracy realizuję oznaczenia chromatograficzne związków polifenolowych w ekstraktach z różnego materiału roślinnego oraz biomasy kultur *in vitro*. Obecnie realizowany projekt badawczy dotyczy gatunku *Rumex thyrsiflorus* (publikacja w przygotowaniu).
  
- **Instytut Fizjologii Roślin Polskiej Akademii Nauk im. F. Górskiego w Krakowie, Zakład Biologii Rozwoju**, (dr Michał Dziurka, prof. dr. hab. Jadwiga Biesaga-Kościelniak)
  - W ramach współpracy z ww. jednostką odbyłam szkolenie z instrumentalnych technik analitycznych oraz metod badania potencjału antyoksydacyjnego metodami CUPRAC i QUENCHER-CUPRAC (od 3.10.16. do 31.10.16.). Ponadto nawiązałam współpracę w zakresie wspólnej realizacji projektów badawczych. Wspólna publikacja oryginalna dotycząca oznaczania potencjału antyoksydacyjnego jest w recenzji [1E]. Obecnie dr Michał Dziurka jest współwykonawcą w moim projekcie NCN – Sonata, dotyczącym gatunku *Schisandra rubriflora*. Z zainicjowaną współpracą wiążą się perspektywy kolejnych wspólnych publikacji.
  
- **Polska Akademia Nauk, Instytut Farmakologii, Zakład Fitochemii** (dr hab. Klaudia Michalska, prof. dr hab. Wanda Kisiel) (współpraca nawiązana przez prof. dr hab. Halinę Ekiert w 2008 roku)
  - Współpraca dotyczyła pomocy w interpretacji wyników analiz spektralnych EI-MS i <sup>1</sup>H NMR. Jej owocem jest m.in. publikacja oryginalna [8O].
  
- c) **Współpraca z Jednostkami w obrębie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum**
  - **Zakład Chemii Nieorganicznej** (dr Anna Maślanka, dr Radosław Ekiert, prof. dr hab. Jan Krzek, prof. dr hab. Włodzimierz Opoka) (współpraca nawiązana przez prof. dr hab. Halinę Ekiert w 2014 roku)
    - Współpraca z dr Radosławem Ekiertem i prof. dr hab. Janem Krzekiem dotyczyła opracowania oraz walidacji metody HP-TLC z detekcją densytometryczną oznaczania lignanów dibenzocyklooktadienowych; efektem jest publikacja [12O].



- Współpraca z dr Anną Maślanką oraz prof. dr hab. Włodzimierz Opoką dotyczyła opracowania oraz walidacji metody TLC z detekcją densytometryczną oznaczania związków idolowych w gatunku *Allium sativum*; efektem jest publikacja [9O].
- Współpraca z dr Anną Maślanką obejmowała pomoc w opracowaniu walidacji metody oznaczania ilościowego lignanów techniką HPLC. Wynikiem współpracy jest wspólna publikacja [8H].
- **Zakład Bromatologii** (dr hab. Mirosław Krośniak, mgr Agnieszka Wojtanowska-Krośniak, dr hab. Paweł Zagrodzki) (współpraca nawiązana przez prof. dr hab. Halinę Ekiert w 2016 roku)
  - Współpraca dotyczy wspólnej realizacji projektów badawczych, szczególnie oznaczeń całkowitej zawartości polifenoli oraz analiz aktywności antyoksydacyjnej. Wynikiem są wspólne doniesienia konferencyjne i publikacja oryginalna [6O]. Ponadto wspólnie realizujemy inny projekt dotyczący analizy związków polifenolowych i antocyjanów w owocach różnych odmian hodowlanych gatunku *Vaccinium corymbosum*.
- **Zakład Biochemii Toksykologicznej** (prof. Bogusława Budziszewska, dr Bartosz Pomierny) (współpraca nawiązana przez prof. dr hab. Halinę Ekiert w 2017 roku)
  - Współpraca obejmuje wspólną realizację badań aktywności neuroprotektoryjnej ekstraktów z materiału roślinnego, oraz z biomasy kultur *in vitro* głównie gatunków rodzaju Schisandra. Z zainicjowaną współpracą wiążą się perspektywy wspólnych publikacji.

#### d) Współpraca z organizacjami komercyjnymi

- **Clematis – Źródło Dobrych Pnączy Spółka z o.o.**, ul. Duchnicka 27, 05-800 Pruszków (dr. Szczepan Marczyński, inż. Andrzej Gruszczyński)
  - Współpraca „Nauki z Biznesem”
  - Firma Clematis jest dystrybutorem różnych gatunków rodzaju Schisandra. Prowadzona współpraca dotyczy pozyskiwania materiału do badań, oraz wymiany doświadczeń.
- **Krakowskie Zakłady Zielarskie „Herbapol” w Krakowie S.A.** ul Chałupnika 14, 31-464 Kraków (dr Radosław Ekiert)
  - Współpraca „Nauki z Biznesem”
  - Wspólne publikacje pogładowe propagujące prozdrowotne działanie surowców roślinnych m.in. *Cistus* sp. [6P] i *Schisandra* sp.[9H], oraz zainicjowanie współpracy z Krajowym Zrzeszeniem Plantatorów Aronii "Aronia Polska”

- **Krajowe Zrzeszenie Plantatorów Aronii "Aronia Polska"**, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice
  - w perspektywie wsparcie funkcjonowania Zrzeszenia przez naukową popularyzację wiedzy na temat prozdrowotnych walorów aronii, oraz udział w Sympozjum Aroniowym w Skierniewicach w 2017 r.
- **AERO-BW K. Domagała Spółka Jawna**, ul. Metalowców 1, 32-500 Chrzanów
  - Opracowanie wspólnego projektu badawczo - rozwojowego dotyczącego pozyskiwania biomasy, oraz komórek macierzystych z kultur *in vitro* na potrzeby przemysłu kosmetycznego pt. „Opracowanie innowacyjnych produktów kosmetycznych z wykorzystaniem komórek macierzystych”, oraz zgłoszenie projektu do konkursu Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Małopolskiego na lata 2014-2020, numer wniosku: RPMP.01.02.01-12-0513/17 (2018 r.; zaakceptowany do realizacji).

### 3.4. Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach

#### KIEROWNIK PROGRAMÓW BADAWCZYCH:

- **Grant Narodowego Centrum Nauki**
  1. **Program SONATA – Narodowe Centrum Nauki (NCN)**  
 „Badania fitochemiczne, biotechnologiczne oraz ocena aktywności biologicznej gatunku *Schisandra rubriflora* - cytryniec czerwonokwiatowy”  
 Numer programu: 2016/23/D/NZ7/01316 (od 4.08.2017 do 3.08.2020 r.)
- **Program Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Dotacja celowa dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich do 35 roku życia”**
  1. „Kultury *in vitro* gatunków rodzaju *Schisandra* jako potencjalne źródło farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych”  
 Numer programu: K/DSC/004297 (od 2017 do 2019 r.)
  2. „Roślinne kultury *in vitro* źródłem farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych”  
 Numer programu: K/DSC/001950 (od 2014 do 2016 r.)
  3. „Akumulacja biologicznie aktywnych związków w kulturach *in vitro* wybranych gatunków roślin leczniczych”  
 Numer programu: K/DSC/000029 (od 2011 do 2013 r.)

#### WSPÓŁWYKONAWCA W PROGRAMACH BADAWCZYCH:

- **Program Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Dotacja na utrzymanie potencjału badawczego Wydziałów UJ CM, tzw. „Projekty statutowe”**

1. „Kultury *in vitro* roślin leczniczych jako potencjalne biotechnologiczne źródło pozyskiwania cennych w lecznictwie i kosmetologii antyoksydantów”

Kierownik: prof. dr hab. Halina Ekiert

Numer programu: K/ZDS/007803 (od 2018 do 2020 roku)

2. „Kultury *in vitro* wybranych gatunków roślin leczniczych jako potencjalne, biotechnologiczne źródło pozyskiwania terapeutycznie ważnych związków na drodze endogennej biosyntezy i biotransformacji egzogennych substratów”

Kierownik: prof. dr hab. Halina Ekiert

Numer programu: K/ZDS/005614 (od 2015 do 2017 roku)

3. „Roślinne kultury *in vitro*, owocniki grzybów wielkoowocowych i kultury mycelialne jako źródło pozyskiwania ważnych terapeutycznie związków fenolowych”

Kierownik: prof. dr hab. Halina Ekiert

Numer programu: K/ZDS/003312 (od 2012 do 2014 roku)

4. „Badania nad możliwościami biotechnologicznego pozyskiwania terapeutycznie ważnych związków z roślinnych kultur *in vitro*”

Kierownik: prof. dr hab. Halina Ekiert

Numer programu: K/ZDS/000952 (od 2010 do 2011 roku)

- **Program Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Dotacja celowa dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich do 35 roku życia”**

1. „Kultury *in vitro* wybranych gatunków roślin leczniczych jako bogate, alternatywne źródło pozyskiwania związków bioaktywnych wykorzystywanych w terapii i kosmetyce”

Kierownik: mgr Paweł Kubica

Numer programu: K/DSC/003506 (od 2016 do 2018 roku)

współuczestnictwo jako promotor pomocniczy

### 3.5. Międzynarodowe i krajowe nagrody oraz odznaczenia związane z działalnością naukową

- **Nagroda za najlepszy poster (II miejsce)** na konferencji: International Conference of Natural and Medical Science: Young Scientists, PhD Students and Students, Lublin, 1-3 grudnia 2017. pt.: “*Schisandra rubriflora* as an alternative source of dibenzocyclooctadiene lignans, compounds with high importance in medicine and cosmetology – preliminary results.”
- **Agricell Report. Publisher: Agritech Consultants, Inc.** – wyróżnienie prac badawczych, doniesień zjazdowych oraz publikacji opublikowanych w JCR z tematyki biotechnologicznej na skalę ogólnosiwiatową:
  - “Various bioreactors tested for production of secondary metabolites”, Agricell Report 68(4), 2017
  - “Effect of light quality on production of lignans and phenolic acids”, Agricell Report 67(2), 2016
  - “Production of secondary metabolites by *in vitro* plant cultures – production of phenolic acids by *in vitro* black chokeberry”, Agricell Report 61(2), 2014
  - “Pharmaceutical product from *in vitro* plant cultures – high yields of deoxyschisandrin and phenolic acids from Chinese magnolia vine”, Agricell Report 61(5), 2013
- **Praca doktorska zgłoszona do Nagrody Ministra Zdrowia** za osiągnięcia będące podstawą nadania stopnia naukowego doktora, doktora nauk farmaceutycznych, 2014 r.
- Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński, *Collegium Medicum* – **wyróżnienie za pracę doktorską**; Kraków 2013
- Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński, *Collegium Medicum* – **nagroda Dziekana Wydziału Farmaceutycznego za osiągnięcia naukowe** w 2013 roku
- Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński, *Collegium Medicum* – **nagroda Dziekana Wydziału Farmaceutycznego za osiągnięcia naukowe** w 2012 roku
- Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński, *Collegium Medicum* – **II miejsce w Wydziałowym Konkursie Prac Magisterskich**: „Akumulacja kwasów fenolowych w kulturach *in vitro* *Ruta graveolens* L.”, promotor: dr hab. Halina Ekiert, praca z zakresu biotechnologii roślin, Kraków 2009
- **Fundacja Hasco-Lek** – udział w III edycji Ogólnopolskiego Konkursu na Najlepsze Prace Magisterskie z Zakresu Farmacji Przemysłowej; Wrocław 2009.

### 3.6. Recenzowanie projektów międzynarodowych i krajowych, oraz publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych

- **Recenzowanie projektów międzynarodowych**

- 1) Czech Science Foundation – external referee of Committee of Agricultural and Biological/Environmental Sciences (2013 r.), Project ID: 14-27289P. “*Schisandra chinensis*: source of biologically valuable dibenzocyclooctadiene-type lignans”.  
Ing. Martina Carnecká, Ph.D.

- **Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych (lata 2013-2018)**

#### CZASOPISMA Z LISTY A MNiSZW:

- 1) Acta Physiologiae Plantarum – 11 recenzji
- 2) Plant Cell Tissue and Organ Culture – 6 recenzji
- 3) Molecules – 6 recenzji
- 4) Natural Product Research – 3 recenzje
- 5) Pharmaceutical Biology – 2 recenzje
- 6) 3 Biotech - 2 recenzje
- 7) Biotechnology Letters – 1 recenzja
- 8) Nutrients – 1 recenzja
- 9) Phytochemistry Letters – 1 recenzja
- 10) Plos One – 1 recenzja
- 11) Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry – 1 recenzja
- 12) International Journal of Molecular Sciences – 1 recenzja
- 13) Separation Science Plus – 1 recenzja
- 14) American Journal of Research in Medical Sciences – 1 recenzja
- 15) Archives of Agronomy and Soil Science – 1 recenzja
- 16) Journal of Separation Science – 1 recenzja
- 17) International Journal of Environmental Analytical Chemistry – 1 recenzja
- 18) African Journal of Biotechnology – 1 recenzja
- 19) African Journal of Microbiology Research – 1 recenzja

#### MONOGRAFIE KSIĄŻKOWE:

- 1) Studies in Natural Products Chemistry (Bioactive Natural Products) Editor: F.R.S. Atta-ur-Rahman, Wydawnictwo: Elsevier Science Publishers, Amsterdam – 3 recenzje w 2017 r.

### 3.7. Staże w zagranicznych lub krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich

#### ZAGRANICZNE STAŻE SZKOLENIOWE, STYPENDIA I KONSULTACJE NAUKOWE

- 1) 15.01.18.-19.01.18. - Lehrstuhl für Technische Biochemie, FK Bio- und Chemieingenieurwesen, Technische Universität Dortmund, Niemcy  
- **Program ERASMUS+**, *Mobilność z krajami programu (KA103) wyjazdy pracowników uczelni w celach szkoleniowych* – szkolenie z zakresu technik analitycznych (HPLC-MS) oraz technik inżynierii chemicznej i biochemicznej w biotechnologii roślin
- 2) 15.05.17.-19.05.17. - Institut für Pharmazeutische Biologie, Technische Universität Braunschweig, Niemcy  
- **Program ERASMUS+**, *Mobilność z krajami programu (KA103) wyjazdy pracowników uczelni w celach szkoleniowych* - szkolenie z zakresu technik biologii molekularnej stosowanych w biotechnologii roślin ze szczególnym uwzględnieniem szlaków biogenetycznych lignanów dibenzoclockotadienowych
- 3) 15.09.17.-15.10.17. - Institut für Pharmazeutische Biologie, Technische Universität Braunschweig, Niemcy  
– **stypendium DAAD** (Deutscher Akademischer Austauschdienst) Research Stays for University Academics and Scientists
  - staż naukowy z zakresu biologii molekularnej oraz technik enzymatycznych i biochemicznych ukierunkowanych na poznanie szlaków biogenetycznych lignanów dibenzocyclootadienowych
- 4) 12.09.16-16.09.16. - Institut für Pharmazeutische Biologie, Technische Universität Braunschweig, Niemcy  
– staż naukowy z zakresu biologii molekularnej „Aspekty biosyntetyczne benzoylo-pochodnych lignanów typu Schisandra”. Staż w ramach funduszy własnych Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej UJ CM
- 5) 19.01.15.-23.01.15. - Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn, Niemcy  
- staż naukowy z zakresu biotechnologii roślin realizowany w ramach pobytu ERASMUS PLUS - krótkoterminowe wyjazdy kadry akademickiej (STA) w celach dydaktycznych
- 6) 12.05.14.-16.05.14. - Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn, Niemcy  
- staż naukowy z zakresu różnych technik stosowanych w roślinnych kulturach tkankowych, oraz zaznajomienie z projektem „Biosynthesis and structural modifications of the selective Gq protein inhibitor FR900359 in *Ardisia crenata*” realizowany w ramach pobytu LLP – ERASMUS - krótkoterminowe wyjazdy kadry akademickiej (STA) w celach dydaktycznych
- 7) 13.05.14. – Lehrstuhl für Technische Biochemie, FK Bio- und Chemieingenieurwesen, Technische Universität Dortmund, Niemcy  
- konsultacje naukowe z zakresu biotechnologii roślin ze szczególnym uwzględnieniem aspektów inżynierii biotechnologicznej.

## **KRAJOWE STAŻE I KONSULTACJE NAUKOWE**

### **• STAŻE Z ZAKRESU BIOTECHNOLOGII**

1. 16.10.17. – Pilotowa Stacja Biotechnologii przy Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu
  - konsultacje z zakresu hodowli mikroorganizmów i tkanek roślinnych w bioreaktorach wielkolaboratoryjnych i przemysłowych
2. 17.10.17. Labo Baza i Centrum Biotechnologii Poznańskiego Parku Naukowo-Technologicznego Fundacji Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, Poznań
  - strategie optymalizacji procesów hodowlanych w bioreaktorach. Warsztaty naukowe.
3. 23.02.16. – Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Zakład Biologii Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin Leczniczych,
  - konsultacje naukowe dotyczące prowadzenia hodowli komórek i organów roślinnych w bioreaktorach laboratoryjnych
4. 24.06.15.-26.06.15. - Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii i Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Katedra Biotechnologii, Pracownia Badania Związków Biologicznie Czynnych
  - staż dotyczący zapoznania się z biotechnologicznymi technikami transformacji genetycznej roślin
5. 23.06.14.-27.06.14. - Gdański Uniwersytet Medyczny, Katedra i Zakład Farmakognozji
  - staż z zakresu technik prowadzenia roślinnych kultur *in vitro* o charakterze wielkolaboratoryjnym
6. 27.06.13.-28.06.13. - Gdański Uniwersytet Medyczny, Katedra i Zakład Farmakognozji
  - staż z zakresu technik prowadzenia eksperymentów biotechnologicznych w instalacjach wielkoskalowych (bioreaktorach), oraz techniki prowadzenia kultur korzeni transformowanych.

### **• STAŻE Z ZAKRESU BIOLOGII MOLEKULARNEJ**

1. 6.02.17.-8.02.17. Blirt S.A., dział DNA-Gdańsk
  - kurs „Real-Time PCR bez tajemnic – podstawy techniki, optymalizacja reakcji oraz rozwiązywanie najczęstszych problemów”
2. 27.06.13.-28.06.13. - Gdański Uniwersytet Medyczny, Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej
  - konsultacje naukowe, zapoznanie się z technikami biologii molekularnej

### **• SZKOŁY ZIMOWE I INNE WARSZTATY NAUKOWE**

1. 10.01.17.-13.01.17. - XXXIV Szkoła Zimowa Instytutu Farmakologii PAN, Kraków, „Od natury do struktury”
2. 28.11.16. – Program Biopharmaceuticals; Le Studium, Loire Institute for Advanced Studies (Orléans, France)
  - Polish-French Scientific Workshop On Life Sciences, Kraków

- Warsztaty naukowe; poznanie profilu naukowego prowadzonego przez stronę francuską i perspektywy współpracy z prof. Nathalie Guivarc'h z Uniwersytetu w Tours (Institute of Biomolecule and Plant Biotechnology), Francja

**3. 6.03.14. – Laboratorium Medycyny Naturalnej BONIMED w Żywcu. Staż naukowy**

- zapoznanie się zasadami funkcjonowania firmy farmaceutycznej

• **STAŻE Z ZAKRESU TECHNIK ANALITYCZNYCH**

**1. 16.10.17. – Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu**

- zapoznanie się z działalnością naukową Instytutu oraz technikami badań mikrobiologicznych surowców roślinnych

**2. 3.10.16.-31.10.16. – Zakład Biologii Rozwoju, Instytut Fizjologii Roślin PAN im. F. Górskiego w Krakowie**

- staż z zakresu instrumentalnych technik analitycznych oraz metod badania potencjału antyoksydacyjnego (metody CUPRAC, QUENCHER-CUPRAC)

**3. 23.09.15. Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Instytut Biologii i Biochemii, Lublin.**

- "From seed to isolated bioactive compounds". Warsztaty naukowe z zakresu zastosowania techniki elektroforezy kapilarnej w fitochemii.

• **SEMINARIA – SZKOLENIA NAUKOWE Z ZAKRESU TECHNIK CHROMATOGRAFICZNYCH I SPEKTROMETRYCZNYCH**

**1. 20.02.18. – Firma Sciex Ltd. - Seminarium naukowe „Wysokorozdzielcza spektrometria mas w analizie białek LC-MS/MS i CESI-MS”, Kraków**

**2. 14.04.14. - Firma SHIM-POL A.M. Borzymowski – Seminarium naukowe „Technologia w służbie społeczeństwu. Nowe oblicze spektrometrii mas LC-MS\MS”, Kraków**

**3. 5.11.13. - Firma SHIM-POL A.M. Borzymowski – Seminarium naukowe „Technika GC-MS/MS – luksus czy konieczność", Kraków**

**4. 14.09.13. - Firma SHIM-POL A.M. Borzymowski – Seminarium „Optymalizacja warunków analizy w pracy z HPLC i UHPLC oraz spektrometrami mas”**

**5. 20.10.10. - Firma SHIM-POL A.M. Borzymowski, Seminarium - „Nowoczesne rozwiązania w analizie instrumentalnej”**

**INNE KRAJOWE KURSY SZKOLENIOWE I WARSZTATY NAUKOWE**

1. 14.02.17.; 21-22.02.17. - VII Warsztaty statystyczne – Analiza wariancji, analiza zmiennych jakościowych, regresja logistyczna. Zakład Bioinformatyki i Telemedycyny Uniwersytetu Jagiellońskiego *Collegium Medicum*, Kraków. Szkolenie w ramach środków z programu KNOW - Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego na lata 2012-2017, przyznanego dla Konsorcjum



Naukowego Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego *Collegium Medicum* i Instytutu Farmakologii PAN

2. 19-20.09.16. – Szkolenie „Prawidłowe realizowanie projektów naukowych finansowanych ze źródeł zewnętrznych. Praktyczne warsztaty zespołowe – Edycja III”
  - Uniwersytet Jagielloński, Medyczne Centrum Kształcenia podyplomowego Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków
3. 26.02.16. – Szkolenie „Prawidłowe realizowanie projektów naukowych finansowanych ze źródeł zewnętrznych. Edycja II”
  - Uniwersytet Jagielloński, Medyczne Centrum Kształcenia podyplomowego Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków
4. 16, 23.02.11. Kurs - Kompetencje i umiejętności informacyjne
  - Projekt „*Pro bono Collegii Medici Universitatis Jagiellonicae*”
5. 1.03.10 – 30.06.10. Kurs - Język angielski specjalistyczny
  - Projekt „*Pro bono Collegii Medici Universitatis Jagiellonicae*”

### **3.8. Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych**

#### **KRAJOWE TOWARZYSTWA NAUKOWE:**

- Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne (PTFarm) – od grudnia 2010 r.
- Polskie Towarzystwo Botaniczne, Oddział Krakowski, przynależność do sekcji PTB: Fizjologii i Biochemii Roślin, Kultur Tkankowych, Struktury i Rozwoju Roślin – od lutego 2018 r.

#### **MIĘDZYNARODOWE TOWARZYSTWA NAUKOWE:**

- Society for Medicinal Plant and Natural Product Research - Gesellschaft für Arzneipflanzen- und Naturstoff-Forschung (GA) – od listopada 2015 r.

### 3.9. Działalność organizacyjna

1. Doposażenie laboratorium biotechnologii roślin macierzystej jednostki - Zakładu Botaniki Farmaceutycznej (zakup aparatury i sprzętu laboratoryjnego) w ramach środków na zakup aparatury przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki – Program Sonata; Numer programu: 2016/23/D/NZ7/01316
2. Czynny udział w Festiwalu Nauki w Krakowie (lata: 2010, 2013-2018)
3. Czynny udział w Nocy Naukowców (2016 r.)
4. Współudział w prowadzeniu koła naukowego działającego przy Katedrze Botaniki Farmaceutycznej z zakresu biotechnologii roślin leczniczych
5. Opieka nad gościem Katedry Botaniki Farmaceutycznej, oraz Wydziału Farmaceutycznego UJ CM: prof. dr hab. Gabriele M. König z Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn (Niemcy). Cel wizyty - nawiązanie kontaktów i rozmowy o możliwościach współpracy między Wydziałami (2017 r)
6. Opieka merytoryczna nad stażem naukowym dr Natalizii Miceli z Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, University of Messina (Włochy). Cel wizyty - nawiązanie kontaktów i rozmowy o możliwościach współpracy między Wydziałami, ze szczególnym uwzględnieniem Katedry Botaniki Farmaceutycznej UJ CM (2017 r)
7. Opieka nad gościem Katedry Botaniki Farmaceutycznej, oraz Wydziału Farmaceutycznego UJ CM - prof. dr hab. Olivierem Kayserem, dziekanem Lehrstuhl für Technische Biochemie, FK Bio- und Chemieingenieurwesen, Technische Universität Dortmund (Niemcy). Cel wizyty - nawiązanie kontaktów i rozmowy o możliwościach współpracy między Wydziałami, ze szczególnym uwzględnieniem Katedry Botaniki Farmaceutycznej UJ CM. (2016 r)
8. Wykład w Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn, Germany (Niemcy), w ramach programu ERASMUS PLUS pt.: „Cracow - one of the most beautiful cities in Europe. Jagiellonian University and Pharmacy studies” (22.01.15.)
9. Wykład w Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn, Germany (Niemcy) w ramach program LLP – ERASMUS pt.: “Studies at the Faculty of Pharmacy in Cracow” - The educational process of pharmacy students at the Jagiellonian University” (14.05.14.)

### **3.10. Promotorstwo i opieka nad naukowymi pracami studentkami**

#### **1) Pełnienie funkcji promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim**

- Doktorant: mgr Paweł Kubica (od 2015 r.)
- Promotor: prof. dr hab. Halina Ekiert
- Temat rozprawy doktorskiej: „Kultury *in vitro* *Verbena officinalis* L. jako model do badań nad akumulacją związków bioaktywnych oraz potencjalne, biotechnologiczne źródło ich pozyskiwania”.
- Wszczęcie przewodu doktorskiego: 30.01.2017. (oficjalne powołanie do roli promotora pomocniczego)

#### **2) Opieka nad doktorantem (potencjalne promotorstwo pomocnicze)**

- Doktorant: mgr Marta Klimek-Szczykutowicz (od 2017 r.)
- Potencjalny promotor: prof. dr hab. Halina Ekiert

#### **3) Opieka nad studentami Studenckiego Koła Naukowego działającego przy Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej UJ CM**

#### **4) Opiekun i pomoc w opiece nad Magistrantami Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej UJ CM (realizacja prac z zakresu biotechnologii roślin)**

#### 4. Bibliometryczne podsumowanie osiągnięć naukowych

Mój dorobek naukowo-badawczy (na dzień 18.05.2018) obejmuje:

- Łączna liczba publikacji: **40**
  - publikacje znajdujące się w bazie Journal Citation Reports: 26
    - publikacje oryginalne: 25 (w tym: w 20 pracach jestem pierwszym autorem, w 5 pracach jestem drugim autorem; w 21 pracach jestem autorem korespondencyjnym)
    - publikacje poglądowe: 1 (jako pierwszy autor i autor korespondencyjny)
  - pozostałe publikacje: 14 (w tym; w 5 pracach jestem pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym)
- Liczba monografii książkowych: **1**
- Łączny impact factor (IF): **54,004**
- Łączna liczba punktów MNiSW: **763**
- Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science: **256**
- Indeks Hirscha według bazy Web of Science: **10**
- Liczba projektów badawczych: **9**, w tym:
  - kierownik projektu: **4**
    - Narodowe Centrum Nauki (NCN) - Program SONATA: **1**
    - Program Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Dotacja celowa dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich do 35 roku życia”: **3**
  - wykonawca: **5**
    - Program Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Dotacja na utrzymanie potencjału badawczego Wydziałów UJ CM, tzw. „Projekty statutowe”: **4**
    - Program Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Dotacja celowa dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich do 35 roku życia”: **1**
- Łączna ilość streszczeń ze zjazdów: **83**
  - międzynarodowych za granicą: **21**
  - międzynarodowych w kraju: **36** (w tym 3 wystąpienia ustne)
  - krajowych: **26** (w tym 3 wystąpienia ustne)
- Łączna ilość wykonanych recenzji: **47**

*Agnieszka Szopa*