

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCZYNY LABORATORYJNEJ



mgr farm. Anna Jesionek

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

Rozprawa doktorska

**Promotor pracy:
prof. dr hab. n. farm. Maria Łuczkiwicz**

**Katedra i Zakład Farmakognozji
z Ogrodem Roślin Leczniczych**

Gdańsk, 2020

STRESZCZENIE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMMARY

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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