

„Kultury *in vitro* *Nasturtium officinale* R. Br. jako potencjalne źródło biologicznie aktywnych metabolitów wtórnych i biopierwiastków”

STRESZCZENIE

Obiektem niniejszej pracy był gatunek wodny lub częściowo wodny należący do rodziny Brassicaceae - *Nasturtium officinale* R. Br. (rukiew wodna). Obecnie, liczba naturalnych stanowisk występowania *N. officinale* na terenie Europy, Azji i Afryki Północnej drastycznie spada, z tego powodu został on zakwalifikowany przez Międzynarodową Unię Ochrony Przyrody (IUCN), jako gatunek częściowo chroniony.

Ziele *N. officinale* – *Nasturtii herba*, od dawna stosowane było w tradycyjnej medycynie Iranu, Azerbejdżanu, Maroka i Mauritiusa. Głównymi grupami związków determinującymi aktywność biologiczną *Nasturtii herba* są: glukozynolaty (GSLs), izotiocyjaniany, związki polifenolowe, oraz witaminy. W ostatnim czasie, badania naukowe potwierdziły wiele cennych farmakologicznych właściwości ekstraktów z ziela, m.in. działanie przeciwnowotworowe, antyoksydacyjne, przeciwzapalne oraz przeciwbakteryjne. *N. officinale* współcześnie, posiada status rośliny „prozdrowotnej” wykorzystywanej nie tylko w fitoterapii, ale również w nowoczesnej dietetyce i kosmetologii.

Celem pracy było zbadanie możliwości stymulacji produkcji biologicznie aktywnych metabolitów, oraz zdolności bioakumulacji pierwiastków w mikropędowych kulturach *in vitro* *N. officinale*. Przedstawiony cel realizowano w obszarze badań biotechnologicznych, fitochemicznych i biologicznych.

Badania biotechnologiczne dotyczyły zainicjowania i zoptymalizowania warunków prowadzenia agarowych i wytrząsanych mikropędowych kultur *N. officinale* w celu uzyskania wysokich przyrostów biomasy, bioakumulacji pierwiastków, oraz produkcji metabolitów. W celu zwiększenia skali produkcji biomasy do wielkolaboratoryjnej, eksperymenty prowadzono też w dostępnych komercyjnie bioreaktorach okresowo-zalewowych (TIS) – RITA® i Plantform. W ramach pracy, stosując strategie wykorzystania różnych regulatorów wzrostu i rozwoju roślin (PGRs) i ich stężeń, czasów trwania cykli hodowlanych, warunków świetlnych, oraz elicytacji i/lub suplementacji biosyntetycznymi prekursorami, opracowano techniki zintensyfikowania produkcji, głównie GSLs oraz związków polifenolowych, o cennych właściwościach prozdrowotnych.

Kultury mikropędowe *N. officinale* zainicjowano z rośliny macierzystej. Hodowano je z powodzeniem na podłożu wg. Murashige i Skoog (MS) zawierającym 1 mg/L 6-benzyloadeniny (BA) i 1 mg/L kwasu 1-naftylooctowego (NAA). W ramach optymalizacji warunków prowadzenia kultur *in*

in vitro przetestowano warianty podłoża MS różniące się zawartością wybranych PGRs - auksyn: kwasu 3-indoliloctowego - IAA, kwasu 3-indolilomasłowego - IBA, kwasu 3-indolilopirogronowego - IPA, kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego - 2,4-D, kwasu 1-naftylooctowego - NAA oraz cytokinin: 6-benzyladeniny - BA, 6-(γ,γ -dimetyloalliloamino)-puryny - 2iP, kinetyny - KIN i zeatyny - Zea (27 wariantów podłoży dla kultur agarowych i 6 wariantów dla kultur wytrząsanych). Spośród testowanych wariantów kompozycji PGRs i czasów trwania hodowli, dla kultur agarowych i wytrząsanych, jako najlepsze warunki dla produkcji GSLs (maks. 182,80 mg SIN/100 g s.m.) i kwasów fenolowych (maks. 206,73 mg/100 g s.m.) wytypowano kultury wytrząsane hodowane przez 10 dni na podłożu MS zawierającym 1 mg/L BA i 1 mg/L NAA. Najlepsze warunki hodowli kultur, zaadaptowano do prowadzenia hodowli w bioreaktorach RITA[®]. Badania wykazały satysfakcjonujące przyrosty biomasy (maks. $G_i=31,71$), a także zdolność do wysokiej produkcji metabolitów wtórnych. Maksymalna zawartość GSLs oznaczona metodą UHPLC-DAD-MS/MS wynosiła 261,97 mg/100 g s.m.; głównymi związkami była glukonasturecyna (maks. 182,93 mg/100 g s.m.) oraz 4-metoksyglukobrassycyna (maks. 58,86 mg/100 g s.m.). Ponadto, metodą UHPLC-DAD-ESI-MS w ekstraktach z kultur mikropędowych oznaczono kwasy fenolowe (m.in. kwas ferulowy - maks. 9,28 mg/100 g s.m. i kwas *p*-kumarowy maks. 1,26 mg/100 g s.m.) oraz flawonoidy (m.in. rutozyd - maks. 23,24 mg/100 g s.m.).

W ramach pracy zbadano wpływ różnych warunków oświetlenia światłem LED (białym, niebieskim - B, czerwonym - R, 70% czerwonym + 30% niebieskim - RB, 50% UV-A + 35% czerwonym + 15% niebieskim - RBUV, 50% dalekiej czerwieni + 35% czerwonym + 15% niebieskim - RBfR, 50% zielonym + 35% czerwonym + 15% niebieskim - RBG, 50% żółtym + 35% czerwonym + 15% niebieskim - RBY) agarowych kultur mikropędowych *N. officinale*, na zdolność akumulacji metabolitów oraz na potencjał antyoksydacyjny. W ramach badań wykazano stymulujące działanie testowanych warunków świetlnych na produkcję GSLs, oraz nieznaczny wpływ na zawartość polifenoli, sacharydów i potencjał antyoksydacyjny badanych ekstraktów. Najwyższą produkcję GSLs (maks. 237,92 mg SIN/100 g s.m.) stwierdzono dla mikropędów hodowanych w świetle RBG. Światło RB stymulowało produkcję chlorofilu *a* (maks. 473,26 mg/100 g s.m.) i karotenoidów (maks. 158,38 mg/100 g s.m.), a światło B chlorofilu *b* (maks. 190,11 mg/100 g s.m.).

W ramach badań nad stymulacją produkcji metabolitów w biomacie kultur wstrząsanych *N. officinale* poprzez zastosowanie elicytacji, przetestowano cztery elicytory (etefon - ETH, jasmonian metylu - MeJA, salicylan sodu - NaSA i ekstrakt drożdżowy - YeE) w dwóch różnych stężeniach 25 i 50 μ M (ETH), 50 i 100 μ M (MeJA i NaSA), oraz 1 mg/L i 3 mg/L (YeE), a biomasę kultur eksperymentalnych zbierano po 24 h, 48 h oraz 4, 6, 8 dniach po elicytacji. Analizy wykazały interesujące różnice w akumulacji poszczególnych GSLs, oraz stymulujący wpływ elicytacji 50 μ M MeJA na produkcję: glukonasturecyny (maks. 68,34 mg/100 g s.m.) i glukobrassycyny (maks. 65,95 mg/100 g s.m.). Elicytacja powodowała wzrost całkowitej zawartości flawonoidów (maks. 1060,80 mg RE/100 g s.m., 100 μ M NaSA), rozpuszczalnych sacharydów (maks. 9,23 g GLU/100 g s.m., 50 μ M

NaSA), chlorofili *a+b* (maks. 147,32 mg/100 g s.m., 100 μ M NaSA), oraz karotenoidów (maks. 10,83 mg/100 g s.m., 50 μ M NaSA).

W ramach badań nad stymulacją produkcji metabolitów przetestowano też suplementację podłoży hodowlanych kultur mikropędowych *N. officinale* prowadzonych w bioreaktorach Platform egzogennymi biosyntetycznymi prekursorami (fenyloalaniną - Phe i tryptofanem - Trp). Zastosowano następujące stężenia prekursorów: 0,05, 0,1, 0,5, 1,0 oraz 3,0 mM. Prekursory suplementowano do podłoży hodowlanych na początku hodowli (dzień 0) oraz po 10 dniach trwania hodowli. Badania potwierdziły stymulujący wpływ zabiegów na produkcję GSLs, flawonoidów, polifenoli, sacharydów i barwników fotosyntetycznych. Jako najlepszy czas suplementacji wytypowano 'dzień 0', a najlepszym prekursorem była Phe w stężeniu 3,0 mM. Uzyskana w tych warunkach wysoka produkcja biomasy (maks. $G_i=10,74$), jak również wydajna akumulacja GSLs, pozwoliły na uzyskanie aplikacyjnych wyników oznaczeń produktywności dla 4-metoksyglukobrassyliny (maks. 149,99 mg/100 g s.m., produktywność = 398,77) i glukonasturcyny (maks. 36,71 mg/100 g s.m., produktywność – 97,59). W ramach badań uzyskano również wysokie całkowite zawartości: flawonoidów (maks. 1364,38 mg RE/100 g s.m., 3,0 mM Phe), polifenoli (maks. 1062,76 mg GAL/100 g s.m., 3,0 mM Trp), oraz sacharydów (maks. 6,92 g GLU/100 g s.m., 0,05 mM Trp). Ponadto, potwierdzono stymulujący wpływ badanych prekursorów na produkcję poszczególnych związków polifenolowych, m.in.: kwasu *p*-kumarowego (maks. 29,11 mg/100 g s.m., 0,5 mM Trp), kwasu ferulowego (maks. 27,76 mg/100 g s.m., 3,0 mM Phe) i rutozydu (maks. 16,03 mg/100 g s.m., 0,1 mM Trp).

W ramach pracy przeprowadzono badania akumulacji biopierwiastków (Ca, Cr, Cu, Fe, Li, Mg, Se, Zn) w modelu mikropędowych, wytrząsanych kultur *N. officinale* metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej (ASA). Testowano następujące sole: makroelementów - wapnia ($\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$) i magnezu ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) oraz mikroelementów - chromu ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), miedzi ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$), żelaza ($\text{FeNaEDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$), litu ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$), selenu ($\text{Na}_2\text{O}_3\text{Se}$) i cynku ($\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), uzyskując stężenia pierwiastków równe: 1, 5, 10, 25, 50 mg na litr pożywki. Spośród badanych pierwiastków, najwyższą bioakumulację stwierdzono dla Cr (maks. 498,62 mg/100 g s.m., 50 mg/L), a najwyższy współczynnik biokoncentracji (BCF) dla Ca (maks. 4467,00, 1 mg/L). Badania potwierdziły stymulujący wpływ zastosowanych soli metali na produkcję GSLs (maks. 172,90 mg/100 g s.m., 1 mg/L Ca), oraz kwasów fenolowych (maks. 139,21 mg/100 g s.m., 50 mg/L Fe). Jako optymalne warunki, wytypowano następujące stężenia pierwiastków: 1 mg/L Ca, 1 mg/L Mg, 5 mg/L Cr, 1 mg/L Cu, 1 mg/L Fe, 10 mg/L Li, 5 mg/L Se oraz 10 mg/L Zn. Spośród badanych wariantów najlepsze wyniki uzyskano dla kultur hodowanych na podłożu zawierającym jony Ca.

W celach porównawczych, dla uzyskania biotechnologicznej oceny wyników, przeprowadzono badania zawartości GSLs w ekstraktach z ziela rośliny macierzystej. Stwierdzono różnice pomiędzy kulturami *in vitro*, a materiałem pozyskanym z warunków *in vivo*. W ziele dominującymi ilościowo GSLs były: glukonasturcyna (maks. 640,94 mg/100 g s.m.), glukozynolat 7- (metylosulfinylo)heptylu (maks. 92,27 mg/100 g s.m.) i glukohirsutyna (maks. 42,79 mg/100 g s.m.). W ekstraktach z ziela

potwierdzono obecność czterech kwasów fenolowych (kwasu galusowego, ferulowego, *p*-kumarowego i protokatechowego) i trzech flawonoidów (*O*-ramnoheksozydu kemferolu, izokwercytryny i rutozydu). Głównymi związkami były – kwas protokatechowy (196,11 mg/100 g s.m.) i izokwercytryna (57,05 mg/100 g s.m.)

W celu oceny potencjału aplikacyjnego uzyskanych wyników badań biotechnologicznych i fitochemicznych, w ramach pracy, zostały wykonane analizy aktywności antyoksydacyjnej, przeciwdrobnoustrojowej oraz przeciwzapalnej wybranych ekstraktów.

Potencjał antyoksydacyjny oznaczony metodami: CUPRAC, DPPH i FRAP, uzależniony był od testowanych warunków hodowli *in vitro*. W ekstraktach z biomasy kultur *in vitro* uzyskano 1,2- krotnie wyższy potencjał antyoksydacyjny oznaczony metodami CUPRAC i DPPH, oraz 1,9-krotnie wyższy oznaczony metodą FRAP, w porównaniu z ekstraktami z rośliny macierzystej.

W porównaniu z zieleń, w ekstraktach z 10-dniowych kultur *in vitro* hodowanych w bioreaktorach RITA[®] stwierdzono zbliżoną aktywność przeciwbakteryjną dla szczepów: *Staphylococcus aureus* (MIC=5 mg/mL), *Escherichia coli* (MIC=10 mg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (MIC=10 mg/mL), *Helicobacter pylori* (1,25 mg/mL) i wyższą dla szczepu *S. epidermidis* (MIC=5 mg/mL). Na podstawie oznaczeń aktywności przeciwgrzybiczej stwierdzono, że ekstrakty z ziela *N. officinale* mają silniejszą aktywność wobec szczepów *Candida albicans* (MIC=5 mg/mL) i *C. parapsilosis* (MIC=10 mg/mL), natomiast ekstrakty z kultur *in vitro* działają silniej w stosunku do *Trichophyton menthagrophytes* (MIC=1,25 mg/mL) i *Microsporum canis* (MIC=5 mg/mL). Na szczepy *C. glabrata*, *Aspergillus niger* i *Penicillium chrysogenum* ekstrakty miały podobną aktywność (MIC=10 mg/mL).

Ponadto, dla ekstraktów z kultur mikropędowych hodowanych w bioreaktorze Platform i suplementowanych 3,0 mM Phe w dniu 0, wykazano działanie przeciwbakteryjne na szczepy związane ze zmianami trądzikowym (*Propionibacterium acnes* i *P. granulosum*). W ramach badań biologicznych, przeprowadzono też oznaczenia aktywności hamowania tyrozynazy przez ten ekstrakt. Najsilniejsze działanie inhibicyjne (maks. 27,84%) uzyskano dla stężenia suchego ekstraktu równego 1250 µg/mL.

W ramach pracy zbadano aktywność przeciwzapalną ekstraktów z 10-dniowych kultur mikropędowych *N. officinale* hodowanych w bioreaktorze RITA[®] przez oznaczenie inhibicji 15-lipooksygenazy (15-LOX), cyklooksygenazy-1 (COX-1), cyklooksygenazy-2 (COX-2) i sekrecyjnej fosfolipazy A₂ (sPLA₂). Interesujące wyniki uzyskano dla COX-2, która była hamowana w znacznie większym stopniu przez ekstrakty z kultur mikropędowych (75,40%), niż ekstrakty z ziela (41,10%).

W pracy doktorskiej wykazano, że kultury mikropędowe *N. officinale* mogą być potencjalnym, bogatym źródłem pozyskiwania biologicznie aktywnych metabolitów, a także posiadają zdolności bioakumulacji pierwiastków prozdrowotnych.

Na uwagę zasługuje nowatorski zakres badań dotyczących zarówno kultur *in vitro* gatunku *N. officinale*, a także rośliny macierzystej. Uzyskane wyniki mają nie tylko charakter poznawczy, ale również aplikacyjny.

Rezultaty prac eksperymentalnych przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej zostały opublikowane w trzech publikacjach eksperymentalnych (kolejne trzy publikacje są w recenzji) w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Wyniki zaprezentowano, na konferencjach zagranicznych w formie posterów (9), oraz na konferencjach krajowych w formie wystąpień ustnych (7) i posterowych (4). Ponadto, w celu usystematyzowania i poszerzenia wiedzy dotyczącej aplikacji leczniczych, spożywczych i kosmetycznych *N. officinale*, oraz zaprezentowania wyników badań własnych, opublikowana została anglojęzyczna i krajowa publikacja przeglądowa.

SUMMARY

The object of the doctoral research was the aquatic or partially aquatic species *Nasturtium officinale* R. Br. (watercress) of the family Brassicaceae. At present, the number of natural habitats of *N. officinale* in Europe, Asia, and North Africa is drastically decreasing; therefore, the species has been classified by the International Union for Conservation of Nature (IUCN) as a partially protected species.

The herb *N. officinale* – *Nasturtii herba* – has long been used in traditional medicine of Iran, Azerbaijan, Morocco, and Mauritius. The main groups of compounds determining the biological activity of *Nasturtii herba* are: glucosinolates (GSLs), isothiocyanates, polyphenolic compounds, and vitamins. Recently, scientific research has confirmed many valuable pharmacological properties of *N. herba* extracts, such as anti-cancer, antioxidant, anti-inflammatory, and antibacterial properties. *N. officinale* today has the status of a “pro-health” plant used not only in phytotherapy, but also in modern dietetics and cosmetology.

The aim of the doctoral research was to investigate the possibility of stimulating the production of biologically active metabolites and the bioaccumulation of elements in *in vitro* microshoot cultures of *N. officinale*. This goal was pursued in biotechnological, phytochemical, and biological research areas.

The biotechnological research concerned the initiation and optimization of the conditions for the cultivation of agar and agitated microshoot cultures of *N. officinale* to obtain high biomass increases, bioaccumulation of elements, and production of metabolites. In order to achieve large-scale laboratory production of biomass, experiments were also performed in commercially available temporary immersion (TIS) bioreactors – RITA[®] and Plantform. Using strategies involving the use of various plant growth regulators (PGRs) and their concentrations, durations of culture cycles, lighting conditions, and elicitation and/or supplementation with biosynthetic precursors, techniques have been developed to intensify the production of compounds with valuable health-enhancing properties, mainly GSLs and polyphenolic compounds.

N. officinale microshoot cultures were initiated from the parent plant. They were successfully grown in a Murashige and Skoog (MS) medium containing 1 mg/L 6-benzyladenine (BA) and 1 mg/L 1-naphthylacetic acid (NAA). As part of the optimization of *in vitro* culture conditions, variants of the MS medium differing in the concentration of selected PGRs were tested, *i.e.* auxins: 3-indolylacetic acid – IAA, 3-indolylbutyric acid – IBA, 3-indolylpyruvic acid – IPA, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid – 2,4-D, 1-naphthylacetic acid – NAA; and cytokinins: 6-benzyladenine – BA,

6-(γ , γ -dimethylallylamino)-purine – 2iP, kinetin – KIN, and zeatin – Zea (27 media variants for agar cultures and 6 variants for agitated cultures). Among the tested variants of PGR composition and cultivation durations, for both agar and agitated cultures, the best conditions for the production of GSLs (max. 182.80 mg SIN/100 g DW) and phenolic acids (max. 206.73 mg/100 g DW) were found to be provided by agitated cultures grown for 10 days in the MS medium containing 1 mg/L BA and 1 mg/L NAA. The best conditions for the cultivation of cultures were adapted to cultivation in RITA[®] bioreactors. The research demonstrated satisfactory increases in biomass (max. $G_i = 31.71$) and the capability to ensure high production of secondary metabolites. The maximum amount of GSLs estimated by the UHPLC-DAD-MS/MS method was 261.97 mg/100 g DW; the main compounds were gluconasturtiin (max. 182.93 mg/100 g DW) and 4-methoxyglucobrassicin (max. 58.86 mg/100 g DW). In addition, extracts from the microshoot cultures were analyzed with the UHPLC-DAD-ESI-MS method for phenolic acids; the ferulic acid (max. 9.28 mg/100 g DW), *p*-coumaric acid (max. 1.26 mg/100 g DW), and rutoside (max. 23.24 mg/100 g DW) were estimated.

The research also involved the use of different LED light combinations (white, blue – B, red – R, 70% red + 30% blue – RB, 50% UV-A + 35% red + 15% blue – RBUV, 50% far red + 35% red + 15% blue – RBfR, 50% green + 35% red + 15% blue – RBG, 50% yellow + 35% red + 15% blue – RBY) to illuminate *N. officinale* microshoot agar cultures and determine their effects on the metabolite accumulation capacity and the antioxidant potential. The experiments demonstrated the stimulating influence of the tested lighting conditions on the production of GSLs, and also a slight influence on the amounts of polyphenols and saccharides in the tested extracts, as well as on their antioxidant potential. The highest production of GSLs (max. 237.92 mg SIN/100 g DW) was achieved with microshoots grown in RBG light. RB light stimulated the production of chlorophyll *a* (max. 473.26 mg/100 g FW) and carotenoids (max. 158.38 mg/100 g FW), and B light the production of chlorophyll *b* (max. 190.11 mg/100 g of FW).

As part of the research aimed at stimulating the production of metabolites in the biomass of *N. officinale* agitated cultures through elicitation, four elicitors (ethephon – ETH, methyl jasmonate – MeJA, sodium salicylate – NaSA, and yeast extract – YeE) were tested at two different concentrations of 25 and 50 μ M (ETH), 50 and 100 μ M (MeJA and NaSA), and 1 mg/L and 3 mg/L (YeE). The biomass of the experimental cultures was collected after 24 h, 48 h, and 4, 6, and 8 days after elicitation. The analyses showed interesting differences in the accumulation of individual GSLs, and the stimulating influence of elicitation with 50 μ M MeJA on the production of gluconasturtiin (max. 68.34 mg/100 g DW) and glucobrassicin (max. 65.95 mg/100 g DW). Elicitation increased the total amounts of flavonoids (max. 1060.80 mg RE/100 g DW, 100 μ M NaSA), soluble saccharides (max. 9.23 g GLU/100 g DW, 50 μ M NaSA), chlorophylls *a* + *b* (max. 147.32 mg/100 g DW, 100 μ M NaSA), and carotenoids (max. 10.83 mg/100 g DW, 50 μ M NaSA).

Stimulation of metabolite production was also investigated *via* supplementation of the growth media of *N. officinale* microshoot cultures in Plantform bioreactors with exogenous biosynthetic

precursors (phenylalanine – Phe, and tryptophan – Trp). The following precursor concentrations were used: 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, and 3.0 mM. The precursors were added into the culture media at the beginning of cultivation (day 0) and after 10 days of culture. The experiments confirmed the stimulating influence of these treatments on the production of GSLs, flavonoids, polyphenols, saccharides, and photosynthetic pigments. ‘Day 0’ was nominated as the best supplementation time, while Phe at a concentration of 3.0 mM was the best precursor. The high biomass production (max. $G_i = 10.74$) and the efficient accumulation of GSLs achieved under these conditions helped to obtain applicative results of productivity determinations for 4-methoxyglucobrassicin (max. 149.99 mg/100 g DW, productivity = 398.77) and gluconasturtiin (max. 36.71 mg/100 g DW, productivity = 97.59). The experiments also produced high total amounts of flavonoids (max. 1364.38 mg RE/100 g DW, 3.0 mM Phe), polyphenols (max. 1062.76 mg GAL/100 g DW, 3.0 mM Trp), and saccharides (max. 6.92 g GLU/100 g DW, 0.05 mM Trp). Moreover, the tested precursors were confirmed to have a stimulating influence on the production of individual polyphenolic compounds, including *p*-coumaric acid (max. 29.11 mg/100 g DW, 0.5 mM Trp), ferulic acid (max. 27.76 mg/100 g DW, 3.0 mM Phe), and rutoside (max 16.03 mg/100 g DW, 0.1 mM Trp).

The doctoral research also included work on the accumulation of bioelements (Ca, Cr, Cu, Fe, Li, Mg, Se, Zn) in the model of agitated microshoot cultures of *N. officinale* using the method of atomic absorption spectrometry (ASA). The following salts were analyzed: macroelements – calcium ($\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$) and magnesium ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), and microelements – chromium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), copper ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$), iron ($\text{FeNaEDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$), lithium ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$), selenium ($\text{Na}_2\text{O}_3\text{Se}$), and zinc ($\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), obtaining the concentrations of the elements equal to: 1, 5, 10, 25, 50 mg per litre of medium. Among the elements tested, the highest bioaccumulation was found for Cr (max. 498.62 mg/100 g DW, 50 mg/L), and the highest bioconcentration factor (BCF) for Ca (max. 4,467.00, 1 mg/L). The analyses confirmed the stimulating influence of the metal salts used on the production of GSLs (max. 172.90 mg/100 g DW, 1 mg/L Ca), and phenolic acids (max. 139.21 mg/100 g DW, 50 mg/L Fe). The following element concentrations were selected as providing optimal conditions: 1 mg/L Ca, 1 mg/L Mg, 5 mg/L Cr, 1 mg/L Cu, 1 mg/L Fe, 10 mg/L Li, 5 mg/L Se, and 10 mg/L Zn. Among the variants tested, the best results were obtained for cultures grown on a medium containing Ca ions.

For comparative purposes, to obtain a biotechnological assessment of the results, analyses of the GSL content in extracts from the herb of the parent plant were performed. Differences were found between *in vitro* cultures and the material obtained *in vivo* conditions. In the herb, the quantitatively dominant GSLs were: gluconasturtiin (max. 640.94 mg/100 g DW), 7-(methylsulfinyl)heptyl-glucosinolate (max. 92.27 mg/100 g DW), and glucohirsutin (max. 42.79 mg/100 g g DW). In the herbal extracts, four phenolic acids (gallic, ferulic, *p*-coumaric, and protocatechuic) and three flavonoids (kaempferol *O*-rhamnohexoside, isoquercitrin, and rutoside) were confirmed. The main compounds were protocatechuic acid (196.11 mg/100 g DW) and isoquercitrin (57.05 mg/100 g DW).

In order to assess the application potential of the obtained results of the biotechnological and phytochemical research, analyses were performed of the antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of selected extracts.

The antioxidant potential determined by the CUPRAC, DPPH and FRAP methods depended on the tested *in vitro* culture conditions. In biomass extracts of the *in vitro* cultures, the antioxidant potential was 1.2 times higher for the CUPRAC and DPPH methods, and 1.9 times higher for the FRAP method, in comparison with extracts from the parent plant.

Compared to the herb, extracts from 10-day-old *in vitro* cultures grown in RITA[®] bioreactors showed similar antibacterial activity for the following strains: *Staphylococcus aureus* (MIC = 5 mg/mL), *Escherichia coli* (MIC = 10 mg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (MIC = 10 mg/mL), *Helicobacter pylori* (1.25 mg/mL), and higher for and *S. epidermidis* strain (MIC = 5 mg/mL). Based on the antifungal activity determinations, *N. officinale* herb extracts were found to exhibit stronger activity against the strains of *Candida albicans* (MIC = 5 mg/mL) and *C. parapsilosis* (MIC = 10 mg/mL), whereas extracts from the *in vitro* cultures were stronger against *Trichophyton menthagrophytes* (MIC = 1.25 mg/mL) and *Microsporium canis* (MIC = 5 mg/mL). The activities of the extracts against the strains of *C. glabrata*, *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum* were similar (MIC = 10 mg/mL).

Furthermore, for extracts from the microshoot cultures grown in the Plantform bioreactor and supplemented with 3.0 mM Phe on 'day 0', antibacterial activity was demonstrated against the strains associated with acne lesions (*Propionibacterium acnes* and *P. granulosum*). The biological part of the research included tests to determine the tyrosinase inhibitory activity of these extracts. The strongest inhibitory effect (max. 27.84%) was obtained for the concentration of dry extract equal to 1250 µg/mL.

The research also investigated the anti-inflammatory activity of extracts from 10-day-old *N. officinale* microshoot cultures grown in the RITA[®] bioreactors by determining the inhibition of 15-lipoxygenase (15-LOX), cyclooxygenase-1 (COX-1), cyclooxygenase-2 (COX-2), and secretory phospholipase A₂ (sPLA₂). Interesting results were obtained for COX-2, which was inhibited to a much greater extent by extracts from the microshoot cultures (75.40%) than by extracts from the herb (41.10%).

The doctoral research has shown that *N. officinale* microshoot cultures can be a potential rich source for obtaining biologically active metabolites, and that the cultures also have the ability to bioaccumulate health-enhancing elements.

Particularly noteworthy is the innovative scope of the research on both *in vitro* cultures and the parent plant of the *N. officinale* species. The results obtained are not only of cognitive but also of applicative value.

The results of the experimental work performed within the framework of this doctoral research have been published in three experimental articles (another three are under review) in international journals. The results have been presented at international conferences in the form of posters (9), and at national conferences in the form of oral presentations (7) and poster presentations (4). Moreover, in

order to systematize and broaden the knowledge on medicinal, nutritive, and cosmetic applications of *N. officinale*, and to present the results of own research, an English- and Polish-language review articles have been published.