Kultury *in vitro Verbena officinalis* L. jako model do badań nad akumulacją związków bioaktywnych oraz potencjalne, biotechnologiczne źródło ich pozyskiwania

mgr Paweł Kubica

STRESZCZENIE

Obiektem badań w pracy były kultury *in vitro Verbena officinalis* L. – werbena lekarska (werbena pospolita). *V. officinalis* to gatunek kosmopolityczny należący do rodziny *Verbenaceae*. Występuje powszechnie w większości stref klimatycznych, na różnych kontynentach (w Europie, Azji, Ameryce Północnej i Ameryce Południowej oraz w Afryce). Ziele *V. officinalis* jest surowcem leczniczym stosowanym od dawna w tradycyjnej medycynie europejskiej, północno-amerykańskiej i w tradycyjnej medycynie chińskiej (TCM). Do oficjalnego lecznictwa europejskiego surowiec ten został wprowadzony w 2008 roku. Monografia surowca („Verbena herb") figuruje w Farmakopei Europejskiej (począwszy od 6 wydania) oraz w Farmakopei Polskiej (począwszy od jej VIII wydania). W najnowszych edycjach tych dokumentów (Farmakopea Europejska 10 i Farmakopea Polska XII) monografia figuruje w niezmienionej formie.

Ziele *V. officinalis* posiada bogaty skład chemiczny. Jego głównymi składnikami są: glikozydy irydoidowe (m.in. werbenalina, hastatozyd), glikozydy fenylopropanoidowe (m.in. werbaskozyd, izowerbaskozyd), kwasy fenolowe (m.in. kwas ferulowy, protokatechowy, rozmarynowy), flawonoidy (m.in. kemferol, luteolina), olejek eteryczny oraz biopierwiastki (Na, K, P, Ca, Mg, Zn, Fe, Mn, Cu). Najnowsze badania naukowe potwierdzają liczne właściwości biologiczne ekstraktów z tego surowca: właściwości antyoksydacyjne, przeciwdrobnoustrojowe (przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze), przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, przeciwbólowe, przeciwlękowe, uspokajające, poprawiające jakość snu, przeciwdrgawkowe, neuroprotekcyjne, przeciwdepresyjne i gastroprotekcyjne. *V. officinalis* jest też cennym źródłem surowców o znaczeniu kosmetycznym, dopuszczonych przez Komisję Europejską do wykorzystania w produkcji fitokosmetyków. Surowce te (w liczbie aż jedenastu) figurują w bazie CosIng (Cosmetic Ingredient Database) opracowywanej przez Komisję Europejską.

Ponadto począwszy od 2010 roku ziele werbeny, posiadając pozytywną opinię naukową EFSA (European Food Safty Authority), dopuszczone jest do wykorzystania w celach prozdrowotnych. Opinia ta wskazuje, że ziele werbeny może chronić komórki i tkanki przed uszkodzeniami spowodowanymi stresem oksydacyjnym, a także zwiększać fizjologiczną odporność organizmu.

Podstawowym celem pracy była inicjacja kultur *in vitro V. officinalis* oraz badania dotyczące zdolności hodowanej biomasy do akumulacji związków bioaktywnych.

Praca objęła trzy obszary badawcze: badania biotechnologiczne i fitochemiczne oraz badania aktywności biologicznej ekstraktów z biomasy uzyskanej *in vitro* oraz w celach porównawczych z ziela roślin gruntowych.

W ramach pracy z sukcesem zainicjowano kultury *in vitro* o różnym stopniu organogenezy – kultury kalusowe oraz kultury mikropędowe. Przeprowadzono szereg badań związanych z optymalizacją warunków prowadzenia kultur *in vitro*. Objęły one dobór podstawowego składu podłoża hodowlanego, jakościowy i ilościowy dobór regulatorów wzrostu i rozwoju roślin (PGRs), czas trwania cykli hodowlanych (2, 3, 4-tygodniowe cykle hodowlane), warunki świetlne prowadzenia kultur (światło diod elektroluminescencyjnych – LED: światło niebieskie, czerwone oraz kombinacja światła czerwonego i niebieskiego (70%/30%), ciemność oraz białe światło fluorescencyjne), a także typy prowadzonych kultur.

Prowadzono różne typy kultur kalusowych: kultury agarowe, zawiesinowe oraz kultury bioreaktorowe w dwóch typach bioreaktorów (bioreaktor balonowy - BB i bioreaktor mieszająco-napowietrzający - STB) oraz różne typy kultur mikropędowych: agarowe, płynne stacjonarne, wytrząsane oraz kultury bioreaktorowe (bioreaktory okresowo-zalewowe RITA® i Plantform).

Badania zmierzały do uzyskania wysokich przyrostów biomasy i wysokiej produkcji wybranych metabolitów wtórnych.

W ekstraktach z biomasy uzyskanej z testowanych typów kultur *in vitro* oraz w ekstraktach z ziela rośliny gruntowej, metodami chromatograficznymi: UHPLC-hr-q-TOF/MS (ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa ze spektrometrią mas o ultrawysokiej rozdzielczości pomiaru czasu przelotu) i HPLC-DAD (wysokosprawna chromatografia cieczowa z detektorem diodowym) oceniano jakościowy skład i oznaczano zawartość: glikozydów fenylopropanoidowych, kwasów fenolowych, irydoidów i flawonoidów. Metodą spektrofotometryczną (Folin–Ciocalteu) oznaczono całkowitą zawartość polifenoli.

W ramach optymalizacji składu podłoży hodowlanych przeprowadzonych na kalusowych kulturach *in vitro V. officinalis* przetestowano 12 wariantów podłoża Murashige i Skoog (MS) zawierających różne jakościowo kombinacje i różne stężenia (0,5-3,0 mg/l) auksyn (kwasu 3-indolilomasłowego – IBA i kwasu 1-naftylooctowego – NAA) i cytokinin (6-benzyloadeniny – BA i kinetyny – KIN) zarówno w obecności białego światła fluorescencyjnego, jak i w ciemności. Wyniki tych badań pozwoliły na wytypowanie wariantu podłoża MS zawierającego 1 mg/l BA i 1 mg/l IBA, które najbardziej sprzyjało przyrostom biomasy (5,4-krotne przyrosty w trakcie 4-tygodniowych cykli hodowlanych) i było równocześnie dobrym podłożem produkcyjnym (zawartość werbaskozydu – 2,45 g/100g s.m.). Podłoże to wykorzystywano w kolejnych etapach eksperymentów nad optymalizacją warunków prowadzenia kultur *in vitro*.

W ramach optymalizacji warunków świetlnych testowano światła LED – czerwone, niebieskie i kombinację światła czerwonego z niebieskim (70%/30%), ciemność i światło białe fluorescencyjne (warunki kontrolne). Hodowle prowadzono w cyklach 2, 3 i 4-tygodniowych. Wyniki tych badań udowodniły, że światło niebieskie oraz kombinacja światła czerwonego z niebieskiem sprzyjają akumulacji glikozydów fenylopropanoidowych (werbaskozydu i izowerbaskozydu), w tym szczególnie werbaskozydu (odpowiednio 6715,57 mg/100g s.m. – światło niebieskie, 6022,63 mg/100g s.m. –

kombinacja światła czerwonego i niebieskiego). Najbardziej korzystne dla akumulacji werbaskozydu i izowerbaskozydu okazały się 4-tygodniowe cykle hodowlane.

Kolejny etap badań dotyczył wpływu typu prowadzonych kultur kalusowych (kultury agarowe, zawiesinowe i bioreaktorowe) i kultur mikropędowych (kultury agarowe, płynne stacjonarne, wytrząsane i bioreaktorowe) na produkcję badanych związków.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono ekstremalnie wysoką zawartość werbaskozydu w ekstraktach z kultur kalusowych, w tym szczególnie w ekstraktach z kultur hodowanych w bioreaktorze STB na wariancie podłoża MS zawierającym 1 mg/l BA i 1 mg/l IBA, w czasie 2-tygodniowego okresu wzrostu (9176,87 mg/100g s.m.). W kulturach mikropędowych ilości werbaskozydu były niższe. Najwyższą zawartość tego związku stwierdzono w mikropędowych kulturach wytrząsanych hodowanych na podłożu Schenka i Hildebrandta (SH) zawierającym 2 mg/l 6-(γ,γ-dimetyloalliloamino)-puryny (2iP) i 0,22 mg/l tidiazuronu (TDZ) (4881,61 mg/100g s.m.).

Uzyskano również wysokie zawartości izowerbaskozydu – maks. 609,26 mg/100g s.m. w agarowych kulturach kalusowych (hodowanych na podłożu MS z dodatkiem 1 mg/l BA i 1 mg/l IBA). W kulturach mikropędowych maksymalna zawartość izowerbaskozydu (451,80 mg/100g s.m.) została uzyskana w kulturach wytrząsanych (hodowanych na podłożu SH zawierającym 2 mg/l 2iP i 0,22 mg/l TDZ). Specyficzna produktywność werbaskozydu była wysoka i wynosiła maks. 120,49 mg/l/dzień, natomiast dla izowerbaskozydu była dużo niższa i wynosiła maks. 10,13 mg/l/dzień.

Kwasy fenolowe w badanych kulturach akumulowane były w wielokrotnie niższych ilościach: kwas rozmarynowy (maks. 26,34 mg/100g s.m. – kultury zawiesinowe), kwas ferulowy (maks. 23,69 mg/100g s.m. – wytrząsane kultury mikropędowe), kwas protokatechowy (maks. 10,64 mg/100g s.m. – kultury zawiesinowe). Zawartości kwasu chlorogenowego, kawowego i wanilinowego nie przekraczały 5 mg/100g s.m.

W ekstraktach z ziela *V. officinalis* zawartości oznaczanych związków były następujące: werbaskozyd – 1728,97 mg/100g s.m., izowerbaskozyd – 78,34 mg/100g s.m., kwas ferulowy – 29,76 mg/100g s.m., kwas protokatechowy – 25,75 mg/100g s.m. i kwas rozmarynowy – 2,53 mg/100g s.m. W ekstraktach z ziela stwierdzono ponadto obecność 2 irydoidów – werbenaliny (4210,88 mg/100g s.m.) i hastatozydu (398,87 mg/100g s.m.) oraz 2 flawonoidów – skutelaryny (172,13 mg/100g s.m.) i 7-glukuronidu apigeniny (41,77 mg/100g s.m.). Wymienionych irydoidów oraz flawonoidów nie stwierdzono w ekstraktach z kultur *in vitro*. Natomiast w ekstraktach z ziela, jak i w ekstraktach z mikropędów (kultury agarowe) metodą UHPLC-hr-q-TOF/MS potwierdzono obecność innych glikozydów fenylopropanoidowych – leukoseptozydu A i cistanozydu D oraz ich izomerów.

W biomasie z kultur mikropędowych (agarowych oraz bioreaktorowych prowadzonych w bioreaktorach RITA® oraz w innym typie bioreaktorów okresowo zalewowych – w bioreaktorach Plantform), a także w zielu rośliny gruntowej oceniono jakościowy skład olejku oraz przeprowadzono oznaczenia jego zawartości metodą chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC/FID) i metodą chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC/MS). Najwyższe ilości olejku,

porównywalne z jego zawartością w zielu (około 8 g/kg s.m.) uzyskano z mikropędów hodowanych przez 56 dni w bioreaktorze Plantform. Dominującymi ilościowo związkami wchodzącymi w skład olejku eterycznego z biomasy z kultur mikropędowych były: 1-okten-3-ol (maks. 57,7%), alkohol benzylowy (maks. 8,5%), alkohol fenyloetylowy (maks. 11,4%), kumaran (maks. 19,3%) i kwas heksadekanowy (maks. 22,4%). Głównymi związkami w olejku pozyskanym z ziela były: kwas heksadekanowy, linalol, anetol, karwon, kamfora, estragol, kumaran, α-terpineol, fiton i izomenton.

W ramach pracy przeprowadzono również szerokie badania aktywności biologicznej ekstraktów z badanych kultur *in vitro* oraz z ziela rośliny gruntowej. Objęły one badania aktywności antyoksydacyjnej, antyproliferacyjnej, cytotoksyczności oraz badania przeciwbakteryjne. Badania aktywności antyoksydacyjnej przeprowadzono wykorzystując pięć różnych metod: CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity) oraz QUENCHER-CUPRAC (‘QUick, Easy, New, CHEap and Reproducible), test DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), oznaczenie właściwości redukujących Fe^{3+} oraz oznaczenie aktywności chelatującej ekstraktów.

Metodami CUPRAC i QUENCHER-CUPRAC zbadano potencjał antyoksydacyjny ekstraktów z agarowych kultur kalusowych i zawiesinowych oraz z ziela. Aktywność antyoksydacyjna ekstraktów z biomasy, uzyskana w obu badanych typach kultur (kultury kalusowe – 44,0 mmol TE/100g s.m., kultury zawiesinowe – 49,7 mmol TE/100g s.m.) była ponad dwukrotnie wyższa niż w przypadku ziela (20,9 mmol TE/100g s.m.). Ogólna aktywność antyoksydacyjna biomasy kultur kalusowych oznaczona metodą QUENCHER-CUPRAC uwzględniająca antyoksydanty uwięzione w matrycy próbki (64,0 mmol TE/100g s.m.) była dwukrotnie wyższa niż w przypadku kultur zawiesinowych (32,1 mmol TE/100g s.m.), ale mniejsza niż w zielu (97,8 mmol TE/100g s.m.).

Badaniom aktywności antyoksydacyjnej trzema innymi metodami (test DPPH, oznaczenie właściwości redukujących Fe^{3+}, aktywność chelatująca ekstraktów) poddano ekstrakty z biomasy kultur kalusowych (kultury agarowe, zawiesinowe i bioreaktorowe prowadzone w bioreaktorze STB) oraz ekstrakty z kultur mikropędowych (kultury agarowe, płynne stacjonarne, wytrząsane i bioreaktorowe prowadzone w bioreaktorze RITA®).

W teście DPPH wszystkie ekstrakty wykazały silną zdolność redukcji wolnych rodników. Ekstrakt z agarowych kultur kalusowych (IC50 = 0,22 mg/ml) miał aktywność zbliżoną do aktywności ekstraktu z ziela (IC50 = 0,21 mg/ml). Ekstrakty z pozostałych typów kultur *in vitro* (kalusowych i mikropędowych, z wyjątkiem wytrząsanych kultur mikropędowych) miały większą aktywność (IC50 = 0,08 - 0,18 mg/ml), niż ekstrakty z ziela. Ekstrakty z kultur wytrząsanych mikropędów (IC50 = 0,31 mg/ml) wykazywały najsłabszą aktywność.

Oznaczenia właściwości redukujących Fe^{3+} wykazały, że aktywność ekstraktów z dwóch typów kultur mikropędowych: agarowych (4,22 ASE/ml) i płynnych stacjonarnych (3,05 ASE/ml) była wyższa niż ekstraktów z ziela (2,80 ASE/ml). Pozostałe badane ekstrakty z różnych typów kultur *in vitro* (kalusowych i mikropędowych) miały slabsze właściwości redukujące (1,76 - 2,68 ASE/ml).

Aktywność chelatująca jony Fe^{2+} ekstraktów ze wszystkich badanych kultur *in vitro* była wyższa (IC50 = 0,03 - 1,03 mg/ml) niż ekstraktów z ziela (IC50 = 1,69 mg/ml). Najsilniejszą aktywność stwierdzono dla ekstraktów z kultur mikropędowych prowadzonych w bioreaktorach RITA®.

Badaniom aktywności cytotoksycznej i antyproliferacyjnej poddano ekstrakty z różnych typów kultur kalusowych: z kultur agarowych, zawiesinowych i bioreaktorowych prowadzonych w bioreaktorze STB oraz ekstrakty z ziela. Cytotoksyczność badano oznaczając toksyczność ekstraktów w stosunku do *Artemia salina.* Ekstrakty z biomasy kultur kalusowych (LC50 = 698,67 µg/ml) i zawiesinowych (LC50 = 479,34 µg/ml) wykazały niską toksyczność, podczas gdy ekstrakty z biomasy z kultur bioreaktorowych były umiarkowanie toksyczne (LC50 = 187 µg/ml). Aktywność antyproliferacyjną w stosunku do linii komórek ludzkiego nerwiaka zarodkowego SH-SY5Y wykazały wszystkie badane ekstrakty. Zarówno ekstrakty z ziela, jak i z biomasy kultur bioreaktorowych (bioreaktory STB) znacząco zmniejszały żywotność komórek (o ponad 70%) przy stężeniu 500 µg/ml po 24 godzinach. Ekstrakt z kultur bioreaktorowych wykazał najniższą wartość IC50 – 240,6 µg/ml po 72 godzinach, a ekstrakt z ziela po tym samym czasie uzyskał wartość IC50 równą 275,1 µg/ml. Dla ekstraktów z kultur kalusowych i zawiesinowych wartości IC50 po 72 godzinach wynosiły odpowiednio 454,7 µg/ml i 419,9 µg/ml.

Badaniom aktywności przeciwbakteryjnej (4 szczepy bakterii Gram-dodatnich i 8 szczepów bakterii Gram-ujemnych) poddano ekstrakty z różnych typów kultur kalusowych (kultury agarowe, zawiesinowe i bioreaktorowe prowadzone w bioreaktorze STB) oraz ekstrakty z kultur mikropędowych (kultury agarowe, płynne stacjonarne, wytrząsane i bioreaktorowe prowadzone w bioreaktorze RITA®). Ekstrakty z biomas wszystkich badanych typów kultur kalusowych i mikropędowych wykazywały działanie przeciwbakteryjne w stosunku do badanych szczepów bakterii. Badane ekstrakty wykazały silniejszą aktywność bakteriostatyczną przeciwko bakteriom Gram-dodatnim i niższą w stosunku do bakterii Gram-ujemnych. Najbardziej wrażliwe na działanie ekstraktów były szczepy: *Y. enterocolitica, K. pneumoniae* oraz *S. epidermidis*.

Uzyskane wyniki badań biotechnologicznych, fitochemicznych i aktywności biologicznej mają nie tylko charakter poznawczy, ale również aplikacyjny. Udowodniły one wysoki potencjał biosyntetyczny komórek z kultur *in vitro V. officinalis* wyraźnie ukierunkowany głównie na produkcję glikozydów fenylopropanoidowych – werbaskozydu i izowerbaskozydu. Uzyskane wyniki pozwalają na zaproponowanie kultur *in vitro* tego gatunku, jako potencjalnego, biotechnologicznego źródła pozyskiwania tych bioaktywnych związków o silnych właściwościach antyoksydacyjnych. Najbogatszym źródłem tych związków są kultury niezróżnicowane szczególnie te prowadzone w bioreaktorze STB. Sumaryczna zawartość obu glikozydów fenylopropanoidowych w bioreaktorach STB jest imponująca (9516,79 mg/100g s.m.). Z kolei kultury mikropędowe *V. officinalis* prowadzone w bioreaktorach Plantform można zaproponować jako bogate źródło pozyskiwania olejku eterycznego (zawartość porównywalna z zawartością w zielu ok. 8 g/kg s.m.).

Dobrze rosnącą w warunkach *in vitro* niezróżnicowaną biomasę i/lub mikropędy *V. officinalis* z kultur bioreaktorowych (prowadzonych w bioreaktorach STB i/lub Plantform) można będzie zaproponować do wykorzystania w przyszłości zarówno w celach farmaceutycznych, prozdrowotnych (w produkcji „healthy food"), jak i w fitokosmetologii. Dobrze rosnące kultury *in vitro* (zarówno kalusowe, jak i mikropędowe) posiadają, bowiem silne właściwości antyoksydacyjne, istotne zarówno w terapii, prewencji licznych chorób cywilizacyjnych, jak i w kosmetologii.

Rezultaty prac eksperymentalnych przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej zostały opublikowane w 6 publikacjach eksperymentalnych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Cząstkowe wyniki badań zaprezentowano na konferencjach międzynarodowych w formie posterów (10) i jednego wystąpienia ustnego oraz na konferencjach krajowych w formie wystąpień posterowych (3) i ustnych (3). Ponadto, w celu usystematyzowania i poszerzenia wiedzy dotyczącej *V. officinalis*, opublikowana została anglojęzyczna publikacja przeglądowa oraz 2 prace w języku polskim przedstawiające walory terapeutyczne, prozdrowotne i kosmetyczne tego gatunku.

SUMMARY

The research object were *in vitro* cultures of *Verbena officinalis* L. - common vervain. *V. officinalis* is a cosmopolitan species of the family *Verbenaceae*. It is common in the majority of climate zones, on different continents (in Europe, Asia, North and South America and in Africa). The herb of *V. officinalis* is a therapeutic raw material used in traditional European, North American and Traditional Chinese Medicine (TCM) since a long time. This raw material was introduced to the official European medicine in 2008. The monograph on the raw material ("Verbena herb") has been present in the European Pharmacopoeia (since the 6th issue) and in the Polish Pharmacopoeia (beginning from its VIII issue). In the latest editions of these documents (European Pharmacopoeia 10th and Polish Pharmacopoeia XII) the monograph remains in an unchanged form.

The herb of *V. officinalis* has a rich chemical composition. Its main components are: iridoid glycosides (i.a. verbenalin, hastatoside), phenylpropanoid glycosides (i.a. verbascoside, isoverbascoside), phenolic acids (i.a. ferulic, protocatechuic, rosmarinic acid), flavonoids (i.a. kaempferol, luteolin), essential oil and bioelements (Na, K, P, Ca, Mg, Zn, Fe, Mn, Cu). The latest scientific research has confirmed numerous biological properties of extracts from this raw material: antioxidative, antimicrobial (antibacterial and antifungal), anti-inflammatory, anticancer, analgesic, anxiolytic, sedative, improving sleep quality, antiseizure, neuroprotective, antidepressant and gastroprotective. *V. officinalis* is also a valuable source of cosmetic materials, approved by the European Commission for use in the production of phytocosmetics. These raw materials (as many as eleven) are listed in the CosIng (Cosmetic Ingredient Database) developed by the European Commission.

Moreover, since 2010 the verbena herb, having received a positive scientific opinion of EFSA (European Food Safety Authority) has been approved for use for health-promoting purposes. This opinion indicates that verbena herb can protect cells and tissues against damage caused by oxidative stress, and increase the physiological resistance of the organism.

The main objective of the study was initiation of *in vitro* cultures of *V. officinalis* and studies concerning the capacity of the biomass to accumulate bioactive compounds.

This PhD work included three research fields: biotechnological and phytochemical studies and investigation on the bioactivity of extracts from *in vitro* biomass and for comparative purposes from herb of a soil-grown plant.

Within the study, *in vitro* cultures with different level of organogenesis (callus cultures and microshoot cultures) were successfully initiated. A series of tests were conducted related to the optimization of conditions for the conduct of *in vitro* cultures. These included selection of the basic composition of the culture medium, qualitative and quantitative selection of plant growth regulators (PGRs), duration of culture cycles (2, 3, 4-weeks culture cycles), light conditions for the cultures (light from electroluminescent diodes – LED: blue, red light and combination of red and blue light (70%/30%), darkness and white fluorescent light), as well as types of cultures.

Different types of callus cultures were maintained: agar, suspension and bioreactor cultures in two types of bioreactors (balloon bioreactor - BB and stirred tank bioreactor - STB) and different types of microshoot cultures: agar, stationary liquid, agitated and bioreactor cultures (RITA® and Plantform temporary immersion bioreactors).

The study aimed at obtaining high biomass growth and high production of selected secondary metabolites.

In the extracts from *in vitro* biomass in the tested *in vitro* culture types and in extracts from the herb of soil-grown plant, chromatographic methods: UHPLC-hr-q-TOF/MS (ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry) and HPLC-DAD (high-performance liquid chromatography-diode-array detector) were used to determine content of: phenylpropanoid glycosides, phenolic acids, iridoids and flavonoids. A spectrophotometry method (Folin–Ciocalteu) was used to determine the total content of polyphenols.

Within the optimization of the composition of culture media, 12 variants of the Murashige and Skoog (MS) medium containing qualitatively different combinations and concentrations (0.5-3.0 mg/l) of auxins (indole-3-butyric acid and – IBA and 1-naphthaleneacetic acid – NAA) as well as cytokinins (6-benzyladenine – BA and kinetin – KIN) were tested in the conditions of continuous artificial fluorescent light, as well as in darkness. Results of this research enabled selecting the MS medium containing 1 mg/l BA and 1 mg/l IBA, which was the most favorable for biomass growth (5.4-fold growth increase during 4-week culture cycles) and it was at the same time a good production medium (verbascoside content – 2.45 g/100g d.w.). This medium was used in the subsequent stages of optimization of *in vitro* culture conditions.

As part of the optimization of light conditions, LED lights– red, blue and a combination thereof (70%/30%) were tested, darkness and white fluorescent light (control conditions). The culture was maintained in 2, 3 and 4-week cycles. Results of these studies provided evidence that blue and the combination of red and blue light favor accumulation of phenylpropanoid glycosides (verbascoside and isoverbascoside), and in particular verbascoside (respectively: 6715.57 mg/100g d.w. – blue light, 6022.63 mg/100g d.w. – combination of red and blue lights). 4-week culture cycles turned out to be most favorable for the accumulation of verbascoside and isoverbascoside.

The next stage of the studies concerned the influence of the type of callus cultures (agar, suspension and bioreactor cultures) and microshoot cultures (agar, liquid stationary, agitated and bioreactor cultures) on the production of the tested compounds.

Based on the obtained results, extremely high content of verbascoside was found in the extracts from callus cultures, in particular from extracts of cultures from STB bioreactor on the MS medium variant containing 1 mg/l BA and 1 mg/l IBA, during 2-weeks growth period (9176.87 g/100g d.w.). The amounts of verbascoside found in microshoot cultures were lower. The highest content of this compound was determined in agitated microshoot cultures maintained on Schenk and Hildebrandt (SH)

medium containing 2 mg/l 6-(γ,γ-dimethylallylamino) purine (2iP) and 0.22 mg/l of thidiazuron (TDZ) (4881.61 mg/100g d.w.).

High content was also determined for isoverbascoside: max. 609.26 mg/100g d.w. in agar callus cultures on MS medium with addition of 1 mg/l BA and 1 mg/l IBA. In microshoot cultures the maximum content of isoverbascoside (451.80 mg/100g d.w.) was obtained from agitated cultures maintained on SH medium containing 2 mg/l 2iP and 0.22 mg/l TDZ. Specific productivity of verbascoside was high (max. 120.49 mg/l/day) whereas the amount of isoverbascoside was much lower (max. 10.13 mg/l/day).

Phenolic acids were accumulated in the tested cultures in much lower quantities: rosmarinic acid (max. 26.34 mg/100g d.w. – suspension cultures), ferulic acid (max. 23.69 mg/100g d.w. – aditated microshoot cultures), protocatechuic acid (max. 10.64 mg/100g d.w. – suspension cultures). Amounts of chlorogenic, caffeic and vanillic acids did not exceed 5 mg/100g d.w.

In the herb extracts the concentrations of determined compounds were as follows: verbascoside – 1728.97 mg/100g d.w., isoverbascoside – 78.34 mg/100g d.w., ferulic acid – 29.76 mg/100g d.w., protocatechuic acid – 25.75 mg/100g d.w. and rosmarinic acid – 2.53 mg/100g d.w. The herb extracts contained 2 iridoids – verbenalin (4210.88 mg/100g d.w.) and hastatoside (398.87 mg/100g d.w.) and 2 flavonoids – scutelarin (172.13 mg/100g d.w.) and apigenin 7-glucuronide (41.77 mg/100g d.w.). These iridoids and flavonoids were not found in *in vitro* culture extracts. In soil-grown plant extract and microshoot cultures extracts two other phenylpropanoid glycosides – leucoseptoside A and cistanoside D and their isomers were confirmed using UHPLC-hr-q-TOF/MS method.

The biomass of microshoot cultures (agar and bioreactor cultures maintained in RITA® bioreactors and in a different temporary immersion bioreactor type – in Plantform bioreactors), as well as the herb of soil-grown plant were analyzed for the content and composition of essential oil using gas chromatography with flame ionization detector (GC/FID) and gas chromatography with mass spectrometry (GC/MS) methods. The highest content of the essential oil, comparable with its content in the herb (approximately 8 g/kg d.w.) were obtained from microshoots cultured for 56 days in a Plantform bioreactor. The compounds predominant in the quantitative composition of the essential oil from microshoot cultures biomass were: 1-octen-3-ol (max. 57.7%), benzyl alcohol (max. 8.5%), phenylethyl alcohol (max. 11.4%), coumaran (max. 19.3%) and hexadecanoic acid (max. 22.4%). The main compounds in the oil obtained from herb were: hexadecanoic acid, linalool, anethole, carvone, camphor, estragol, coumaran, α-terpineol, fiton and isomenthone.

Within this work, comprehensive studies were carried out on the biological activities of the tested extracts from *in vitro* cultures and from herb of soil-grown plant. They included the investigation of antioxidant, antiproliferative, cytotoxicity and antibacterial activities. The antioxidant activity testing was performed using five different methods: CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity) and QUENCHER-CUPRAC (‘QUick, Easy, New, CHEap and Reproducible), DPPH test

(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), Fe^{3+} reducing activity and chelating activity of the extracts was determined.

The CUPRAC and QUENCHER-CUPRAC methods were used to investigate the antioxidative potential of callus and suspension cultures and from herb. The antioxidant activity of biomass extracts obtained in both tested culture types (callus – 44.0 mmol TE/100g d.w., suspension – 49.7 mmol TE/100g d.w.) was over twofold higher than for herb (20.9 mmol TE/100g d.w.). The total antioxidant activity of callus culture biomass determined with QUENCHER-CUPRAC method including antioxidants trapped in the sample matrix (64.0 mmol TE/100g d.w.) was twofold higher than for suspension cultures (32.1 mmol TE/100g d.w.), but lower than for the herb (97.8 mmol TE/100g d.w.).

Antioxidant activity testing (DPPH test, reducing activity, chelating activity) included extracts from callus culture biomass (agar, suspension and STB bioreactor cultures) and microshoot culture extracts (agar, stationary liquid agitated cultures and cultures maintained in RITA® bioreactor).

In DPPH test all extracts exhibited strong free radicals scavenging activity. Extract from agar callus cultures (IC50 = 2.22 mg/ml) had activity similar to the activity of herb extract (IC50 = 2.21 mg/ml). Extracts of the remaining *in vitro* cultures types (callus and microshoot cultures, with the exception of agitated microshoot cultures), showed higher activity (IC50 = from 0.08 to 0.18 mg/ml), than herb extracts. Extracts from agitated microshoot cultures (IC50 = 0.31 mg/ml) had the lowest activity.

Results of the Fe^{3+} reducing activity showed that the activity of extracts from two types of microshoot cultures: agar (4.22 ASE/ml) and stationary liquid (3.05 ASE/ml) were higher than extracts from the herb (2.80 ASE/ml). The remaining tested extracts from different types of *in vitro* cultures (callus and microshoot) had lower reducing activity (from 1.76 to 2.68 ASE/ml).

The Fe^{2+} ion chelating activity of extracts from all tested *in vitro* cultures was higher (IC50 = from 0.03 to 1.03 mg/ml) than from the herb (IC50 = 1.69 mg/ml). The highest activity was determined for extracts of microshoot cultures maintained in RITA® bioreactors.

The extracts from different types of callus cultures: agar, suspension and STB bioreactor cultures as well as the herb extracts were tested for cytotoxic and antiproliferative activities. Cytotoxicity was tested by determining toxicity of the extracts against *Artemia salina.* Callus biomass extracts (LC50 = 698.67 μg/ml) and suspension extracts (LC50 = 479.34 μg/ml) exhibited low toxicity, whereas bioreactor culture extracts were moderately toxic (LC50 = 187 μg/ml). Antiproliferative activity was tested on human neuroblastoma cell line SH-SY5Y and it was exhibited by all tested extracts. Both, herb and bioreactor culture extracts (STB bioreactors) significantly reduced cell viability (by over 70%) at the concentration of 500 μg/ml after 24 hours. Extract from bioreactor cultures exhibited the lowest IC50 value – 240.6 μg/ml after 72 hours, and herb extract reached the IC50 value of 275.1 μg/ml after the same time. For extracts from callus and suspension cultures the IC50 values after 72 hours were 454.7 μg/ml and 419.9 μg/ml, respectively.

The extracts from different types of callus cultures (agar, suspension and STB bioreactor cultures) and extracts from microshoot cultures (agar, stationary liquid, agitated and RITA® bioreactor cultures) were studied for antibacterial activities (against 4 Gram-positive and 8 Gram-negative bacteria strains). All extracts from biomass of all tested callus and microshoot cultures exhibited antibacterial action towards the tested bacterial strains. The tested extracts exhibited stronger bacteriostatic activity towards Gram-positive and lower towards Gram-negative bacteria. The highest sensitivity to the extracts were observed for: *Y. enterocolitica*, *K. pneumoniae* and *S. epidermidis* strains.

The obtained results of biotechnological and phytochemical investigations feature have not only cognitive but also application character. They have provided evidence for the biosynthetic potential of cells from *in vitro* cultures of *V. officinalis* clearly targeting the production of phenylpropanoid glycosides - verbascoside and isoverbascoside. The obtained results enable the proposition of *in vitro* cultures of this species as a potential biotechnological source for these bioactive compounds with strong antioxidative properties. The richest source of these compounds are undifferentiated cultures maintained in an STB bioreactor. The total content of these compounds is impressive (9176.87 mg/100g d.w.). On the other hand, the microshoot cultures of *V. officinalis* maintained in Plantform bioreactors can be proposed as a rich source of essential oil (concentration comparable to the content in herb, approx. 8 g/kg d.w.).

An undifferentiated biomass and/or microshoots growing well under *in vitro* conditions from the aforementioned bioreactor cultures (maintained in STB and/or Plantform bioreactors) may be proposed for future use in pharmaceutical, health-promoting (healthy food production) as well as phytocosmetology purposes. Fast growing *in vitro* cultures (both callus and microshoot) possess strong antioxidative properties, significant for therapy, prevention of numerous civilization diseases, as well in cosmetology.

Results of the experimental works carried out within the doctoral thesis were published in 6 experimental publications in international journals. The partial study results were presented at international conferences in the form of posters (10) and one oral presentation and at national conferences in the form of posters (3) and oral presentations (3). Moreover, in order to systematize and expand the knowledge regarding *V. officinalis*, a review publication in English, as well as 2 papers in Polish presenting the therapeutic and cosmetic benefits of this species were published.