UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum w Bydgoszczy

mgr farm. Filip Oskar Graczyk

Analiza farmakognostyczno-chemiczna i fitofarmakologiczna owoców *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. jako nowego surowca adaptogennego

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne

Promotor:
dr hab. n. farm. Daniel Załuski, prof. UMK

Bydgoszcz 2023 r.

Składam najserdeczniejsze podziękowania mojemu Promotorowi,
panu dr hab. n. farm. Danielowi Załuskiemu, prof. UMK
za opiekę naukową, cenne uwagi merytoryczne, pomoc i cierpliwość.

Dziękuję wszystkim pozostałym współautorom publikacji,
za współpracę podczas realizacji badań.

Dziękuję również pracownikom
Katedry Botaniki Farmaceutycznej i Farmakognozji
za pomoc, życzliwość i przyjazną atmosferę w pracy.

Moim Rodzicom i Bliskim
za motywację, wsparcie i wiarę,
szczególnie wtedy, kiedy sam przestawałem w siebie wierzyć,
dziękuję.

1. SPIS TREŚCI

1. SPIS TREŚCI 3

2. LISTA PUBLIKACJI BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY DOKTORSKIEJ 6

3. WYKSZTAŁCENIE ORAZ FORMY AKTYWNOŚCI NAUKOWO-BADAWCZEJ 7

4. WSTĘP 10

5. CZĘŚĆ TEORETYCZNA 12

5.1. Charakterystyka botaniczna *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. 12

5.2. Charakterystyka fitochemiczno-farmakologiczna *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. 16

6. CEL PRACY 21

7. BADANIA WŁASNE 22

7.1. Materiał roślinny 22

7.2. Ekstrakcja surowców - metody 22

7.3. Ekstrakcja ciecz-ciecz polifenoli z intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus* 23

7.4. Analiza farmakognostyczna owoców *Eleutherococcus senticosus* – analiza mikroskopowa 24

7.5. Analiza fitochemiczna owoców *Eleutherococcus senticosus* 25

7.5.1. Analiza HPLC–PDA eleuterozydów B, E i E1 25

7.5.2. Analiza HPLC–PDA kwasów fenolowych 25

7.5.3. Analiza HS–SPME/GC–MS związków lotnych 26

7.5.4. Izolacja oleju z owoców *Eleutherococcus senticosus* i przygotowanie próbek 27

7.5.5. Analiza HPLC–PDA kwasu ursolowego i tokoferoli w oleju z owoców *Eleutherococcus senticosus* 27

7.5.6. Analiza GC-MS kwasów tłuszczowych w oleju z owoców *Eleutherococcus senticosus* 28

7.6. Analiza fitochemiczna intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus* 29

7.6.1. Profilowanie związków fenolowych w intrakcie z owoców *Eleutherococcus senticosus* z wykorzystaniem HPLC-PDA 29

7.6.2. Profilowanie metabolomiczne cukrów w intrakcie z owoców *Eleutherococcus senticosus* stosując HPLC-RID 29

7.6.3. Całkowita zawartość polifenoli (TPC) w intrakcie z owoców *Eleutherococcus senticosus* 30

7.6.4. Całkowita zawartość flawonoidów (TFC) w intrakcie z owoców *Eleutherococcus senticosus* 30

7.6.5. Całkowita zawartość kwasów fenolowych (TPAC) w intrakcie z owoców *Eleutherococcus senticosus* 31

7.7. Analiza fitofarmakologiczna intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus* 32

7.7.1. Przygotowanie roztworów intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus* do testów cytotoksycznych 32
7.7.2. Oznaczenie stężenia cytotoksycznego CC_{50} intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus* 32
7.7.3. Aktywność wirusobójcza intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus* i eleuterozydów B i E 33
7.7.4. Test proliferacji leukocytów krwi obwodowej stymulowanych intraktem z owoców *Eleutherococcus senticosus* 33
7.7.5. Oznaczenie stężenia cytokin w komórkach PBL stymulowanych intraktem z owoców Eleutherococcus senticosus 34
7.7.6. Ocena wzbudzenia odporności wrodzonej komórek PBL przez intrakt z owoców *Eleutherococcus senticosus* 35
7.7.7. Analiza właściwości antyoksydacyjnych intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus* z wykorzystaniem ABTS 35
7.7.8. Analiza właściwości antyoksydacyjnych intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus* z wykorzystaniem DPPH 36
7.7.9. Analiza zdolności chelatujących intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus* z wykorzystaniem ferrozyny 36
7.7.10. Ocena inhibicji tyrozynazy przez intrakt z owoców *Eleutherococcus senticosus* 37
7.7.11. Ocena inhibicji hialuronidazy przez intrakt z owoców *Eleutherococcus senticosus* 37
7.7.12. Ocena inhibicji acetylocholinoesterazy przez intrakt z owoców *Eleutherococcus senticosus* 38
7.7.13. Analiza cytotoksyczności intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus* 39
8. ANALIZA STATYSTYCZNA 40
9. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ I DYSKUSJA 43
9.1. Analiza farmakognostyczna owoców *Eleutherococcus senticosus* – analiza mikroskopowa 43
9.2. Analiza fitochemiczna owoców *Eleutherococcus senticosus* 45
9.3. Analiza fitochemiczna intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus* 48
9.4. Analiza fitofarmakologiczna intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus* 50
10. WNIOSKI 58
11. PIŚMIENNICTWO 60
12. SPIS RYCIN 69
13. KOPIE PUBLIKACJI BĘDĄCYCH PODSTAWĄ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ 70
PUBLIKACJA P1 71
PUBLIKACJA P2 88
PUBLIKACJA P3 99
14. STRESZCZENIE 117

15. SUMMARY 119

16. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW O UDZIALE W PUBLIKACJI 121

17. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ 139

2. LISTA PUBLIKACJI BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Niniejsza rozprawa doktorska została oparta na cyklu publikacji powiązanych tematycznie, które opublikowano w latach 2021-2022. Łączna wartość Impact Factor wynosi IF=15.049, natomiast sumaryczna liczba punktów MNiSW to 420.

[P1] Graczyk F., Strzemski M., Balcerek M., Kozłowska W., Mazurek B., Karakuła M., Sowa I., Ptaszyńska A. A., Załuski D., Pharmacognostic evaluation and HPLC-PDA and HS-SPME/GC-MS metabolomic profiling of *Eleutherococcus senticosus* fruits. Molecules. 2021 Mar 31; 26(7):1969. doi: 10.3390/molecules26071969. PMID: 33807364; PMCID: PMC8036712.

IF = 4.927; Punkty MNiSW = 140.000.

[P2] Graczyk F., Orzechowska B., Franz D., Strzemski M., Verpoorte R., Załuski D., The intractum from the *Eleutherococcus senticosus* fruits affects the innate immunity in human leukocytes: From the ethnomedicinal use to contemporary evidence-based research. Journal of Ethnopharmacology. 2021 Mar 25; 268:113636. doi: 10.1016/j.jep.2020.113636. PMID: 33271247.

IF = 5.195; Punkty MNiSW = 140.000.

[P3] Graczyk F., Gębalski J., Makuch-Kocka A., Gawenda-Kempczyńska D, Ptaszyńska A. A., Grzyb S., Bogucka-Kocka A., Załuski D., Phenolic profile, antioxidant, anti-enzymatic and cytotoxic activity of the fruits and roots of *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. Molecules. 2022 Aug 30; 27(17):5579. doi: 10.3390/molecules27175579. Z tej publikacji do monocyklu wykorzystano tylko wyniki badań dotyczące intraktu.

IF = 4.927; Punkty MNiSW = 140.000.

3. WYKSZTAŁCENIE ORAZ FORMY AKTYWNOŚCI NAUKOWO-BADAWCZEJ

Wykształcenie:

- **2022 r. -** uzyskanie tytułu **Magistra farmacji**, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Tytuł pracy magisterskiej: *„Identyfikacja eleuterozydów B, E i E1 w owocach Eleutherococcus"*
  Opiekun naukowy: dr hab. n. farm. Daniel Załuski, prof. UMK

- **2019 r. -** uzyskanie tytułu **Magistra analityki medycznej**, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Tytuł pracy magisterskiej: *„Polifenole roślinne jako inhibitory hialuronidazy"*
  Opiekun naukowy: dr hab. n. farm. Daniel Załuski, prof. UMK

Zatrudnienie:

- **2022.09 – obecnie:** Apteka Wracam Do Zdrowia w Solcu Kujawskim – magister farmacji
- **2022.04 – 2022.09**: Apteka Centrum Zdrowia w Gniewkowie – magister farmacji
- **2020.05 – obecnie**: Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
  Katedra Botaniki Farmaceutycznej i Farmakognozji – asystent (grupa pracowników badawczo-dydaktyczna)

Wykaz opublikowanych artykułów niewchodzących w skład rozprawy doktorskiej:

- Gębalski, J., **Graczyk, F**., Załuski, D., Paving the way towards effective plant-based inhibitors of hyaluronidase and tyrosinase: a critical review on a structure–activity relationship. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2022 Apr 26; 37(1), pp. 1120-1195. doi:10.1080/14756366.2022.2061966
  IF= 5.756; Punkty MNiSW= 140

Udział w konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym:

- **Graczyk Filip**, Adamczyk Kuba, Olech M., Abramek J., Pietrzak W., Kuźniewski Rafał, Bogucka-Kocka A., Nowak R., Ptaszyńska A.A., Rapacka-Gackowska Alina, Skalski Tomasz*, Strzemski M., Sowa I., Wójciak-Kosior M., Feldo M., Załuski Daniel, Biological activities of *Eleutherococcus* spp. extracts. Poster.

  6th International Conference and Workshop "Plant: the source of research material". 10-12 September 2019, Lublin-Nałęczów, Poland. Book of abstracts. L. Borkowski, A. Bogucka-Kocka, J. Kocki, I. Sowa.

  Lublin: Lubelskie Towarzystwo Wspierania Nauk Farmaceutycznych, Polska Akademia Nauk Oddział w Lublinie, **10 – 12.09.2019**

- **Graczyk Filip,** Adamczyk Kuba, Kuźniewski Rafał, Piskorska Elżbieta, Orzechowska B., Kaczorowski Piotr, Olszewska-Słonina Dorota, Załuski Daniel.

  Owoce *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. nowym surowcem adaptogennym? Wystąpienie ustne.

  Bonifraterska Konferencja Ziołolecznictwa 2019 "Fitoterapia: Tradycja. Współczesność. Perspektywy rozwoju". Warszawa, **29 listopada 2019 r.**

- Kuźniewski Rafał, **Graczyk Filip**, Piskorska Elżbieta, Olszewska-Słonina Dorota, Załuski Daniel, The content of polyphenolic compounds in *Cannabis* stems. Poster.

  6th International Conference and Workshop "Plant: the source of research material". 10-12 September 2019, Lublin-Nałęczów, Poland. Book of abstracts. L. Borkowski, A. Bogucka-Kocka, J. Kocki, I. Sowa.

  Lublin: Lubelskie Towarzystwo Wspierania Nauk Farmaceutycznych, Polska Akademia Nauk Oddział w Lublinie, **10 – 12.09.2019**

Pozostałe formy aktywności naukowo-dydaktycznej:

- **8.11.2022** - Kujawsko-Pomorskie Forum Innowacji, Nauki, Biznesu i Samorządu (FINBiS), konkurs „Liderzy Innowacji Pomorza i Kujaw” (LIPIK) tytuł *Lidera Innowacji Pomorza i Kujaw 2022* w kategorii: Jednostka naukowa/Zespół badawczy za rozwiązanie pod nazwą: Preparaty ograniczające masowe wymieranie pszczół.

- **8.11.2022** - Kujawsko-Pomorskie Forum Innowacji, Nauki, Biznesu i Samorządu (FINBiS), konkurs „Liderzy Innowacji Pomorza i Kujaw" (LIPIK) Nagroda specjalna Jego Magnificencji Rektora UMK w kategorii: *Innowator UMK.*
- **2019 r.** – ukończenie kursu i uzyskanie 5-letniego zezwolenia na uczestnictwo w procedurach na zwierzętach (myszy)
- Prowadzenie zajęć dydaktycznych na kierunku Farmacja (Farmakognozja)
- Opiekun Studenckiego Koła Naukowego Farmakognozji
- Opieka nad studentami w ramach wymiany Erasmus (Turcja, Włochy)

4. WSTĘP

Produkcja nowoczesnych leków pochodzenia naturalnego w dużej mierze opiera się na szerokim wykorzystaniu ekstraktów roślinnych. Jednakże do otrzymania wysokiej jakości ekstraktu, ważna jest jakość użytego do ekstrakcji surowca roślinnego oraz rodzaj i warunki procesu ekstrakcji. Ponadto, istotny wpływ mają warunki uprawy, klimat czy środowisko wzrostu rośliny.

Dlatego też kluczowym elementem procesu pozyskiwania ekstraktów roślinnych jest opracowanie protokołu standaryzacji surowca roślinnego już na etapie uprawy roślin, w oparciu o odpowiednie normy i przepisy legislacyjne. Wszystkie te wymienione aspekty, przekładają się bezpośrednio na uzyskanie wyciągów o wysokiej zawartości wtórnych metabolitów roślinnych, o przewidywanym kierunku działania farmakologicznego. Istotnym faktem, na który także warto zwrócić uwagę, są ekonomiczne korzyści, które wynikają z trafnego doboru optymalnej metody ekstrakcji. To jest szczególnie ważne z punktu widzenia pacjenta i praktycznego zastosowania w farmacji.

Stąd też wynika tak obszerna, kompleksowa analiza fitochemiczna, w przebiegu której ekstrakty oraz ich poszczególne frakcje, poddawane są holistycznej kontroli ilościowo-jakościowej pod względem zawartości wtórnych metabolitów i ich bioaktywności.

Uwzględniając powyższe, w tym kontekście zwrócono uwagę na obecność metabolitów pierwotnych i wtórnych w ekstraktach pozyskanych z owoców *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim., a także na ich aktywność na poziomie farmakologicznym.

Eleutherococcus senticosus (Rupr. et Maxim.) Maxim., to roślina wywodząca się z terenów północno-wschodniej Azji i Rosji. W Polsce występuje w ogrodach botanicznych stanowiąc składnik kolekcji, np. Narodowej Kolekcji *Eleutherococcus* w Arboretum w Rogowie. Jest składnikiem Kolekcji Roślin Adaptogennych wchodzącej w strukturę Ogrodu Roślin Leczniczych i Kosmetycznych, CM UMK. Roślinę cechuje znane już od czasów antycznych działanie lecznicze, które wynika z różnorodnego składu chemicznego.

Identyfikacja fitochemiczna związków czynnych i ich aktywność biologiczna stanowią szerokie pole rozważań naukowych, w kontekście potencjalnie nowych ich zastosowań leczniczych. Istotnym faktem, który także należy podkreślić, jest problem, jaki rodzi wykorzystywanie tradycyjnego surowca jakim jest korzeń, który przekłada się na

alarmujący wzrost zagrożenia wyginięciem tego gatunku. Dlatego ważnym aspektem rozważań dotyczących leczniczych surowców roślinnych, jest poszukiwanie takich, które nie oddziaływają ujemnie na populację samej rośliny.

Szczególne zainteresowania naukowców, ze względu na szeroki zakres biologicznej aktywności, zarówno przeciwzapalnej jak i antyoksydacyjnej, skupiają się na polifenolach roślinnych. Związki te cechują się wielokierunkowym działaniem, co przekłada się na ich potencjalne, nowatorskie zastosowanie w lecznictwie.

Głównymi założeniami cyklu prac, który został przedstawiony do ewaluacji w ramach rozprawy doktorskiej, była ocena cech farmakognostycznych owoców *E. senticosus*, ich składu chemicznego i aktywności farmakologicznej pod kątem przydatności jako nowego surowca adaptogennego.

5. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

5.1. Charakterystyka botaniczna *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.

Domena: *Eukaryota* – organizmy jądrowe

Królestwo: *Plantae* – rośliny

Podkrólestwo: *Virdiplantae* – rośliny zielone

Infrakingdom: *Streptophyta* – rośliny lądowe

Nadgromada: *Embryophyta* – rośliny wyższe

Gromada: *Tracheophyta* – rośliny naczyniowe

Podgromada: *Spermatophytina* – rośliny nasienne

Klasa: *Magnoliopsida* – rośliny dwuliścienne

Nadrząd: *Asteranae* – astrowe

Rząd: *Apiales* – selerowce

Rodzina: *Araliacea*e – araliowate

Rodzaj: *Eleutherococcus* Maxim – eleuterokok

Gatunek: *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. – Eleuterokok kolczasty [1]

Spośród około 40 gatunków należących do rodzaju *Eleutherococcus*, które swoim zasięgiem naturalnego występowania obejmują tereny wschodniej i południowej Azji, Rosji, *Eleutherococcus senticosus*, jest najbardziej znanym przedstawicielem tego rodzaju. Człon „*senticosus*" oznacza „pełen cierni" czy też „pełny barier". Stąd też pochodzenie polskiej nazwy tej rośliny - *Eleuterokok kolczasty*. Gatunek ten jest znany pod wieloma nazwami regionalnymi, takimi jak *Eleuterokokk koljucij, Tahozhnyi koren* (Rosja), *Wu Jia Pi* lub *Ci Wu Jia* (Chiny), *Gokashi* (Japonia), *Taigawurzel* (Niemcy). W literaturze, a także w przemyśle farmaceutycznym, istnieją jednocześnie określenia synonimiczne, z których najpopularniejsze to *Siberian ginseng* – żeń-szeń syberyjski; *Acanthopanax senticosus, Hedera senticosa*. Nomenklatura ta może potencjalnie wskazywać niepoprawnie na zaliczanie *E. senticosus* do innych niż właściwa rodzina [2,3].

Eleutherococcus senticosus głównie spotykany jest w lasach mieszanych lub iglastych, stanowiąc składnik podszytu leśnego, zarośli, zwykle na terenach stanowiących tajgę, do wysokości około 800 m n.p.m. Zasięg występowania *E. senticosus*, to przede wszystkim terytoria Dalekiego Wschodu, głównie północo-wschodnie Chiny, Mandżuria, a także w części rosyjskiej Kraju Ussuryjskiego, na Syberii, w Korei, Japonii. W Polsce, Arboretum w Rogowie posiada w swoich zasobach kolekcję gatunków z rodzaju *Eleutherococcus* [2, 4-7].

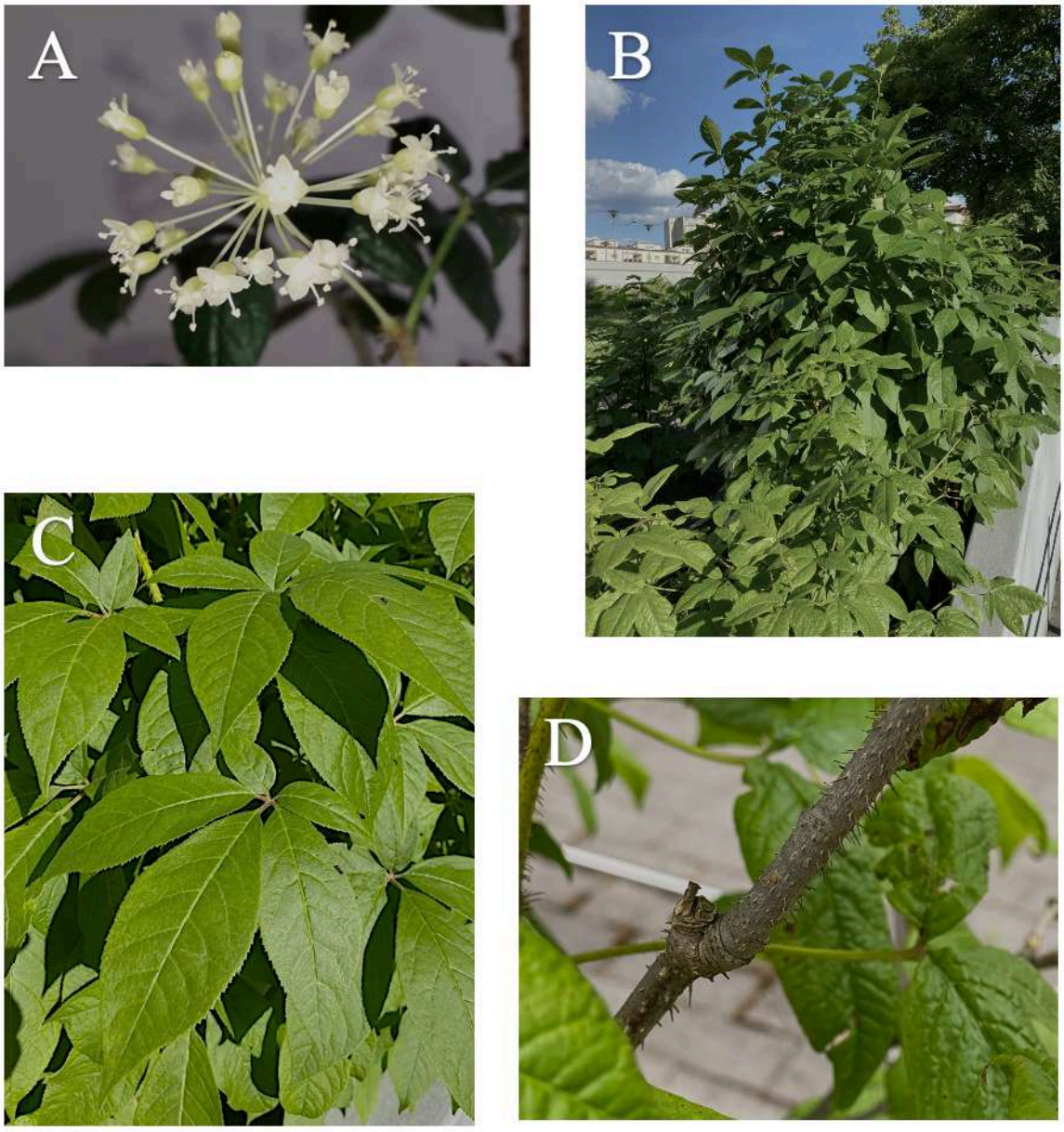
Eleutherococcus senticosus osiąga pokrój średnio 2,5 metra, w szczególnych przypadkach, może osiągać rozmiary do 4 metrów. Korona jest silnie rozgałęziona, wytwarzają kłącza o średnicy 1,5 – 4 cm, włóknistym przełamie, o zabarwieniu od szarego do czerwonobrunatnego, które są płytko umieszczone w podłożu, mogąc wytwarzać drobne rozłogi i korzenie. Cechą charakterystyczną gatunku jest pokrycie jasnoszarą korą z kolcami charakterystycznie skierowanymi skośnie, ku dołowi.

Liść pięciopalczasty, podłużne lub eliptyczno-jajowate listki, z których trzy środkowe są większe od dwóch peryferyjnych, z charakterystycznymi rudawymi włoskami na nerwach, osadzone na 3 – 12 centymetrowych ogonkach. Brzegi listków są podwójnie ostro piłkowane.

Kwiatostan rośliny w postaci wiechy, złożonej z 2 – 6 baldachów, lub też pojedynczego baldachu. *Eleutherococcus senticosus* generuje 3 rodzaje drobnych kwiatów, które w zależności od płciowości, różnią się kolorem: bladofioletowe – męskie lub obupłciowe, żółte – żeńskie. Kwitnienie przypada na okres letni, od czerwca do lipca. Roślina owocuje na przełomie września i października, wydając małe kuliste pestkowce, zawierające od 2 do 5 pestek (Rycina 1-2).

Zbioru owoców, a także surowca farmakopealnego, jakim jest kłącze i korzeń, dokonuje się jesienią, surowiec oczyszcza się, suszy i tnie na kawałki, zgodnie z wymaganiami Farmakopei Polskiej i Farmakopei Europejskiej [2, 8 – 12].

Rycina 1. Budowa morfologiczna owocostanów E. senticosus - fot. F. Graczyk (Ogród Roślin Leczniczych i Kosmetycznych CM UMK, Bydgoszcz, 2021).



Rycina 2. A – budowa morfologiczna kwiatostanów E. senticosus, B - pokrój morfologiczny E. senticosus, C - budowa morfologiczna liścia pięciopalczastego E. senticosus, D - powierzchnia kory E. senticosus, z charakterystycznym pokryciem kolcami - fot. F. Graczyk (Ogród Roślin Leczniczych i Kosmetycznych CM UMK, Bydgoszcz, 2021).

5.2. Charakterystyka fitochemiczno-farmakologiczna *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.

Historia badań *E. senticosus* sięga lat 50. i 60. XX wieku, kiedy radzieccy naukowcy przeprowadzili po raz pierwszy analizy fitochemiczne i farmakologiczne. W późniejszych latach, badania nad rośliną rozpoczęli również naukowcy z Korei, Chin oraz Niemiec. Początkowo skupili się na tradycyjnych surowcach farmakopealnych, jakimi są korzenie i kłącza. Współczesna nauka uwzględnia części nadziemne gatunku, kwiaty czy owoce i ich wykorzystanie jako surowca leczniczego, z pominięciem korzeni i kłączy, których nadmierne wykorzystanie stwarza zagrożenie ekstynkcji gatunku.

Wyniki przeprowadzonych badań fitochemicznych wskazały na obecność w *E. senticosus* chemicznie różnych metabolitów. Najbardziej powszechnymi związkami aktywnymi w *E. senticosus* są związki o charakterze fenolowym, a wśród nich grupa glikozydów zwana eleuterozydami [8, 13, 14].

Eleuterozydy stanowią niejednorodną grupę związków chemicznych, występują głównie w formie glikozydów, które w swojej strukturze zawierają wiązania hemiacetalowe. Część glikonową stanowi D-galaktoza, D-glukoza, L-ramnoza lub L-arabinoza, natomiast ze względu na rodzaj aglikonu, eleuterozydy podzielić można na: pochodne steroli (eleuterozyd A), pochodne fenylopropanów (eleuterozyd B), pochodne kumaryn (eleuterozyd B_1, B_2), pochodne lignanów (eleuterozyd B_4, E, E_1, E_2, D) oraz pochodne kwasów triterpenowych (eleuterozyd I, K, L, M). Spośród nich, eleuterozydy B, B1, C, D, E, F cechuje największa aktynowość biologiczna, w największym stopniu odpowiadają one za działanie farmakologiczne *E. senticosus*. Ponadto, możliwe było wyizolowanie ich w czystej postaci, co przełożyło się na określenie ich dokładnego działania farmakologicznego. Najwyższe stężenie eleuterozydów odnotowano w korzeniach i kłączach rośliny, owoce cechują się niższym stężeniem tych związków [8, 15, 16].

Oprócz wcześniej wspomnianej grupy związków, w surowcach pozyskiwanych z *E. senticosus* zidentyfikowano kwasy fenolowe (kwas kawowy, kwas chlorogenowy), wanilinę, tokoferole, karoteny, flawony, sessilozydy czy glikozydy pochodne lupanu. Wysokie stężenie flawonoidów takich jak kwercetyna i rutyna zaobserwowano w liściach.

Chemiczna różnorodność związków, przekłada się na określone właściwości farmakologiczne *E. senticosus.* Ze względu na nie zaliczany jest do grupy roślin określanej mianem *adaptogenów* [12, 15, 17, 18].

Adaptogeny zostały opisane po raz pierwszy w latach 40. XX wieku jako substancje pochodzenia naturalnego, które cechuje zdefiniowana aktywność farmakologiczna, umożliwiająca organizmowi ludzkiemu zwiększenie przystosowania, adaptacji, do zmieniających się warunków życiowych. W latach 60. XX wieku, definicja ta została poszerzona i rozwinięta, według której roślinę adaptogenną cechuje:

- niespecyficzność działania – adaptogen zwiększa odporność organizmu na działanie niesprzyjających bodźców zewnętrznych (fizycznych, chemicznych, biologicznych),
- brak szkodliwości – substancja adaptogenna nie powinna działać toksycznie na organizm,
- regulacja homeostazy na poziomie komórki, tkanki, organu.

Przykładami roślin adaptogennych są między innymi: *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim., *Panax ginseng* C.A. Meyer (żeń-szeń właściwy), *Rhodiola rosea* L. (różeniec górski), *Schisandra chinensis* L. (cytryniec chiński), *Withania somnifera* (L.) Dunal (witania ospała) [11, 19-21].

Jedną z najdłużej stosowanych roślin adaptogennych w TCM i ludowej medycynie Rosji jest *E. senticosus*. Surowcem leczniczym są kłącza wraz z korzeniami, które zbiera się jesienią. Dane literaturowe donoszą o synergistycznym działaniu zespołu eleuterozydów obecnych w tym gatunku, które uwzględniając aspekty molekularne i biochemiczne, opiera się na kilku mechanizmach.

Pierwszym z nich jest inhibicja aktywności transferazy katecholowej (COMT). Podczas sytuacji stresowych, w organizmie dochodzi do wydzielenia noradrenaliny przez nadnercza, która przy udziale transferazy katecholowej jest przekształcana do nieaktywnej jej formy, normetanefryny. Hamowanie aktywności tego enzymu, przede wszystkim przez eleuterozydy B i E, które jako kompetencyjny inhibitor wpływają ujemnie na aktywność COMT, wpływa na zwiększenie powinowactwa noradrenaliny do receptorów noradrenalinowych w błonach komórkowych.

Kolejny mechanizm opiera się na regulacji syntezy adenozynotrifosforanu (ATP) w komórce poprzez wzrost stężenia glukozo-6-fosforanu (G-6-P). W sytuacjach stresowych, w osoczu krwi powstają kompleksy glikokortykoidów z *β*-lipoproteinami, które zmniejszają transport glukozy (Glu) z osocza przez błonę komórkową do jej wnętrza. W rezultacie dochodzi do hamowania heksokinazy, jednego z enzymów odpowiedzialnych za przemianę Glu do G-6-P w procesie glikolizy. Ekstrakty z *E. senticosus* wpływają na *β*-lipoproteiny, zmniejszając ich powinowactwo do glikokortykoidów, co w efekcie, przekłada się na wzrost aktywności heksokinazy. To z kolei prowadzi do wzrostu poziomu glukozo-6-fosforanu, którego rozkład powoduje uwolnienie energii w formie ATP. Wzrost stężenia ATP w konsekwencji prowadzi do zwiększenia procesów anabolicznych w komórce [22].

Ostatni z mechanizmów zakłada oddziaływanie eleuterozydów na oś przysadka-podwzgórze-nadnercza, która przyczynia się do wzrostu wytwarzania amin katecholowych i glikokortykosteroidów [8, 13, 23].

Wyniki badań naukowych wskazują na przeciwzapalne działanie etanolowych ekstraktów z korzeni *E. senticosus*. Sugeruje się, że hamowanie stanu zapalnego odbywa się poprzez aktywację makrofagów oraz inhibicję syntazy tlenku azotu (iNOS). Ekstrakty hamują kinazę aktywującą czynnik NF- κB, co przekłada się na inhibicję syntazy tlenku azotu, a w konsekwencji na zatrzymanie reakcji stanu zapalnego [24].

Niezwykle istotnym działaniem ekstraktów z *E. senticosus* jest wpływ na wzrost proliferacji limfocytów T i przyśpieszenie ich różnicowania. U podłoża mechanizmu leży interakcja między receptorem TLR (ang. Toll Like Receptor) umiejscowionym w błonie komórkowej limfocytów, a kompleksami polisacharydów w ekstrakcie, które zbudowane są z glukozy, ksylozy, galaktozy, arabinozy. Przyłączenie się kompleksu do receptora TLR aktywuje kaskadę reakcji katalizowanych przez kinazy MAP z udziałem czynnika NF- κB, co w efekcie prowadzi do zwiększenia liczby i przyśpieszenia dojrzewania limfocytów [25].

Od kilku lat w Europie wzrasta zainteresowanie preparatami adaptogennymi zawierającymi w składzie *E. senticosus*. Preparaty te wpływają pozytywnie na proces zapamiętywania i uczenia się, wyciszają stany depresyjne i lękowe, z tego względu polecane jest ich stosowanie w stanach wycieńczenia psychicznego, przemęczenia, rekonwalescencji i zwiększonej pracy umysłowej. Najczęściej rekomendowana dobowa dawka waha się między 0,5 - 4 g suszonego korzenia. Pierwsze rezultaty suplementacji daje się zauważyć po

około 2 tygodniach systematycznego stosowania. W aptekach i sklepach zielarskich, *E. senticosus* może być wydawany w postaci tabletek, kapsułek, nalewek, suszu. W Polsce ekstrakty z *E. senticosus* można spotkać głównie jako składniki suplementów diety, między innymi w takich produktach jak: PharmoVit Żeń-szeń syberyjski, ekstrakt 20:1, Yango Żeń-szeń syberyjski, Swanson Eleuthero, Wish Żeń-szeń syberyjski ekstrakt 400 mg, Panaseus Pamięć bez granic, Olimp Gold Żeń-szeń, ViVita Energia i Ochrona, Herbaya Żeń-szeń syberyjski Adaptogen, USP Zdrowie Acatar Complex [5, 14, 26-30].

Według danych literaturowych, związki, odpowiedzialne za efekt leczniczy przetworów z *E. senticosus*, to przede wszystkim eleuterozyd B i E. Sumaryczna zawartość tych dwóch związków powinna wynosić nie mniej niż 0,08%, zgodnie z wytycznymi farmakopealnymi.

Efekt leczniczy związków zależny jest od jego biodostępności. Eleuterozyd B wchłania się szybko w jelicie cienkim, kumuluje się głównie w wątrobie, sercu, nerkach. Jego okres półtrwania w organizmie wynosi od 2 do 4 godzin. Eleuterozyd B przyczynia się do obniżenia stężenia cholesterolu we krwi, modulacji liczby leukocytów, wykazuje działanie neuroprotekcyjne, ochronne przeciwko promieniowaniu jonizującemu i wolnym rodnikom. Eleuterozyd B wykazuje także właściwości przeciwdepresyjne, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne i przeciwutleniające [31-34]. Udowodnione zostało, że związek ten łagodził objawy uszkodzenia płuc poprzez dodatnią regulację białka Nrf2 i hamowanie stresu oksydacyjnego. Ponadto eleuterozyd B hamował ekspresję RIPK1 i RIPK3, które są krytycznymi cząsteczkami sygnałowymi w nekroptozie [35, 36].

Eleuterozyd E wykazuje zbliżone właściwości farmakokinetyczne w stosunku do eleuterozydu B, jego biologiczny okres półtrwania wynosi około 4,6 godzin. Wykazuje niższą aktywność przeciwutleniającą w stosunku do wyżej wymienionego. Udowodnione zostało, że eleuterozyd E wpływa na zwiększenie wytwarzania dopaminy i serotoniny. Dowiedziono także, że związek ten może niwelować behawioralne skutki wywołane 72-godzinnym deficytem snu u myszy. Związek podawano przez 10 dni w stężeniach 50 i 10 mg/kg, około godziny przed testem poznawczo-behawioralnym [37]. Wykazano również na modelach mysich z cukrzycą typu 2, że eleuterozyd E może łagodzić cukrzycę poprzez zwiększenie wychwytu glukozy, regulację oporności na insulinę i regulację metabolizmu [9 ,15, 38 – 41].

Wykazano także, że eleuterozyd E działa neuroprotekcyjnie, chroniąc nerwy przed uszkodzeniami wywołanymi promieniowaniem podczas radioterapii [42].

Niewiele jest doniesień na temat działań niepożądanych stosowania *E. senticosus* lub jego przetworów. Jednym z nielicznych jest możliwość wystąpienia lekkiej hipoglikemii bezpośrednio po spożyciu surowca lub ekstraktu. Długotrwałe spożywanie dużych dawek może doprowadzić do bezsenności, drażliwości, uczucia niepokoju. Stosowanie *E. senticosus* w zalecanych dawkach nie przyczynia się do zmian aktywności cytochromu P450 i CYP3A4, na podstawie czego można sugerować brak wpływu na metabolizm innych leków 43 – 45].

W etnomedycynie rosyjskiej, *Eleutherococcus senticosus* wykorzystywany jest do leczenia chorób, między innymi o podłożu immunologicznym. Ze względu jednak na nadmierne wykorzystywanie korzenia jako surowca, gatunek uważany jest za zagrożony i w niektórych krajach (np. Republice Korei Południowej) został umieszczony na liście gatunków roślin zagrożonych wyginięciem. W związku z tym, w niniejszym cyklu badań, przedmiotem zainteresowania zostały części nadziemne, takie jak owoce, które mogą stanowić nowe, zrównoważone źródło związków o działaniu adaptogennym.

6. CEL PRACY

Aktywność adaptogenna surowców roślinnych, od lat stosowanych w etnofarmakologii wielu obszarów świata, jest obecnie potwierdzana naukowo z wykorzystaniem współczesnych metod badawczych. Niektóre gatunki adaptogenne, np. *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. ze względu na nadmierną eksploatację kłączy i korzeni zostały objęte ochroną gatunkową w wielu państwach. Z tego względu niezbędne jest podjęcie działań zmierzających do poszukiwania nowych surowców adaptogennych, stanowiących, np. części nadziemne roślin.

Nadrzędnym celem badań opisanych w pracach wchodzących w cykl rozprawy doktorskiej było uzyskanie odpowiedzi na pytanie:

czy części nadziemne, takie jak owoce *E. senticosus* mogą być stosowane jako surowiec adaptogenny jednocześnie stanowiąc zamiennik dla części podziemnych?

Cel nadrzędny został osiągnięty poprzez realizację celów podrzędnych obejmujących:

a) ocenę farmakognostyczną owoców,

b) ocenę fitochemiczną owoców,

c) ocenę fitochemiczną intraktu z owoców,

d) ocenę farmakologiczną intraktu z owoców pod kątem działania adaptogennego

7. BADANIA WŁASNE

7.1. Materiał roślinny

Surowce do badań stanowiły dojrzałe owoce, owocnie, nasiona *E. senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim., które zebrane zostały w Ogrodzie Roślin Leczniczych i Kosmetycznych w Bydgoszczy we wrześniu 2017 i 2020 r. (N: 53◦07'36,55" E: 18◦01'51,64") **(Publikacja 1, 2 i 3)**. Próbki roślinne zostały zdeponowane w Katedrze Botaniki Farmaceutycznej i Farmakognozji Collegium Medicum w Bydgoszczy, Kat. Nr. ES Październik 2017 i Kat. Nr. ES Październik 2020.

Owoce po wysuszeniu przechowywano w warunkach domowych (temperatura pokojowa, torebka papierowa, ciemne miejsce), natomiast intrakt przygotowany z owoców przechowywano w lodówce. Tożsamość materiału roślinnego została oceniona na podstawie cech morfologicznych oraz za pomocą analizy HPLC-DAD w porównaniu z substancjami referencyjnymi.

7.2. Ekstrakcja surowców - metody

(Publikacja 1) Suszone na powietrzu i sproszkowane owoce (10 g) umieszczono w 100 mL 75% (v/v) etanolu, macerowano przez 24 godziny. Następnie próbki poddano trzykrotnej ekstrakcji typu UAE (łaźnia ultradźwiękowa – Polsonic, Warszawa, Polska), łącznie trzy cykle ekstrakcji przy użyciu 100 i 2 × 50 mL 75% etanolu. Ekstrakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 15 min dla każdego cyklu. Ostatecznie otrzymano 200 mL ekstraktu. Następnie ekstrakt przefiltrowano przez bibułę filtracyjną Whatman nr 4. Rozpuszczalnik odparowano w wyparce próżniowej (45 °C), zamrożono (-20 °C) i poddano procesowi liofilizacji.

Liofilizat przechowywano w eksykatorze w temperaturze 4 °C. Wydajność ekstrakcji obliczono na podstawie suchej masy ekstraktu [%]. Te same czynności wykonano dla ekstrakcji owocni i nasion.

(Publikacja 2 i 3) Świeże owoce (20 g) macerowano w 100 mL 40% (v/v) etanolu przez 30 dni w warunkach domowych (temperatura pokojowa, ciemne miejsce). Następnie ekstrakt przefiltrowano przez bibułę filtracyjną Whatman nr 4. Rozpuszczalnik odparowano na wyparce w warunkach próżniowych w 45 °C, następnie zamrożono w -20 °C i poddano liofilizacji. Liofilizat przechowywano w eksykatorze w 4 °C. Wydajność ekstrakcji obliczono na podstawie suchej masy ekstraktu [%].

7.3. Ekstrakcja ciecz-ciecz polifenoli z intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus*

(Publikacja 2) Liofilizat intraktu z owoców (200 mg) rozpuszczono w 10 mL wody destylowanej i ekstrahowano 10 x 2 mL octanu etylu w probówce Falcon (15 mL). Po każdej ekstrakcji warstwę octanu etylu zebrano i przeniesiono do probówki Falcon (50 mL). Po ekstrakcji frakcję octanową (20 mL) odparowano do sucha w strumieniu azotu. Suchą pozostałość rozpuszczono w 60% MeOH (v/v) i przeniesiono ilościowo do kolby miarowej (5 mL).

7.4. Analiza farmakognostyczna owoców *Eleutherococcus senticosus* – analiza mikroskopowa

(Publikacja 1) Budowa anatomiczna owoców została określona za pomocą mikroskopu świetlnego zespolonego z kamerą, w powiększeniu obiektywu 40-krotnym. Jako odczynnik zastosowano wodzian chloralu. Obrazy komputerowe rejestrowano przy użyciu oprogramowania ProgRes CapturePro 2.8 — system optyczny Jenoptik.

7.5. Analiza fitochemiczna owoców *Eleutherococcus senticosus*

7.5.1. Analiza HPLC–PDA eleuterozydów B, E i E1

(Publikacja 1) Analizę przeprowadzono stosując chromatograf EliteLaChrom z detektorem PDA i oprogramowaniem EZChrom Elite (Merck, Darmstadt, Niemcy). Użyto kolumnę RP18e LiChrospher 100 (Merck, Darmstadt, Niemcy) (25 cm x 4,0 mm, 5 µm), temperatura 25 °C. Jako fazę ruchomą zastosowano mieszaninę wody (rozpuszczalnik A) i acetonitrylu (rozpuszczalnik B), zakwaszone 0,025% kwasu trifluorooctowego. Zastosowano elucję gradientową: 0,0–8,0 min A 90%, B 10%; 8,1-18,0 min A 90-80%, B 10-20%; 18,1–30,0 min A 80%; B 20%; 30,1–45,0 min A 0%, B 100%; 45,1–60,0 min A 90%, B 10%. Szybkość przepływu wynosiła 1,0 mL/min. Dane zbierano pomiędzy 190 a 400 nm. Tożsamość związków ustalono przez porównanie czasów retencji i widm UV z odpowiednimi wzorcami. Analizę ilościową przeprowadzono przy λ = 264 nm dla eleuterozydu B i λ = 206 nm dla eleuterozydu E i E1.

7.5.2. Analiza HPLC–PDA kwasów fenolowych

(Publikacja 1) Analizę przeprowadzono stosując chromatograf EliteLaChrom z detektorem PDA i oprogramowaniem EZChrom Elite (Merck, Darmstadt, Niemcy). Użyto kolumnę C18 z odwróconą fazą (Kinetex, Phenomenex, Aschaffenburg, Niemcy) (25 cm × 4,6 mm, 5 µm), mieszanina wody (rozpuszczalnik A) i acetonitrylu (rozpuszczalnik B) zakwaszone 0,025% kwasu trifluorooctowego. Zastosowano elucję gradientową: 0,0–5,0 min A 95%, B 5%; 5–60 min A od 5 do 20% i B od 95–80%. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1,0 mL/min, temperatura 25 °C. Dane zbierano pomiędzy 210 a 400 nm. Tożsamość związków ustalono przez porównanie czasów retencji i widm UV z odpowiednimi wzorcami. Analizę ilościową przeprowadzono przy λ = 326 nm dla kwasów chlorogenowych i λ = 260 nm dla kwasu protokatechowego.

7.5.3. Analiza HS–SPME/GC–MS związków lotnych

(Publikacja 1) Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME) została przeprowadzona z niewielkimi modyfikacjami według [46]. Pokrótce, 100 mg wysuszonych owoców *E. senticosus* umieszczono w fiolce o pojemności 15 mL i wyekstrahowano włóknem powleczonym 50/30 µm diwinylobenzen-karboksy-polidimetylosiloksanem (DVB/CAR/PDMS; Supelco, Bellefonte, PE, USA). Jako wzorzec wewnętrzny zastosowano wodny roztwór 2-undekanonu 2 mg/mL (Merck, Polska). Równoważenie prowadzono w 60 °C przez 15 min, czas ekspozycji włókien wynosił 15 min, a desorpcja termiczna trwała 3 min w 250 °C, bezpośrednio w porcie wstrzykiwania w chromatografie gazowym (GC). Wszystkie analizy wykonano w trzech powtórzeniach.

Analizę metodą chromatografii gazowej (GC) przeprowadzono przy użyciu systemu Agilent 7890B GC sprzężonego ze spektrometrem masowym 7000GC/TQ (Agilent Technologies, Paolo Alto, CA, USA). Rozdział przeprowadzono na kolumnie HP-5 MS (30m × 0,25 mm × 0,25 µm) (J&W, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) przy stałym przepływie helu 1 mL/min. Temperaturę wtryskiwacza ustawiono na 250 °C, a próbkę nałożono w trybie dzielonym (70:1). Program temperaturowy wynosił 50 °C przez 1 min, następnie 5 °C /min do 120 °C, 8 °C /min do 200 °C, następnie do 250 °C w 16 °C /min i utrzymywany w warunkach izotermicznych przez 2 min. Temperaturę źródła MS, linii przesyłowej i kwadrupola ustawiono odpowiednio na 230 °C, 320 °C i 150 °C. Widma masowe zebrano w trybie skanowania m/z 30–400, a napięcie jonizacji wynosiło 70 eV. Akwizycję danych przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Agilent MassHunter Workstation (wersja B.08.00).

Identyfikację związków oparto na porównaniu fragmentacji wzorców z biblioteką widm masowych NIST17 i porównywano je ze wskaźnikiem retencji (RI) uzyskanym przez obliczenia względem standardu n-alkanowego (C8–C20; Merc, Polska).

Analizę ilościową (wyrażoną jako procent każdego związku) przeprowadzono metodą normalizacji powierzchni pików bez współczynnika korekcji.

7.5.4. Izolacja oleju z owoców *Eleutherococcus senticosus* i przygotowanie próbek

(Publikacja 1) Suszone na powietrzu i sproszkowane owoce *E. senticosus* (5 g) wyekstrahowano czterokrotnie heksanem (4 × 30 mL) przy użyciu łaźni ultradźwiękowej (4 × 15 min.). Ekstrakty połączono i odparowano w wyparce obrotowej. Olej (50 mg) umieszczono w kolbie miarowej (5 mL) i rozpuszczono w 2-propanolu. Roztwór przefiltrowano przez 0,25 µm poliamidowy filtr membranowy przed analizą HPLC. Olej (10 mg) rozpuszczono w 500 µL TBME i derywatyzowano przez dodanie 250 µL TMSH. Tak przygotowane próbki poddano analizie GC-MS.

7.5.5. Analiza HPLC–PDA kwasu ursolowego i tokoferoli w oleju z owoców *Eleutherococcus senticosus*

(Publikacja 1) Analizę przeprowadzono na chromatografie VWR Hitachi Chromaster 600 z detektorem z matrycą diodową 5430, detektorem 5440 FL i oprogramowaniem EZChrom Elite (Merck, Darmstadt, Niemcy). Do analiz zastosowano kolumnę RP18e LiChrospher 100 (Merck, Darmstadt, Niemcy) (25 cm × 4,0 mm, wielkość cząstek 5 µm). Tożsamość związków ustalono przez porównanie czasów retencji i widm PDA z odpowiednimi standardami. Kwas ursolowy oznaczono z wykorzystaniem metodyki Strzemski et al. [47]. Zastosowano układ izokratyczny w podstawowych warunkach chromatograficznych: faza ruchoma składała się z acetonitrylu, wody i 1% wodnego roztworu kwasu fosforowego (75:25:0,5 v/v/v); szybkość przepływu eluentu 1,0 mL/min; temperatura kolumny 10 °C. Objętość wtrysku wynosiła 10 µL. Analizę oparto na chromatogramach zarejestrowanych detektorem PDA. Dane zbierano między 200 a 400 nm. Analizę ilościową przeprowadzono przy λ = 200 nm.

Tokoferole oznaczano za pomocą systemu izokratycznego. Faza ruchoma składała się z acetonitrylu i metanolu (5:95 v/v). Szybkość przepływu eluentu wynosiła 1,2 mL/min. Temperaturę kolumny ustawiono na 30 °C. Objętość wtrysku wynosiła 5 µL. Analizę ilościową przeprowadzono przy użyciu detektora fluorescencyjnego o długości fali wzbudzenia przy λ = 296 nm i długości fali emisji przy λ = 330 nm.

7.5.6. Analiza GC-MS kwasów tłuszczowych w oleju z owoców *Eleutherococcus senticosus*

(Publikacja 1) Analizę przeprowadzono przy użyciu systemu Agilent GC–MSD (GC/MSD 6890N/5975) wyposażonego w kolumnę kapilarną HP-88 Agilent (60 m × 0,25 mm; grubość filmu 0,20 µm), MSD ChemStation ver. oprogramowanie E.02.02.1431 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) oraz wtryskiwacz typu split-splitless. Temperaturę pomiaru zaprogramowano na przedział 110 °C do 190 °C z 8 °C /min, utrzymywaną przez 2 min w 110 °C i 13 min w 190 °C. Temperatura wtryskiwacza wynosiła 250 °C. Objętość nastrzyku wynosiła 1 µL (stosunek podziału 150:1; przepływ podzielony 180 mL/min). Jako gaz nośny zastosowano hel przy szybkości przepływu 1,2 mL/min. Jako detektor połączony z GC zastosowano kwadrupolowy spektrometr masowy z jonizacją elektronową (EI) przy 70 eV, z trybem akwizycji pełnego skanu (50 m/z do 500 m/z). Temperaturę źródła MS i kwadrupola MS ustawiono odpowiednio na 230 °C i 150. Identyfikację składników oparto na porównaniu ich widm masowych z zasobami biblioteki widm masowych NIST oraz czasów retencji ze standardami.

7.6. Analiza fitochemiczna intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus*

7.6.1. Profilowanie związków fenolowych w intrakcie z owoców *Eleutherococcus senticosus* z wykorzystaniem HPLC-PDA

(Publikacja 2) Badania zostały przeprowadzone na chromatografie EliteLaChrom z detektorem PDA i oprogramowaniem EZChrom Elite (Merck, Darmstadt, Niemcy). Zastosowano następujący system chromatografii gradientowej: kolumna RP18e LiChrospher 100 (Merck, Darmstadt, Niemcy) (25 cm × 4,0 mm, wielkość cząstek 5 µm) w 25 °C, mieszanina acetonitrylu (rozpuszczalnik A) i wody (Rozpuszczalnik B) oba zakwaszone 0,025% kwasem trifluorooctowym, zastosowano jako fazę ruchomą. Związki rozdzielono metodą elucji gradientowej z programem: 0,0–8,0 min A 10%, B 90%; 8,1-18,0 min A 10-20%, B 90-80%; 18,1–28,0 min A 20%, B 80%; 28,1-35,0 min A 20-25%, B 80-75%; 35,1–40,0 min A 25%, B 75%. Szybkość przepływu wynosiła 1,0 mL/min. Dane zbierano pomiędzy 190 a 400 nm. Tożsamość związków ustalono przez porównanie czasów retencji i widm UV z odpowiednimi wzorcami. Analizę ilościową przeprowadzono odpowiednio przy λ = 259 nm, 264 nm, 255 nm, 260 nm, 323 nm, 206 nm, 322 nm, 206 nm, 328 nm dla kwasu protokatechowego, eleuterozydu B, kwasu *p*-hydroksybenzoesowego, kwasu wanilinowego, kwasu kawowego, eleuterozydu E, kwas ferulowego, eleuterozydu E1 i kwasu rozmarynowego.

7.6.2. Profilowanie metabolomiczne cukrów w intrakcie z owoców *Eleutherococcus senticosus* stosując HPLC-RID

(Publikacja 2) Ocenę jakościową i ilościową przeprowadzono wykorzystując chromatograf Agilent 1200 z detektorem RID. Zastosowano izokratyczny system chromatograficzny: kolumna Rezex RHM Monosacharyd H+ (Phenomenex, Aschaffenburg, Niemcy) (30 cm x 7,8 mm, wielkość cząstek 8 µm) w 60 °C, jako fazę ruchomą zastosowano odgazowaną wodę. Szybkość przepływu wynosiła 1,0 mL/min. Cukry monitorowano za pomocą detektora do badania współczynnika załamania ustawionego na polaryzację

dodatnią, a ich tożsamość ustalono przez porównanie czasów retencji i widm UV z odpowiednimi standardami. Do porównawczej analizy jakościowej przeanalizowano 33 cukry (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). W badanych próbkach wykryto i zmierzono ilościowo tylko *mio*-inozytol i *D*-mannitol.

7.6.3. Całkowita zawartość polifenoli (TPC) w intrakcie z owoców *Eleutherococcus senticosus*

(Publikacja 3) Reakcja Folina-Ciocalteu (F-C) oparta jest na zdolności polifenoli do tworzenia barwnych produktów z odczynnikiem Folina-Ciocalteu. Wartość absorbancji jest proporcjonalna do całkowitej zawartości związków fenolowych w badanej próbce [48, 49]. Zastosowano następujące parametry, 25 µL ekstraktu z owoców *E. senticosus* zmieszano z 25 µL odczynnika Folin-Ciocalteu. Roztwór inkubowano w 25 °C przez 5–8 min, po czym doprowadzono do objętości 200 µL wodą destylowaną i dodano 25 µL roztworu węglanu sodu. Po 60 min mierzono absorbancję za pomocą spektrofotometru przy długości fali 750 nm. Kwas galusowy zastosowano jako standard do krzywej kalibracyjnej. Całkowitą zawartość związków fenolowych określono z krzywej kalibracyjnej dla kwasu galusowego w mg równoważników kwasu galusowego na gram ekstraktu (mg/g).

7.6.4. Całkowita zawartość flawonoidów (TFC) w intrakcie z owoców *Eleutherococcus senticosus*

(Publikacja 3) Całkowitą zawartość flawonoidów oznaczono kolorymetryczną metodą Christa i Müllera z wykorzystaniem chlorku glinu [50]. Oryginalna metoda została dostosowana do analiz, wykorzystując 25 µL badanych próbek, które dodano do 75 µL etanolu. Następnie uzupełniono 10 µL 1M octanu potasu, a po 5 min 10 µL 10% chlorku glinu. Mieszaninę natychmiast rozcieńczono przez dodanie 130 µL wody destylowanej i dokładnie wymieszano. Absorbancję określono przy 510 nm, po 30 minutowej inkubacji w zacienieniu. Jako wzorzec do krzywej kalibracyjnej zastosowano kwercetynę. Całkowitą

zawartość flawonoidów w ekstrakcie wyrażono jako mg równoważników kwercetyny na gram ekstraktu (mg/g).

7.6.5. Całkowita zawartość kwasów fenolowych (TPAC) w intrakcie z owoców *Eleutherococcus senticosus*

(Publikacja 3) Oznaczenie całkowitej zawartości kwasów fenolowych metodą Arnova [51]. Zmieszano 25 µL każdego z ekstraktów z 150 µL wody, 25 µL kwasu solnego (18 g/L), 25 µL odczynnika Arnova (10 g molibdenianu sodu i 10 g azotanu sodu rozpuszczonego w 100 mL metanolu) i 25 µL roztworu wodorotlenku sodu (40 g/L). Pomiaru dokonano przy długości fali 490 nm, zawartość kwasów fenolowych obliczono jako procent kwasu kawowego.

7.7. Analiza fitofarmakologiczna intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus*

7.7.1. Przygotowanie roztworów intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus* do testów cytotoksycznych

(Publikacja 2) Intrakt rozpuszczono w 20% EtOH w PBS (10 mg/mL). Eleuterozyd B (2 mg/mL) i eleuterozyd E (2 mg/mL) rozpuszczono w EtOH z DMSO (obj./obj. 20%). Przed dodaniem do hodowli komórkowych wszystkie próbki rozcieńczono pożywką DMEM 2% FBS. Próbki badano w stężeniach 2,35, 4,7, 9,4, 18,8, 37,5, 75, 150, 300 µg/mL. Stężenie końcowe ustalono na 300 µg/mL dla intraktu i 100 µg/mL (0,26 µM) dla eleuterozydu B i 100 µg/mL (0,13 µM) dla eleuterozydu E, co było równoznaczne z najwyższą wartością, która nie wywołała efektu cytopatycznego (ang. cythopatic effect – CPE) w komórkach. Jako kontrole pozytywne zastosowano LPS (1 µg/mL), cydofowir (100 µg/mL), rybawirynę (100 µg/mL). Stosowane stężenie DMSO (<0,1%) nie miało wpływu na wyniki testów.

7.7.2. Oznaczenie stężenia cytotoksycznego CC_{50} intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus*

(Publikacja 2) Działanie cytotoksyczne intraktu na komórki ludzkiego nowotworu płuc A549 (ATCC® CCL-185TM) zostało określone przy pomocy testu z błękitem trypanu oraz metodą MTT. Subkonfluentne monowarstwy komórek nowotworowych A549 ($1,8 \times 10^4$ komórek/studzienkę) zawieszonych w medium Dulbecco Minimal Essential Medium (DMEM) uzupełnione 5% płodową surowicą bydlęcą (FBS), antybiotykami (100 U/mL penicyliny i 100 µg/mL streptomycyny) i 2 mM L-glutaminy (Sigma Aldrich, USA). Następnie inkubowano w 96-dołkowych płytkach z dodatkiem badanych substancji w stężeniu 300, 150, 75, 37,5, 18,8, 9,4, 4,7, 2,35 µg/mL, w trzech powtórzeniach, przez 72 godziny w 37 °C w atmosferze z 5% CO_2. W trakcie inkubacji obserwowano zmiany w morfologii komórek wskazujące na cytotoksyczność (CTE, efekt cytotoksyczny) i oceniano je w skali: 0 - brak cytotoksyczności; 1 – do 25%, 2–do 50%, 3–do 75%, 4–100% cytotoksyczności Następnie wykonano test MTT, dodając do każdego dołka 20 µl roztworu MTT (Promega, Madison,

WI, USA). Po inkubacji płytek przez 3h w temperaturze 37 °C, 5% CO_2, dodano roztwór inaktywujący (SDS-HCl - 100 µL do każdej studzienki), po czym zmierzono wartości absorbancji przy 570 nm (spektrofotometr Multiskan RC, Thermo Labsystems, USA). Stężenie cytotoksyczne 50% (CC_{50}) określono na podstawie odczytu mikroskopowego (CTE). CC_{50} zdefiniowano jako stężenie, które zmniejszyło żywotność komórek o 50% w stosunku do kontroli bez leku.

7.7.3. Aktywność wirusobójcza intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus* i eleuterozydów B i E

(Publikacja 2) Związki testowano przeciwko wirusowi VSV- wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (szczep Indiana; ATTC VR-1238TM, Rhabdoviridae); jako kontrolę zastosowano cydofowir i rybawirynę. Próbki wirusa VSV-107 $TCID_{50}$/mL wytworzono przez infekcję pojedynczych warstw hodowli komórkowej A549. Każdy test przeprowadzono trzykrotnie. Aktywność wirusobójcza intraktu oraz eleuterozydów B i E, została oceniona poprzez inkubację wirusów *in vitro* z badanymi substancjami. Wirusy inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej z nietoksycznym stężeniem każdego związku. Jednocześnie, tę samą ilość wirusa inkubowano z pożywką hodowlaną jako kontrolą. Po upływie wyznaczonego czasu inkubacji, wirusy zmiareczkowano (10^{-1} do 10^{-8}) i wysiano na monowarstwy komórek nowotworowych linii komórkowej A549 wysianych na 96-dołkowych płytkach (na 24 godziny przed eksperymentem ($2x10^4$ komórek/studzienka)). Płytki inkubowano przez 72 godziny w 37 °C w wilgotnej atmosferze z 5% CO_2. Efekt cytopatyczny (CPE) określono na podstawie odczytu mikroskopowego jak również stosując metodę z MTT. Punktacja CPE wynosiła od 0 (brak CPE) do 4 (100% CPE).

7.7.4. Test proliferacji leukocytów krwi obwodowej stymulowanych intraktem z owoców *Eleutherococcus senticosus*

(Publikacja 2) Izolacja leukocytów krwi obwodowej (PBL): zgodnie z zasadami Deklaracji Helsińskiej, krew z żył obwodowych została pobrana od zdrowych ochotników (30–40 lat) w Szpitalu Collegium Medicum w Bydgoszczy. Stan zdrowia ochotników uznano klinicznie

za dobry, rutynowe badania laboratoryjne nie wykazały odchyleń od normy, nie brali żadnych leków. Badanie zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną (Uniwersytet Mikołaja Kopernika). PBL izolowano zgodnie ze standardowym protokołem z krwi obwodowej uzupełnionej antykoagulantami (EDTA), przez wirowanie gradientowe w Gradisol G, o gęstości 1,115 g/mL (AquaMedica, Poznań, Polska). Leukocyty zebrano, przemyto dwukrotnie RPMI 1640, uzupełniono 2% FBS i zawieszono w tej pożywce z gęstością 2 x 10^6 komórek/mL.

PBL izolowane od zdrowych ochotników wysiano w gęstości 1 x 10^6 komórek/mL na 24-studzienkowych płytkach DMEM z 5% FBS, w 500 µL. Następnie dodano 500 µL roztworu próbki intrkatu z owoców *E. senticosus* lub LPS (1 µg/mL; studzienki kontrolne) i płytki inkubowano 48 godzin w inkubatorze (37 °C, 5% CO_2). Każdym związkiem stymulowano trzy różne próbki krwi. Następnie wykonano test MTT. Żywotność komórek (%) obliczono dla każdego stężenia jako średnią Abs/ $Abs_{kontroli}$ × 100, gdzie Abs i $Abs_{kontrola}$ są odczytami absorbancji dla studzienek ze związkami i bez związków. Kontrolę tła (kontrolę rozpuszczalnika) odjęto od wszystkich pomiarów przed obliczeniami.

7.7.5. Oznaczenie stężenia cytokin w komórkach PBL stymulowanych intraktem z owoców Eleutherococcus senticosus

(Publikacja 2) Poziomy cytokin (IL-2, IL-10) oznaczano w supernatantach nad niezakażonymi wirusem hodowlami PBL, traktowanymi i nietraktowanymi intraktem. Zestaw ELISA (IL-10, ELISA MAX, Biolegend; IL-2, Life Technologies) wykorzystano zgodnie z instrukcjami producenta. Gęstość optyczną mierzono przy długości fali 450 nm z korekcją przy λ = 570 nm przy użyciu spektrofotometru Multiskan RC (Thermo Labsystems, USA). Stężenia cytokin wyrażono w pg/mL.

7.7.6. Ocena wzbudzenia odporności wrodzonej komórek PBL przez intrakt z owoców *Eleutherococcus senticosus*

(Publikacja 2) Odporność wrodzoną określano oceniając oporność komórek PBL na infekcję VSV, jak opisano wcześniej przez Orzechowska et al. [58]. Pokrótce, leukocyty (1 x 10^6/mL) zostały zakażone wirusem pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV) (100 $TCID_{50}$ - 50% dawki zakażającej hodowlę tkankową). Po 40 min adsorpcji w temperaturze pokojowej wirus usunięto przez trzykrotne przemycie 5 mL RPMI 1640 i 2% FBS. Następnie do studzienek dodano 1 mL pożywki hodowlanej lub rozcieńczonego badanego związku, tak aby końcowe stężenia użytych związków wynosiły 300 µg/mL dla intraktu i 100 µg/mL dla eleuterozydów B i E. Każdy związek był używany do stymulacji trzech losowo wybranych próbek krwi (zakażonych wirusem). Zainfekowane komórki inkubowano w 37 °C przez 48 godzin. Jedną próbkę zainfekowanych komórek odłączono od badanych i przechowywano oddzielnie w temperaturze 4 °C, aby służyła jako kontrola płukania. Miana wirusa VSV w próbkach oznaczano w komórkach L929. Miano VSV wyższe niż 4 log $TCID_{50}$ uznawano za niedobór oporności/odporności wrodzonej, miano 2–3 log wskazywało na oporność częściową, a miano 0–1 log na całkowitą oporność/odporność wrodzoną przeciwwirusową.

7.7.7. Analiza właściwości antyoksydacyjnych intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus* z wykorzystaniem ABTS

(Publikacja 3) Do oceny działania przeciwutleniającego związków naturalnych w lekach roślinnych stosuje się wiele metod, jedną z nich jest metoda z odczynnikiem ABTS. Test z zastosowaniem ABTS mierzy względną zdolność antyoksydantów do rozkładu ABTS w fazie wodnej w porównaniu ze standardem [52, 53]. W oparciu o oryginalną metodę 10 µL badanych próbek inkubowano przez 30 min z 190 µL roztworu ABTS w ciemności. Absorbancję mierzono przy długości fali 734 nm. Jako związek odniesienia zastosowano kwas askorbinowy. Wyniki obliczono za pomocą następującego równania:

$$\%_{ABTS} = \left(\frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}}\right) \times 100\%$$

A_{blank}— Absorbancja próby ślepej

A_{sample}— Absorbancja próby badanej

7.7.8. Analiza właściwości antyoksydacyjnych intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus* z wykorzystaniem DPPH

(Publikacja 3) Inną metodą pomiaru zdolności antyoksydacyjnej badanych próbek jest wykorzystanie DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl-hydrat). Mechanizm testu polega na redukcji DPPH w obecności antyoksydantów w badanych próbkach, co wiąże się ze spadkiem absorbancji [52, 54]. Do 10 µL ekstraktów w połączeniu z 280 µL roztworu DPPH, dodano 10 µL metanolu, mierzono absorbancję przez 1 h przy 515 nm. Jako związek odniesienia zastosowano kwas askorbinowy. Wyniki obliczono z następującego równania:

$$DPPH = \left(\frac{(Acontrol - (Asample - Ablank)}{Acontrol}\right) \times 100\%$$

$A_{control}$—Absorbancja DPPH

A_{sample}— Absorbancja ekstraktu/standardu

As_{blank}— Absorbancja MeOH

7.7.9. Analiza zdolności chelatujących intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus* z wykorzystaniem ferrozyny

(Publikacja 3) Zastosowano test kolorymetryczny [55 – 57]. 75 µL próbki badanej inkubowano przez 5 min w temperaturze 25 °C z 15 µL roztworu $FeCl_2$, uzupełniono etanolem do objętości 200 µL mieszaniny reakcyjnej. Następnie dodano 15 µL roztworu ferrozyny i inkubowano przez 5 min w temperaturze 25 °C. W rezultacie przeprowadzonych reakcji, zredukowany kompleks ferrozyny przybiera niebieski kolor. Procentową zawartość chelatowanego żelaza w próbce określa się przez porównanie absorbancji (560 nm) próbki z absorbancją kwasu askorbinowego. Wyniki oszacowano za pomocą następującego wzoru:

$$\%_{\text{CHELATING EFFECT}} = \left(\frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}}\right) \times 100\%$$

A_{blank}—Absorbancja próby ślepej

A_{sample}—Absorbancja próby badanej

7.7.10. Ocena inhibicji tyrozynazy przez intrakt z owoców *Eleutherococcus senticosus*

(Publikacja 3) Do oceny inhibicji tyrozynazy użyty został zestaw firmy Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) [57]. Tyrozynaza jest enzymem, który przekształca L-tyrozynę w L-DOPA i L-DOPA w DOPA-chinon, co w rezultacie przekłada się na zmianę barwy roztworu poreakcyjnego na brązową. 10 µL próbki (1 mg/mL), 140 µL buforu fosforowego (pH = 6,8) i 25 µL enzymu (125 U/mL w buforze fosforowym pH = 6,8) inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 min. Przygotowano także próbę kontrolną bez dodatku inhibitora (Ac). Po inkubacji, do każdego dołka dodano 25 µL L-tyrozyny (0,3 mg/mL) i zmierzono absorbancję przy 510 nm (model kinetyczny, co 5 minut). Zakres liniowy wykresu został następnie podzielony na dwa punkty czasowe (T_1 i T_2). Analizę wykonano w trzech powtórzeniach. Jako standard zastosowano kwas kojowy (0,01 mg/mL). Procent inhibicji enzymu obliczono według równania:

$$\%_{\text{INHIBITION}} = \frac{\Delta A_C - \Delta A_S}{\Delta A_C} \times 100\%$$

A_C—Różnica w absorbancji pomiędzy czasami T2 i T1 dla kontroli pozytywnej

A_S— Różnica w absorbancji pomiędzy czasami T2 i T1 dla próby badanej

7.7.11. Ocena inhibicji hialuronidazy przez intrakt z owoców *Eleutherococcus senticosus*

(Publikacja 3) Inhibicja hialuronidazy (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) jest dwuetapową reakcją turbidymetryczną, na podstawie, której mierzona jest ilość kwasu hialuronowego (HA). Spadek zmętnienia jest proporcjonalny do aktywności enzymatycznej w próbce [59]. 10 µL próbki (0,5 mg/mL), 15 µL buforu octanowego (Ph = 5,35), 25 µL buforu do inkubacji (pH = 5,35, 0,1 mg/mL BSA, 4,5 mg/mL NaCl) i 25 µL enzymu (30 U/mL,

bufor do inkubacji) inkubowano przez 10 minut w 37 °C, następnie dodano 25 µL roztworu kwasu hialuronowego (0,3 mg/mL w buforze octanowym pH = 5,35). Płytki inkubowano w 37 °C przez 45 min. Po tym czasie, niezhydrolizowany HA wytrącono przez dodanie 200 µL 2,5% bromku cetylotrimetyloamoniowego (CTAB). Przez 10 min płytki inkubowano w temperaturze 25 °C, intensywność tworzenia kompleksu mierzono przy długości fali 600 nm. Każdą próbę przeprowadzono trzykrotnie. Jako substancję referencyjną zastosowano escynę (0,01 mg/mL). Procent inhibicji hialuronidazy określono według równania:

$$\%_{\text{INHIBITION}} = \frac{A_S - A_C}{A_T - A_C} \times 100\%$$

A_S—Absorbancja HA + próbki + enzymu

A_C— Absorbancja HA + enzymu

A_T— Absorbancja HA + próbki

7.7.12. Ocena inhibicji acetylocholinoesterazy przez intrakt z owoców *Eleutherococcus senticosus*

(Publikacja 3) Acetylocholinesteraza (AChE) katalizuje hydrolizę acetylocholiny na cholinę i kwas octowy. Do określenia stopnia inhibicji AChE zastosowano zestaw z firmy Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Zasada działania metody opiera się na zmianie zabarwienia mieszaniny reakcyjnej po dodaniu odczynnika wywołującego - kwasu 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowego) (DTNB). Intensywność barwy jest proporcjonalna do aktywności enzymatycznej AChE w badanych próbkach [60]. Analizę przeprowadzono na 96-dołkowej płytce. 45 µL enzymu (0,4 U/mL, pH = 7,5 buforu fosforowego) i 5 µL próbki (0,1 mg/mL) inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 min. Po inkubacji, dodano 155,5 µL roztworu (154 µL buforu, 1 µL substratu i 0,5 µL DTNB), następnie zmierzono absorbancję w dwóch punktach, T_0 i T_{10}, przy długości fali 405 nm. Wszystkie próby były testowane trzykrotnie. Jako standard zastosowano fizostygminę (0,05 mg/mL). Do obliczenia inhibicji tyrozynazy zastosowano następujące równanie:

$$\%_{\text{INHIBITION}} = \frac{1 - A_S}{A_C} \times 100\%$$

A_S – absorbancja acetylocholiny + enzym + próbka

A_C – absorbancja acetylocholiny + enzym

7.7.13. Analiza cytotoksyczności intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus*

(Publikacja 3) FaDu to linia komórkowa o morfologii nabłonka, która została pobrana od pacjenta z rakiem płaskonabłonkowym. Komórki HEPG2 (HepG2) to ludzka linia komórkowa raka wątroby. Ze względu na wysoką specjalizację komórkową (zarówno funkcjonalną, jak i morfologiczną) komórki HepG2 i FaDu są odpowiednim modelem do badania aktywności cytotoksycznej ksenobiotyków *in vitro* [61, 62].

Linie komórkowe FaDu i HepG2 pozyskane zostały z American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) i hodowane przy użyciu EMEM (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) uzupełnionego 10% płodową surowicą bydlęcą (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 100 U/mL penicyliny i 100 mg/mL streptomycyny (PenStrep, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Linie komórkowe inkubowano w 37 °C, w wilgotnej atmosferze oraz 5% CO_2. Działanie cytotoksyczne ekstraktów i substancji odniesienia badano za pomocą testu MTT (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA), zgodnie z procedurą producenta [63]. Roztwory podstawowe testowanych związków przygotowano rozpuszczając je w DMSO. Zawiesinę komórek przygotowano w gęstości 1×10^5 komórek/mL. Komórki inkubowano przez 24 h z różnymi stężeniami badanych związków (1–100 µg/mL). Absorbancję mierzono przy 570 nm za pomocą czytnika mikropłytek (Epoch, BioTek Instruments, Santa Clara, CA, USA). Każdy eksperyment powtórzono trzy razy. Wyniki przedstawiono jako % żywotności komórek wobec próby kontrolnej.

8. ANALIZA STATYSTYCZNA

Oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach. Dane poddano analizie statystycznej przy użyciu programu Statistica 7.0. (StatSoft, Kraków, Polska) - **Publikacja 1,** programu Statistica 12.0. (StatSoft, Kraków). - **Publikacja 2,** Statistica 13.1 (StatSoft, Kraków, Polska) **– Publikacja 3.** Wyniki poddano jednokierunkowej analizie wariancji.

Publikacja 1 - różnice statystyczne między badanymi grupami oszacowano za pomocą testu Spearman'a (R) i Person'a (r). Wszystkie testy statystyczne przeprowadzono na poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Publikacja 2 - różnice statystyczne między badanymi grupami oszacowano testami Spearman'a (R) i Wilcoxon'a. Wszystkie testy statystyczne przeprowadzono na poziomie istotności $\alpha = 0,05$

Publikacja 3 - różnice statystyczne między zawartością związków fenolowych i polifenolowych w intractum i ekstrakcie oszacowano za pomocą testu t-Studenta. Przeprowadzono test ANOVA w celu porównania aktywności przeciwutleniającej i antyenzymatycznej intraktu, ekstraktu i substancji referencyjnych. Do analizy post-hoc wykorzystano test Scheffe'go. Wszystkie testy statystyczne przeprowadzono na poziomie istotności $p = 0,05$.

Zakres badań w poszczególnych publikacjach obejmował:

Publikacja 1: Pharmacognostic evaluation and HPLC-PDA and HS-SPME/GC-MS metabolomic profiling of *Eleutherococcus senticosus* fruits. Molecules. 2021 Mar 31; 26(7):1969.

Analiza mikroskopowa owoców, ekstrakcja owoców oraz analiza po kątem składu chemicznego:

- analiza farmakognostyczna owoców,

- ocena zawartości eleuterozydów B, E, E1 w owocach *E. senticosus* z wykorzystaniem HPLC-PDA,

- ocena zawartości kwasów fenolowych w owocach *E. senticosus* z wykorzystaniem HPLC-PDA,

- ocena zawartości związków lotnych, zawartości tokoferoli, kwasu ursolowego w oleju z owoców *E. senticosus* z wykorzystaniem HS-SPME/GC-MS oraz HPLC-PDA,

- ocena zawartości kwasów tłuszczowych w ekstraktach olejowych z owoców *E. senticosus* z wykorzystaniem GC-MS,

- analiza statystyczna otrzymanych wyników.

Publikacja 2: The intractum from the *Eleutherococcus senticosus* fruits affects the innate immunity in human leukocytes: From the ethnomedicinal use to contemporary evidence-based research. Journal of Ethnopharmacology. 2021 Mar 25; 268:113636.

Przygotowanie intraktu z owoców *E. senticosus* oraz jego ocena pod względem chemicznym oraz farmakologicznym i cytotoksycznym:

- ekstrakcja polifenoli z intraktu,

- profilowanie metabolomiczne związków fenolowych z wykorzystaniem HPLC-PDA,

- ocena zawartości cukrów z wykorzystaniem HPLC-RID,

- określenie stężenia cytotoksycznego i ustalenia wartości CC_{50},

- ocena aktywności wirusobójczej intraktu, eleuterozydów B i E,

- ocena przeżywalności i proliferacji krwinek białych PBL, wzrostu produkcji cytokin oraz ocena pobudzenia i wzrostu odporności komórek zainfekowanych wirusem VSV po stymulacji intraktem,

- analiza statystyczna otrzymanych wyników.

Publikacja 3: Phenolic profile, antioxidant, anti-enzymatic and cytotoxic activity of the fruits and roots of *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. Molecules. 2022 Aug 30; 27(17):5579.

Analiza intraktu z owoców *E. senticosus* oraz jego ocena pod względem chemicznym, ocena jego aktywności przeciwutleniającej, przeciwenzymatycznej oraz cytotoksycznej:

- analiza składu chemicznego intraktu z oznaczeniem całkowitej zawartości polifenoli (TPC), całkowitej zawartości flawonoidów (TFC), całkowitej zawartości kwasów fenolowych (TPAC)
- analiza aktywności przeciwutleniającej intraktu z wykorzystaniem testu z DPPH i ABTS,
- analiza zdolności chelatujących intraktu z wykorzystaniem ferrozyny,
- ocena aktywności antyenzymatycznej intraktu względem tyrozynazy, hialuronidazy, acetylocholinoesterazy,
- ocena cytotoksyczności intraktu wobec komórek nowotworowych linii FaDu i HepG2,
- analiza statystyczna otrzymanych wyników.

9. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ i DYSKUSJA

Wyniki przeprowadzonych badań zostały szczegółowo omówione, z uwzględnieniem aktualnych doniesień literaturowych. Wspólnymi cechami prowadzonych badań była analiza składu chemicznego owoców *E. senticosus* i otrzymanego z nich intraktu, a także ocena jego aktywności farmakologicznej pod kątem działania adaptogennego.

9.1. Analiza farmakognostyczna owoców *Eleutherococcus senticosus* – analiza mikroskopowa

(Publikacja 1) Dobór materiału roślinnego do badań jak i dla przetwórstwa farmaceutycznego, o odpowiednich cechach fitochemicznych, jest ważnym aspektem, który przekłada się na otrzymanie wysokiej jakości produktu końcowego. Istnieje wiele doniesień na temat różnic w jakości importowanych do Europy surowców roślinnych, dlatego tak ważna jest właściwa i trafna ocena makro- i mikroskopowa surowca pod względem cech farmakognostycznych, która zapobiegnie przed używaniem surowca zafałszowanego, który nie wykazuje pożądanych właściwości leczniczych [64].

W toku niniejszych badań, ocenie mikroskopowej pod względem cech anatomicznych zostały poddane owoce *E. senticosus*. Budowa anatomiczna owoców jest zbliżona do większości gatunków z rodziny *Araliaceae*, w przekroju poprzecznym w wewnętrznej strefie mezokarpu widoczne są kanały wydzielnicze wypełnione żółtymi kropelkami oleju. Ich obecność, a także obecność druzów w tej strefie oraz czerwonych chromoplastów w strefie zewnętrznej mezokarpu, może posłużyć jako swoisty marker anatomiczny do identyfikacji owoców tego gatunku. Nasze doniesienia są zgodne z Solomonowa et al. [65].

W oparciu o analizę mikroskopową proszku z wysuszonych owoców można określić jego następujące cechy anatomiczne: obecność ściśle do siebie przylegających komórek naskórka, endokarp zawierający włókna zorientowane skośnie do osi kamienia, obecność kanałów wydzielniczych w mezokarpie, które są wypełnione olejem, zaokrąglone komórki miąższu. Z kolei, za cechy diagnostyczne można uznać druzy i chromoplasty w mezokarpie oraz krople oleju tłuszczowego w bielmie.

Wytypowane markery anatomiczne są przydatne do identyfikacji dostarczanych do badań i produkcji farmaceutycznej owoców *E. senticosus*, mogą być przydatne do opracowania monografii dla tego surowca, zgodnie z zaleceniami Europejskiej Agencji Leków.

9.2. Analiza fitochemiczna owoców *Eleutherococcus senticosus*

Rośliny wytwarzają dziesiątki związków, które odpowiadają za ich aktywność farmakologiczną i często cechują się właściwościami odrębnymi niż związki syntetyczne. Jedną z najbardziej rozpowszechnionych grup związków roślinnych są polifenole.

(Publikacja 1) Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) jest wiodącą techniką stosowaną w analizie metabolitów roślinnych, jest często wykorzystywana jako technika pilotażowa do separacji i identyfikacji związków polifenolowych. Materiał do badań stanowiły całe owoce, nasiona i owocnie uzyskane z 4-letnich okazów *E. senticosus*. W pierwszym etapie analiz fitochemicznych zastosowano HPLC-PDA oraz GC-MS. Stosując ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami otrzymano ekstrakty z wydajnością (%) na poziomie 20 (całe owoce), 26 (nasiona) i 33 (owocnie). W kolejnym etapie dokonano analizy HPLC-PDA eleuterozydów B, E, E1, kwasu chlorogenowego, kwasu protokatechowego. Na podstawie uzyskanych wyników badań, spośród trzech eleuterozydów (B, E i E1), tylko eleuterozydy B i E (średniopolarne) zostały oznaczone w ekstraktach z całych owoców – odpowiednio 0,66 i 0,74 mg/g suchego ekstraktu. Wyniki badań wskazały na obecność tych związków w innych strukturach owoców (nasiona i owocnia), jednak ich stężenie jest niższe niż w całych owocach.

Dane literaturowe donoszą o zawartości eleuterozydów B i E w metanolowych ekstraktach z owoców *E. senticosus* pozyskanych z 4-letniej rośliny na poziomie 35,6 i 29,7 mg/100g ekstraktu. Ponadto, wykazano, że ekstrakty otrzymane z owoców roślin 2 i 3-letnich nie zawierały tych związków [66].

Na podstawie badań własnych stwierdzono, że całe owoce *E. senticosus* są bogatym źródłem kwasu chlorogenowego (1,08 mg/ g suchego ekstraktu) w porównaniu z owocnią i nasionami (0,66 i 0,76 mg/g suchego ekstraktu). Wykazano także znaczące ilości kwasu protokatechowego (0,08 mg/g suchego ekstraktu). Doniesienia literaturowe wskazują na wysoką zawartość kwasu chlorogenowego w metanolowych ekstraktach z owoców rośliny 4-letniej (409.2 mg/100g), [66]. Z kolei wodne ekstrakty z owoców zawierały 0,57 mg/g suchej masy kwasu chlorogenowego [67].

W celu identyfikacji składników lotnych zastosowano HS–SPME w połączeniu z GC–MS, zidentyfikowano 38 składników lotnych, co stanowi 93,9% całkowitej sumy.

Zidentyfikowane związki są przedstawicielami grupy węglowodorów monoterpenowych i monoterpenów utlenionych (13,2%) oraz węglowodorów seskwiterpenowych i seskwiterpenów utlenionych (76,6%). Wśród tych grup związkami dominującymi były: (E)-*β*-farnezen (19.46 ± 0.78%), germakren D (12.88 ± 1.10%), (E,Z)-*α*-farnezen (12.84 ± 0.85%), i *β*-bisabolen (12.64 ± 0.70%). Należy pamiętać, że skład ilościowy i jakościowy poszczególnych składników może być różny, w zależności od pochodzenia rośliny, co zostało potwierdzone badaniem składu okazów pozyskanych z różnych terytoriów (Rosja, Chiny), [68]. Co więcej, Załuski et al. udowodnili, że na skład związków lotnych może mieć wpływ czas przechowywania surowca leczniczego [69].

W kolejnym etapie badań dokonano ekstrakcji heksanem oleju z owoców (wydajność 5,4 ± 0,015%). Otrzymano olej półstały, zielonawożółtej barwy, z charakterystycznym zapachem, o absorpcji światła w zakresie 190-430 nm oraz 600-680 nm. Wysoki pik absorbancji przy długości fali 269 nm może wskazywać na obecność tokoferoli, zwłaszcza *α*-tokoferolu, którego zakres absorbancji przypada na 265–310 nm [70]. Natomiast, pik absorbancji przy długościach fal 407 nm oraz 660-680 nm może wskazywać na obecność chlorofilów. Analiza HPLC pozwoliła ustalić, że badany olej zawierał chlorofil A (12,43 mg/g), chlorofil B (3,67 mg/g), zawartość karotenoidów wyniosła 10,13 mg/g oleju.

Analiza chromatograficzna (HPLC–PDA) wykazała dominujący pik z czasem retencji 7,25 min, który został zidentyfikowany jako mieszaninę *β*- i *γ*-tokoferoli, a ich zawartość została określona na 1,36 mg/g oleju, co stanowi umiarkowaną wartość na tle innych olejów pozyskanych z nasion i owoców innych roślin [71]. Zawartość *α*- i *δ*-tokoferolu wynosiła odpowiednio 0,29 i 0,33 mg/g oleju. Porównując dostępne dane literaturowe, nasuwają się wnioski, że olej pozyskany z owoców *E. senticosus* może stanowić bogate źródło *δ*-tokoferolu, gdyż zawiera prawie trzykrotnie większe ilości tego związku niż na przykład olej sojowy [72].

Stosując GC-MS zidentyfikowano w oleju 5 rodzajów kwasów tłuszczowych, stanowiących 24% składu oleju, 3 spośród zidentyfikowanych, stanowiły kwasy nienasycone, t.j. kwas linolenowy (18%), kwas oleinowy (5,36%), a także kwas *α*-linolenowy (0,40%). Z kolei, kwasy nasycone (palmitynowy i stearynowy) stanowiły łącznie 2,5% zawartości oleju. Na tej podstawie można sądzić, że olej pozyskany z owoców *E. senticosus*

jest bogatym źródłem kwasów nienasyconych, mimo że stosunek n-3 kwasów do n-6 kwasów nie jest korzystny z punktu widzenia dietetycznego.

Jak wynika z literatury, owoce *E. senticosus* zawierają kwas ursolowy [73], dlatego, w niniejszej pracy oceniono zawartość tego triterpenu w oleju z nasion techniką HPLC-PDA. Wykazano, że jego zawartość wynosiła 35,72 mg/g oleju. Uwzględniając zawartość oleju w owocach, można stwierdzić, że zawartość kwasu ursolowego w samych owocach wynosi około 1,9 mg/g. Wyniki badań własnych pokazują, że owoce *E. senticosus* są znacznie bogatszym źródłem kwasu ursolowego niż podają wcześniejsze doniesienia. Jang et al. [73] stwierdzili, że 100 g owoców zawiera około 3,5 mg kwasu ursolowego. Różnica ta może wynikać z charakteru fizykochemicznego rozpuszczalników zastosowanych do ekstrakcji, heksan w przypadku badań własnych i metanol w przypadku badań Jang'a et al.

9.3. Analiza fitochemiczna intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus*

(Publikacja 2) Aktywność adaptogenna związana jest z obecnością metabolitów wtórnych, bardzo często charakterystycznych tylko dla niewielkiej grupy roślin. Pierwotne i wtórne metabolity są odpowiedzialne za działanie farmakologiczne surowca roślinnego oraz jego przetworów. W przypadku *Eleutherococcus* głównymi wtórnymi metabolitami są eleuterozydy, zwłaszcza eleuterozyd B i E, [8]. Jednak analiza HPLC-DAD intraktu dostarczyła nieoczekiwanych wyników, ponieważ nie zidentyfikowano w nim eleuterozydów, zarówno w surowym intrakcie, jak i w warstwie octanu etylu. Brak tych związków może wynikać z różnicy w ich polarności i polarności rozpuszczalnika użytego do przygotowania intraktu. Warstwa octanu etylu okazała się bogata w kwas kawowy (3,85 mg/g suchego intraktu i protokatechowy (1,16 mg/g suchego intraktu). Drugą grupę badanych metabolitów stanowiły cukry. W intrakcie zidentyfikowano *mio*-inozytol (267,5 mg/g suchego intraktu) i D-mannitol (492,5 mg/g suchego intraktu). *Mio*-inozytol jest alkoholem cukrowym o działaniu immunostymulującym, doniesienia literaturowe wskazują, że stosowany w dawkach od 232,7 do 687,3 mg/kg w diecie może wzmacniać nieswoistą i swoistą odpowiedź immunologiczną u ryb (karp Jian, *Cyprinus carpio* var. Jian) mierzoną jako wzrost aktywności fagocytarnej leukocytów [74].

W kolejnym etapie badań **(Publikacja 3)** określono całkowitą zawartość związków fenolowych i polifenolowych w intrakcie. Na podstawie analizy uzyskanych wyników, zauważono, że całkowite stężenie polifenoli (TPC) wyniosło 1,02 ± 0,04 mg/ g intraktu; całkowite stężenie flawonoidów (TFC) – 0,30 ± 0,074 mg/ g intraktu, natomiast stężenie kwasów fenolowych oszacowano na 0,19 ± 0,05 mg/g intraktu. Dane te porównano z dostępnymi doniesieniami literaturowymi, dotyczącymi zwartości tych składników w tradycyjnie używanym surowcu, korzeniu. Adamczyk et al. [75] zbadali zawartość flawonoidów i polifenoli w metanolowym ekstrakcie z korzenia *E. senticosus* oraz 4 innych gatunków *Eleutherococcus*. Wykazano, że TPC zawierał się w przedziale od 4,10 do 10,40 mg GAE/g, natomiast TFC od 1,80 do 6,50 mg QEs/g.

Uzyskane wyniki wskazują na wyższe stężenia TFC i TPC w ekstrakcie z korzeni *E. senticosus*. Można zasugerować, że stężenia związków polifenolowych zależą od rodzaju

materiału roślinnego (część podziemna lub nadziemna), rodzaju rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji, sposobu ekstrakcji oraz warunków wzrostu. Z tego powodu ważne jest kontrolowanie każdej partii zebranego materiału roślinnego, aby zapewnić jakość ekstraktu lub preparatów roślinnych.

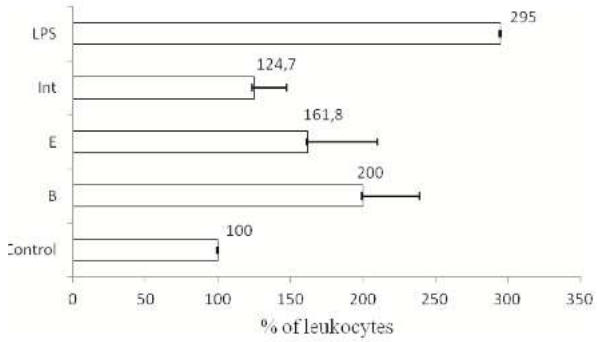
9.4. Analiza fitofarmakologiczna intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus*

(Publikacja 2) W niniejszym cyklu badań, została postawiona hipoteza, że intrakt z owoców *Eleutherococcus senticosus* może odgrywać fizjologiczną rolę w nieswoistej odporności organizmu. W badaniu aktywności leków roślinnych wybór odpowiednich metod i ich walidacja są ważnymi etapami określania aktywności produktów i ekstraktów. Aby potwierdzić założoną hipotezę, zbadany został bezpośredni wpływ intraktu na stymulację leukocytów ludzkiej krwi obwodowej (PBL) w obecności wirusa VSV w modelu VSV-PBL *in vitro*.

Ponieważ wirusy mogą replikować tylko w komórkach żywych, w początkowym etapie określono CPE (efekt cytopatyczny) analizowanych próbek na linii komórkowej A549. Komórki nowotworowe stymulowano badanymi komponentami przez 3 dni, stężenia do 300 µg/mL intraktu nie powodowały zmian cytopatycznych w komórkach. Wynik ten został porównany z wzorcami eleuterozydów B i E, stężenie do 100 µg/mL nie powodowało zmian cytopatycznych.

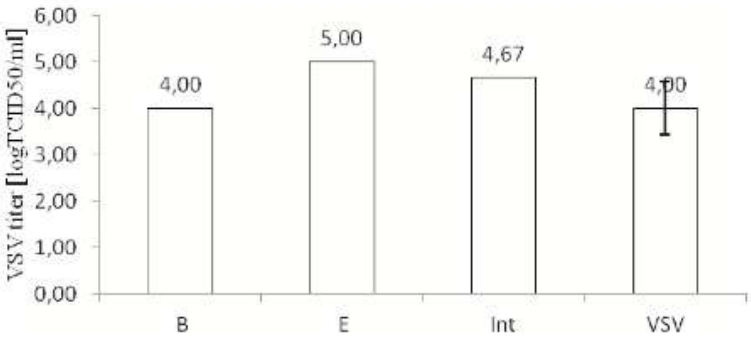
Linia komórkowa A549 została później zastosowana jako medium służące ocenie wytwarzania cząstek wirusów i oceny aktywności przeciwwirusowej badanego intraktu.

W celu zweryfikowania czy wyselekcjonowane wcześniej dawki nie powodują śmierci izolowanych od zdrowych dawców leukocytów, leukocyty były stymulowane przez 48 h intraktem (300 µg/mL) i eleuterozydami B i E (po 100 µg/mL), wyniki porównywano z niestymulowaną próbą kontrolną (Rycina 3). Stężenia nie wpłynęły na spadek żywotności PBL, przeciwnie, zauważono wzrost proliferacji PBL. Na rycinie 3 przedstawiono statystycznie istotny wzrost liczby PBL w porównaniu z kontrolą po 48 h stymulacji. Wzrost liczby leukocytów jest częściowo zgodny z postawioną hipotezą o adaptogennym działaniu intraktu z owoców.

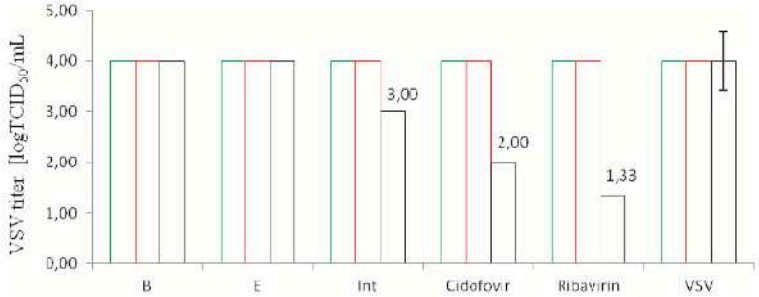


Rycina 3 Proliferacja (%) leukocytów po stymulacji intraktem (300 µg/mL), eleuterozydami B i E (po 100 µg/mL) przez 48 godzin. Jako kontrolę pozytywną zastosowano LPS (100 µg/mL). Dane z trzech oddzielnych eksperymentów przeprowadzonych z użyciem leukocytów izolowanych od niezależnych dawców testowanych w dwóch powtórzeniach są wyrażone jako średnia ± SEM. Wszystkie dane przedstawiono jako wartości mediany.

Aby uniknąć nieścisłości, czy badany intrakt z owoców *E. senticosus* ma zdolności adaptogenne i zmniejsza miano wirusów, czy działa samodzielnie jako lek przeciwwirusowy, określona została jego aktywność przeciwko wirusowi pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV). W celu zidentyfikowania etapu, na którym replikacja może być zahamowana, VSV wstępnie potraktowano związkami przed infekcją komórek, drugim wariantem było potraktowanie związkami podczas adsorpcji wirusa, a ostatnim wariantem było dodanie związków po adsorpcji wirusa. Inkubacja VSV z intraktem przed zakażeniem nie powodowała istotnego obniżenia miana wirusa (Rycina 4). Nie zaobserwowano wpływu na replikację VSV, gdy próbki dodawano w trakcie adsorpcji lub 30 min po zakażeniu VSV (Rycina 5). Dodatkowo w celu weryfikacji naszych wyników, do doświadczenia włączono eleuterozydy B i E. Zebrane dane sugerują, że intrakt, eleuterozydy B i E nie działały jako środki przeciwwirusowe z mianem (logTCID50/mL) około 4,6, 4,0 i 5,0 w porównaniu do niestymulowanej kontroli z mianem na poziomie 4,0.



Rycina 4 Wirusobójczy wpływ związków na VSV. Eleuterozyd B (100 µg/mL), eleuterozyd E (100 µg/mL) i intrakt (300 µg/mL) inkubowano z VSV przez 2 godziny w 37 °C. Po czasie inkubacji mieszaniny miareczkowano, wysiewano na monowarstwie komórek A549 i inkubowano przez 72 godz. Miano VSV porównano z nietraktowaną (tylko VSV) kontrolą.

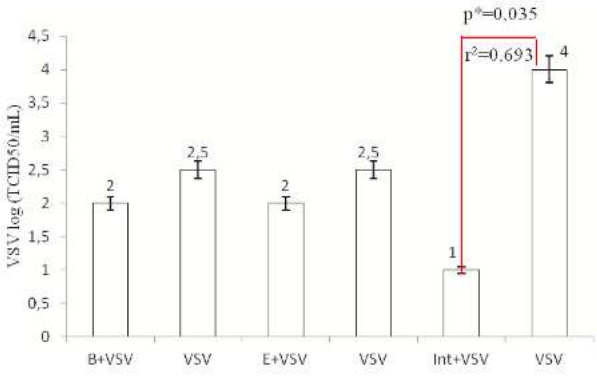


Rycina 5 Wpływ związków na replikację VSV w trzech wariantach: zielony: związki dodano do komórek A549 24 h przed infekcją VSV; czerwony: związki były obecne tylko w okresie adsorpcji; czarny: związki dodano po okresie adsorpcji. Jako kontrole pozytywne zastosowano cydofowir i rybawirynę. B, eleuterozyd B (100 µg/mL); E, eleuterozyd E (100 µg/mL); Int, intrakt (300 µg/mL).

Dodanie intraktu 90 min po zakażeniu obniżyło miano VSV o około 1 log, natomiast rybawiryna zastosowana jako kontrola, o około 2,6 log. Według [76], obniżenie miana mniej niż 1 log wskazuje na całkowity brak działania wirusobójczego. Uzyskane wyniki potwierdziły naszą hipotezę o braku aktywności anty-VSV.

Nieswoistą, wrodzoną odporność można stymulować różnymi roślinnymi metabolitami, takimi jak adaptogeny, które powinny zwiększać odporność, na przykład na infekcję wirusami, takimi jak wirus VSV. Aby stworzyć jak najbardziej zbliżone warunki zachodzące w organizmie człowieka po zakażeniu wirusem, określono wpływ intraktu na wzbudzenie odporności ludzkich leukocytów (PBL) w odpowiedzi na zakażenie tym wirusem (VSV), w modelu VSV-PBLs *in vitro*. VSV nie powoduje naturalnych infekcji w europejskiej populacji ludzkiej, dlatego w ludzkiej surowicy nie ma swoistych przeciwciał

przeciwko VSV, co wyklucza udział odporności nabytej w tym eksperymentalnym modelu odporności wrodzonej. Po 48-godzinnej stymulacji intraktem komórek PBL zakażonych VSV, zauważono trzykrotny spadek miana VSV w porównaniu z niestymulowaną kontrolą, co wskazuje na częściową oporność (Rycina 6). Nie stwierdzono statystycznie istotnego spadku miana w przypadku traktowania próbek eleuterozydami B i E.



Rycina 6 Wpływ intraktu z owoców E. senticosus oraz eleuterozydu B i eleuterozydu E na stymulację odpowiedzi immunologicznej w komórkach PBL zakażonych VSV. B, eleuterozyd B (100 µg/mL); E, eleuterozyd E (100 µg/L)); Int, intrakt (300 µg/mL). Wyniki przedstawiono w postaci mediany.

Miano wirusa VSV ≥ 4 log TCID50 uznano za niedobór odporności wrodzonej, miano 2–3 log wskazuje na częściową odporność, a miano 0–1 log wskazuje na całkowitą wrodzoną odporność przeciwwirusową. Co ciekawe, stosując VSV-PBLs jako system modelowy, stwierdzono, że tylko intrakt powodował statystycznie istotną oporność, zaklasyfikowaną do oporności częściowej, z mianem 3 log. Zauważono istotną korelację między VSV-PBLs-Intrakt a VSV-PBLs (r^2 = 0,693). Sugeruje to, że niższa replikacja wirusa po stymulacji VSV-PBLs-Intrakt może być związana ze zwiększonym wydzielaniem IL-10. Dodatni współczynnik korelacji (r^2 = 0,872) wskazuje, że zmienne są bezpośrednio powiązane. Jest to zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi replikacji VSV w leukocytach wrażliwych na infekcje wirusowe, w których wykazano, że zmiany w równowadze profilu cytokin mogą być związane z produkcją czynnika martwicy nowotworu-α (TNF-α), interleukiny 10 (IL-10) lub interferonu-γ (IFN-γ) przez leukocyty zakażone VSV [77]. Należy wspomnieć, że infekcja VSV nie wpłynęła na żywotność PBLs, jak wykazano wcześniej [78].

Roślinne adaptogeny znane są ze swojego działania przeciwzapalnego, dlatego w następnym etapie eksperymentów, sprawdzony został wpływ intraktu na produkcję zarówno interleukiny IL-2 (cytokina prozapalna), jak i interleukiny IL-10 (cytokina przeciwzapalna). W badanych stężeniach nie zaobserwowano istotnych zmian w poziomie IL-2. Jednak próbki traktowane intraktem wykazały statystycznie istotny wzrost produkcji IL-10 – wzrost stężenia o 328 ± 1,4 pg/mL (kontrola dodatnia wzrost o 473 pg/mL). W przypadku eleuterozydu B i E, wzrost był na poziomie 170,3 i 187 pg/mL. Znaczny wzrost stężenia IL-10 po stymulacji leukocytów intraktem może wynikać z synergizmu różnych związków w nim obecnych.

Dotychczas badano jedynie wpływ ekstraktów z korzenia na poziom IL-6 w tkance płucnej mysiego modelu ostrego uszkodzenia płuc oraz w komórkach ludzkiego mięsaka maziówkowego SW982. Ekstrakt obniżał poziom IL-6 [79]. Wyniki badań ekstraktu etanolowego z korzeni *E. senticosus* wykazały wzrost stężenia IL-6 (0,03–1,0 mg/mL). Takiego efektu nie zaobserwowano w przypadku izolowanych metabolitów, tj. eleuterozydu B i E [80]. Spadek stężenia IL-4, IL-5 i IL-12 zaobserwowano przy wyższych dawkach ekstraktu, natomiast przy niższych zaobserwowano stymulację IL-6 i IL-13 [81]. Dane literaturowe z tego zakresu nie są spójne, dlatego najbardziej wiarygodnym krokiem byłaby ocena wpływu ekstraktu na szeroki panel interleukin, zarówno prozapalnych, jak i przeciwzapalnych, w jednym zestawie eksperymentalnym.

(Publikacja 3) W kolejnym etapie badań określono potencjał antyoksydacyjny intraktu. Wiadomym jest, że przeciwutleniacze pochodzenia roślinnego mogą chronić organizm na poziomie molekularnym przed wolnymi rodnikami. Nie ma jednego uniwersalnego testu do oceny tych zdolności, dlatego w eksperymentach uwzględniono trzy metody. Badanie próbek różnymi metodami powinno wykazać, czy aktywność antyoksydacyjna próbek roślinnych zależy od ich profilu chemicznego i interakcji z wolnym rodnikiem. Zmierzone wartości antyoksydacyjne intraktu zostały wyrażone jako wartość medialnego stężenia skutecznego - EC_{50}. Dla metody z ABTS, wartość EC_{50} wyniosła 55,22 µg/mL, dla testu z DPPH – 250,48 µg/mL. W teście oceny chelatowania jonów żelaza z ferrozyną, intrakt odznaczył się chelatowaniem na poziomie 12,12%. Prezentowane wartości okazały się dwukrotnie słabsze w porównaniu do ekstraktu z korzenia *E. senticosus*.

Zapalenie to naturalny proces indukowany przez różne bodźce, na rozwój i przebieg którego mają wpływ między innymi takie enzymy jak hialuronidaza (Hyal) czy tyrozynaza (Tyr). Hialuronidazy to enzymy rozkładające kwas hialuronowy. Tyrozynaza, z kolei uczestniczy w procesie melanogenezy, w wyniku którego jest produkowana melanina. Wielu badaczy ustaliło związek między ekspresją Hyal a wzrostem stanu zapalnego, jak również odkryto, że aktywność hialuronidazy wzrasta w różnych chorobach nowotworowych. Uwzględniając powyższe, identyfikacja i klasyfikacja inhibitorów Hyal może być korzystna z perspektywy opracowywania nowych klas leków przeciwzapalnych. Dlatego też, w dalszych poszukiwaniach, zbadano wpływ intraktu na aktywność tych enzymów. Wyniki przedstawione zostały jako wartość IC_{50}, dla hialuronidazy (30 U/mL) ta wartość wynosiła 217,44 µg/mL, dla tyrozynazy – 586,83 µg/mL. Zmierzona została także aktywność względem acetylocholinoesterazy (0,4 U/mL), nie stwierdzono inhibicji. Intrakt okazał się słabszym inhibitorem od klasycznego ekstraktu z korzenia *E. senticosus* (IC_{50} wynosiły odpowiednio dla hialuronidazy 44,80 µg/mL i 162,56 µg/mL – dla tyrozynazy).

Interesującym odkryciem była inhibicja hialuronidazy przez intrakt, który okazał się być silniejszym inhibitorem niż escyna, IC_{50} = 388,80 µg/mL. Oznacza to, że intrakt z owoców może mieć potencjalne zastosowanie jako substancja lecznicza.

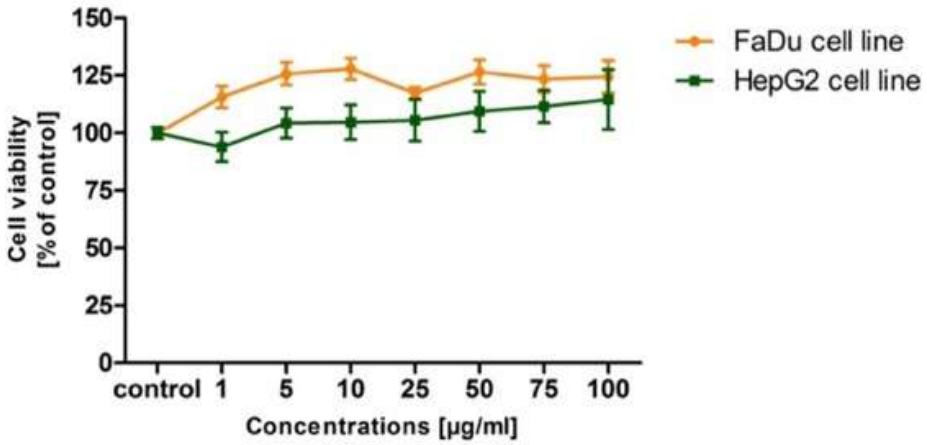
Dostępność danych literaturowych dotyczących wpływu przetworów z owoców *E. senticosus* na analizowane enzymy jest bardzo nieliczna. Fakt ten wskazuje na pionierskość podjętych w niniejszym cyklu badań. Uzyskane wyniki zostały odniesione do wyników aktywności przeciwenzymatycznej innych organów *E. senticosus.* Adamczyk et. al. [75] badali aktywność anty-acetylocholinesterazową i anty-hialuronidazową ekstraktów z korzenia *E. senticosus* (100 µg/0,16 mL), uzyskując poziom inhibicji 26,1 i 10%. Kuźniewski et al. [82] stwierdzili, że 75% etanolowe ekstrakty z jesiennych i wczesnowiosennych liści *E. senticosus* hamowały Hyal odpowiednio w 74,3% i 33%, przy stężeniu 22 µg/0,16 mL mieszaniny reakcyjnej. Zwiększone hamowanie ekstraktów z liści jesiennych może być spowodowane obecnością większej ilości substancji polifenolowych.

Rozpoczynając analizę cytotoksyczności intraktu z owoców *E. senticosus* postawiono hipotezę, że adaptogeny nie powinny działać jako silne środki cytotoksyczne wobec

komórek nowotworowych, powinny stymulować nieswoistą odporność organizmu jako adaptogen. Sugeruje się, że w przypadku nowotworów adaptogeny raczej nie powinny działać bezpośrednio na komórki, a jedynie pobudzać układ odpornościowy do niszczenia komórek nowotworowych. Aby potwierdzić założenie, że intrakt wykazuje bardziej działanie adaptogenne niż cytotoksyczne, określono jego cytotoksyczność na dwie linie komórek nowotworowych, FaDu i HepG2.

FaDu to linia komórkowa o morfologii nabłonka, która została rozpoznana na podstawie biopsji u pacjenta z rakiem płaskonabłonkowym. Komórki HepG2 to ludzka linia komórkowa raka wątroby. Ze względu na wysoką specjalizację komórkową (zarówno funkcjonalną, jak i morfologiczną), komórki HepG2 i FaDu są odpowiednim modelem do badania aktywności cytotoksycznej ksenobiotyków *in vitro* oraz toksyczności [61, 62, 83].

Wyniki zaprezentowane poniżej (Rycina 7), obrazują żywotność obu linii komórkowych po potraktowaniu intraktem. Nie zauważono zmian w żywotności komórek, nie zauważono zmian cytotoksycznych.



Rycina 7 Aktywność cytotoksyczna intraktu wobec linii komórkowych FaDu i HepG2. Stężenia intraktu: 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 µg/mL.

Istnieją pewne doniesienia na temat cytotoksycznej aktywności adaptogenów wobec linii komórkowych. Jednym z interesujących są badania nad nanocząsteczkami srebra z przyłączonym ekstraktem z suszonych łodyg *Eleutherococcus senticosus*. Wyniki wskazują na ich znaczne działanie cytotoksyczne i apoptotyczne wobec komórek raka płuc A549 i komórek raka okrężnicy HT29 przy stężeniu 10 µg/mL. Autorzy sugerują, że potencjał

przeciwnowotworowy Sg-AgNP jest powiązany ze stymulacją apoptozy przez szlak kaspazy-3/p38 MAPK poprzez tworzenie ROS [84]. Z kolei Załuski et al. [85] określili działanie cytotoksyczne intraktu z owoców *E. senticosus* na linie komórkowe białaczek, HL-60, HL-60/MX1, HL-60/MX2, CEM/C1 i CCRF/CEM, donosząc, że wartość IC_{50} mieściła się w zakresie 10,40-50 µg/mL. Autorzy również przebadali inne części *E. senticosus,* wartości IC_{50} dla ekstraktów etanolowych z korzeni, liści wiosennych i jesiennych wobec linii komórkowej HL-60, wyniosły odpowiednio: 208, 312 i 299 µg /mL [13]. Jest to kolejny dowód sugerujący, że adaptogeny są raczej słabym środkiem przeciwnowotworowym i nie hamują bezpośrednio proliferacji komórek. Należy również zwrócić uwagę na fakt, że uzyskane stężenia toksyczne były bardzo wysokie, niezależnie od tego, czy użyto komórek zdrowych, czy nowotworowych, jest to zgodne z funkcją adaptogenu, który jest uważany raczej za nietoksyczną substancję dla organizmu [78, 86]. Nie spełnia to także rekomendacji Narodowego Instytutu Raka dotyczącej aktywności cytotoksycznej *in vitro*. Według wytycznych, jeśli wartość IC_{50} wynosi więcej niż 20 µg/mL, substancja jest klasyfikowana jako nietoksyczna (National Cancer Institute, Stany Zjednoczone), [87].

10. WNIOSKI

Wyniki badań, które zostały przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, pozwoliły na rozszerzenie aktualnego stanu wiedzy o cechach farmakognostycznych i fitochemicznych owoców *E. senticosus*. Ponadto poznano skład chemiczny i aktywność farmakologiczną intraktu z owoców *E. senticosus*. Na podstawie uzyskanych wyników można wysunąć następujące wnioski:

1. Uzyskane wyniki badań jednoznacznie wskazały, że sposób przygotowania przetworu ma wpływ na skład chemiczny i właściwości produktu.
2. Owoce *E. senticosus* charakteryzują się cechami anatomicznymi, obserwowanymi mikroskopowo (druzy i czerwone chromoplasty w mezokarpie, żółte krople oleju tłuszczowego w bielmie), które pozwalają na ocenę surowca pod względem jego czystości, jakości, zanieczyszczeniem innymi surowcami roślinnymi.
3. Owoce *E. senticosus* cechują się wysoką zawartością kwasu chlorogenowego i eleuterozydów B i E. Ekstrakty z nich pozyskane mogą być potencjalnie badane pod kątem wykorzystania w profilaktyce i terapii chorób skóry przebiegających z nadaktywnością tyrozynazy, jako środek wybielający skórę.
4. Wykazano, że intrakt z owoców *E. senticosus* nie zawiera eleuterozydów, które w literaturze naukowej uznane są za związki odpowiedzialne za efekt adaptogenny. Można zasugerować, że intrakt jest nowym źródłem innego związku o działaniu immunostymulującym, mianowicie *myo*-inozytolu.
5. Istotne z punktu działania leczniczego intraktu jest indukcja nieswoistej odpowiedzi immunologicznej leukocytów (PBLs) w modelu badawczym VSV-PBLs-Intrakt. Po raz pierwszy wykazano, że intrakt obniża miano wirusa VSV, prawdopodobnie poprzez wzrost poziomu przeciwzapalnej interleukiny IL-10. Uzyskane wyniki potwierdzają słuszność tradycyjnego stosowania owoców, w etnomedycynie ludów Syberii, w leczeniu chorób wirusowych i schorzeń charakteryzujących się niskim poziomem leukocytów.

6. Wykazano, że intrakt cechuje się niską aktywnością cytotoksyczną. Uzyskane wyniki wskazują, że adaptogeny są raczej nietoksyczne zarówno dla komórek zdrowych i nowotworowych. Według hipotez postawionych w latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych przez naukowców radzieckich, adaptogen powinien charakteryzować się niskim potencjałem przeciwnowotworowym. Powinien natomiast stymulować układ immunologiczny do walki z komórkami nowotworowymi. Otrzymane wyniki własne częściowo wpisują się w te założenia, jednak wymagane są dalsze badania.

Podsumowując, zaprezentowane wyniki badań wykazały, że intrakt pozyskany z owoców *E. senticosus* stanowi doskonałą alternatywę dla tradycyjnie pozyskiwanych ekstraktów z korzenia, cechując się zbliżonymi do tradycyjnego właściwościami biochemicznymi i leczniczymi. Nadmierna eksploatacja, polegająca na zbiorach w środowisku naturalnym, wskazuje na potrzebę wprowadzenia upraw ważnych roślin leczniczych w Europie. Dostrzeżony został potencjał owoców jako źródło odnawialnego adaptogenu, a także gatunków potencjalnie interesujących do uprawy w Europie Zachodniej. Może być on z powodzeniem stosowany jako suplement diety, który mógłby zastąpić tradycyjnie używane ekstrakty korzeniowe, przyczyniając się tym samym do bardziej zrównoważonego, ekologicznego pozyskiwania surowca i przyczynienia się do zachowania występowania tej cennej adaptogennej rośliny w środowisku naturalnym, odsuwając widmo zagrożenia jej wyginięciem.

11. PIŚMIENNICTWO

1. Ruggiero M. A., Gordon D. P., Orrell T. M., Bailly N., Bourgoin T., Brusca R. C., et al. Correction: a higher level classification of all living organisms. PLOS One. 2015 Jul 11.

2. Załuski D., Smolarz D. H., *Eleutherococcus senticosus* – przykład rośliny adaptogennej. Postępy fitoterapii. 2008;(4): 240-245.

3. Bone K., Mills S. Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim.), How to use the monogrpahs, Part three: Materia Medica. Principles and Practice of Phytotherapy Modern Herbal Medicine, Second Edition. 2013; 818-825.

4. Huang L. Z., Zhao H. F., Huang B. K., Zheng C. J., Peng W., Qin L. P. *Acanthopanax senticosus*: review of botany, chemistry and pharmacology. Pharmazie. 2011;(66): 83-97.

5. Wdowik A. Wybrane surowce zielarskie o działaniu adaptogennym – właściwości, mechanizmy działania, zastosowanie *Rhodiola rosea, Schisandra chinensis*. 2017.

6. Tumiłowicz J., Banaszczak P. Woody species of *Araliaceae* at the Rogów Arboretum. Rocznik dendrologiczny. 2006; 54: 35-50.

7. Kajdański E. Zawiłe dzieje „korzenia życia": od cesarskiej alkowy do koncernów farmaceutycznych. Zeidler K. (red.), Gdańskie studia Azji Wschodniej. 2013;(4): 124-129.

8. Załuski D., Smolarz H. D., Chomicki A. TLC screening for eleutherosides B, E, and E1, and isofraxidin in the roots of six *Eleutherococcus* species cultivated in Poland. Acta Chromatographica. 2010: p. 581–589.

9. Davydov M., Krikorian A. D. *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim. (Araliaceae) as an adaptogen: a closer look. Journal of Ethnopharmacology. 2000;(72): 345-393.

10. Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne. Farmakopea Polska XI Warszawa: Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, 2014.

11. Wolski T., Baj T., Ludwiczuk A., Sałata M., Główniak K. Surowce roślinne o działaniu adaptogennym oraz ocena zawartości adaptogenów w ekstraktach i preparatach otrzymanych z rodzaju *Panax*. Postępy Fitoterapii. 2009;(2): 77-97.

12. Matławska I. Farmakognozja. Podręcznik dla studentów Poznań: Wydawnictwo Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; 2008.

13. Załuski D., Smolarz H. D., Bogucka-Kocka A. Cytotoxic activity of ethanolic extracts of *Eleutherococcus* species cultivated in Poland on HL60 leukemia cell line. Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences. 2014: p. 41-45.

14. Bączek K. *Eleuterokok kolczys*ty – alternatywa dla żeń-szenia? Herbalism. 2017: p. 7-9.

15. Załuski D., Janeczko Z. Eleuterozydy. Ich budowa, właściwości biologiczne i działanie lecznicze. Postępy fitoterapii. 2013;: 118-122.

16. Kohlmünzer S. Farmakognozja Podręcznik dla studentów farmacji Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 1998.

17. Muszyńska B., Łojewski M., Rojowski J., Opoka W., Sułkowska-Ziaja K. Surowce naturalne mające znaczenie w profilaktyce i wspomagające leczenie depresji. Psychiatria Polska. 2015;(49): 435-453.

18. Murthy N. H., Kim Y., Georgiev M. Biotechnological production of eleutherosides: current state and perspective. Applied Microbiology and Biotechnology. 2014; 98: 7319-7329.

19. Liao L., Li L., Yi H., Meng H., Yin-mao D., Pei-gen X. A preliminary review of studies on adaptogens: comparison of their bioactivity in TCM with that of ginseng-like herbs used worldwide. Chinese Medicine. 2018.

20. Gerontakos S. E., Casteleijn D., Shikov A., Wardle J. A critical review to identify the domains used to measure the effect and outcome of adaptogenic herbal medicines. Yale Journal of Biology and Medicine. 2020: p. 327-346.

21. Panossian A., Wikman G. Effects of adaptogens on the central nervous system and the molecular mechanisms associated with their stress—protective activity. Pharmaceuticals. 2010: p. 188-224.

22. Panossian A. G. Adaptogens: Tonic Herbs for Fatigue and Stress. Alternative and Complementary Therapies. 2004 Jul 05; 9(6): 327-331.

23. Kwan C. Y., Zhang W., Sim S., Deyama T., Nishibe S. Vascular effects of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*): Endothelium-dependent NO- and EDHF- mediated relaxation depending on vessel size. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2004; 369: 473-480.

24. Jung C. H., Jung H., Shin Y. C., Park J. H., Jun C. Y., Kim H. M., et al. *Eleutherococcus senticosus* extract attenuates LPS- induced iNOS expression through the inhibition of Akt and JNK pathways in murine macrophage. Journal of Ethnopharmacology. 2007; 113: 183-187.

25. Han S. B., Yoon Y. D., Ahn H. J., Lee H. S., Lee C. W., Yoon W. K., et al. Toll-like receptor-mediated activation of B cells and macrophages by polysaccharide isolated from cell culture of *Acanthopanax senticosus*. International Immunopharmacology. 2003; 3: 1301-1312.

26. DOZ.pl Sp. z o.o. DOZ. [Online].; Dostęp: 2022-09-12 https://www.doz.pl/apteka/szukaj?search=Eleutherococcus+senticosus

27. Bleakney T. L. Deconstructing an adaptogen. Holistic Nursing Practice. 2008; 22: 220-224.

28. EMA. Assessment report on *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. Et. Maxim) Maxim., radix. 2014; Report No.: 3-6.

29. Załuski D., Smolarz H. D. TLC profiling, nutritional and pharmacological properties of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*) cultivated in Poland. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. 2016: p. 1497-1502.

30. Baj T. aptekarzpolski.pl. [Online].; Dostęp: 2022-09-11. https://www.aptekarzpolski.pl/wiedza/08-2010-adaptogeny-jak-wspomoc-organizm-w-walce-ze-stresem

31. Zhang B., Chang H. S., Hu K. L., Yu X., Li L. N. Combination of geniposide and eleutheroside b exerts antidepressant-like effect on lipopolysaccharide-induced depression mice model. Chinese Journal of Integrative Medicine. 2021; 27: 534-541.

32. Wang F., Yuan C., Liu B., Yang Y. F., Wu H. Z. Syringin exerts anti-breast cancer effects through pi3k-akt and egfr-ras-raf pathways. Journal of Translational Medicine. 2022; 20: 310.

33. Dong H., Wu M., Wang Y., Du W., He Y., Shi Z. Total syntheses and anti-inflammatory activities of syringin and its natural analogues. Journal of Natural Products. 2021; 84: 2866-2874.

34. Shen Z., Yang C., Zhu P., Tian C., Liang A. Protective effects of syringin against oxidative stress and inflammation in diabetic pregnant rats via tlr4/myd88/nf-κb signaling pathway. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2020; 131: Article 110681.

35. Zhang A., Liu Z., Sheng L., Wu H. Protective effects of syringin against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. Journal of Surgical Research. 2017; 201: 252-257.

36. Zhang H., Yang Q., Li J. Eleutheroside B protects against acute kidney injury by activating igf pathway. Molecules. 2019; 24: 3876.

37. Huang L. Z., Wei L., Zhao H. F., Huang B. K., Rahman K, Qin L. P. The effect of eleutheroside E on behavioral alterations in murine sleep deprivation stress model. European Journal of Pharmacology. 2011; 656: 150-155.

38. Ahn J., Um M. Y., Lee H., Jung C., Heo S. H., Ha T. Y. Eleutheroside E, an active component of *Eleutherococcus sentic*osus, ameliorates insulin resistance in type 2 diabetic db/db mice. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013; 2013.

39. Kimura Y., Sumiyoshi M. ffects of various *Eleutherococcus senticosus* cortex on swimming time, natural killer activity and corticosterone level in forced swimming stressed mice. Journal of Ethnopharmacology. 2004; 95(2-3): 447-453.

40. Gębalski J., Graczyk F., Załuski D. Paving the way towards effective plant-based inhibitors of hyaluronidase and tyrosinase: a critical review on a structure–activity relationship. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2022: p. 1120-1195.

41. Arouca A., Grassi-Kassisse D. M. *Eleutherococcus senticosus*: Studies and effects. Health. 2013; 5(9): 1509-1515.

42. Zhou Y., Cheng C., Baranenko D., Wang J., Li Y., Lu W. Effects of *Acanthopanax senticosus* on brain injury induced by simulated spatial radiation in mouse model based on pharmacokinetics and comparative proteomics. International Journal of Molecular Sciences. 2018; 19(1): 159.

43. McKenna D., Jones K., Hughes K., Humphrey S. Botanical Medicines: the Desk Reference for Major Herbal Supplements. Botanical Medicines. 2nd ed. 2002; 255-270.

44. Załuski D.., Kuźniewski R, Janeczko Z. 'HPTLC-profiling of eleutherosides, mechanism of antioxidative action of eleutheroside E1, the PAMPA test with LC/MS detection and the structure-activity relationship. Saudi Journal of Biological Sciences. 2018; 25: 520-528.

45. Fang L., Dong Y., Deng L. Neuroprotective effect of eleutheroside B on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis in PC12 cells. Neural Regeneration Research. 2011; 18: 1375-1379.

46. Zielińska S., Dąbrowska M., Kozłowska W., Kalemba D., Abel R., Dryś A., et al. Ontogeneticand trans-generational variation of essential oil composition in *Agastache rugosa*. Industrial Crops and Products. 2017; 97: 612-619.

47. Strzemski M., Wójciak-Kisior M., Sowa I., Rutkowska E., Szwerc W., Kocjan R., et al. Carlina species as a new source of bioactive pentacyclic triterpenes. Industrial Crops and Products. 2016; 94.

48. Chun O. K., Kim D. O., Lee C. Y. Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003: p. 8067-72.

49. Pior R. L., Wu X., Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005; 53: 4290-4302.

50. Christ B., Muller H. Zur serienmäßigen bestimmung des gehaltes an flavonol-derivaten in drogen. Archiv der Pharmazie. 1960; 293: 1033-1042.

51. Gawlik-Dziki U., Dziki D., Baraniak B., Lin R. The Effect of Simulated digestion in vitro on bioactivity of wheat bread with tartary buckwheat flavones addition. LWT—Food Science. Technology. 2009; 42: 137-143.

52. Floegel A., Dae-Ok K., Sang-Jin C., Sung I. K., Ock C. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. Journal of Food Composition and Analysis. 2011; 24: 1043-1048.

53. Rice-Evans C., Miller N. J. Total antioxidant status in plasma and body fluids. Methods in Enzymology. 1994; 234: 279-293.

54. Blois M. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature. 1958; 181: 1199-1200.

55. Riemer J., Hoepken H., Czerwinska H., Robinson S. R., Dringen R. Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. Analytical Biochemistry. 2004; 331: 370-375.

56. Stookey L. L. Ferrozine—A new spectrophotometric reagen for iron. Analytical Chemistry. 1970; 42: 779-781.

57. Sheet–MAK257 PI. Sigma Aldrich. [Online].; Dostęp: 2022-01-01. https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/125/489/mak257bul.pdf

58. Orzechowska B., Antoszków Z., Siemieniec I., Lorenc M., Jatczak B., Błach-Olszewska Z. Cytokine production by human leukocytes with different expressions of natural antiviral immunity and the effect of antibodies against interferons and TNF-alpha. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis. 2007: p. 111-117.

59. Sheet-MAK458 PI. Sigma Aldrich. [Online].; Dostęp: 2022-01-01 https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/355/214/mak458pis-mk.pdf

60. Sheet–MAK119 PI. Sigma Aldrich. [Online].; Dostęp: 2022-01-01 https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/130/634/mak119bul.pdf

61. Senthilraja P., Kathiresan K. In vitro cytotoxicity MTT assay in Vero, HepG2 and MCF-7 cell lines study of Marine Yeast. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2015 May: p. 80- 84.

62. Knowles B. B., Howe C. C., Aden D. P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. Science. 1980; 209: 497-499.

63. MTT Cell Growth Assay Kit. Pl Sigma Aldrich. [Online].; Dostęp: 2022-01-01 https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/263/797/isscr2017-3dgro-ps-mk.pdf

64. Wang Y. H., Meng Y., Zhai C., Wang M., Avula B., Yuk J., et al. The chemical characterization of *Eleutherococcus senticosus* and *Ci-wu-jia* tea using UHPLC-UV-QTOF/MS. International Journal of Molecular Sciences. 2019; 20: 475.

65. Solomonova E., Trusov N., Nozdrina T. Opportunities for using of *Eleutherococcus* fruits as a new food raw material. Proceedings of the 1st International Symposium Innovations in Life Sciences (ISILS 2019). 2019; 10-11.

66. Bączek K. Accumulation of biologically active compounds in *Eleuthero* (*Eleutherococcus senticosus*/Rupr. et Maxim./Maxim.) grown in Poland. Herba Polonica. 2009; 55: 7-13.

67. Kim Y. H., Cho L. M., Kim D. B., Shin G. H., Lee J. H., Lee J. S., et al. The antioxidant activity and their major antioxidant compounds from *Acanthopanax senticosus* and *A. koreanum*. Molecules. 2015: p. 13281–13295.

68. Richter R., Hanssen H. P., Koenig W. A., Koch A. Essential oil composition of *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim roots. Journal of Essential Oil Research. 2007; 19: 209-210.

69. Załuski D., Janeczko Z. Variation in phytochemicals and bioactivity of the fruits of *Eleutherococcus* species cultivated in Poland. Natural Product Research. 2015: p. 2207–2211.

70. Strzemski M., Płachno B. J., Mazurek B., Kozłowska W., Sowa I., Lustofin K., et al. Morphological, anatomical, and phytochemical studies of *Carlina acaulis* L. cypsela. International Journal of Molecular Sciences. 2020; 21: 9230.

71. Grilo E. C., Costa P. N., Gurgel C. S., de Lima Beserra A. F., de Souza Almeida F. N., Dimenstein R. α-tocopherol and gamma-tocopherol concentration in vegetable oils. Food Science and Technology International. 2014; 34: 379-385.

72. Ergönül P. G., Köseoglu O. Changes in α-, β-, γ- And δ-tocopherol contents of mostly consumed vegetable oils during refining process. CyTA - Journal of Food. 2014; 12: 199-202.

73. Jang D., Lee J., Eom S. H., Lee S. M., Gil J., Lim H. B., et al. Composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Eleutherococcus senticosus* fruit extracts. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2016: p. 126-130.

74. Jiang W. D., Feng L., Liu Y., Jiang J., Hu K. Effects of graded levels of dietary mho-inositol on non-specific immune and specific immune parameters in juvenile Jian carp (*Cyprinus cardio* var. Jian). Aquaculture Research. 2010; 41: 1413-1420.

75. Adamczyk K., Olech M., Abramek J., Pietrzak W., Kuźniewski R., Bogucka-Kocka A., et al. *Eleutherococcus* species cultivated in Europe: a new source of compounds with antiacetylcholinesterase, antihyaluronidase, anti-DPPH, and cytotoxic activities. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2019: p. 1-10.

76. Ruppach H. Reduction factors in viral clearance studies. BioProcessing Journal. 2014; 12(4): 24-30.

77. Tomczyk T., Wróbel G., Chaber R., Siemieniec I., Piasecki E., Krzystek-Korpacka M., et al. Immune consequences of in vitro infection of human peripheral blood leukocytes with Vesicular Stomatitis Virus. Journal of Innate Immunity. 2018; 10(2): 131-144.

78. Orzechowska B., Chaber R., Wiśniewska A., Pajtasz-Piasecka E., Jatczak B., Siemieniec I., et al. Baicalin from the extract of *Scutellaria baicalensis* affects the innate immunity and apoptosis in leukocytes of children with acute lymphocytic leukemia. International Immunopharmacology. 2014; 23: 558-567.

79. Fei H. J, Zhu L. L., Xia L. M., Peng W. B, Wang Q. *Acanthopanax senticosus* attenuates inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting the NF-kB pathway. Genetics and Molecular Research. 21014; 13(4): 10537-10544.

80. Steinman G. G., Esperester A., Joller P. Immunopharmacological in vitro effects of *Eleutherococcus senticosus* extracts. Drug Research. 2011; 51(1): 76-83.

81. Schmolz M. W., Sacher F., Archer B. The synthesis of Rantes, G-CCSF, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, and IL-13 in human whole-blood cultures is modulated by an extract from *Eleutherococcus senticosus* L. roots. Phytotherapy Research. 2001; 15: 268-279.

82. Kuźniewski R., Załuski D., Olech M., Banaszczak P., Nowak R. LC-ESI-MS/MS profiling of phenolics in the leaves of *Eleutherococcus senticosus* cultivated in the West Europe and anti-hyaluronidase and anti-acetylcholinestarase activities. Natural Product Research. 2018: p. 448-452.

83. Grever M. C. B. Cancer drug discovery and development. De Vita, V.H.S. and Rosenberg, S.A., (eds.) Cancer: Principles and practice of oncology. 2001: p. 328-339.

84. Kim G. C., Castro-Aceituno V., Abbai R,. Lee H. A., Simu S., Han Y., et al. Caspase-3/MAPK pathways as main regulators of the apoptotic effect of the phyto-mediated synthesized silver nanoparticle from dried stem of *Eleutherococcus senticosus* in human cancer cells. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2018: p. 128-133.

85. Załuski D., Olech M., Galanty A., Verpoorte R., Kuźniewski R., Nowak R., et al. Phythochemichal content and pharma-nutrition study on *Eleutherococcus senticosus* fruits intractum. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2016; 10.

86. Yaremenko K. V., Pashinski V. G. Preparations of natural origin as remedies for prophylactic oncology. New medicinal preparations from plants of Siberia and the Far East. Tomsk. 1986: p. 171-172.

87. Omosa L. K., Midiwo J. O., Masila V. M., Gisacho B. M., Munayi R., Kamakama F., et al. Cytotoxicity of 91 Kenyan indigenous medicinal plants towards human CCRFCEM leukemia cells. Journal of Ethnopharmacology. 2016; 179: 177-196.

12. SPIS RYCIN

Rycina 1. Budowa morfologiczna owocostanów *E. senticosus* - fot. F. Graczyk (Ogród Roślin Leczniczych i Kosmetycznych CM UMK, Bydgoszcz, 2021). 14

Rycina 2. A – budowa morfologiczna kwiatostanów *E. senticosus,* B - pokrój morfologiczny E. senticosus, C - budowa morfologiczna liścia pięciopalczastego E. senticosus, D - powierzchnia kory *E. senticosus*, z charakterystycznym pokryciem kolcami - fot. F. Graczyk (Ogród Roślin Leczniczych i Kosmetycznych CM UMK, Bydgoszcz, 2021)..... 15

Rycina 3 Proliferacja (%) leukocytów po stymulacji intraktem (300 µg/mL), eleuterozydami B i E (po 100 µg/mL) przez 48 godzin. Jako kontrolę pozytywną zastosowano LPS (100 µg/mL). Dane z trzech oddzielnych eksperymentów przeprowadzonych z użyciem leukocytów izolowanych od niezależnych dawców testowanych w dwóch powtórzeniach są wyrażone jako średnia ± SEM. Wszystkie dane przedstawiono jako wartości mediany. 51

Rycina 4 Wirusobójczy wpływ związków na VSV. Eleuterozyd B (100 µg/mL), eleuterozyd E (100 µg/mL) i intrakt (300 µg/mL) inkubowano z VSV przez 2 godziny w 37 °C. Po czasie inkubacji mieszaniny miareczkowano, wysiewano na monowarstwie komórek A549 i inkubowano przez 72 godz. Miano VSV porównano z nietraktowaną (tylko VSV) kontrolą. 52

Rycina 5 Wpływ związków na replikację VSV w trzech wariantach: zielony: związki dodano do komórek A549 24 h przed infekcją VSV; czerwony: związki były obecne tylko w okresie adsorpcji; czarny: związki dodano po okresie adsorpcji. Jako kontrole pozytywne zastosowano cydofowir i rybawirynę. B, eleuterozyd B (100 µg/mL); E, eleuterozyd E (100 µg/mL); Int, intrakt (300 µg/mL). 52

Rycina 6 Wpływ intraktu z owoców E*. senticosus* oraz eleuterozydu B i eleuterozydu E na stymulację odpowiedzi immunologicznej w komórkach PBL zakażonych VSV. B, eleuterozyd B (100 µg/mL); E, eleuterozyd E (100 µg/L)); Int, intrakt (300 µg/mL). Wyniki przedstawiono w postaci mediany. 53

Rycina 7 Aktywność cytotoksyczna intraktu wobec linii komórkowych FaDu i HepG2. Stężenia intraktu: 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 µg/mL. 56

13. KOPIE PUBLIKACJI BĘDĄCYCH PODSTAWĄ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

PUBLIKACJA P1

molecules

MDPI

Article

Pharmacognostic Evaluation and HPLC–PDA and HS–SPME/GC–MS Metabolomic Profiling of *Eleutherococcus senticosus* Fruits

Filip Graczyk [1,*], Maciej Strzemski [2], Maciej Balcerek [1], Weronika Kozłowska [3], Barbara Mazurek [4], Michał Karakuła [2], Ireneusz Sowa [2], Aneta A. Ptaszyńska [5] and Daniel Załuski [1]

[1] Department of Pharmaceutical Botany and Pharmacognosy, Ludwik Rydygier Collegium Medicum, Nicolaus Copernicus University, Marie Curie-Skłodowska 9, 85-094 Bydgoszcz, Poland; balcerek@cm.umk.pl (M.B.); daniel_zaluski@onet.eu (D.Z.)
[2] Department of Analytical Chemistry, Medical University of Lublin, Chodźki 4a, 20-093 Lublin, Poland; maciej.strzemski@poczta.onet.pl (M.S.); michal.karakula@umlub.pl (M.K.); i.sowa@umlub.pl (I.S.)
[3] Department of Pharmaceutical Biology, Wroclaw Medical University, Borowska 211, 50-556 Wroclaw, Poland; weronika.kozlowska@umed.wroc.pl
[4] Analytical Department, New Chemical Syntheses Institute, Aleja Tysiąclecia Państwa Polskiego 13a, 24-110 Puławy, Poland; barbara.mazurek@ins.lukasiewicz.gov.pl
[5] Department of Immunobiology, Institute of Biological Sciences, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka 19 Str., 20-033 Lublin, Poland; anetaptas@wp.pl
* Correspondence: filip.graczk@gmail.com; Tel.: +48-795672587

check for updates

Citation: Graczyk, F.; Strzemski, M.; Balcerek, M.; Kozłowska, W.; Mazurek, B.; Karakuła, M.; Sowa, I.; Ptaszyńska, A.A.; Załuski, D. Pharmacognostic Evaluation and HPLC–PDA and HS–SPME/GC–MS Metabolomic Profiling of *Eleutherococcus senticosus* Fruits. *Molecules* **2021**, *26*, 1969. https://doi.org/10.3390/molecules26071969

Academic Editors: Young Hae Choi, Young Pyo Jang, Yuntao Dai and Luis Francisco Salomé-Abarca

Received: 5 March 2021
Accepted: 27 March 2021
Published: 31 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract: *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. is a medicinal plant used in Traditional Chinese Medicine (TCM) for thousands of years. However, due to the overexploitation, this species is considered to be endangered and is included in the Red List, e.g., in the Republic of Korea. Therefore, a new source of this important plant in Europe is needed. The aim of this study was to develop pharmacognostic and phytochemical parameters of the fruits. The content of polyphenols (eleutherosides B, E, E1) and phenolic acids in the different parts of the fruits, as well as tocopherols, fatty acids in the oil, and volatile constituents were studied by the means of chromatographic techniques [HPLC with Photodiode-Array Detection (PDA), headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry (HS–SPME/GC–MS)]. To the best of our knowledge, no information is available on the content of eleutherosides and phenolic acids in the pericarp and seeds. The highest sum of eleutheroside B and E was detected in the whole fruits (1.4 mg/g), next in the pericarp (1.23 mg/g) and the seeds (0.85 mg/g). Amongst chlorogenic acid derivatives (3-CQA, 4-CQA, 5-CQA), 3-CQA was predominant in the whole fruits (1.08 mg/g), next in the pericarp (0.66 mg/g), and the seeds (0.076 mg/g). The oil was rich in linoleic acid (C18:3 (n-3), 18.24%), ursolic acid (35.72 mg/g), and α-tocopherol (8.36 mg/g). The presence of druses and yellow oil droplets in the inner zone of the mesocarp and chromoplasts in the outer zone can be used as anatomical markers. These studies provide a phytochemical proof for accumulation of polyphenols mainly in the pericarp, and these structures may be taken into consideration as their source subjected to extraction to obtain polyphenol-rich extracts.

Keywords: *Eleutherococcus senticosus*; fruits; eleutherosides; nutri-pharmacological; metabolomics; herbs

1. Introduction

Plant-based metabolites have served as lead compounds for many important drugs, such as morphine, digoxin, quinine, hyoscyamine, salicylic acid, and artemisinin [1]. According to the WHO (World Health Organization), about 80% of the world's population use plants in the primary health system, both in the developing and developed countries. For instance, 14% of the Russian population use them regularly and 44% from time-to-time [2].

One of the best-known plants, used as a source of pharmacologically active and nutritional molecules, is *Eleutherococcus senticosus* (Siberian ginseng). The plant is native to Russia, the Far East, China, Korea, and Japan. The fruits of *E. senticosus* have been used in Russia for many years as a tonic on the central nervous system and as an adaptogen. Modern research is focused on elucidation of the pharmacological activities of wild fruits, including their antioxidant, antimicrobial, and anticancer effects. An acidified 80% methanol extract showed high xanthine oxidase and AChE inhibitory activities. The anticancer activity of the extract was also proven by screening various human cell lines, including LNCaP (prostate cells), MOLT-4F (leukemia cells), A549 (lung cells), ACHN (renal cells) HCT-15 (colon cells), and SW-620 (colon cells). The latest reports indicate their immunostimulatory and anti-inflammatory activities and an increase in the number of leukocytes. The intractum from the fruits was found to stimulate human leukocyte resistance to the VSV (*Vesicular Stomatitis Virus*) infection via reduction of viral replication, which might be associated with increased secretion of interleukin 10 (IL-10). Besides medical applications, the fruits are industrially used in the production of phyto-jam (0.8–1.6 kg/100 kg of the product). Considering the data mentioned above, the consumption of wild edible fruits of *E. senticosus* by local communities in many developing countries is gaining increasing interest [3–7].

According to the European Medicines Agency (EMA), the pharmacological activity of *E. senticosus* in traditional applications is attributed to secondary metabolites called eleutherosides. They are very varied with saponins, lignans, coumarins, and phenylpropanoids as their aglycons. Eleutheroside B (syringin 4-β-D-glucoside) and E ((−)-syringaresinol 4,4″-*O*-β-D-diglucoside) are the major compounds and, according to the European Pharmacopoeia, their sum should not be less than 0.08%. Eleutherosides are thought to be the most active compounds present mainly in the roots. Although the fruits are used as ingredients in the production of galenic formulations, the roots are a major subject of research while the fruits remain largely unknown. The fruits are rich in flavonoids (13.4–14.4 mg/g ext.), polyphenols (38.5–41.1 mg/g ext.), minerals (Ca 3730–4495, Mg 1430–1540, Fe 35.4–53, Mn 75.2–88.3, Zn 18.9–41.0, Cu 3.34–13, Se 0.19–061; mg/kg respectively), and essential oil (0.3%, v/d.w.). Interestingly, a large amount of *myo*-inositol and D-mannitol was found as well (267.5 and 492.5 mg/g dry extract, respectively) [8–10].

As demonstrated by previous studies conducted by Załuski, *E. senticosus* is successfully cultivated in the botanical garden in Rogów (Central Polish Lowlands), and some methods required for determination of phenolic metabolites in the plant material and the biological activity of extracts have been developed [11,12]. The observations have also been confirmed by Bączek, who studied the impact of growth conditions on accumulation of biologically active compounds in organs of two-, three-, and four-year-old plants [13]. Nevertheless, the species cultivated in Bydgoszcz (North Polish Lowlands) has not yet been studied in detail (Figure 1). Preliminary information on chemical compounds in the *E. senticosus* fruits intractum have been previously reported by Graczyk et al. [8]. To the best of our knowledge, no data are available on the localization of eleutherosides and phenolic acids in anatomical structures or on pharmacognostic features that can be used as markers in quality assessment. It is well known that phytochemicals can be accumulated in different fruit parts, e.g., *Citrus limon* Burm. contains the highest amount of chlorogenic or caffeic acids or hesperidin in the peel [14–17]. In addition, there is no information about the oil in the fruits, which may be of interest e.g., for the food industry [10,18–20].

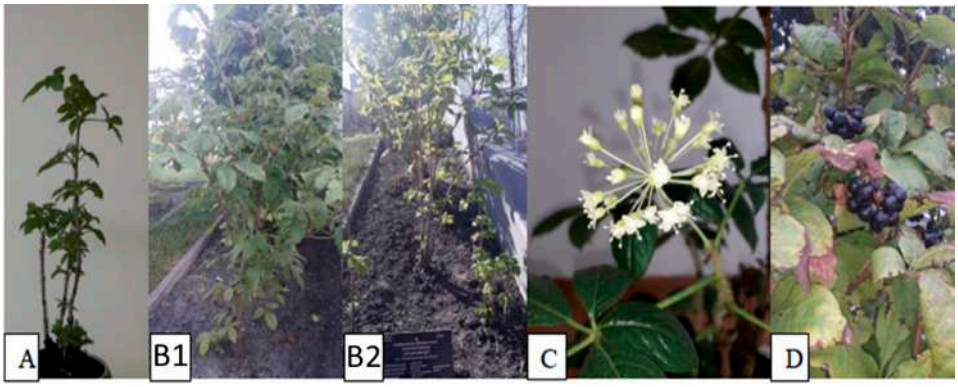


Figure 1. Morphological characteristics of the investigated species; (**A**) 1-year-old plant, general morphology; (**B1**,**B2**) 4-year-old plants growing in the crop field, general morphology; (**C**) flowers; (**D**) mature fruits.

To confirm our hypothesis, this study was focused on the quantitative analysis of phytochemicals with their localization in the anatomical fruit parts (seeds, pericarp) and on anatomical features that can be possibly used in the quality control of this pharmaceutically important plant.

2. Results and Discussion

2.1. Microscopic Pharmacognostic Features of Fruits

The quality control of plant-based material is important to ensure the best quality of products. For many years, plant materials imported to Europe have been of bad quality (adulterated or substituted) [21]; therefore, to ensure good quality, new protocols for a new herbal material are needed. The fruits of *Eleutherococcus senticosus* species growing in Asia and cultivated in Poland or other European countries have not yet been evaluated in terms of pharmacognostic features. The poor-quality plant material now offered on the market necessitates development of proper well-controlled production procedures. The development of a pharmacognostic protocol including microscopic and phytochemical studies will help in identification of these fruits and protect from adulteration.

The characteristic anatomical features of the fruits are shown in Figures 2 and 3. The anatomical structure of the *E. senticosus* fruits is characteristic for most species from the Araliaceae family. The microscopic studies of the transverse section showed the presence of secretory canals filled with yellow oil droplets in the inner zone of the mesocarp. The presence of druses and yellow oil droplets in the inner zone of the mesocarp and red chromoplasts in the outer zone of the mesocarp visible in the transverse fruit section are distinguishing features that can be used as anatomical markers. This study is a complement of the research conducted by Solomonowa et al. [20], in which the morphological-anatomical and morphometric study of fruits were carried out. The morphometric indicators of the fruits are as follows: fruit length 9.95 mm, fruit diameter 4.65, stone length 5.25 mm, and stone width 1.98 mm.

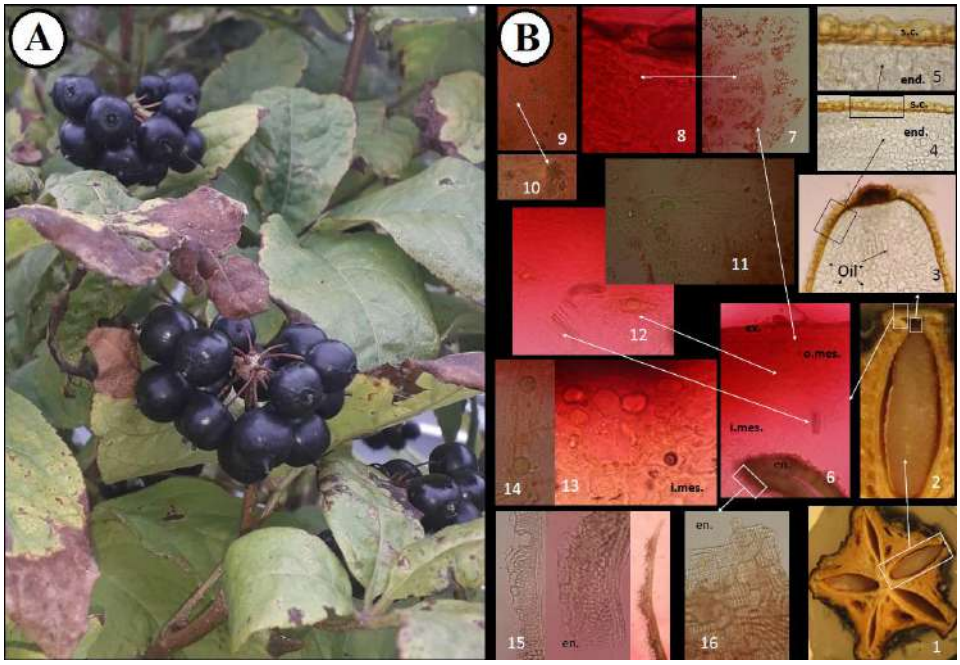


Figure 2. (**A**). Morphological structure and anatomical features of *E. senticosus* fruits. (**B**). **1**. Transverse section of the fruit, **2**–**3**. Seed, **4**–**5**. Seed coat and endosperm, **6**. Pericarp, **7**–**8**. Outer zone of mesocarp, **9**–**10**. Mesocarp with druses, **11**–**13**. Inner zone of mesocarp with secretory canals and oil droplets (transverse section), **14**. Inner zone of mesocarp with secretory canals and oil droplets (longitudinal section), **15**. Endocarp (transverse section), **16**. Endocarp (tangential section). end.—endosperm, s.c.—seed coat, en.—endocarp, i.mes.—inner zone of mesocarp, o.mes.—outer zone of mesocarp, ex.—exocarp.

The powder microscopy of the fruits (Figure 3) shows epidermis cells tightly adjacent to each other. The endocarp contains fibers oriented askew to the stone axis. The secretory canals in the mesocarp are filled with oil, probably essential oil, rounded parenchymatous cells. In turn, the druses and chromoplasts in the mesocarp and fatty oil drops in the endosperm can be considered as diagnostic features. The parameters analyzed here are useful for identification and authentication of this medicinally important plant and will provide the latest knowledge for the development of herbal monographs as recommended by the European Medicines Agency.

2.2. HPLC–PDA and GC–MS Metabolite Profiling of the Fruits

2.2.1. HPLC–PDA Analysis of Eleutherosides B, E, and E1 in the Anatomical Structures of the Fruits

For the analysis of the metabolome, such approaches as HPLC, TLC–UV, GC–MS, LC-MS, MS^n, and NMR-spectrometry are currently used. TLC coupled with densitometry and HPLC or HPLC–MS have usually been applied to analyze eleutherosides. High-performance liquid chromatography (HPLC) is a leading technique for detection of plant-based metabolites and is very often used as a pilot technique for separation and identification of phytochemicals [10–12].

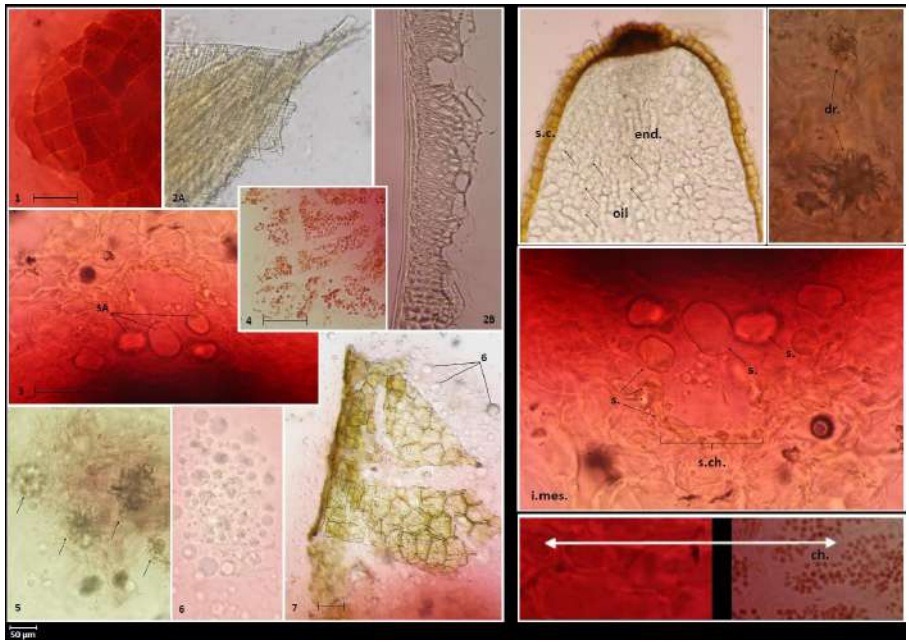


Figure 3. Diagnostic features of powdered fruits. **1**. Polygonal cells of fruit epidermis (exocarp). **2**. Inner layers of endocarp cells are represented by fibers, oriented askew to stone axis (2A—tangential section, 2B—transverse section). **3**. Secretory canal (cross-section) in mesocarp, parenchymal cells (3A—visible oil content). **4**. Outer part of the mesocarp composed of parenchymal cells containing red plastids (chromoplasts). **5**. Druses in mesocarp cells located closer to the endocarp. **6**. Drops of fatty oil from the endosperm. **7**. Seed coat built of large cells with brown contents. Diagnostic features of the fruits. s.c.—seed coat, end.—endosperm, i.mes.—inner zone of mesocarp, s.ch.—secretory canals, s.—secretion (essential oil), dr.—druses, ch.—chromoplasts.

The extraction of the fruits, seeds, and pericarp obtained from the 4-year-old plant resulted in 20, 26, and 33% dry extract yield, respectively. No data on the characterization of the anatomical parts of *E. senticosus* fruits and the distribution of their active constituents have been published before. Plant metabolites exhibit a very broad range of polarities. This means that only part of the plant's chemodiversity is present in any plant extract. Among the three studied eleutherosides (eleutheroside B, E, and E1), only eleutheroside B and E have been found in the largest amount in the whole fruits i.e., 0.66 and 0.74 mg/g d. ext., respectively (Figures 4 and 5). Considering the distribution of these compounds, a higher quantity was noticed in the pericarp than in the seeds; however, there was no significant difference between the pericarp and seeds, especially in the case of eleutheroside E. The latest studies conducted by Graczyk et al. [8] have revealed the absence of eleutherosides in the intractum made of the fresh fruits. This may result from their medium polarity. Eleutherosides are usually well extracted with 75% (*v/v*) methanol or ethanol; therefore, we suppose that the ethanol concentration (40% *v/v*) used to prepare the intractum may have been too low to extract eleutherosides. Moreover, the extraction of the whole fruits also means that some compounds will not be extracted, and the intractum was prepared through maceration, while ultrasounds were applied in this study.

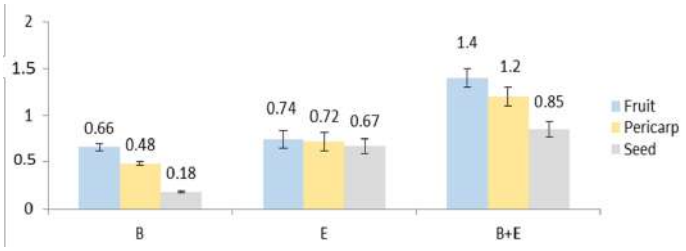


Figure 4. Contents of eleutherosides (mg/g extract): B—eleutheroside B, E—eleutheroside E, B + E—sum of eleutheroside B and eleutheroside E.

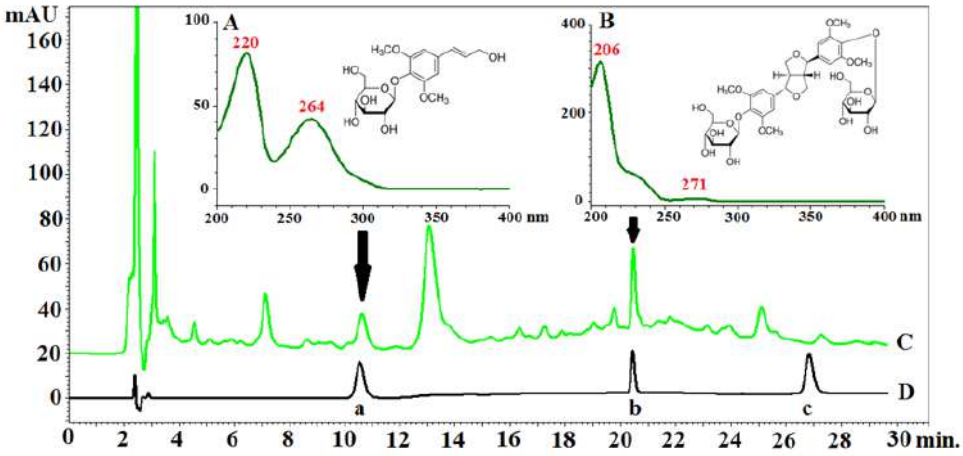


Figure 5. Chromatogram of *Eleutherococcus senticosus* fruit and reference standards with PDA spectra and structures of determined compounds: (**A**)—PDA spectrum and chemical structure of eleutheroside B; (**B**)—PDA spectrum and chemical structure of eleutheroside E; (**C**)—chromatogram of the extract of *Eleutherococcus senticosus* fruit; (**D**)—chromatogram of the mixture of standards (**a**—eleutheroside B, **b**—eleutheroside E, **c**—eleutheroside E1). RP18e LiChrospher 100 column (Merck, Darmstadt, Germany) (25 cm × 4.0 mm i.d., 5 µm particle size) at 25 °C; mixtures of water (solvent A) acetonitrile (solvent B) and both acidified with 0.025% of trifluoroacetic acid were used as the mobile phase. The compounds were separated by gradient elution with the following program: 0.0–8.0 min A 90%, B 10%; 8.1–18.0 min A 90–80%; B 10–20%, 18.1–30.0 min A 80%, B 20%. The flow rate was 1.0 mL/min.

Bączek [13] showed that the content of eleutherosides B and E in methanol fruit extract obtained from a 4-year-old plant was 35.6 and 29.7 (mg/100g), respectively. It should be mentioned that eleutherosides were not present in the fruits of 2- and 3-year-old plants, respectively. Unfortunately, the authors did not provide information about the calculation, i.e., it was not specified whether 100 g referred to the plant material or the extract. This makes the comparison difficult and, in many cases, unreliable. Taking into consideration the sum of eleutheroside B and E, the extract from the whole fruits contains a higher quantity of eleutherosides. However, it is very important that the pericarp contains more eleutherosides than the seeds, which means that the seeds may be used in the micropropagation of the species. *Eleutherococcus senticosus* is included in the Red List in some countries [8]; in this case, the pericarp may serve as a source of eleutherosides, while the seed (embryo) may be used for in vitro germination to develop seedlings and increase the number of botanical specimens.

2.2.2. HPLC–PDA Analysis of Phenolic Acids in the Anatomical Structures of the Fruits

Phenolic acids play a vital function as non-nutritional constituents of human diet and pharmacologically active compounds. In some fruits, they are accumulated in different parts. In this study, it has been found that the whole fruits contain a high amount of chlorogenic acid; 3-CQA (1.08 mg/g d. ext.), in comparison to the pericarp (0.66 mg/g d. ext.) and seeds (00.76 mg/g d. ext.) (Table 1, Figure 6).

Table 1. Contents of phenolic acids (mg/g extract ±SD), *n* = 3 (3-CQA—chlorogenic acid, 4-CQA—cryptochlorogenic acid, 5-CQA—neochlorogenic acid, PA—protocatechuic acid. Additional information on HPLC–DAD data is given in the supporting information part).

Sample	3-CQA	4-CQA	5-CQA	PA	Total Content
Fruit	1.08 ± 0.96	0.07 ± 0.01	0.030 ± 0.01	0.08 ± 0.07	1.26
Pericarp	0.66 ± 0.2	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.001	0.04 ± 0.03	0.74
Seed	0.076 ± 0.03	0.008 ± 0.001	0.004 ± 0.002	0.008 ± 0.001	0.096

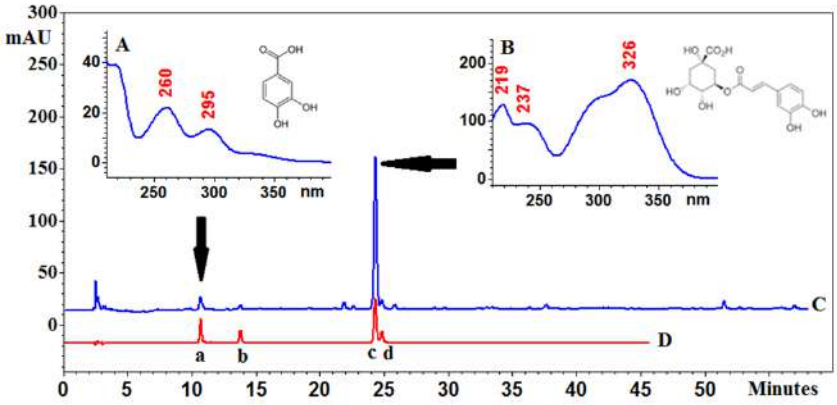


Figure 6. Chromatogram of *Eleutherococcus senticosus* fruits (**C**) and a mixture of reference standards (**D**): a—protocatechuic acid, b—neochlorogenic acid, c—chlorogenic acid and d—cryptochlorogenic acid with PDA spectra and structures of the main compounds: (**A**)—protocatechuic acid and (**B**)—chlorogenic acid. C18 core-shell column (Kinetex, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) (25 cm × 4.6mm i.d., 5 µm particle size) at 25 °C, a mixture of water (solvent A) and acetonitrile (solvent B) with 0.025% of trifluoroacetic acid; gradient elution program: 0.0–5.0 min A 95%, B 5%; 5–60 min A from 5 to 20%, and B from 95–80%. The flow rate was 1.0 mL/min.

Chlorogenic acid is the main phenolic component in coffee and beverages prepared from herbs, fruits, and vegetables. The results presented in literature revealed that the content of chlorogenic acid in methanol extracts of fruits from a 4-year-old plant was 409.2 mg/100g [13]. No chlorogenic acid has been detected in the fruits of 2- and 3-year-old plants, respectively. Other studies have shown that the water extract from the fruits of *E. senticosus* contained 0.57 mg/g dry weight of chlorogenic acid [9].

2.3. HS–SPME/GC–MS Analysis of Volatile Metabolites in the Fruits

HS–SPME coupled with the GC–MS analysis identified 38 volatile constituents (VOCs) in the *E. senticosus* fruits, representing 93.9% of the total number. The detected compounds belong to several classes, such as monoterpene hydrocarbons and oxygenated monoterpenes (13.2%) and sesquiterpene hydrocarbons and oxygenated sesquiterpenes (76.6%). The percentage composition of the identified compounds is listed in the elution order in Table 2 and Figure 7 and Figure S2. (E)-β-farnesene (19.46 ± 0.78%), germacrene D

(12.88 ± 1.10%), (E,Z)-*α*-farnesene (12.84 ± 0.85%), and *β*-bisabolene (12.64 ± 0.70%) were the main compounds identified in the *E. senticosus* fruits.

Table 2. Percentage of volatile compounds identified by HS–SPME/GC–MS in *E. senticosus* fruits (% ± SD) (RT—retention time, RI calc—retention index, calculated, RI lit—retention index, literature. Internal standard—2-undecanone. All analyses were performed in triplicate).

No.	RI Lit.	RI Calc.	RT (Min)	Compound Name	Formula	Compound *m/z*	Match Factor (%)	Content
1	930	926	6.01	α-Thujene	$C_{10}H_{16}$	93; 91; 77	94.55	0.05 ± 0.02
2	939	933	6.18	α-Pinene	$C_{10}H_{16}$	93; 91; 77	95.00	0.12 ± 0.09
3	975	973	7.18	(Z)-Sabinene	$C_{10}H_{16}$	93; 91; 77	97.84	2.46 ± 1.19
4	985	987	7.52	6-methyl-5-hepten-2-one	$C_8H_{14}O$	43; 108; 69; 55	97.50	0.15 ± 0.03
5	990	991	7.63	β-Myrcene	$C_{10}H_{16}$	93; 69; 41	96.20	1.43 ± 0.44
6	1002	1005	7.99	α-Phellandrene	$C_{10}H_{16}$	93; 77; 136	96.90	2.22 ± 0.6
7	1011	1010	8.15	3-Carene	$C_{10}H_{16}$	93; 79; 121	97.90	0.37 ± 0.012
8	1026	1025	8.54	*O*-Cymene	$C_{10}H_{14}$	119; 134; 91	97.90	1.40 ± 0.26
9	1029	1029	8.65	Limonene	$C_{10}H_{16}$	93; 68; 79	98.50	2.81 ± 0.54
10	1037	1038	8.91	(Z)-β-Ocimene	$C_{10}H_{16}$	93; 91; 79	93.24	0.05 ± 0.01
11	1050	1048	9.19	(E)-β-Ocimene	$C_{10}H_{16}$	93; 91; 79	97.10	0.86 ± 0.15
12	1059	1059	9.49	γ-Terpinene	$C_{10}H_{16}$	93; 136; 77	98.60	0.11 ± 0.01
13	1070	1067	9.73	(Z)-Sabinene hydrate	$C_{10}H_{18}O$	71; 93; 43	98.50	0.90 ± 0.09
14	1088	1089	10.33	Terpinolene	$C_{10}H_{16}$	121; 93; 136	95.04	0.16 ± 0.01
15	1159	1159	12.30	Sabina ketone	$C_9H_{14}O$	81; 96; 67; 55	83.10	0.08 ± 0.01
16	1177	1179	12.85	Terpinen-4-ol	$C_{10}H_{18}O$	71; 111; 93	96.52	0.15 ± 0.02
17	1294	1295	15.99	2-Undecanone (IS)	$C_{11}H_{22}O$	58; 43; 71	93.20	3.79 ± 6.31
18	1294	1299	16.11	Methyl myrtenate	$C_{11}H_{16}O_2$	105; 137; 91;77	94.50	0.07 ± 0.02
19	1376	1381	17.91	α-Copaene	$C_{15}H_{24}$	161;119; 105; 93	98.20	1.05 ± 0.16
20	1388	1390	18.11	β-Bourbonene	$C_{15}H_{24}$	81; 123; 161	94.90	0.12 ± 0.02
21	1408	1409	18.49	7-epi-Sesquithujene	$C_{15}H_{24}$	119; 93; 91; 69	93.00	0.14 ± 0.02
22	1419	1426	18.81	β-Caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	93; 91; 133; 79	97.90	0.91 ± 0.14
23	1432	1436	18.99	(Z)-β-Copaene	$C_{15}H_{24}$	161; 105; 91; 119	99.00	0.25 ± 0.04
24	1434	1441	19.08	(E)-α-Bergamotene	$C_{15}H_{24}$	119; 93; 91; 69	97.60	0.54 ± 0.07
25	1456	1463	19.49	(E)-β-Farnesene	$C_{15}H_{24}$	69; 93; 133; 161	90.00	19.46 ± 0.78
26	1466	1471	19.64	(Z)-Muurola-4,5-diene	$C_{15}H_{24}$	161; 105; 91; 204	94.20	0.26 ± 0.04
27	1481	1490	20.00	Germacrene D	$C_{15}H_{24}$	161; 105; 91; 119	94.60	12.88 ± 1.10
28	1497	1498	20.16	(E,Z)-α-Farnesene	$C_{15}H_{24}$	93; 119; 69; 107	92.10	12.84 ± 0.85
29	1511	1515	20.43	(E)-β-Bisabolene	$C_{15}H_{24}$	93; 69; 94; 109	95.70	12.64 ± 0.70
30	1513	1522	20.55	γ-Cadinene	$C_{15}H_{24}$	161; 93; 105; 119	97.70	0.55 ± 0.06
31	1522	1530	20.68	β-Sesquiphellandrene	$C_{15}H_{24}$	69; 161; 93; 91	95.70	2.6 ± 0.22
32	1532	1538	20.81	(E)-γ-Bisabolene	$C_{15}H_{24}$	93; 107; 135; 119	94.60	3.26 ± 0.43
33	1540	1548	20.97	(E)-α-Bisabolene	$C_{15}H_{24}$	93; 119; 121; 80	95.70	1.63 ± 0.20
34	1563	1559	21.15	(E)-Nerolidol	$C_{15}H_{26}O$	69; 93; 81; 83	85.30	0.23 ± 0.06
35	1607	1619	22.12	β-Oplopenone	$C_{15}H_{24}O$	177; 43; 93; 79	93.40	0.15 ± 0.02
36	1658	1665	22.80	α-Bisabolol oxide B	$C_{15}H_{26}O_2$	143; 105; 85; 81	97.66	0.76 ± 0.12
37	1685	1692	23.20	α-Bisabolol	$C_{15}H_{26}O$	109; 119; 69; 43	98.90	6.35 ± 0.9
38	2104	2107	27.78	6-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	$C_{19}H_{36}O_2$	55; 74; 84; 96	94.52	0.13 ± 0.10
				Monoterpene hydrocarbons and oxygenated monoterpenes				13.17
				Sesquiterpene hydrocarbons and oxygenated sesquiterpenes				76.62
				Other compounds				4.07
				Total				93.86

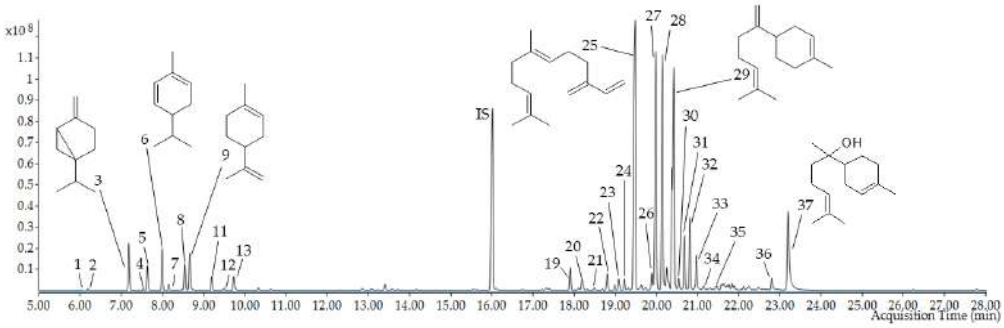


Figure 7. HS–SPME/GC–MS chromatogram of volatile compounds in *E. senticosus* fruits. The numbers correspond to the compounds in Table 2; IS—internal standard.

Previous reports on the essential oil from *E. senticosus* fruits indicated β-caryophyllene and humulene [7] or spathulenol [10] as the main compounds. However, the results of the present study revealed farnesene and bisabolene-type derivatives as dominant compounds showing more similarity to the essential oil from leaves described by Zhai et al. [22]. Studies conducted on *E. senticosus* root material obtained from different regions (Russia, China—two different sources) showed significant fluctuations in the quantity of the compounds, which may be connected with differentiation of the chemotypes [23]. Moreover, Załuski and Janeczko reported differences in the composition of fruit essential oil connected with duration of storage [10].

2.4. GC–MS and HPLC–PDA Profiling of the Fruit Fatty Oil

The oil obtained by hexane extraction of ground fruits constituted 5.4 ± 0.015% of their weight. The oil is a semi-solid, yellow-green substance with a characteristic aroma (Figure 8A) absorbing UV–VIS radiation in the range of 190–430 nm and at a wavelength of 660–680 nm (Figure 8B). Absorbance at a wavelength of 269 nm may indicate the presence of tocopherols, especially α-tocopherol absorbing radiation in the range of 265–310 nm [24]. Absorbance at 407 and 660–680 nm may indicate the presence of chlorophylls [25]. It was shown that the content of chlorophyll A and chlorophyll B was 12.43 mg/g and 3.67 mg/g, respectively, and the content of carotenoids in the tested oil was 10.13 mg/g.

2.4.1. GC–MS Analysis of Fatty Acids

The analysis of the oil by gas chromatography with mass spectrometry showed the presence of five fatty acids, including three unsaturated acids (linoleic, oleic, and α-linolenic acids), the total content of which was 24% (Table 3). The dominant fatty acid was linoleic acid (over 18%), while the content of α-linolenic acid was only 0.4%. The content of saturated acids was only 2.5%. Thus, the *E. senticosus* fruit oil is a rich source of unsaturated acids, but the proportion of n-3 acids to n-6 acids is not beneficial for human health [26]. In addition, the analysis showed the presence of four components of the essential oil and trimethylsulfonium ursolate—a derivative of ursolic acid and TMSH. An example of a chromatogram is presented in Figure 9, and the mass spectrum for fatty acids is shown in Figure S1.

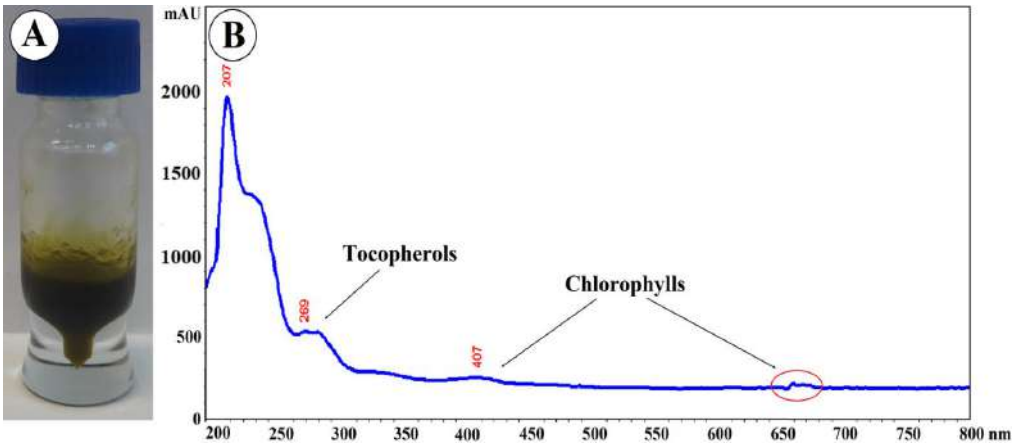


Figure 8. (**A**) Photography and (**B**) UV–VIS spectroscopic fingerprint of *Eleutherococcus senticosus* fruit oil.

Table 3. Content of fatty acids (% *w/w* ±SD) in *Eleutherococcus senticosus* seed oil (n = 3) (RT—retention time, FAME—fatty acid methyl esters, FA—fatty acid, M—molecular ion), LOD—limit of detection, LOQ—limit of quantification.

Compound Name	FA Abbreviation	RT FAME (Min.)	Mass Data FAME	LOD (% *w/w*)	LOQ (% *w/w*)	Content of FA
Palmitic acid	C16:0	12.94 ± 0.1	270 (M), 239,227,213,185,143, 129,11197,87,74,69,55	0.044	0.132	2.18 ± 0.04
Stearic acid	C18:0	15.08 ± 0.1	298 (M), 267,255,241,227, 213,199,185,171,157, 143,129,115,97, 87,83,74,69,55	0.026	0.078	0.29 ± 0.00
Oleic acid	C18:1 (*n-9*)	15.77 ± 0.1	296 (M), 278,264,235, 222,180,166, 137,123,110, 97,83,69,55	0.037	0.111	5.36 ± 0.05
Linoleic acid	C18:2 (*n-6*)	16.95 ± 0.2	294 (M), 263,233,220,205, 191,178,164,150, 135,123,109,95, 81,67,59,55	0.013	0.039	18.24 ± 0.26
α-Linolenic acid	C18:3 (*n-3*)	18.56 ± 0.2	292 (M), 261,236,193,163, 149,121,108, 95,79,67,55	0.015	0.045	0.40 ± 0.04
Total						26.47

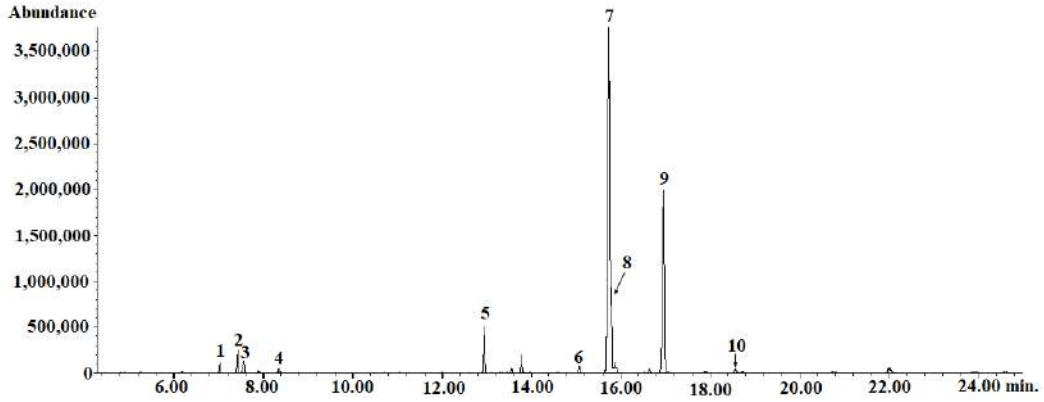


Figure 9. GC–MS chromatogram of *Eleutherococcus senticosus* fruit oil. 1-(Z)-β-farnesene; 2-α-bergamotene; 3-α-farnesene; 4-β-cubebene; 5-methyl palmitate; 6-methyl stearate; 7-trimethylsulfonium ursolate; 8-methyl oleate; 9-methyl linoleate; 10-methyl linolenate. HP-88 Agilent 45 capillary column (60 m × 0.25 mm; 0.20 µm film thickness). The oven temperature was programmed from 110 °C to 190 °C with 8 °C/min held for 2 min at 110 °C and 13 min at 190 °C. The temperature of the injector was 250 °C. Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 1.2 mL/min A quadrupole mass spectrometer with electron ionization (EI) at 70 eV and with a full scan type acquisition mode (50 *m/z* to 500 *m/z*) was used as a detector connected with GC. The temperature of the MS source and the MS quadrupole was set to 230 °C and 150 °C, respectively.

The chromatographic analysis (HPLC–PDA) revealed a dominant peak with a retention time of 7.25 min. This peak was identified as a mixture of β- and γ-tocopherols, and their content was determined to be 1.36 mg/g oil. The α- and δ-tocopherol content was 0.29 and 0.33 mg/g of oil, respectively (Table 4). Grilo et al. assessed the content of tocopherols in commonly used oils (rapeseed, sunflower, corn, and soybean). The content of α-tocopherol ranged from 0.071 to 0.43 mg/g and γ-tocopherol ranged from 0.092 to 0.27 mg/g for soybean and sunflower oils, respectively [27]. Thus, it can be concluded that the *E. senticosus* seed oil contains a moderate amount of α-tocopherol. On the other hand, the tested oil may be a valuable source of β- and γ-tocopherols; however, the assessment of the mutual quantitative relationships of these two compounds requires further research and other methods. Ergönül and Köseoğlu have shown that the content of δ-tocopherol in unrefined soybean oil is 0.12 mg/g, while in rapeseed oil it is 0.012 mg/g [28]. Thus, it can be concluded that the *E. senticosus* fruit oil is quite a rich source of δ-tocopherol, as it contains nearly three-fold higher amounts of this compound than soybean oil.

Table 4. Content of selected biologically active compounds (mg/g ± SD) in *Eleutherococcus senticosus* seed oil (n = 3) (RT—retention time, LOD—limit of detection, LOQ—limit of quantification. Tocopherol content).

Compound Name	RT (Min.)	Theoretical Plates	Linear Regression Equation	Concentration Range (µg/mL)	Correlation Coefficient (r)	LOD	LOQ	Content
Fluorescence Detection						**(ng/mL)**	**(ng/mL)**	
α-Tocopherol	8.36 ± 0.1	6158	y = 1851639x + 17320	0.48–7.20	0.9979	12.0	38.0	0.29 ± 0.00
β- + γ-Tocopherol	7.25 ± 0.1	5779	y = 4739064x + 115013	0.59–8.88	0.9997	6.0	20.0	1.36 ± 0.07
δ-Tocopherol	6.30 ± 0.1	5527	y = 4041480x + 112005	0.55–8.34	0.9999	5.5	18.5	0.33 ± 0.00
Spectrophotometric Detection						**(µg/mL)**	**(µg/mL)**	
Ursolic acid	31.4 ± 0.2	6111	y = 30275.9x + 93277	39.20–117.60	0.9989	0.17	0.51	35.72 ± 0.82

2.4.2. HPLC–PDA Analysis of Ursolic Acid

Pentacyclic triterpenes are lipophilic compounds present in the oil fraction [29]. As shown in literature, *E. senticosus* fruits contain ursolic acid [7]. Therefore, the content of this triterpene in *E. senticosus* seed oil was evaluated in the present study. Its content was shown to be 35.72 mg/g of oil (Table 4). Given the oil content in the fruits, it can be concluded that the ursolic acid content in the fruits is over 1.9 mg/g. Our research shows that *E. senticosus* fruits are a much richer source of ursolic acid than previously thought. Jang et al. found that 100 g of fruits contain about 3.5 mg of ursolic acid [7]. The results obtained by Yang's team were on lower possibly due to the use of methanol in fruit extraction.

3. Materials and Methods

3.1. Chemicals and Reagents

The standards of eleutheroside B (≥98.0%), eleutheroside E (≥98.0%), eleutheroside E1 (≥98.0%), protocatechuic acid (≥97%), ursolic acid (≥90%), δ-tocopherol, (+)-γ-tocopherol, (±)-α-tocopherol (analytical standards), methyl palmitate (≥99.0%), methyl stearate (≥99.5%), methyl oleate (≥99.0%), methyl linoleate (≥98.5%), methyl linolenate (≥99.0%), 2-propanol (99.9%), hexane (≥95%), phosphoric acid (≥85%), trimethylsulfonium hydroxide (TMSH) (0.25 M methanolic solution), gradient grade acetonitrile, and trifluoroacetic acid (≥99%) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). LC grade methanol (MeOH) was purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Water for HPLC was purified by ULTRAPURE Millipore Direct-Q® 3UV-R (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Tert-butyl methyl ether (TBME) (99.8%) was purchased from Avantor Performance Materials Poland S.A. (Gliwice, Poland). All other reagents were of analytical grade. Eleutheroside standards were dissolved in 75% methanol (final concentration of 0.16, 0.16, and 0.36 mg/mL for eleutheroside B, E, and E1, respectively). Phenolic acid standards and ursolic acid were dissolved in methanol (final concentration of 0.24, 1.04, 0.23, 0.30, and 0.50 mg/mL for neochlorogenic, chlorogenic, cryptochlorogenic, protocatechuic, and ursolic acid, respectively). Standard solutions were prepared by dilution of stock solutions to appropriate concentrations.

3.2. Plant Material and Preparation of the Extract

Mature fruits of 4-year-old *Eleutherococcus senticosus* were collected in the Garden of Medicinal and Cosmetic Plants in Bydgoszcz (Poland) in September 2017 (N: 53°07′36.55″ E: 18°01′51.64″). The plant sample was deposited at the Department of Pharmaceutical Botany and Pharmacognosy, Collegium Medicum, Bydgoszcz, Poland, Cat. Nr. ES 10/2018. Air-dried and powdered fruits (10 g each) were soaked in 100 mL of 75% ethanol for 24 h. Next, the samples were subjected to triple UAE-type extraction (ultrasonic bath—Polsonic, Warsaw, Poland) using 100 and 2 × 50 mL of 75% ethanol. The extraction was performed at room temperature for 15 min for each cycle. Finally, 200 mL of each extract was obtained. After that, the extract was filtered through Whatman no. 4 filter paper. The solvent was dried with an evaporator in vacuum conditions at 45 °C, frozen at −20 °C, and subjected to lyophilization. The dried residue was stored in an exsiccator at 4 °C. The extraction yield was calculated based on the dry weight of the extract [%]. The same steps were made for extraction of the pericarp and seeds.

3.3. Microscopic Analysis

The anatomical structure of the fruits was examined microscopically using a compound microscope coupled with a camera, evaluated, and photographed (40X). Chloral hydrate was used as a reagent. Computer images were captured using software ProgRes CapturePro 2.8—Jenoptik optical system.

3.4. HPLC–PDA Analysis of Eleutherosides B, E, and E1

The analyses were performed on an EliteLaChrom chromatograph with a PDA detector and EZChrom Elite software (Merck, Darmstadt, Germany). The following chro-

matographic system was used: an RP18e LiChrospher 100 column (Merck, Darmstadt, Germany) (25 cm × 4.0 mm i.d., 5 µm particle size) at 25 °C; mixtures of water (solvent A) and acetonitrile (solvent B) both acidified with 0.025% of trifluoroacetic acid were used as the mobile phase. The compounds were separated by gradient elution with the following program: 0.0–8.0 min A 90%, B 10%; 8.1–18.0 min A 90–80%, B 10–20%; 18.1–30.0 min A 80%; B 20%; 30.1–45.0 min A 0%, B 100%; 45.1–60.0 min A 90%, B 10%. The flow rate was 1.0 mL/min. Data were collected between 190 and 400 nm. The identity of compounds was established by comparison of retention times and UV spectra with the corresponding standards. Quantitative analysis was performed at λ = 264 nm for eleutheroside B and λ = 206 nm for eleutheroside E and E1. The chromatographic parameters and calibration data for quantification of the investigated eleutherosides are provided in Table S1.

3.5. HPLC–PDA Analysis of Phenolic Acids

The analyses were performed on an EliteLaChrom chromatograph with a PDA detector and EZChrom Elite software (Merck, Darmstadt, Germany). The chromatographic system was as follows: a C18 reversed phase core-shell column (Kinetex, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) (25 cm × 4.6 mm i.d., 5 µm particle size), a mixture of water (solvent A) and acetonitrile (solvent B) with 0.025% of trifluoroacetic acid, and the following gradient elution program: 0.0–5.0 min A 95%, B 5%; 5–60 min A from 5 to 20% and B from 95–80%. The flow rate of the mobile phase was 1.0 mL/min and the temperature of thermostat was set at 25 °C. Data were collected between 210 and 400 nm. The identity of compounds was established by comparison of retention times and UV spectra with the corresponding standards. Quantitative analysis was performed at λ = 326 nm for chlorogenic acids and λ = 260 nm for protocatechuic acid. The chromatographic parameters and calibration data for quantification of the investigated phenolic acids are provided in Table S1.

3.6. HS–SPME/GC–MS Analysis of Volatile Compounds

Head space-solid phase microextraction (HS–SPME) was conducted according to Zielińska et al. [30] with slight modifications. Briefly, 100 mg of dry *E. senticosus* fruits were placed in a 15 mL sealed vial and extracted using a fiber coated with 50/30 µm divinylbenzene–carboxen–polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS; Supelco, Bellefonte, PE, USA). The 2-undecanone–2 mg/mL in water (Merck, Poland) was used as an internal standard. Equilibration was performed at 60 °C for 15 min, the fiber exposition time was 15 min, and the thermal desorption was 3 min at 250 °C directly in the gas chromatography (GC) injection port. All analyses were performed in triplicate. The gas chromatography (GC) analysis was performed using Agilent 7890B GC coupled with a 7000GC/TQ system mass spectrometer (Agilent Technologies, Paolo Alto, CA, USA). Separation was carried out on an HP-5 MS column; 30m × 0.25 mm × 0.25 µm (J&W, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) at a constant helium flow of 1 mL/min. The injector temperature was set at 250 °C and the sample was applied in a split mode (70:1). The temperature program was 50 °C for 1 min, followed by 5 °C/min to 120 °C, 8 °C/min to 200 °C, then to 250 °C in 16 °C/min and held isothermal for 2 min. The MS source, transfer line, and quadrupole temperature were set at 230 °C, 320 °C, and 150 °C, respectively. The mass spectra were collected in a scan mode from *m/z* 30–400 and the ionization voltage was 70 eV. Data acquisition was performed using Agilent MassHunter Workstation software (version B.08.00). The identification of the compounds was based on a comparison of fragmentation patterns with the NIST17 mass spectra library and they were matched with retention index (RI) obtained by calculation relative to the n-alkane standard (C8–C20; Merc, Poland). The quantitative analysis (expressed as percentages of each compound) was carried out by peak area normalization measurements without a correction factor.

3.7. Isolation of Oil and Preparation of Samples

Air-dried and pulverized fruits (5 g) were extracted four times with hexane (4 × 30 mL) using an ultra-sonic bath (4 × 15 min.) The extracts were combined and evaporated in a rotary evaporator. The oil (50 mg) was placed in a volumetric flask (5 mL) and dissolved in 2-propanol. The solution was filtered through a 0.25 μm polyamide membrane filter before HPLC analysis. The oil (10 mg) was dissolved in 500 μL of TBME and derivatized by the addition of 250 μL of TMSH. The whole sample was shaken vigorously, and the GC–MS analysis was performed.

3.7.1. HPLC–PDA Analysis of Ursolic Acid and Tocopherols in the Oil

The analysis was performed on a VWR Hitachi Chromaster 600 chromatograph with a 5430 Diode Array Detector, a 5440 FL Detector, and EZChrom Elite software (Merck, Darmstadt, Germany). A RP18e LiChrospher 100 column (Merck, Darmstadt, Germany) (25 cm × 4.0 mm i.d., 5 μm particle size) was used for the analyses. The identity of compounds was established by comparison of retention times and PDA spectra with the corresponding standards. Ursolic acid was determined using a previously published methodology [31]. An isocratic system was used with the basic chromatographic conditions: the mobile phase consisted of acetonitrile, water, and a 1% aqueous phosphoric acid solution (75:25:0.5 *v/v/v*); eluent flow rate 1.0 mL/min; column temperature 10 °C. The injection volume was 10 μL. The analysis was based on chromatograms recorded with the PDA detector. Data were collected between 200 and 400 nm. The quantitative analysis was performed at λ = 200 nm.

Tocopherols were determined using an isocratic system. The mobile phase consisted of acetonitrile and methanol (5:95 *v/v*). The eluent flow rate was 1.2 mL/min. The column temperature was set at 30 °C. The injection volume was 5 μL. The quantitative analysis was performed using a fluorescence detector with an excitation wavelength at λ = 296 nm and an emission wavelength at λ = 330 nm.

3.7.2. GC–MS Analysis of Fatty Acids in the Oil

The analysis was performed using an Agilent GC–MSD system (GC/MSD 6890N/5975) equipped with a HP-88 Agilent capillary column (60 m × 0.25 mm; 0.20 μm film thickness), MSD ChemStation ver. E.02.02.1431 software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), and a split–splitless injector. The oven temperature was programmed from 110 °C to 190 °C with 8 °C/min, held for 2 min at 110 °C and 13 min at 190 °C. The temperature of the injector was 250 °C. The injection volume was 1 μL (split ratio 150:1; split flow 180 mL/min). Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 1.2 mL/min. A quadrupole mass spectrometer with electron ionization (EI) at 70 eV and with a full scan type acquisition mode (50 *m/z* to 500 *m/z*) was used as a detector connected with the GC. The temperature of the MS source and the MS quadrupole was set at 230 °C and 150 °C, respectively. Identification of the constituents was based on a comparison of their mass spectra with the mass spectra library NIST resources and retention times with standards.

3.8. Statistical Analysis

Determinations were performed in triplicate. The data were subjected to statistical analysis using Statistica 7.0. (StatSoft, Cracow, Poland). The evaluations were analyzed for one-way analysis of variance. Statistical differences between the treatment groups were estimated by Spearman's (R) and Person's (r) test. All statistical tests were carried out at a significance level of α = 0.05.

4. Conclusions

The practical aspect of the present results may be the application of the fruits as an ingredient of plant-based products used to treat immune-related diseases, as confirmed by Graczyk et al. [8]. With their chlorogenic acid content, the fruit extracts can be examined as a skin-whitening agent acting as tyrosinase inhibitor and possibly used in the cosmetic

industry. In addition to this, we did not find information on doses used in ethnomedicine, showing the need of re-confirmation of the fruits' activity with regard to therapeutically active doses. Based on these results, the fruits may be a substitution for the roots to prevent exploitation of this endangered plant in some countries. This study has clearly shown that the species can be cultivated in Europe, producing biologically active metabolites.

Supplementary Materials: The following are available online, Figure S1: Mass spectra for standards (based on the NIST database) and investigated fatty acids. Figure S2: Mass spectra of HS-SPME/GC-MS investigated compounds. Table S1: Chromatographic parameters and calibration data for quantification of investigated eleutherosides and phenolic acids.

Author Contributions: Conceptualization, F.G. and D.Z.; methodology, F.G.; software, M.S.; validation, M.S.; formal analysis, F.G.; investigation, F.G., M.B., W.K., M.S., B.M., M.K.; data curation, M.S.; writing—original draft preparation, F.G., M.K., I.S., W.K., A.A.P.; visualization, F.G.; supervision, D.Z.; project administration, D.Z.; funding acquisition, D.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Publication of the article was financed by the Polish National Agency for Academic Exchange under the Foreign Promotion Programme (NAWA), for A.A.P. (bee-research.umcs.pl; Api Lab UMCS PPI/PZA/2019/1/00039). This work was partially supported by the Nicolaus Copernicus University under the programme The Polish–Dutch Platform of plant-based medicines. M.S. is a Scholarship holder of the Polish Minister of Science and Higher Education for Outstanding Young Scientists 2020.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.

References

1. Verpoorte, R. Secondary metabolism. In *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2000; pp. 1–29.
2. Shikov, A.N.; Pozharitskaya, O.N.; Makarov, V.G.; Wagner, H.; Verpoorte, R.; Heinrich, M. Medicinal plants of the Russian Pharmacopoeia; Their history and applications. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *154*, 481–536. [CrossRef] [PubMed]
3. Li, T.S.C. Comprehensive crop reports: Siberian ginseng. *Horttechnology* **2001**, *11*, 79–85. [CrossRef]
4. Schmidt, M.; Thomsen, M.; Kelber, O.; Kraft, K. Myths and facts in herbal medicines: *Eleutherococcus senticosus* (Siberian ginseng) and its contraindication in hypertensive patients. *Bot. Targets Ther.* **2014**, *4*, 27–32. [CrossRef]
5. Załuski, D.; Olech, M.; Galanty, A.; Verpoorte, R.; Kuźniewski, R.; Nowak, R.; Bogucka-Kocka, A. Phytochemical content and pharma-nutrition study on *Eleutherococcus senticosus* fruits intractum. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*. [CrossRef]
6. Lee, J.H.; Lim, J.D.; Choung, M.G. Studies on the anthocyanin profile and biological properties from the fruits of *Acanthopanax senticosus* (Siberian Ginseng). *J. Funct. Foods* **2013**, *5*, 380–388. [CrossRef]
7. Jang, D.; Lee, J.; Eom, S.H.; Lee, S.M.; Gil, J.; Lim, H.B.; Hyun, T.K. Composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Eleutherococcus senticosus* fruit extracts. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2016**, *6*, 125–130. [CrossRef]
8. Graczyk, F.; Orzechowska, B.; Franz, D.; Strzemski, M.; Verpoorte, R.; Załuski, D. The intractum from the *Eleutherococcus senticosus* fruits affects the innate immunity in human leukocytes: From the ethnomedicinal use to contemporary evidence-based research. *J. Ethnopharmacol.* **2021**, *268*. [CrossRef]
9. Kim, Y.H.; Cho, M.L.; Kim, D.B.; Shin, G.H.; Lee, J.H.; Lee, J.S.; Park, S.O.; Lee, S.J.; Shin, H.M.; Lee, O.H. The antioxidant activity and their major antioxidant compounds from *Acanthopanax senticosus* and *A. koreanum*. *Molecules* **2015**, *20*, 13281–13295. [CrossRef]
10. Załuski, D.; Janeczko, Z. Variation in phytochemicals and bioactivity of the fruits of *Eleutherococcus* species cultivated in Poland. *Nat. Prod. Res.* **2015**, *29*, 2207–2211. [CrossRef]
11. Załuski, D.; Kuźniewski, R.; Janeczko, Z. HPTLC-profiling of eleutherosides, mechanism of antioxidative action of eleutheroside E1, the PAMPA test with LC/MS detection and the structure–activity relationship. *Saudi J. Biol. Sci.* **2018**, *25*, 520–528. [CrossRef]
12. Załuski, D.; Olech, M.; Kuźniewski, R.; Verpoorte, R.; Nowak, R.; Smolarz, H.D. LC-ESI-MS/MS profiling of phenolics from *Eleutherococcus* spp. *inflorescences*, structure-activity relationship as antioxidants, inhibitors of hyaluronidase and acetylcholinesterase. *Saudi Pharm. J.* **2017**, *25*, 734–743. [CrossRef]

13. Bączek, K. Accumulation of biologically active compounds in Eleuthero (*Eleutherococcus senticosus*/Rupr. et Maxim./Maxim.) grown in Poland. *Herba Pol.* **2009**, *55*, 7–13.
14. Gorshkova, T.A.; Salnikov, V.V.; Pogodina, N.M.; Chemikosova, S.B.; Yablokova, E.V.; Ulanov, A.V.; Ageeva, M.V.; Van Dam, J.E.G.; Lozovaya, V.V. Composition and distribution of cell wall phenolic compounds flax (*Linum usitatissimum* L.) stem tissues. *Ann. Bot.* **2000**, *85*, 477–486. [CrossRef]
15. Hutzler, P.; Fischbach, R.; Heller, W.; Jungblut, T.P.; Reuber, S.; Schmitz, R.; Veit, M.; Weissenböck, G.; Schnitzler, J.P. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *J. Exp. Bot.* **1998**, *49*, 953–965. [CrossRef]
16. Iglesias-Carres, L.; Mas-Capdevila, A.; Bravo, F.I.; Aragonès, G.; Muguerza, B.; Arola-Arnal, A. Optimization of a polyphenol extraction method for sweet orange pulp (*Citrus sinensis* L.) to identify phenolic compounds consumed from sweet oranges. *PLoS ONE* **2019**, *14*. [CrossRef]
17. Xi, W.; Lu, J.; Qun, J.; Jiao, B. Characterization of phenolic profile and antioxidant capacity of different fruit part from lemon (*Citrus limon* Burm.) cultivars. *J. Food Sci. Technol.* **2017**, *54*, 1108–1118. [CrossRef] [PubMed]
18. Ahn, J.; Um, M.Y.; Lee, H.; Jung, C.H.; Heo, S.H.; Ha, T.Y. Eleutheroside E, an active component of *Eleutherococcus senticosus*, ameliorates insulin resistance in type 2 diabetic db/db mice. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2013**, *2013*. [CrossRef]
19. Bączek, K. Diversity of *Eleutherococcus* genus in respect of biologically active compounds accumulation. *Herba Pol.* **2015**, *60*, 34–43. [CrossRef]
20. Solomonova, E.; Trusov, N.; Nozdrina, T. Opportunities for using of eleutherococcuses fruits as a new food raw material. In Proceedings of the 1st International Symposium Innovations in Life Sciences (ISILS 2019), Belgorod, Russia, 10–11 October 2019.
21. Wang, Y.H.; Meng, Y.; Zhai, C.; Wang, M.; Avula, B.; Yuk, J.; Smith, K.M.; Isaac, G.; Khan, I.A. The chemical characterization of *Eleutherococcus senticosus* and Ci-wu-jia tea using UHPLC-UV-QTOF/MS. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 475. [CrossRef]
22. Zhai, C.; Wang, M.; Raman, V.; Rehman, J.U.; Meng, Y.; Zhao, J.; Avula, B.; Wang, Y.H.; Tian, Z.; Khan, I.A.; et al. *Eleutherococcus senticosus* (Araliaceae) leaf morpho-anatomy, essential oil composition, and its biological activity against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **2017**, *54*, 658–669. [CrossRef] [PubMed]
23. Richter, R.; Hanssen, H.P.; Koenig, W.A.; Koch, A. Essential oil composition of *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim roots. *J. Essent. Oil Res.* **2007**, *19*, 209–210. [CrossRef]
24. Strzemski, M.; Płachno, B.J.; Mazurek, B.; Kozłowska, W.; Sowa, I.; Lustofin, K.; Załuski, D.; Rydzik, Ł.; Szczepanek, D.; Sawicki, J.; et al. Morphological, anatomical, and phytochemical studies of *Carlina acaulis* L. cypsela. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9230. [CrossRef]
25. Blicharska, E.; Tatarczak-Michalewska, M.; Plazińska, A.; Plaziński, W.; Kowalska, A.; Madejska, A.; Szymańska-Chargot, M.; Sroka-Bartnicka, A.; Flieger, J. Solid-phase extraction using octadecyl-bonded silica modified with photosynthetic pigments from *Spinacia oleracea* L. for the preconcentration of lead(II) ions from aqueous samples. *J. Sep. Sci.* **2018**, *41*, 3129–3142. [CrossRef]
26. Sonestedt, E.; Ericson, U.; Gullberg, B.; Skog, K.; Olsson, H.; Wirfält, E. Do both heterocyclic amines and omega-6 polyunsaturated fatty acids contribute to the incidence of breast cancer in postmenopausal women of the Malmö diet and cancer cohort? *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 1637–1643. [CrossRef] [PubMed]
27. Grilo, E.C.; Costa, P.N.; Gurgel, C.S.S.; de Lima Beserra, A.F.; de Souza Almeida, F.N.; Dimenstein, R. α-tocopherol and gamma-tocopherol concentration in vegetable oils. *Food Sci. Technol.* **2014**, *34*, 379–385. [CrossRef]
28. Ergönül, P.G.; Köseoğlu, O. Changes in α-, β-, γ- And δ-tocopherol contents of mostly consumed vegetable oils during refining process. *CYTA J. Food* **2014**, *12*, 199–202. [CrossRef]
29. Madrigal, R.V.; Plattner, R.D.; Smith, C.R. *Carduus nigrescens* seed oil-A rich source of pentacyclic triterpenoids. *Lipids* **1975**, *10*, 208–213. [CrossRef]
30. Zielińska, S.; Dąbrowska, M.; Kozłowska, W.; Kalemba, D.; Abel, R.; Dryś, A.; Szumny, A.; Matkowski, A. Ontogenetic and trans-generational variation of essential oil composition in *Agastache rugosa*. *Ind. Crop. Prod.* **2017**, *97*, 612–619. [CrossRef]
31. Strzemski, M.; Wójciak-Kosior, M.; Sowa, I.; Rutkowska, E.; Szwerc, W.; Kocjan, R.; Latalski, M. *Carlina* species as a new source of bioactive pentacyclic triterpenes. *Ind. Crop. Prod.* **2016**, *94*. [CrossRef]

PUBLIKACJA P2

Journal of Ethnopharmacology 268 (2021) 113636

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm

The intractum from the *Eleutherococcus senticosus* fruits affects the innate immunity in human leukocytes: From the ethnomedicinal use to contemporary evidence-based research

Filip Graczyk [a], Beata Orzechowska [b], Dominika Franz [b], Maciej Strzemski [c], Robert Verpoorte [d], Daniel Załuski [a,*]

[a] Department of Pharmaceutical Botany and Pharmacognosy, Ludwik Rydygier Collegium Medicum, Nicolaus Copernicus University, 9 Marie Curie-Skłodowska Street, 85-094, Bydgoszcz, Poland
[b] Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy (IIET) Polish Academy of Sciences, Wroclaw, Poland
[c] Department of Analytical Chemistry, Medical University of Lublin, Chodźki 4a, 20-093 Lublin, Poland
[d] Natural Products Laboratory, Institute of Biology, Leiden University, 2300 RA, Leiden, the Netherlands

ARTICLE INFO

Keywords:
Adaptogen
Eleutherococcus
Innate immunity
VSV
Metabolites
Fruits

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: In the ethnomedicine of Russia, the *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. fruits and roots are used to treat immune-related diseases. Because of the overexploitation of the roots, the species is considered to be endangered and is put on the Red List in some countries (e.g. the Republic of Korea). Therefore, the aerial parts of *E. senticosus* might be explored as a new sustainable source of compounds with an adaptogenic activity.
Aim of the study: This study is aimed to evaluate the adaptogenic activity of the *Eleutherococcus senticosus* fruits intractum to support the use of the fruits in folk medicine of Russia.
Materials and methods: The effect on IL-2 and IL-10 release by peripheral blood leukocytes (PBLs) was measured by the ELISA, the CPE on the A549 and PBLs were determined with trypan blue and the MTT. The innate immunity assay was done in the VSV-PBLs model. Metabolic profiling was done using HPLC-DAD and HPLC-RID.
Results: We report for the first time that the intractum (300 μg/mL) and eleutheroside E (100 μg/mL) and B (100 μg/mL) do not act as a virucidal agent (VSV). The intractum and eleutherosides E and B caused the increase of the PBLs proliferation up to 24.61 and 100%, resp. The decreased viral replication in the VSV-PBLs-Int model might be associated with an increased secretion of IL-10 (328 pg/mL). Eleutheroside E and B did not affect the innate immunity. No eleutherosides were determined in the intractum, the ethyl acetate layer contained caffeic and protocatechuic acids. A large amount of *myo*-inositol and D-mannitol was found (267.5 and 492.5 mg/g DE).
Conclusions: Our observations justify the traditional use of the fruits in Russia in immune-related diseases. The results mean that there are other compounds than eleutherosides responsible for the adaptogenic effect, probably *myo*-inositol and caffeic acid, for which an immunostimulatory activity has already been confirmed.

1. Introduction

Herbal medicinal products based on *Eleutherococcus* extracts are a recent European development from a traditional use in Eastern Asia and North Russia. Since few years, *Eleutherococcus* products increased their presence in the market, mainly as dietary supplements and nutri-pharm products. *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim., known as Ciwujia in Chinese, Siberian ginseng, Devil's Shrub Touch-me-not, Prickly Eleutherococc, is a well-known medicinal plant traditionally used as an adaptogen in Russia and in China (Lau et al., 2019; Soejarto

Abbreviations: Int, the intractum; DE, dried extract; E, eleutheroside E; B, eleutheroside B; PBLs, peripheral blood leukocytes; VSV, Vesicular stomatitis virus; VSV-PBLs model, Vesicular stomatitis virus-peripheral blood leukocytes; VSV-PBLs-Int model, Vesicular stomatitis virus-peripheral blood leukocytes-Intractum; A549, the human lung carcinoma cell line; L929, the murine fibroblast-like cell line; CC_{50}, 50% cytotoxic concentration; CPE, cytopathic effect; IL-2, interleukine 2; IL-10, interleukine 10; LPS, lipopolysaccharide; TCID50, tissue culture infectious dose.

* Corresponding author.
E-mail addresses: daniel_zaluski@onet.eu, daniel.zaluski@cm.umk.pl (D. Załuski).

https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113636
Received 21 July 2020; Received in revised form 12 November 2020; Accepted 24 November 2020
Available online 1 December 2020
0378-8741/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

and Farnsworth, 1978). In TCM the plant was used for over 4000 years to increase longevity. In Europe, the oldest sources on *E. senticosus* date back to 1855, when two Russian scientists began studying the plant after their travel to the Far East of Russia in 1853–1857. An intensive study of *E. senticosus* (*Eleutherococci radix et rhizoma*) initiated in the middle of the twentieth century by Russian scientists, and after its introduction in medical practice in the USSR in the 70s, it became popular also in Europe (Soejarto and Farnsworth, 1978; Tabachnik, 1997; Yance, 2013).

Eleutherococci radix et rhizoma is best known for its adaptogenic activity and has been classified as the true adaptogen (Liao et al., 2018), (Table 2). The concept of an adaptogen was introduced by Soviet scientist, dr Nikolay Lazarev, who had been searching for substances which produced "a state of nonspecific resistance". According to Brekhman and Dardymov, adaptogens should improve the adaptation to stress, they are "a new class of metabolic regulators which increase the ability of an organism to adapt to environmental factors and to avoid damage from such factors". They increase general non-specific resistance of the body, namely, resistance to diverse chemical, physical, and biological factors. Currently the renewed definition of adaptogen is supported by the results of recent studies on the molecular mechanisms of action (Brekhman and Dardymov, 1969; Panossian et al., 2020; Seo et al., 2019; Shikov et al., 2014).

It was reported that, in the late 1970's Olympic Games, the athletes of the Old Soviet Union improved their records due to supplementation of *E. senticosus* roots products (Boon and Smith, 2004; Domene, 2013). For medicinal purposes alcoholic extracts, tincture, oil, decoction and cream are traditionally used (Table 1). The roots are used to manufacture a drink, known as Baikal (Байкал), and as a source of biologically active compounds in natural multivitamin complex, known as Elton (Элтон, 50 mg of powdered root), (Parfenova et al., 2013; Solomonova et al., 2019).

Over the last years, in some countries like South Korea, *E. senticousu* has become rare, due to the over-exploitation, and it has been classified as a protected plant by the Environmental Ministry, therefore a new renewable source of this adaptogen is needed (Kang et al., 2010; Kim, 2014). The best solution would be the use of aerial parts, e.g. the fruits. Their main metabolites are very varied and are called the eleutherosides with eleutheroside B (syringin 4-β-D-glucoside) and E ((−)-siringaresinol 4,4″-*O*-β-D-diglucoside) to be in a majority. Moreover, the fruits are rich in flavonoids (13.4–14.4 mg/g ext.), polyphenols (38.5–41.1 mg/g ext.), minerals (Ca 3730–4495, Mg 1430–1540, Fe 35.4–53, Mn 75.2–88.3, Zn 18.9–41.0, Cu 3.34–13, Se 0.19–061; mg/kg respectively), (Kim et al., 2015; Załuski et al., 2010; Załuski and Janeczko, 2015). Triterpenic acids, e.g. ursolic acid were also determined (Jang et al., 2016).

Powder and infusion of fruits have a tonic effect on the central nervous system in small doses, however in higher doses it acts as a sedative. It is said that eleutheroside B and E are the most active compounds and are probably responsible for the adaptogenic activity. The latest results have shown cardioprotective effects of eleutheroside B in rabbit heart models (Zhang et al., 2020). In turn eleutheroside E might regulate steroidogenesis, estrone, arachidonic acid, tyrosine and glutathione metabolism in Wistar rats model (Ma et al., 2020). Both eleutherosides showed protective effects against neuritic atrophy and nerve cell death, as well as a weak inhibitory effect on CYP2C9 and CYP2E1 but no effect on CYP2D6 and CYP3A4 (Guo et al., 2014). The pro-healthy extract properties (no information regarding the solvent) are the reason for which it is used in the production of phyto-jam, 0.8–1.6 kg of extract/100 kg of the final product (Parfenova et al., 2013; Solomonova et al., 2019).

On the basis of our previous findings on the *E. senticosus* fruits intractum, we have concluded a possible adaptogenic activity. To probe our hypothesis we studied the plant material in a series of *in vitro* models for bioactivities related to the adaptogenic properties. The impact on the proliferation of human leukocytes (PBLs) isolated from the healthy volunteers and the sensitivity of leukocytes to the vesicular stomatitis virus infection (*VSV, Rhabdoviridae*; VSV-PBLs) was evaluated. The virucidal properties and a production of IL-2 and IL-10 were also tested.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

The standards of eleutheroside B ≥ 98.0% (HPLC) and eleutheroside E ≥ 98.0% (HPLC), *myo*-inositol ≥99%, D-mannitol ≥98%, protocatechuic acid ≥97%, p-hydroxybenzoic acid 99%, vanillic acid ≥97%, caffeic acid ≥98%, ferulic acid ≥99%, rosmarinic acid ≥98%, DMEM Medium, RPMI 1649 Medium, phosphate buffered saline (PBS), gradient grade acetonitrile and trifluoroacetic acid ≥99% were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). LC grade methanol (MeOH) was purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, USA). Ultrapure water was prepared using a Millipore Direct-Q3 purification system (Bedford, MA, USA). The A549 cell line (ATCC CCL 185) - human lung carcinoma cell line and was maintained in RPMI 1640 culture medium and Dulbecco medium (IIET, Wroclaw, Poland) respectively, supplemented with 10% fetal bovine serum, antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 μg/mL streptomycin), and 2 mM L-glutamine. Vesicular stomatitis virus (VSV) (strain Indiana; ATTC VR-1238™, Rhabdoviridae, was propagated and titrated in L929 cells (ATCC CCL1). All other reagents were of analytical grade.

Table 1
Summary of the pharmaceutical forms and dosage for an oral administration of *Eleutherococcus senticosus* preparations (Baranov, 1982; Pizzorno and Murray, 2012). All photos come from the private collection of D. Załuski.

Pharmaceutical form	Roots				Fruits
	Powder	Tincture (1:5)	Fluid extract (1:1)	Solid extract (20:1)	Intractum
Doses	2–4 g/1–3 divided doses daily	10–20 mL/1–3 divided doses daily	2–4 mL/1–3 divided doses daily	100–200 mg/1–3 divided doses daily	No data available

Table 2
List of the plant species classified into the true adaptogens group and as a plant material traditionally used in the immune system deficiencies. The fruits of *Eleutherococcus senticosus* are now being explored as a sustainable plant-based adaptogen.

Family	Species	Part	Traditional use	References
Araliaceae	*Panax ginseng* C. A.Mey,	root	used for strengthening, nourishing, adjusting blood pressure and restoring heart function, neurasthenia and physical weakness, dysphoria, thirst, asthenia coughing, joint pain, haemoptysis, haematemesis, bleeding wounds	(Patel et al., 2007); (Wang et al., 2016); (Liao et al., 2018)
Schisandraceae	*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.,	fruit, seed	increase mental ability, remove fatigue, improve visual acuity in the dark, sleep aids, stress prevent	(Liao et al., 2018); (Zhang et al., 2014); You et al., 2015)
Araliaceae	*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim.	root **fruit?**	improving the circulatory system, anti-fatigue, promoting blood circulation for removing blood stasis, invigorating the stomach and for diuresis, increase cellular energy levels and prevent oxidative damages	(Liao et al., 2018); (Huang et al., 2011); (Gaffney et al., 2001); (Huang et al., 2011)
Crassulaceae	*Rhodiola crenulata* (Hook. et Thoms) S.H.Fu	rhizome, root	increases the body's resistance to stress and other adverse environmental factors	(Liao et al., 2018); (Chen et al., 20150; (Chiang et al., 2015)
Brassicaceae	*Lepidium meyenii* Walp.	root	improves semen quality, for enhancing fertility effectively, anti-fatigue	(Liao et al., 2018); (Gonzales et al., 2012); (Xia et al., 2018)

2.2. Plant material and preparation of the extract

The matured fruits of *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. were collected at the Garden of Medicinal and Cosmetic Plants in Bydgoszcz (Poland) in September 2017 (*N:* 53°07′36.55″ *E:* 18°01′51.64″). The plant sample was deposited at the Department of Pharmaceutical Botany and Pharmacognosy, Collegium Medicum, Bydgoszcz, Poland, Cat. Nr. ES October 2018. Plant materials identity was evaluated morphologically and by HPLC-DAD and HPLC-RID analysis, in comparison with reference data. The fresh fruits (20 g) were macerated in 100 mL 40% ethanol for 30 days under domestic conditions (room temperature, dark place). After that, the extract was filtered through Whatman no. 4 filter paper. The solvent was dried with an evaporator under vacuum conditions at 45 °C, next frozen at −20 °C and subjected to lyophilisation. The dried residue was stored in an exsiccator at 4 °C. The extraction yield was calculated based on the dry weight of the extract [%].

2.2.1. Liquid-liquid extraction of polyphenols

Dry intractum (200 mg) was dissolved in 10 mL of water and extracted 10 x with 2 mL of ethyl acetate in a Falcon tube (15 mL). After each extraction, the ethyl acetate layer was collected and transferred to a falcon tube (50 mL). After extraction, the acetate fraction (20 mL) was evaporated to dryness under a stream of nitrogen. The dry residue was dissolved in 60% MeOH (v/v) and transferred quantitatively into a volumetric flask (5 mL).

2.2.2. HPLC-PDA-based metabolomic profiling of phenolic compounds in the extract

Analyses were performed on EliteLaChrom chromatograph with PDA detector and EZChrom Elite software (Merck, Darmstadt, Germany). Gradient chromatographic system was used as follows: RP18e LiChrospher 100 column (Merck, Darmstadt, Germany) (25 cm × 4.0 mm i.d., 5 μm particle size) at 25 °C, a mixture of acetonitrile (solvent A) and water (solvent B) both acidified with 0.025% of trifluoroacetic acid were used as the mobile phase. The compounds were separated by gradient elution with program: 0.0–8.0 min A 10%, B 90%; 8.1–18.0 min A 10–20%, B 90–80%; 18.1–28.0 min A 20%, B 80%; 28.1–35.0 min A 20–25%, B 80-75%; 35.1–40.0 min A 25%, B 75%. Flow rate was 1.0 mL/min. Data were collected between 190 and 400 nm. The identity of compounds was established by comparison of retention times and UV spectra with the corresponding standards. Quantitative analysis was performed at λ = 259 nm, 264 nm, 255 nm, 260 nm, 323 nm, 206 nm, 322 nm, 206 nm, 328 nm for protocatechuic acid, eleutheroside B, *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, caffeic acid, eleutheroside E, ferulic acid, eleutheroside E1 and rosmarinic acid resp.

2.2.3. HPLC- RID-based metabolomic profiling of sugars in the extract

Qualitative and quantitative analyses were performed on an Agilent 1200 chromatograph with RID detector. Isocratic chromatographic system was used as follows: Rezex RHM Monosaccharide H+ column (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) (30 cm × 7.8 mm i.d., 8 μm particle size) at 60 °C, degassed water was used as the mobile phase. Flow rate was 1.0 mL/min. Sugars were monitored using a refractive index detector set on positive polarity and their identity was established by comparison of retention times and UV spectra with the corresponding standards. For qualitative analysis, 33 sugars were analyzed (ribitol ≥99.0%, D-altrose ≥97.0% (HPLC), D-(−)-arabinose ≥98.0%, D-(+)-cellobiose ≥98.0%, D-(+)-digitoxose ≥99.0%, dulcitol ≥99.0%, meso-erythritol ≥99.0%, D-(−)-fructose ≥99.0% (HPLC), L-(−)-fucose ≥99.5% (GC), D-(+)-galactose ≥99.0%, gentiobiose ≥85.%, D-(+)-glucose ≥99.5% (GC), *myo*-inositol ≥99%, isomaltose ≥98.0%, lactose ≥98.0%, lactulose ≥98.0%, D-lyxose ≥99.0%, D-maltose ≥99.0%, maltotriose ≥90.0%, maltulose ≥98%, D-mannitol ≥98%, D-(+)-mannose ≥98.0%, melibiose ≥98.0%, D-(+)-melezitose ≥97%, D-(+)-raffinose ≥99.0%, L-(+)-rhamnose ≥99.0%, D-(−)-ribose ≥99.0%, D-sorbitol ≥99.0%, stachyose ≥98.0%, sucrose ≥99.5%, trehalose ≥99.0%, xylitol ≥99.0%, D-(+)-xylose ≥99.0%). The sugars were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Only *myo*-inositol and D-mannitol were detected and measured quantitatively. To prepare calibration curve three concentrations of *myo*-inositol and D-mannitol were used (0.25; 0.5; 1.0 mg/mL) which were linear with the curve equations y = 17.11875941x+0.00113333 and y = 18.36674978x+0.0152813, with a correlation coefficient of 0.999 (R^2), resp.

2.3. Preparation of stock solutions of the extract and compounds for bioassay

The intractum was dissolved in 20% EtOH in PBS (10 mg/mL). Eleutheroside B (2 mg/mL) and eleutheroside E (2 mg/mL) were dissolved in EtOH with DMSO (v/v 20%). Before addition to the cell cultures, all samples were diluted with DMEM 2% FBS medium. The samples were tested in a concentration of 2.35, 4.7, 9.4, 18.8, 37.5, 75, 150, 300 μg/mL. The final concentration was established as 300 μg/mL for the intractum and 100 μg/mL (0.26 μM) for eleutheroside B and 100 μg/mL (0.13 μM) for eleutheroside E, resp., what was equal the highest value that does not cause the CPE in the cells. LPS (1 μg/mL), cidofovir (100 μg/mL), ribavirin (100 μg/mL) were used as positive controls. The concentration of DMSO used (<0.1%) did not influence the assays.

2.4. Cells and viruses

Compounds were tested against VSV-vesicular stomatitis virus (strain Indiana; ATTC VR-1238™, *Rhabdoviridae*); in A549-human lung adenocarcinoma epithelial cell line culture (ATCC® CCL-185™).

2.5. Isolation of peripheral blood leukocytes (PBLs)

The study was conformed to the principles of the Declaration of Helsinki. Peripheral venous blood was taken from healthy human volunteers (30–40 years old) in the Hospital of Collegium Medicum in Bydgoszcz in 2018. Volunteers were clinically recognized to be in a good health, routine laboratory tests showed no deviations from normal range, they did not take any medication. The study was approved by the Bioethical Commission (Nicolaus Copernicus University). Human peripheral blood leukocytes (PBLs) were isolated according to the standard protocol from peripheral blood supplemented with anticoagulants (EDTA), by gradient centrifugation in Gradisol G, with a density of 1.115 g/mL (Aqua Medica, Poznań, Poland). The leukocytes were collected from the interphase, washed two times with RPMI 1640, supplemented with 2% of FBS and suspended in this medium at a density of 2×10^6 cells/mL.

2.6. Cytotoxicity assay: determination of cytotoxic concentration CC_{50}

The cytotoxic effect of samples on A549 cells was determined microscopically with trypan blue test and with the MTT method. Briefly, subconfluent monolayers of A549 cells ($1{,}8 \times 10^4$ cell/well in Dulbecco Minimal Essential Medium (DMEM) supplemented with 5% Fetal Bovine Serum (FBS), antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 μg/mL streptomycin), and 2 mM L-glutamine (all from Sigma Aldrich, USA) were incubated in 96-multiwell plates in the presence of dilutions of the compounds (300, 150, 75, 37.5, 18.8, 9.4, 4.7, 2.35 μg/mL), in triplicate for 72 h at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO_2. During the incubation, changes in cell morphology indicating cytotoxicity (CTE, cytotoxic effect) were observed and scored according to a scale: 0 - no cytotoxicity; 1 - up to 25%; 2–50%; 3–75%; 4–100% cytotoxicity. Next MTT assay has been performed by adding 20 μL of MTT solution (Promega, Madison, WI, USA) to each well. After incubation of microplates at 37 °C/5% CO_2 for 3 solubilization/stop solution- SDS-HCl - (100 μL/well) was added and the absorbance values of the wells were measured at 570 nm using a 96-well plate reader (Multiskan RC spectrophotometer, Thermo Labsystems, USA). The 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) was determined based on microscopic reading (CTE). CC_{50} was defined as the concentration that reduced cell viability by 50% with respect to controls without drug.

2.7. Characterization of the antiviral activity of the intractum and eleutherosides B and E

All experiments described below were performed in parallel with drug effective against used virus (Cidofovir, Ribavirin) to test the suitability of the assay. The VSV-107 $TCID_{50}$/mL stocks were generated by infecting monolayers of A549 cell culture. Each assay was run three times.

2.7.1. Virucidal activity

The virucidal activity was measured by *in vitro* incubation of viruses with the compounds. Briefly, viruses were incubated for 2 h at RT with non-toxic (CC_{20}) concentration of each compound. Simultaneously, the same amount of virus was incubated with culture medium as a control. After incubation viruses were titrated (10^{-1} do 10^{-8}) and plated on A549 cell monolayers seeded in 96-well plates 24 h before experiment (2×10^4 cell/well). The plates were incubated for 72 h at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO_2. The cytopathic effect (CPE) was observed under microscope and determined by the MTT method. Scoring of CPE was from 0 (no CPE) to 4 (100% cell destruction).

2.7.2. Pretreatment assays

To assess the effect of the pretreatment with the samples, A549 cell monolayers seeded in 96-well plates were treated for 24 h at 37 °C with CC_{20} of each compound in triplicate. Then, the medium was removed and the cell monolayers were infected with 100 $TCID_{50}$/well of each virus. After 30 min at 37 °C the viral inoculum was removed. Plates were washed and finally overlaid with 2% DMEM (100 μL per well) and then incubated 72 h. Finally, the cytopathic effect (CPE) was observed under microscope and determined by the MTT method.

2.7.3. Time of addition assays

To study the effect of the samples in the adsorption and post-adsorption events, two different treatments with the compounds were carried out. First when the derivatives were present: (i) only during the adsorption period (Adsorption); (ii) after adsorption and until the end of the experiment (Post-Adsorption). Briefly, A549 cell monolayers cultured in 96-well plates were then infected with 100 $TCID_{50}$/well of each virus in the presence or absence of each compound and further incubated at 37 °C (for designated time for each virus) allowing only the adsorption step of the viral particles to the cells (Adsorption). Cell monolayers were then washed and incubated with 2% DMEM. In the Post Adsorption experiments, A549 cell monolayers were infected with 100 $TCID_{50}$/well of virus and after adsorption, cells were washed and derivatives were added to the wells. CPE was assessed after 72 h under microscope and determined by the MTT method.

2.8. Proliferation assay

PBLs isolated from healthy volunteers were seeded at a density of 1×10^6 cells/mL in 24-well DMEM plates with 5% FBS, in 500 μL. Then, 500 μL of samples solution or LPS (1 μg/mL; control wells) was added and plates were incubated 48 h in an incubator (37 °C, 5% CO_2). Three different blood samples were stimulated with each compound. Next, the MTT test was performed. Cell viability (%) was calculated for each concentration as mean of as Abs treated/Abs control × 100, where Abs treated and Abs control are the absorbance readings for the wells with and without compounds. The background control (solvent control) was subtracted from all the measurements before calculation.

2.9. Cytokine determination

Cytokine levels were determined in the supernatants above the uninfected PBL cultures, treated and not treated with compounds. ELISA kits (IL-10, ELISA MAX, Biolegend; IL-2, Life Technologies) were utilized according to the producer's instructions. The optical density was measured at 450 nm with a λ correction of 570 nm using a Multiskan RC spectrophotometer (Thermo Labsystems, USA). Cytokine concentrations were expressed in pg/mL.

2.10. Evaluating the innate immunity

Innate immunity was determined by assessing the resistance of PBLs to VSV infection as described earlier (Orzechowska et al., 2007). Briefly, leukocytes (1×10^6/mL) were infected with a vesicular stomatitis virus (VSV) (100 $TCID_{50}$- 50% tissue culture infective dose). After 40 min of adsorption at room temperature, the virus was removed by washing three times with 5 mL RPMI 1640 and with 2% FBS. Next, 1 mL of culture medium or diluted compound were added to wells, so that the final concentrations of compounds used was 300 μg/mL for the intractum and 100 μg/mL for eleutherosides B and E, resp. Each compound was used to stimulate three randomly selected blood samples (infected with the virus). Three replicates per concentration were prepared. Infected cells were incubated at 37 °C for 48 h. A sample of infected cells was set aside and kept at a temperature of 4 °C, to serve as a wash control. Titers of VSV in samples of the medium above the leukocytes were determined in L929 cells. A VSV titer higher than 4 log $TCID_{50}$ was considered a deficiency of resistance/innate immunity, a titer of 2–3 log indicated partial resistance, and a titer of 0–1 log indicated complete resistance/innate antiviral immunity.

2.11. Statistical analysis

The results were expressed as the mean ± SEM of three independent experiments performed at least in triplicate. The obtained data were subjected to statistical analysis using Statistica 12.0. (StatSoft, Cracow). The evaluations were analyzed for one-factor variance analysis. Statistical differences between the treatment groups were estimated by Spearman's (R) and Wilcoxon tests. All statistical tests were carried out at significance level of $\alpha = 0.05$.

3. Results

3.1. Survival of A549 cell line

Because the viruses can replicate only in living cells, at the first step the CPE of the analyzed samples on A549 cell line was determined. The A549 cells were stimulated during 3 days and compared to the control. Concentrations up to 300 μg/mL for the intractum and up to 100 μg/mL for eleutheroside B and E, resp., did not cause any cytopathic changes in the cells. The A549 cell culture may be used in the further studies as a medium for generating viruses particles and evaluating antiviral activity of the samples.

3.2. Survival of PBLs and their proliferation

In order to check whether the doses selected in 3.1. do not cause the death of leukocytes isolated from the healthy donors, the cells were stimulated for 48 h with the intractum (300 μg/mL) and eleutheroside B and E (100 μg/mL each) and compared with non-stimulated control. Concentrations did not affect the viability decrease of PBLs, contrary, the increase in the PBLs proliferation was noticed. Fig. 1 shows a statistically significant increase of the PBLs number in comparison to the control after 48 h of stimulation. The increase of the number of leukocytes is in a line with our hypothesis on the adaptogenic activity of the fruits.

3.3. Effect of the intractum, eleutheroside B and E on IL-2 and IL-10 levels in PBLs

The plant-based adaptogens are known for their anti-inflammatory activity, so we tested the impact of compounds both on IL-2 (pro-inflammatory cytokine) and on IL-10 (anti-inflammatory cytokine) production, (Table 3). At the tested concentrations, no significant changes in the IL-2 levels were observed. However, the intractum samples showed a statistically significant increase of the production of IL-10. A weaker effect was observed in case of eleutheroside B and E.

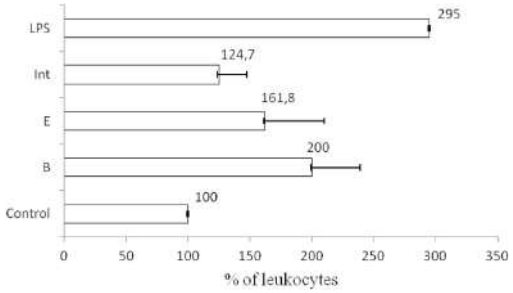


Fig. 1. Proliferation (%) of leukocytes after the intractum (300 μg/mL), eleutheroside B and E (100 μg/mL each) stimulation during 48 h. LPS (100 μg/mL) was used as a positive control. Data of three separate experiments performed using leukocytes isolated from independent donors assayed in duplicate are expressed as mean ± SEM. All data are presented as median values. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon test, *$p < 0.05$.

Table 3
Effect of compounds of the IL-2 and IL-10 release (pg/mL). B, eleutheroside B (100 μg/mL); E, eleutheroside E (100 μg/mL); Int, intractum (300 μg/mL). LPS as a control at concentration of 100 μg/mL was used. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon test, *$p < 0.05$.

Compounds	B	E	Int	LPS
IL-2	n.d.	n.d.	n.d.	n.s.
IL-10	170.3 ± 7.9	187 ± 1.3	328 ± 1.4	473
t-test	0.446	0.573	0.062	0.0882

3.4. Antivirial activity of the intractum, eleutheroside B and E

To avoid any misunderstandings, whether the compounds have the adaptogenic abilities and decrease the viruses' titer, or act alone as an antiviral agent, their activity against vesicular stomatitis virus (VSV), has been determined. The incubation of the VSV with the intractum, eleutheroside B and E prior to infection did not cause a significant reduction of the virus titer (Fig. 2). No effect on VSV replication was observed when the samples were added during the adsorption period, or 30 min after infection with VSV (Fig. 3). Our data suggest that the intractum, eleutherosides B and E did not act as the antiviral agents with the titer (log$TCID_{50}$/mL) about 4.6, 4.0 and 5.0 in comparison to a non-stimulated control, equal 4,0.

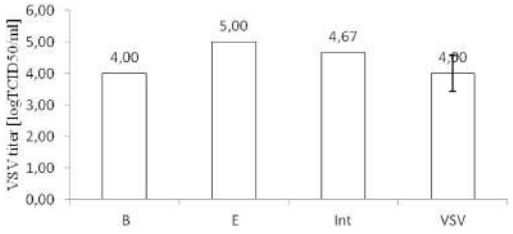


Fig. 2. The virucidal effect of the compounds on VSV. Eleutheroside B (100 μg/mL), eleutheroside E (100 μg/mL), and the intractum (300 μg/mL) were incubated with VSV for 2 h in 37 °C. After incubation mixtures were titrated, plated on A549 cell monolayers, and incubated for 72 h. VSV titer was compared to not treated (VSV only) control.

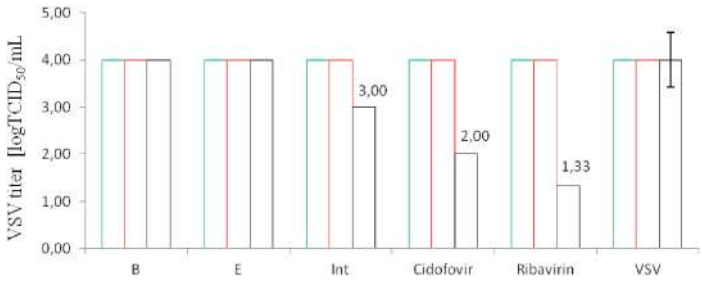


Fig. 3. The influence of the compounds on VSV replication in three variants: green: compounds were added to the A549 cells 24 h before infection with VSV; red: compounds were present only during the adsorption period (adsorption); black: compounds were added after the adsorption period. Cidofovir and ribavirin were used as positive controls. B, eleutheroside B (100 μg/mL); E, eleutheroside E (100 μg/mL); Int, intractum (300 μg/mL).

3.5. Effect of the intractum, eleutheroside B and E on the non-specific resistance after PBLs stimulation with VSV

The non-specific, innate immunity can be stimulated with different plant-based metabolites, such as adaptogens, which should increase the resistance to VSV infection. Innate immunity was determined by assessing the resistance of PBLs to VSV infection. VSV does not cause natural infections in the European human population, so specific antibodies against VSV are absent in human serum, which excludes the participation of acquired immunity in this experimental model of innate immunity. The 48 h stimulation of VSV infected PBLs with the intractum caused a 3-log drop in titer of VSV in comparison to non-stimulated control, which indicates a partial resistance. No statistically significant decrease of the titer was observed in case of eleutheroside B and E (Fig. 4).

3.6. HPLC-DAD and HLC-RID metabolomic profiling of polyphenols and sugars in the intractum

Primary and secondary metabolites are responsible for pharmacological effects of the plant, we examined *myo*-inositol and D-mannitol in the raw intractum and phenolic profile after its additional water/ethyl acetate partition clean-up. Table 4 presents the quantitative results for eleutherosides, phenolic acids and sugars. Fig. 5 presents an exemplary chromatogram for eleutherosides and phenolic acids, Fig. 6 presents the chromatogram for sugars. The extraction of the fruits resulted in 5.5% dry extract yield.

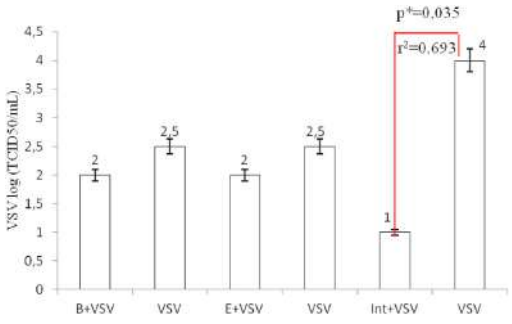


Fig. 4. Effect of eleutheroside B, eleutheroside E and the intractum on the innate immune stimulation in PBLs infected with VSV. B, eleutheroside B (100 μg/mL); E, eleutheroside E (100 μg/mL); Int, intractum (300 μg/mL). Median titer and Min-Max are presented. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon test, *$p < 0.05$.

4. Discussion

In this study, we hypothesized that the intractum from the fruits of *Eleutherococcus senticosus* and eleutheroside B and E may have a physiological role in non-specific body resistance. This hypothesis was based on the knowledge regarding the ethnomedicinal and ethnonutritional uses of the fruits by the Russians living in Siberia, i.e. aiming at improvement of the physical body performance and immunity. In the process of plant-based drug discovery, the selection of an appropriate bioassay and its validation are important steps to determine the activity of the products and extracts. To test our hypothesis, we examined the direct impact of the compounds on a stimulation of the PBLs in the presence of the VSV (VSV-PBLs *in vitro*).

Because the viruses can replicate only in alive cells, the A549 cell line was used in the research as a living environment for the virus replication. However, to exclude a cytotoxic activity of the compounds, in the first step the CPE of the intractum and eleutherosides B and E towards the A549 cell line was assayed. The non-toxic doses were calculated as 300, 100 and 100 μg/mL, respectively. Some authors reported a cytotoxic activity of adaptogens towards cancer cell lines (Atta and al-Ani, 2015; Cichello et al., 2015; Hacker et al., 1984; Kim et al., 2018; Lee et al., 2018; Wong et al., 2018; Yu et al., 2003; Yu et al., 2015; Zhu et al., 2015). However, it requires high concentrations, what does not meet the recommendation of an interesting *in vitro* cytotoxic activity if the IC_{50} is < 20 μg/mL (National Cancer Institute, United States), (Omosa et al., 2016). Our results are in agreement with those obtained by Protasova et al. (1986) who concluded that the adaptogens in oncology are especially effective for cancer prevention and in cancer patients with a small tumor mass. However, they act rather via modifying the immune response than via the CPE, making a patient better prepared for specific treatment. The CPE due to PBLs for the established doses, i.e. 300, 100 and 100 μg/mL, was also excluded. That finding is in agreement with a function as an adaptogen, which is generally thought to be a rather nontoxic substance for normal cell lines (Fulder et al., 2013; Orzechowska et al., 2014; Panossian, 2017; Protasova and Zykov, 1984; Yaremenko and Pashinski, 1986).

Inflammation is a process constantly occurring in the body and is activated by different factors among others hyaluronidase. The anti-hyaluronidase activity of the intractum or the 75% methanol extracts has already been reported. The intractum inhibited hyaluronidase at the level of 60% at a concentration of 22 μg/0.16 mL, while for aescin the same value was observed at concentration of 400 μg/0.16 mL (Załuski et al., 2016). Following the adaptogen criteria, the adaptogen should regulate the inflammatory process, therefore the impact of the intractum on the production of IL-2 (pro-inflammatory) and IL-10 (anti-inflammatory) was measured. On the basis of the results, it is shown that the intractum and eleutheroside B and E increased only the level of IL-10 (Table 2). There was not statistically significant difference between

Table 4
Contents of phenolic compounds in the ethyl acetate fraction from the intractum and sugars (mg/g extract): E-eleutheroside E, E1-eleutheroside E1, B-eleutheroside B, PA-protocatechuic acid, 4-OH-benzoic acid, VA-vanillic acid, CA-caffeic acid, FA-ferulic acid, RA-rosmarinic acid, Myo-I - *myo*-inositol, D-M- D-mannitol.

E	E1	B	PA	4-OH	VA	CA	FA	RA	Myo-I	D-M
n.d.	n.d.	n.d.	1.16 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.07	3.85 ± 0.07	0.11 ± 0,01	n.d.	267.5 ± 0.07	492.5 ± 0.07

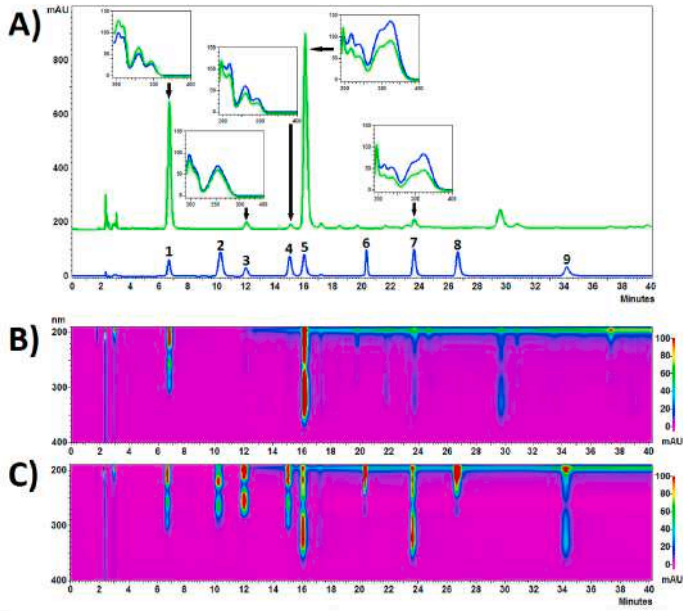


Fig. 5. A) An exemplary chromatogram of *Eleutherococcus senticosus* intractum (green line) and reference compounds (blue line): 1-protocatechuic acid, 2-eleutheroside B, 3-*p*-hydroxybenzoic acid, 4-vanillic acid, 5-caffeic acid, 6-eleutheroside E, 7-ferulic acid, 8-eleutheroside E1, 9-rosmarinic acid. Over the chromatograms the spectra of identified and reference compounds. B and C-the spectrochromatograms of intractum and reference compounds, resp. RP18e LiChrospher 100 column at 25 °C, a mixture of acetonitrile (solvent A) and water (solvent B) both acidified with 0.025% of trifluoroacetic acid were used as the mobile phase. The compounds were separated by gradient elution with program: 0.0–8.0 min A 10%, B 90%; 8.1–18.0 min A 10–20%, B 90-80%; 18.1–28.0 min A 20%, B 80%; 28.1–35.0 min A 20–25%, B 80-75%; 35.1–40.0 min A 25%, B 75%. Flow rate was 1.0 mL/min.

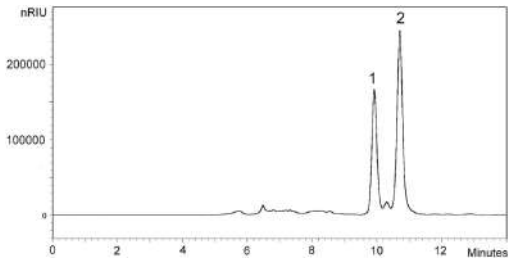


Fig. 6. An exemplary chromatogram of the sugars in the *Eleutherococcus senticosus* intractum: 1-*myo*-inositol, 2-D-mannitol. The compounds were separated by isocratic elution on the Rezex RHM Monosaccharide H+ column, 30 cm × 7.8 mm i.d., 8 μm particle size) at 60 °C, degassed water was used as the mobile phase. Flow rate was 1.0 mL/min.

eleutheroside B and E in the PBLs-stimulated IL-10 production (r^2 = 0.933; $p < 0.05$). The intractum contributes to a higher IL-10 production than eleutherosides which may result from the synergism of different compounds present in the intractum. Until now, only the influence of the root extracts has been tested on the level of IL-6 (pro-inflammatory) in the lung tissue of a mouse model for acute lung injury, and in SW982 human synovial sarcoma cells. The extract down-regulated the level of IL-6 (Fei et al., 2014). The results of other studies on the ethanol extract from the roots of *E. senticosus* exhibited the ability to induce and enhance IL-6 in the concentration range 0.03–1.0 mg/mL. Such an effect was not observed in case of the isolated metabolites, i.e. eleutheroside B and E (Steinmann et al., 2001). It was found that the synthesis of Rantes (the C–C chemokine subfamily), after stimulation of whole blood cultures by an ethanol root extract of *E. senticosus* may be increased over a wide range of concentrations. A decrease in IL-4, IL-5 and IL-12 was noticed at higher concentrations, but at lower ones a stimulation of IL-6 and IL-13 was seen (Schmolz et al., 2001). Regarding the above statements, the use of this extract should be discussed again, especially in case of patients suffering from cancers and inflammatory-based disorders. The literature provides different information about the influence of *E. senticosus* on interleukins' levels. Therefore, the most reliable step would be to evaluate the impact of the extract on a wide panel of interleukins, both pro- and anti-inflammatory in one set of experiments.

For a better understanding of the mechanism of the adaptogen's action, the next step was to exclude a virucidal activity of the intractum and eleutheroside B and E towards the VSV. The established antiviral drugs, cidofovir and ribavirin, were included as control drugs. No antiviral activity was expected because an adaptogen should activate the immune system to fight viral infections. In order to identify the step at which replication might be inhibited, VSV was pretreated with the compounds prior to cells infection, the second variant was to treat with the compounds during virus adsorption and the last variant was to add the compounds after the virus adsorption. The addition of the intractum 90 min after infection lowered the VSV titer about 1 log comparing to the control ribavirin about 2.6 log. According to Ruppach (2014), a titer

lower than 1 log indicates a complete lack of virucidal effect. The obtained results have confirmed our hypothesis regarding a lack of an anti-VSV activity and there are in an agreement with those obtained by Wacker and Eilmes (1978) for the roots' ethanol extract (100 μg). No inhibition of the VSV replication was seen when the extract and the VSV were introduced into fibroblast at the same time. Inhibition was only described when the extract was introduced into the mouse fibroblast culture before contact with the VSV, the cells became resistant to the virus for 6 h. Thus, adaptogens may cause changes in the cell at molecular level and prepare cells to inactivate virus.

Some authors reported *in vitro* antiviral activity (human rhinovirus, respiratory syncytial virus and influenza A virus) of the ethanol extract from the roots of *E. senticosus* (Wacker and Eilmes, 1978). In addition to this, clinical studies indicated that *Eleutherococcus* acts as an anti-influenza agent when used prophylactically (Galanova, 1977).

The use of plant-based compounds is one of the most effective strategies to stimulate the human immunity. However, the large part of the knowledge is taken from the ethnopharmacological use of the plant material or galenic preparations without having a scientific background. To create most similar conditions taking place in human body after virus infection, here, we studied the influence of the intractum and eleutheroside B and E on the stimulation of human leukocyte resistance to the VSV infection. Fig. 4 presents the VSV replication, whereas a VSV replication titer $\geq$ than 4 log $TCID_{50}$ was considered a deficiency of innate immunity, a titer of 2–3 log indicated partial resistance, and a titer of 0–1 log indicated complete innate antiviral immunity. Interestingly, using the VSV-PBL*s* as the model system we found that only the intractum caused statistically significant resistance, classified to the partial resistance, with a titer of 3 log. There was a significant correlation between the VSV-PBLs-Int stimulation with a non-stimulated one ($r^2 = 0.693$). This suggests that lower viral replication after the VSV-PBL*s*-Int stimulation might be associated with an increased secretion of IL-10, (Table 2). A positive coefficient of correlation ($r^2 = 0.872$) indicates that the variables are directly related. This is in an agreement with an earlier study on VSV replication in leukocytes sensitive to viral infection. In this study the changes in the cytokine profile balance might be connected with tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin 10 (IL-10) or interferon-γ (IFN-γ) production by VSV-infected leukocytes (Tomczyk et al., 2018). It should be mentioned that infection with VSV did not influence the viability of PBLs as it was shown before (Orzechowska et al., 2014). Other adaptogens can also influence the innate immunity. For example the water extract from the *Scutellariae radix*, the adaptogen raw material, stimulated resistance of human leukocytes to VSV infection (Orzechowska et al., 2014). Similar observations have been noticed in experimental influenza infections of the mice. No virus particles were discovered in the lungs after the mice were administered intranasally the ethanol root extract from *E. senticosus* and the virus (Protasova et al., 1986).

Adaptogenic activity is linked with the presence of secondary metabolites, very often characteristic only for a small group of plants. Previous research demonstrated that the intractum contained 130 mg/g DE of polyphenols (Załuski et al., 2016). In case of *Eleutherococcus* the main metabolites are eleutherosides, especially eleutheroside B (syringin 4-*β*-D-glucoside) and E ((−)-siringaresinol 4,4″-*O*-*β*-D-diglucoside), (Załuski et al., 2010). However, the HPLC-DAD analysis has revealed unexpected results, because there was no eluetherosides in the intractum both in the raw intractum and in the ethyl acetate layer. As shown in Table 3, the ethyl acetate layer was found to be rich in caffeic (1.29 mg/g DE) and protocatechuic acids (1.16 mg/g DE). In previous studies using LC-ESI-MS/MS to analyze phenolic acids obtained after acidic hydrolysis, Załuski et al. (2016) revealed that the dichloromethane and ethyl acetate layers were rich in vanillic (16.0 and 21.1 mg/g DE, resp.) and 4-OH-benzoic (7.0 and 7.3 mg/g DE, resp.) acids. The immunostimulatory capacity of caffeic acid has previously been evaluated by Barros et al. (2020), Bufalo and Sforcin (2015), El-Seedi et al. (2012), Kilani-Jaziri et al. (2016), Park et al. (2004).

The other group of the examined metabolites were sugars. Amongst 33 of that group, only two were detected, *myo*-inositol and D-mannitol, the sugars that occurred to be in a large amount, 267.5 and 492.5 mg/g DE, resp. The content of *myo*-inositol in eight varieties of peeled apples, ranged from 5.61 to 18.3% (Ker et al., 2010).

Myo-inositol is a sugar alcohol with an immunostimulatory activity. Literature pointed out that *myo*-inositol in doses between 232.7 and 687.3 mg/kg diet may enhance the non-specific immune and specific immune responses in fish (Jian carp, *Cyprinus carpio* var. Jian) measured as the increase of the phagocytic activity of leucocytes, haemagglutination titre, lysozyme activity, anti-*A. hydrophila* antibody titre and immunoglobulin M after infection with *Aeromonas hydrophila* (Jiang et al., 2010). Similar results have been found by Wang et al. (2020), that studied the influence of dietary *myo*-inositol on the skin mucosal immunity and growth of taimen (*Hucho taimen*), at the concentration 28.75–738.15 mg/kg diet. A regulatory activity on immune function has also been confirmed in *in vivo* model with mice treated with 1,2-dimethylhydrazine (DMH), a colon carcinogen, which also reduces NK function. The NK activity was enhanced (Bizzarri et al., 2016).

Myo-inositol is generally recognized as safe by the FDA and 2 g *myo*-inositol twice a day seems to be the good therapeutic approach to improve metabolic alterations. In case of an immunostimulatory activity the doses below 1 g seems to be effective (Benelli et al., 2016; Formoso et al., 2018). Comparing the quantity of *myo*-inositol in the intractum to the doses required, we can suggest that 1.5 g of the intractum twice a day should provide an enough quantity of *myo*-inositol to obtain the immunostymulatory effect. It should be mentioned, this compound is very well absorbed from the human gastrointestinal tract (99.8%) and is also a constituent of the daily human diet e.g. the Americans' diet consists of approximately 900 mg of *myo*-inositol (Clements and Darnell, 1980).

5. Conclusion and future perspectives

To conclude, our study for the first time demonstrates that the *E. senticosus* fruits which have been traditionally used in Russia as medicine, are a novel source of yet unknown metabolites, with the immunostimulatory activity proved in the VSV-PBL*s* model. The confirmed activity justified the traditional use of the fruits for the treatment of viral diseases and diseases characterized by a low level of leukocytes. A possible adaptogenic mode of action might be ascribed to the plant in agreement with Russian scientists who postulate that an adaptogenic activity can be observed when there is a disturbance in the body's homeostasis. Restoring homeostasis is the holy grail of curing patients. The role of adaptogens in early stage disturbances in homeostasis is thus an important challenge for further research.

The over-exploitation, by harvesting in the wild, shows the need of establishing the cultivation of important medicinal plants in Europe. We perceive the potential of the fruits as a renewable adaptogen, and the species possibly of interest for cultivation in Western Europe. However, further studies, in *in vivo* model regarding a bioavailability and potential toxicity, are needed to meet all the EU criteria about the plant-based drugs and medicines used in traditional healing systems.

Author contributions

F.G. prepared the intractum, performed the screening of adaptogenic plants, performed phytochemical and biological analysis, drafted the manuscript. B.O. performed the biological experiments. D.F. performed antivirial tests. M.S. performed phytochemical analysis. R.V. made a correction of the manuscript, review. D.Z. provided the plant materials, conceived and supervised the study, drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The studies were partially financed by The National Science Centre, Poland, within the project: "Quantitative evaluation of eleutherosides and flavonoids in the *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. fruits intractum; cytotoxic, hepatopreventive and adaptogenic activities", and "Production method and potential adaptogenic activity of the AdaptES preparation" financed by The Ministry of Science and Higher Education.

References

Atta, W.S., Al-Ani, N.K., 2015. Antimicrobial and cytotoxic activity of Withania somnifera. J Al-Nahrain Univer. 18 (3), 115–125. https://anjs.edu.iq/index.php/anjs/article/view/318/260.

Baranov, A.I., 1982. Medicinal uses of ginseng and related plants in the Soviet Union. Recent trends in the Soviet literature. J. Ethnopharmacol. 6, 339–353. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7154701/.

Barros, B.R., Nascimento, D.K., Araujo, D.R., Batista, F.R., Lima, A.M.N., Filho, I.J., Oliveira, M.L., Melo, C.M., 2020. Phytochemical analysis, nutritional profile and immunostimulatory activity of aqueous extract from Malpighia emarginata DC leaves. Biocatal. Agri. Biotechnol. 23, 101442. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101442.

Benelli, E., Ghianda, S., Cosmo, C., Tonacchera, M., 2016. A combined therapy with myo-inositol and D-chiro-inositol improves endocrine parameters and insulin resistance in PCOS young overweight women. Internet J. Endocrinol. 2016, 1–5. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27493664/.

Bizzarri, M., Dinicola, S., Bevilacqua, A., Cucina, A., 2016. Broad spectrum anticancer activity of mho-inositol and inositol hexakisphosphate. Internet J. Endocrinol. 1–14, 2016. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5067332/.

Boon, H., Smith, M., 2005. The complete natural medicine guide the 50 most common medicinal herbs. J. Natl. Med. Assoc. 97 (1), 112–113. PMC2568577.

Brekhman, I.I., Dardymov, I.V., 1969. New substances of plant origin which increase nonspecific resistance. Annu. Rev. Pharmacol. 9, 419–430. https://doi.org/10.1146/annurev.pa.09.040169.002223.

Bufalo, M.C., Sforcin, J.M., 2015. The modulatory effects of caffeic acid on human monocytes and involvement in propolis action. J. Pharm. Pharmacol. 67 (5), 740–745. https://doi.org/10.1111/jphp.12364.

Cichello, S.A., Yao, Q., Dowell, A., Leury, B., He, X.Q., 2015. Proliferative and inhibitory activity of Siberian ginseng (Eleutherococcus senticosus) extract on cancer cell lines; A-549, XWLC-05, HCT-116, CNE and Beas-2b. Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP 16, 4781–4786. https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.11.4781.

Clements, R.S., Darnell, B., 1980. Myo-inositol content of common foods: development of a high-myo-inositol diet. AJCN (Am. J. Clin. Nutr.) 33, 1954–1967. https://doi.org/10.1093/ajcn/33.9.1954.

Chen, S.P., Huang, Liu, R., Lu, T.M., Wei, J.C.C., Wu, T.C., Tsai, W.Y., 2015. Complementary usage of Rhodiola crenulata (L.) in chronic obstructive pulmonary disease patients: the effects on cytokines and T cells. Phytother Res. 29 (4), 518–525. https://doi.org/10.1002/ptr.5259.

Chiang, H.M., Chen, H.C., Wu, C.S., Wu, P.Y., Wen, K.C., 2015. Rhodiola plants: chemistry and biological activity. J. Food Drug Anal. 23 (3), 359–369. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.04.007.

Domene, A.M., 2013. Effects of adaptogen supplementation on sport performance. A recent review of published studies. J. Hum. Sport Exerc. 8 (4), 1054–1066. https://doi.org/10.4100/jhse.2013.84.15.

El-Seedi, H., El-Said, A., Khalifa, S., Goransson, U., Bohlin, L., Borg-Karlson, A.-K., Verpoorte, R., 2012. Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acid. J. Agric. Food Chem. 60, 10877–10895. https://doi.org/10.1021/jf301807g.

Fei, H.J., Zhu, L.L., Xia, L.M., Peng, W.B., Wang, Q., 2014. Acanthopanax senticosus attenuates inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting the NF-kB pathway. Genet. Mol. Res. 13 (4), 10537–10544. https://doi.org/10.4238/2014.

Formoso, G., Baldassarre, M.P.A., Ginestra, F., Carlucci, M.A., Bucci, I., Consoli, A., 2019. Inositol and antioxidant supplementation: safety and efficacy in pregnancy. Diabetes Metab. Res. Rev. 35, 1–14. https://doi.org/10.1002/dmrr.3154.

Fulder, S., Mizrahi, A., Sheinman, N., 2013. Potentiating Health and the Crisis of the Immune System: Integrative Approaches to the Prevention and Treatment of Modern Diseases. Springer Science&Business Media. https://doi.org/10.1016/S0940-2993(00)80021-4.

Gaffney, B., Hügel, H., Rich, P., 2001. Panax ginseng and Eleutherococcus senticosus may exaggerate an already existing biphasic response to stress via inhibition of enzymes which limit the binding of stress hormones to their receptors. Med. Hypotheses 56 (5), 567–572. https://doi.org/10.1054/mehy.2000.1163.

Galanova, B.K., 1977. Eleutherococcus in the Prophylaxis of Influenza and Relapses of Essential Hypertension. Adaptation and Adaptogens. Academy of Science of the USSR Far East Science Centre, Vladivostok, pp. 126–127.

Gonzales, G.F., 2012. Ethnobiology and ethnopharmacology of Lepidium meyenii (Maca), a plant from the Peruvian highlands. Evid. Based Complement. Altern. Med. 2012, 193496. https://doi.org/10.1155/2012/193496.

Guo, S., Liu, Y., Tai, S., yin, S., Liu, G., 2014. Effects of eleutheroside B and eleutheroside E on activity of cytochrome P450 in rat liver microsomes. BMC (Biomed. Chromatogr.) 14, 1–7. https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-1.

Hacker, B., Medon, P.J., 1984. Cytotoxic effects of Eleutherococcus senticosus aqueous extracts in combination with N6(Δ2-Isopentenyl)-adenosine and 1-β-D-Arabinofuranosylcytosine against L1210 leukemia cells. J. Pharmacol. Sci. 73 (2), 270–272. https://doi.org/10.1002/jps.2600730235.

Huang, L., Zhao, H., Huang, B., Zheng, C., Peng, W., Qin, L., 2011. Acanthopanax senticosus: review of botany, chemistry and pharmacology. Int. J. Pharm. Sci. 66 (2), 83–97. https://doi.org/10.1691/ph.2011.0744.

Huang, L.-Z., Huang, B.-K., Ye, Q., Qin, L.-P., 2011. Bioactivity-guided fractionation for anti-fatigue property of Acanthopanax senticosus. J. Ethnopharmacol. 133 (1), 213–219. https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.09.032.

Jang, D., Lee, J., Eom, S.H., Lee, S.M., Gil, J., Lim, H.B., Hyun, T.K., 2016. Composition, antioxidant and antimicrobial activities of Eleutherococcus senticosus fruit extracts. JAPS 6, 125–130. https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60322.

Jiang, W.-D., Feng, L., Liu, Y., Jiang, J., Hu, K., Li, S.H., Zhou, X.Q., 2010. Effects of graded levels of dietary mho-inositol on non-specific immune and specific immune parameters in juvenile Jian carp (Cyprinus cardio var. Jian). Aquacult. Res. 41, 1413–1420. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02649.x.

Kang, H., Shin, S., Whang, H., 2010. Are the conservation areas sufficient to conserve endangered plant species in Korea? J. Ecol. Field Biol. 33 (4), 377–389. https://doi.org/10.5141/JEFB.2010.33.4.377.

Ker, Y.B., Peng, ChH., Chyau, ChCh, Peng, R.Y., 2010. Soluble polysaccharide and myo-inositol content help differentiate the antioxidative and hypolipidemic capacity of peeled apples. J. Agric. Food Chem. 58, 4660–4665. https://doi.org/10.1021/jf903495h.

Kilani-Jaziri, S., Mustapha, N., Mokdada-Bzeouich, I., El Gueder, D., Ghedira, K., Ghedira-Chekir, L., 2016. Flavones induce immunomodulatory and anti-inflammatory effects by activating cellular anti-oxidant activity: a structure-activity relationship study. Tumor Biol. 37 (5), 6571–6579. https://doi.org/10.1007/s13277-015-4541-5.

Kim, S.B., 2014. Korean Red List of Threatened Species, second ed. Publisher: National Institute of Biological Resources, Seoul.

Kim, Y.H., Cho, L.M., Kim, D.B., Shin, G.H., Lee, J.H., Lee, J.S., Park, S.O., Lee, S.J., Shin, H.M., Lee, O.H., 2015. The antioxidant activity and their major antioxidant compounds from Acanthopanax senticosus and A. koreanum. Molecul. 20, 13281–13295. https://doi.org/10.3390/molecules200713281.

Kim, C.G., Castro-Aceituno, V., Abbai, R., Lee, H.A., Simu, S.Y., Han, Y., Hurh, J., Kim, Y. J., Yang, D.C., 2018. Caspase-3/MAPK pathways as main regulators of the apoptotic effect of the phyto-mediated synthesized silver nanoparticle from dried stem of Eleutherococcus senticosus in human cancer cells. Biomed. Pharmacother. 99, 128–133. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.050.

Lau, K.M., Yue, G.G., Chan, Y.Y., Kwok, H.F., Gao, S., Wong, ChW., Lau, C., 2019. A review on the immunomodulatory activity of Acanthopanax senticosus and its active components. Chin. Med. 31, 14–25. https://doi.org/10.1186/s13020-019-0250-0.

Lee, K., Ahn, J.H., Lee, K.T., Jang, D.S., Choi, J.H., 2018. Deoxyschizandrin, isolated from Schisandra berries, induces cell cycle arrest in ovarian cancer cells and inhibits the protumoural activation of tumour-associated macrophages. Nutrients 10 (1), 91. https://doi.org/10.3390/nu10010091.

Liao, L.Y., He, Y.F., Li, L., Meng, H., Dong, Y.M., Yi, F., Xiao, P.G., 2018. A preliminary review of studies on adaptogens: comparison of their bioactivity in TCM with that of ginseng-like herbs used worldwide. Chin. Med. 13–57. https://doi.org/10.1186/s13020-018-0214-9.

Ma, Y.-S., Hou, Z.-J., Li, Y., Zheng, B.-B., Wang, J.-M., Wang, W.-B., 2020. Unveiling the pharmacological mechanisms of eleutheroside E against postmenopausal osteoporosis through UPLC-Q/TOF-MS-based metabolomics. Front. Pharmacol. 11, 1–9. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01316.

Omosa, L.K., Midiwo, J.O., Masila, V.M., 2016. Cytotoxicity of 91 Kenyan indigenous medicinal plants towards human CCRFCEM leukemia cells. J. Ethnopharmacol. 179, 177–196. https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.12.028.

Orzechowska, B., Antoszków, Z., Siemieniec, I., Lorenc, M., Jatczak, B., Blach-Olszewska, Z., 2007. Cytokine production by human leukocytes with different expressions of natural antiviral immunity and the effect of antibodies against interferons and TNF-±. Arch. Immunol. Ther. Exp. 55 (2), 111–117. https://doi.org/10.1007/s00005-007-0013-y.

Orzechowska, B., Chaber, R., Wiśniewska, A., Pajtasz-Piasecka, E., Jatczak, B., Siemieniec, I., Gulanowski, B., Chybicka, A., Blach-Olszewska, Z., 2014. Baicalin from the extract of Scutellaria baicalensis affects the innate immunity and apoptosis in leukocytes of children with acute lymphocytic leukemia. Int. Immunopharm. 23, 558–567. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.10.005, 2014.

Panossian, A., 2017. Understanding adaptogenic activity: specificity of the pharmacological action of adaptogens and other phytochemicals. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1401, 49–64. https://doi.org/10.1111/nyas.13399, 2017.

Panossian, A., Efferth, T., Shikov, A.N., Pozharitskaya, O.N., Kuchta, K., Mukherjee, P.K., Banerjee, S., Heinrich, M., Wu, W., Wagner, H., 2020. Evolution of the adaptogenic concept from traditional use to medical systems: pharmacology of stress- and aging-related diseases. Med. Res. Rev. 1–75. https://doi.org/10.1002/med.21743, 2020.

Parfenova, T.V., Tekuteva, L.A., Korostyleva, L.A., Popova, V.A., Son, O.M., Mukhortov, S.A., Alekseev, N.N., 2013. Composition for Phytojam Preparations (Versions). Patent Nr RU2533040.

Park, J.H., Lee, J.K., Kim, H.S., Chung, S.T., Eom, J.H., Kim, K.A., Oh, H.Y., 2004. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. Int. Immunopharm. 4 (3), 429–436. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2004.01.013.

Patel, S., Rauf, A., 2017. Adaptogenic herb ginseng (Panax) as medical food: status quo and future prospects. Biomed. Pharmacother. 85, 120–127. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.112.
Pizzorno, J.E., Murray, M.T., 2012. Textbook of Natural Medicine, fourth ed. Elsevier Health Sciences, Missouri.
Protasova, S.F., Zykov, M.P., 1986. Antiviral effect of Eleutherococcus in experimental influenza infection. New data on Eleutherococcus. In: Proceedings of the Second International Symposium on Eleutherococcus, vol. 2, pp. 170–174. https://doi.org/10.3390/ph13090236. Moscow.
Ruppach, H., 2014. Log10 Reduction factors in viral clearance studies. Bio. Processing J. 12, 24–30. https://doi.org/10.12665/J124.Ruppach.
Seo, E.-J., Klauck, S.M., Efferth, T., Panossian, A., 2019. Adaptogens in chemobrain (Part I): plant extracts attenuate cancer chemotheraphy-induced cognitive impairment – transcriptome-wide microarray profiles of neuroglia cells. Phytomedicine 55, 80–91. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.10.022.
Schmolz, M.W., Sacher, F., Archer, B., 2001. The synthesis of Rantes, G-CCSF, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, and IL-13 in human whole-blood cultures is modulated by an extract from Eleutherococcus senticosus L. roots. Phytother Res. 15, 268–270. https://doi.org/10.1002/ptr.746.
Shikov, A.N., Pozharitskaya, O.N., Makarov, V.G., Wagner, H., Verpoorte, R., Heinrich, M., 2014. Medicinal plants of the Russian Pharmacopoeia; their history and applications. J. Ethnopharmacol. 154, 481–536. https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.007.
Soejarto, D.D., Farnsworth, N.R., 1978. The correct name for Siberian ginseng. Botanical Museum Leaflets 26, 339. https://doi.org/10.1016/0378-8741(84)90005-9.
Solomonova, E., Trusov, N., Nozdrina, T., 2019. Opportunities for using of Eleutherococcus fruits as a new food raw material. Adv. Biolog. Sci. Res. 7, 303–307. https://doi.org/10.2991/isils-19.2019.73.
Steinman, G.G., Esperester, A., Joller, P., 2001. Immunopharmacological in vitro effects of Eleutherococcus senticosus extracts. Drug Res. 51 (1), 76–83. https://doi.org/10.1055/s-0031-1300006.
Tabachnik, B., 1997. Adaptogens-natural protectors of the immune system. In: Mizrahi, A., Fulder, S., Sheinman, N. (Eds.), Potentiating Health and the Crisis of the Immune System. Springer, Boston, MA, pp. 143–147. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0059-3_13.
Tomczyk, T., Wróbel, G., Chaber, R., Siemieniec, I., Piasecki, E., Krzystek-Korpacka, M., Orzechowska, B., 2018. Immune consequences of in vitro infection of human peripheral blood leukocytes with Vesicular Stomatitis Virus. J. Innate Immun. 10 (2), 131–144. https://doi.org/10.1159/000485143.
Wacker, A., Eilmes, H.G., 1978. Virushemmung mit Eleutherokokk fluid-extract. Erfahrungsheilkunde 27 (6), 346–351.
Wang, T., Guo, R., Zhou, G., Zhou, X., Kou, Z., Sui, F., 2016. Traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of Panax notoginseng (Burk.) FH Chen: a review. J. Ethnopharmacol. 188, 234–258. https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.005.
Wang, Ch, Lu, S., Li, J., Wang, L., Jiang, H., Liu, Y., Liu, H., Han, S., Yin, J., 2020. Effects of dietary mho-inositol on growth, antioxidative capacity, and nonspecific immunity in skin mucus of taxmen Hucho taxmen fry. Fish Physiol. Biochem. 1011–1018. https://doi.org/10.1007/s10695-020-00766-z, 2020.
Wong, K.E., Mora, M.C., Sultana, N., Moriarty, K.P., Arenas, R.B., Yadava, N., Schneider, S.S., Tirabassi, M.V., 2018. Evaluation of Rhodiola crenulata on growth and metabolism of NB-1691, an MYCN-amplified neuroblastoma cell line. Tumour Biolo 40 (6), 1–15. https://doi.org/10.1177/1010428318779515.
Xia, C., Chen, J., Deng, J.L., Zhu, Y.Q., Li, W.Y., Jie, B., 2018. Novel macamides from maca (Lepidium meyenii Walpers) root and their cytotoxicity. Phytochem. Lett. 25, 65–69. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.03.001.
Yance, D.R., 2013. Adaptogens in Medicinal Herbalism: Elite Herbs and Natural Compounds for Mastering Stress, Aging, and Chronic Disease. Simon and Schuster Publisher, Toronto.
Yaremenko, K.V., Pashinski, V.G., 1986. Preparations of natural origin as remedies for prophylactic oncology. New medicinal preparations from plants of Siberia and the Far East. Tomsk 171–172. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0059-3_13.
You, J., Roh, K.B., Li, Z., Liu, G., Tang, J., Shin, S., 2015. The antiaging properties of Andrographis paniculata by activation epidermal cell stemness. Molecules 20 (9), 17557–17569. https://doi.org/10.3390/molecules200917557.
Yu, C.Y., Kim, S.H., Lim, J.D., Kim, M.J., Chung, I.M., 2003. Intraspecific relationship analysis by DNA markers and in vitro cytotoxic and antioxidant activity in Eleutherococcus senticosus. Toxicol. Vitro 17 (2), 229–236. https://doi.org/10.1016/s0887-2333(03)00008-0.
Yu, G.J., Choi, I.W., Kim, G.Y., Hwang, H.J., Kim, B.W., Kim, C.M., Kim, W.J., Yoo, Y.H., Choi, Y.H., 2015. Induction of reactive oxygen species-mediated apoptosis by purified Schisandrae semen essential oil in human leukemia U937 cells through activation of the caspase cascades and nuclear relocation of mitochondrial apoptogenic factors. Nutr. Res. 35 (10), 910–920. https://doi.org/10.1016/j.nutres.2015.06.016.
Załuski, D., Janeczko, Z., 2015. Variation in phytochemicals and bioactivity of the fruits of Eleutherococcus species cultivated in Poland. Nat. Prod. Res. 29, 2207–2211. https://doi.org/10.1080/14786419.2014.1002091.
Załuski, D., Olech, M., Galanty, A., Verpoorte, R., Kuźniewski, R., Nowak, R., Bogucka-Kocka, A., 2016. Phytochemical content and pharma-nutrition study on Eleutherococcus senticosus fruits intractum. Oxid. Med Cell Long 1–10. https://doi.org/10.1155/2016/9270691, 2016.
Załuski, D., Smolarz, H.D., Chomicki, A., 2010. TLC screening for eleutherosides B, E, and E1, and isofraxidin in the roots of six Eleutherococcus species cultivated in Poland. Acta Chromatogr. 22, 581–589. https://doi.org/10.1556/AChrom.22.2010.4.7.
Zhang, C., Zhao, X., Mao, X., Liu, A., Liu, Z., Li, X., 2014. Pharmacological evaluation of sedative and hypnotic effects of schizandrin through the modification of pentobarbital-induced sleep behaviors in mice. Eur. J. Pharmacol. 744, 157–163. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.09.012.
Zhang, P.-P., Guo, Z.-F., Zhang, P.-H., Liu, Z.-P., Song, L., Zhang, Z.-F., Jia, Y.-Z., Cao, Z.-Z., Ma, J.-H., 2020. Eleutheroside B, a selective late sodium current inhibitor, suppresses atrial fibrillation induced by sea anemone toxin II in rabbit hearts. APS 2020, 1–9. https://doi.org/10.1038/s41401-020-0453-z.
Zhu, L., Li, B., Liu, X., Huang, G., Meng, X., 2015. Isolation and purification of schisandrol A from the stems of Schisandra chinensis and cytotoxicity against human hepatocarcinoma cell lines. Phcog. Mag. 11 (41), 131–135. https://doi.org/10.4103/0973-1296.149726.

PUBLIKACJA P3

molecules

MDPI

Article

Phenolic Profile, Antioxidant, Anti-Enzymatic and Cytotoxic Activity of the Fruits and Roots of *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim

Filip Graczyk [1,*], Jakub Gębalski [1], Anna Makuch-Kocka [2], Dorota Gawenda-Kempczyńska [1], Aneta A. Ptaszyńska [3], Sebastian Grzyb [4], Anna Bogucka-Kocka [5] and Daniel Załuski [1]

1 Department of Pharmaceutical Botany and Pharmacognosy, Ludwik Rydygier Collegium Medicum, Nicolaus Copernicus University, Marie Curie-Skłodowska 9, 85-094 Bydgoszcz, Poland
2 Department of Pharmacology, Faculty of Health Sciences, Medical University of Lublin, 4a Chodzki Str., 20-093 Lublin, Poland
3 Department of Immunobiology, Institute of Biological Sciences, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka 19 Str., 20-033 Lublin, Poland
4 College of Engineering and Health in Warsaw, Bitwy Warszawskiej 1920 r. 18 Str., 02-366 Warsaw, Poland
5 Department of Biology and Genetics, Medical University of Lublin, 4a Chodzki Str., 20-093 Lublin, Poland
* Correspondence: filip.graczyk@cm.umk.pl

Abstract: *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. is well-known for its adaptogenic properties in traditional Eastern medicine. It has been categorized as an endangered species due to the over-exploitation of the roots. As a result, alternatives must be found, including the usage of renewable aerial parts such as fruits. The goal of this research was to determine the phenolic compounds and the enzymatic, antioxidant, and cytotoxic activities of the intractum gained from the *E. senticosus* fruits and the mixture of chloroform-methanol roots extract with naringenin (3:7:5). The obtained results showed, that the intractum contained 1.02 mg/g ext. of polyphenols, 0.30 mg/g ext. of flavonoids, and 0.19 mg/g ext. of phenolic acids. In turn, the mixture of chloroform-methanol roots extract with naringenin (3:7:5) contained 159.27 mg/g ext. of polyphenols, 137.47 mg/g ext. of flavonoids, and 79.99 mg/g ext. of phenolic acids. Regarding the anti-enzymatic assay, the IC_{50} values for tyrosinase and hyaluronidase were equal to 586.83 and 217.44 [μg/mL] for the intractum, and 162.56 and 44.80 [μg/mL] for the mixture, respectively. Both preparations have possessed significant antioxidant activity in the ABTS, DPPH, and ferrozine tests. No cytotoxic effect on the FaDu and HEP G2 cancer cell lines was observed. Our findings support the traditional use of fruits and roots. Moreover, the results indicate also that adaptogens are rather nontoxic for normal and cancer cells, which corresponds with some hypotheses on adaptogens activity.

Keywords: *Eleutherococcus senticosus*; intractum; cytotoxicity; COVID-19; hyaluronidase; tyrosinase; polyphenols

check for updates

Citation: Graczyk, F.; Gębalski, J.; Makuch-Kocka, A.; Gawenda-Kempczyńska, D.; Ptaszyńska, A.A.; Grzyb, S.; Bogucka-Kocka, A.; Załuski, D. Phenolic Profile, Antioxidant, Anti-Enzymatic and Cytotoxic Activity of the Fruits and Roots of *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. *Molecules* **2022**, *27*, 5579. https://doi.org/10.3390/molecules27175579

Academic Editor: Vincenzo De Feo

Received: 1 August 2022
Accepted: 28 August 2022
Published: 30 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The Araliaceae are a family of plants composed of approximately 1500 species of 43 genera. That family also contains the genus of *Eleutherococcus* Maxim. which includes about 40 species present in the areas of Northern Russia, China, Japan, and Korea. One of the most promising species is *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. which in ancient times was commonly used in traditional medicine in northeastern Asia or eastern Russia. It is known for its adaptogenic activity [1,2].

Traditional Chinese medicine has known and used this plant for more than 4000 years, as a medicine to increase longevity. Europeans also knew the *E. senticosus*'s therapeutic properties, the oldest sources tell that in the mid-nineteenth century, the plant had become a subject of research by Russian scientists, with its peak in the 1970s, when it was used by

USSR Olympians. It was reported, that in the 1970s Olympic Games, the Soviet contestants used a drink called Baikal, which was made of *E. senticosus* roots, to improve their sporting achievements. Later on, it gained more and more popularity over the years in central Europe [3–6].

Nowadays, it has become popular in Europe and the USA as a supplement for weaknesses, impotence, or immunity, mainly used as a dietary supplement and nutria-pharm product. *Eleutherococcus senticosus* turned out to be one of the ten most popular herbal supplements used in the United States, occurring in the forms of capsules, powdered plant material, or tea bags [7,8].

Over the years of its popularity, *E. senticosus* has been included in the group of so-called true adaptogens. In this group, *Eleutherococcus senticosus* has also been classified–*Eleutherococci radix et.rhizoma.* A majority of adaptogens are the roots usually of five–six year-old plants, which means that the plants are harvested as a whole or the roots are cut off and the plant needs a longer period for their regeneration. Therefore, it has been classified as a protected plant in some countries, such as South Korea. It is caused by overexploitation of the root material which has put the species in danger of extinction. For that reason, it is needed to find alternatives, in particular, the use of renewable aerial parts, e.g., the fruits, the aerial parts must be studied in detail to protect the species from overexploitation [9].

Eleutherococcus senticosus is rich in chemically different compounds, such as lignans, saponins, flavonoids, phenolic acids, and essential oil. Their main metabolites are termed the eleutherosides with eleutheroside B (syringin 4-β-D-glucoside) and eleutheroside E ((−)-siringaresinol 4,4′′-O-β-D-diglucoside), as main compounds. Eleutherosides have been found both in the underground and aerial parts of the plant. Furthermore, the fruits are rich in polyphenols (38.5–41.1 mg/g ext.), flavonoids (13.4–14.4 mg/g ext.), minerals (Mn 75.2–88.3, Fe 35.4–53.0, Zn 18.9–41.0, and Cu 3.34–13.0; mg/kg, respectively) [10–12].

The chemical diversity of plants is connected to their special biological properties. The *E. senticosus* extracts, mainly made from the roots, for many years have been used globally as an adaptogenic agent. Eleutheroside B and E were found to be responsible for the plant's adaptogenic abilities [13]. It is proved that both eleutherosides present protective effects against nerve cell death, with a weak inhibitory effect on CYP2C9 and CYP2E1 but no effect on CYP2D6 and CYP3A4 [8]. Eleutheroside B was found to have cardioprotective abilities in rabbit heart models [14], while eleutheroside E is able to modulate the steroidogenesis, arachidonic acid, glutathione, and tyrosine metabolism in Winstar rats' models. In turn, the fruits have been used in Russia as a food ingredient and a strengthening agent. However, it should be noted that in small doses, the powder fruits or infusion of it, have a reviving effect on the central nervous system, in higher dosages though, has a sedative effect [15].

Epidemiological studies carried out in the Soviet Union during the 1970s demonstrate that *E. senticosus* may reduce human mortality during influenza epidemics and typical complications of influenza infection, such as pneumonia, bronchitis, and otitis. Moreover, the morbidity rate has also been reduced, especially among children treated with a liquid extract for a month. Nowadays, the world is standing up to the coronavirus pandemic and many researchers are looking for a cure for tackling that. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is a pandemic pneumonia produced by the coronavirus that causes severe acute respiratory illness (SARS-CoV-2). The majority of severe COVID-19 patients experience difficulty breathing, and chest pressure, and eventually develop acute respiratory distress syndrome (ARDS), which has a high fatality rate. Infected lungs cause uncontrolled inflammation, which leads to fluid leakage and extracellular matrix accumulation. Hyaluronan (HA) is a component of the extracellular matrix (ECM) that has important physiologic and pathological functions. It is likewise found largely in the respiratory airways and increases in number during COVID-19 illness [16–18]. Nonetheless, there has been no obvious link between COVID-19 pathophysiology and HA yet.. A promising source of compounds with anti-COVID-19 activity might be plant-based compounds that act synergistically and are incomparable to those of synthetic compounds. Thus far, none of the plant compounds

have progressed to the clinical stage related to anti-COVID-19. Based on the available data, long research stages are still required.

Despite a large number of studies on the potential uses of plant-derived immunostimulators or adaptogens, few have progressed to the clinical stage. Considering *E. senticosus* some clinical studies were performed by Soviet scientists in the 1970s and 1980s. On the basis of our previous discoveries on the intractum from the *E. senticosus* fruits, we have concluded its potential adaptogenic activity [19], with possible immunostimulant and anti-inflammatory effects. It is also known that the compounds contained in the fruits and roots of *E. senticosus* can regulate the activity of the enzymes, such as hyaluronidase (Hyal) [20], which makes them potentially useful as preparations in COVID-19 treatment with anti-inflammatory activity.

Regardless of this, there is a need to provide more information on whether it might be demonstrating any activities at the biochemical and cellular levels. Therefore, the question arises, whether preparations made of the fruits or roots of *E. senticosus* can affect the course of the disease caused by SARS-CoV-2 virus infection and if its mechanism is related to the inhibition of enzyme activity. To justify that thesis, the plant materials were examined in a series of in vitro assays for phytochemicals and bioactivities related to the analysis of phenolic compounds, antioxidant, enzymatic, and cytotoxic activity of the intractum from *E. senticosus* fruits, and the mixture of the chloroform-ethanol root extract with naringenin (3:7:5). Naringenin is a flavonoid with anti-inflammatory and immunomodulatory activities.

In our work we have followed a new concept regarding plant extract, i.e., using polar and non-polar compounds extracted from one plant material, which allowed for an exhaustive use of the roots in terms of number and amount of extractables. The use of polar and non-polar constituents as a mixture is also a novel approach to the development of plant-based preparations. Polar and non-polar constituents with naringenin might act synergistically and, we suppose that potentially could increase their activity. Moreover, the plant material was harvested in Poland, which means that the species might possibly be introduced to crops in Poland to reduce the risk of its extinction. The plants imported from Russia or China and products made from them are very often of poor quality and do not meet the European requirements, so that is why this plant should be studied so extensively.

2. Results and Discussion

2.1. Chemical Composition

For clarity, the samples in this work were marked as follows: the intractum from the fruits as intractum; a combination of extracts from the roots (chloroform-methanol-naringenin) in a proportion 3:7:5 as an extract.

It is known that plants produce dozens of compounds, which are responsible for the plant's pharmacological activity and are incomparable to those of synthetic compounds. However, amongst a wide spectrum of phytochemicals present in one species, in many cases, only a small group of them is responsible for the activity. One of the most widespread groups of plant-based compounds is polyphenols. In the first phase of the research, we performed studies to provide information about the content of phenolic and polyphenolic compounds in the intractum and extract (Table 1). It appeared that the extract contains a higher amount of TPC, TFC, and total phenolic acids when compared to the intractum. All these differences are statistically significant with $p < 0.001$. The concertation of phenolic acids in the extract was almost half of the total phenolic components' concentration; whilst the concertation of the flavonoids was almost equal to the concertation of total phenolic compounds.

Table 1. Chemical composition of the *E. senticosus* intractum and the extract [mg/g ext. ± SD]. Different superscript letters within the same row indicate statistically significant differences with $p < 0.001$.

	Intractum	Extract
Total Phenolic Compounds	1.02 ± 0.04 [a]	159.27 ± 2.73 [b]
Total Phenolic Acids	0.19 ± 0.05 [a]	79.99 ± 3.57 [b]
Total Flavonoids Content	0.30 ± 0.07 [a]	137.47 ± 5.23 [b]

It has been reported that the concentration of polyphenols and flavonoids in the *E. senticosus* fruits intractum was higher than that obtained in this study (130 and 92 mg/g ext., respectively). In addition to this, the TPC in the 75% ethanolic extracts from the fresh fruits of *Eleutherococcus* species growing in Poland, obtained using ultrasound-assisted extraction was also higher (6.1–19.7 mg/g dry sample). Furthermore, the concentration of TPC and TFC in the fruits did not alter during one-year storage in the ambient temperature. Probably it results from a different region of the plants' growth. These fruits were collected in Bydgoszcz (N: 53°07′36.55″ E: 18°01′51.64″) compared to those earlier studied and collected in Rogów (51°49′ N i 53′ E); [21,22].

There are few data on the phenolic acid content of *Eleutherococcus* species growing in Russia or Asia, as well as in their predicted environment. A good example of this is provided by Jang et al. [21] who found that the Korean *E. senticosus* fruit ethanol extract contained higher concentrations of polyphenols and flavonoids than that now estimated, i.e., 334.36 ± 12.8 mg/g ext. of TPC and 198.25 ± 23.5 mg/g ext. of TFC, respectively. Shoheal et al. [22], studied the EtOH and aqueous extracts of the *E. senticosus*; the study revealed the following concentration of flavonoids and polyphenols, 0.20%; 0.30%, and 0.30; 0.60%, respectively.

Regarding the roots, the high content of phenolic compounds obtained in this study might result from the use of polar and non-polar solvents for extraction, which means that aglycons can be present in the extract. Adamczyk et al. [23] investigated the contents of flavonoids and polyphenols in the methanol root extract of *E. senticosus* and four other *Eleutherococcus* species. The TPC ranged from 4.10 ± 1.40 to 10.40 ± 1.30 and was expressed as gallic acid equivalents (mg GAE/g); TFC varied from 1.80 ± 0.02 to 6.50 ± 1.10 and was expressed as mg of quercetin equivalent (mg QEs/g). The obtained results in our study present higher concentrations of TFC and TPC in the extract made of *E. senticosus* roots, which may result from a combination of polar and non-polar extracts.

There are plenty of results on TPC and TFC in plants, therefore we decided to contrast the obtained data only with other adaptogenic plants. A very popular species is *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill., the chemical composition of which was investigated by Mocan et al. [24]. Their results showed that *Schisandra chinensis* leaves and fruits were found to be a rich source of flavonoids, the ethanol leaves and fruits extracts presented sums of TPC–62.36 ± 1.38 mg GAE/g plant material, the fruits–9.20 ± 0.43 mg GAE/g plant material. Significantly, the TFC in both leaves and fruit extracts were lower –35.1 ± 1.23 mg rutin equivalents/g plant material and 7.65 ± 0.95 mg RE/g plant material resp. Jeong et al. [25] estimated that water fruit extract of the previously mentioned plant presented a TPC of 17.72 ± 0.39 mg GAE/g, and TFC of 33.43 ± 0.24 mg QE/g ext. Cheng et al. [26] researched the *Schisandra chinensis* pollen extract showing that it had high TPC (53.74 ± 1.21 mg GAE/g) and TFC contents (38.29 ± 0.91 mg rutin/g).

Another adaptogenic plant–*Scutellaria baicalensis* Georgi was also used as an interesting point to counter-argue our results. Vergun et al. [27] estimated the total polyphenol, flavonoid, and phenolic acid content of *S. baicalensis* ethanol extracts, showing that leaves extract contained the highest amounts of those compounds–96.76 ± 2.18 mg GAE/g ext., 72.66 ± 2.69 mg QE/g ext. and 23.44 ± 1.13 mg CAE/g ext., resp. In turn, Li et al. [28] determined the phenolic content of the methanol *S. baicalensis* root extract, with the result of 36.30 ± 0.67 mg GAE/g ext. Chan et al. [29] reported that root extracts of *S.*

baicalensis exhibited following TPC–water extract 3.85 ± 0.07 mg GAE/g; ethanol extract 3.65 ± 0.07 mg GAE/g; ether extract 3.45 ± 0.06 mg GAE/g).

As can be noticed, the concentrations of polyphenolic compounds vary from themselves and surely are dependent on the type of plant material (underground or aerial part), the solvent used for extraction, extraction methods, and growth conditions. For this reason, it is important to control each batch of the harvested plant material to ensure the quality of the extract or plant-based preparations.

2.2. Antioxidant Activity

Antioxidants from plant sources are included in the human diet to protect the body at the molecular level. Three methods were included in the experiments. Testing different samples using different methods should show whether the antioxidative activity of plant samples depends on their chemical profile and the interactions with the free radical. The extracts' antioxidant capacities were measured and expressed as the EC_{50} value. The different parts of the plant showed different antioxidant potency (Table 2).

Table 2. Antioxidant activity of the intractum and extract, EC_{50} value presented as [µg/mL]. * % Chelating of iron was presented in %. Ascorbic acid was used as a reference substance. Different superscript letters within the same row indicate statistically significant differences with $p < 0.01$.

Method	*Intractum*	Extract	Ascorbic Acid
Ferrozine Assay *	12.12 ± 1.86 [a]	26.34 ± 1.14 [b]	6.44 ± 0.02 [c]
ABTS	55.22 ± 1.15 [a]	18.10 ± 0.20 [b]	2.27 ± 0.07 [c]
DPPH	250.48 ± 19.99 [a]	138.17 ± 4.28 [b]	24.93 ± 0.28 [c]

The ferrozine-based iron assay was used to study the metal chelating activity in the fruit and root preparations. The obtained results show that the extract is more abundant in iron chelating than the intractum, as well as is more active in ABTS and DPPH tests, with a statistical significance of $p < 0.01$.

There is little data about the metal chelating of *E. senticosus*. Załuski et al. [30] report the chelating properties of 75% ethanol extract from the spring leaves, fruits, and roots from *E. senticosus*, proving metal chelating activity of the ethanol extracts from the roots and spring leaves (0.50 ± 0.05 mg/mL). The authors confirmed their contribution in another study, in which three *Eleutherococcus* species were examined, the outcomes revealed that extracts can bind Fe^{2+} with EC_{50} from 0.20 to 0.60 mg/mL, with 0.3 mg/mL for *E. senticosus* [31]. It is in line with our records, positively corresponding with chelating results of both the extract and the intractum.

The literature provides some information about the antioxidative activity of other *Eleutherococcus* species. The methanol extracts of 5 *Eleutherococcus* species (*E. henryi*, *E. sessiliflorus*, *E. senticosus*, *E. gracilistylus*, *E. divariactus*) investigated by Adamczyk et al. [23] have shown influential antioxidant activities. Examined extracts at a concentration of 0.80 mg/mL, expressed DPPH reduction in the range of 14.7 to 26.2%, with *E. gracilistylus* as the most active species. In turn, Liu et al. [32] have investigated the potential of chemical compounds possessed by *E. senticosus*, such as flavonoids, and phenolic acids, and correlated it with its potential to reduce DPPH and ABTS, proving that high concentrations of those components are positively correlated with high antioxidant activity. Those findings stand in line with our current and previous reports [19].

Schisandra chinensis (Turcz.) Baill. was analyzed to compare our results with this adaptogenic plant. Mocan et al. [24] have also examined the antioxidant activities of this plant. For the *S. chinensis* leaves extracts, the DPPH assay was 26.87 ± 0.84 µg QE/mg plant material, and the ABTS assay–45.97 ± 0.31 µg Trolox equivalents (TE)/mg plant material. In the case of *S. chinensis* fruit extracts, the results were 7.80 ± 0.55 µg QE/mg plant material and 15.95 ± 0.68 µg TE/mg plant material, respectively. The results obtained by Jeong et al. [25] showed that water extracts of *S. chinensis* fruits did also exhibit inhibition

of DPPH, 26.37 ± 2.42%, however, it did not show any ion-chelating activities. In turn, Cheng et al. [26] reported the capacity of *S. chinensis* pollen extracts to chelate iron which was equal to 23.24 ± 0.79 mg Na_2EDTA per gram extract.

To counter-argue with another plant, Vergun et al. [27] estimated an antioxidant ability of *S. baicalensis* G. leaves, with results in the range of 7.63–8.83 mg Trolox equivalents (TE)/g ext. Li et al. [28] determined the antioxidant capacity of whole plant methanol extracts, with results of 184.34 ± 4.50 µmol Trolox/g ext. Li et al. provided a set of results regarding an antioxidant activity of *S. baicalensis* extracts with EC_{50} at 70.81 and 35.34 µg/mL in DPPH and ABTS respectively. Chanaj-Kaczmarek et al. [33] investigated the ion-chelating properties of *S. baicalensis* hydroalcoholic root extracts, with the EC_{50} results of 8.54 ± 0.013 mg/mL. The obtained data suggest that the high antioxidant activity of researched plants might be paired with their adaptogenic abilities.

2.3. Enzymatic Activity

All the results obtained are presented as a IC_{50} value (Table 3). Both the intractum and extract showed inhibitory activity against tyrosinase (TYR) and hyaluronidase (Hyal). However, the extract presented, statistically significantly ($p < 0.001$), much lower concentrations needed to inhibit both tyrosinase and hyaluronidase compared to the intractum.

Table 3. The anti-enzymatic activity of the intractum and extract. The results are presented as the IC_{50} value [µg/mL]. * Kojic acid was used as a reference substance in tyrosinase assay, physostigmine in acetylcholinesterase assay and aescin in hyaluronidase assay. Different superscript letters within the same row indicate statistically significant differences with $p < 0.001$.

Enzyme Unit Activity (U/mL)	*Intractum*	Extract	Reference Substance *
Tyrosinase (125)	586.83 ± 2.36 ^{a}	162.56 ± 0.02 ^{b}	44.43 ± 0.23 ^{c}
Acetylcholinesterase (0.4)	N/A	N/A	5.00 ± 0.11
Hyaluronidase (30)	217.44 ± 10.72 ^{a}	44.80 ± 3.11 ^{b}	388.80 ± 3.45 ^{c}

Inflammation is a natural process that is induced by a variety of stimuli, including hyaluronidase or tyrosinase. Hyaluronidases are enzymes that break down hyaluronic acid. Many researchers have established a link between the expression of Hyal and the increase of inflammation and tumor growth. It was discovered that its activity is increasing in a variety of cancer diseases. Therefore, the identification and classification of Hyal inhibitors might be beneficial in the development of anti-inflammatory drugs. The intractum or extract have already been shown to have anti-enzymatic action.

Intractum inhibited hyaluronidase by 50% at a concentration of 217.44 ± 10.72 [µg/mL], while tyrosinase was inhibited at the same level at a concentration of 586.83 ± 2.36 [µg/mL]. Simultaneously, the extract inhibited hyaluronidase and tyrosinase by 50% at a concentration of 44.80 ± 3.11 and 162.56 ± 0.02 [µg/mL], respectively. Compared to the reference substances, the research shows that both samples are greater at inhibiting Hyal than the standard substance aescin, the extract showed the strongest inhibition. These differences are statistically significant with $p < 0.001$. This means it could have potential use as a healing substance.

Unfortunately, the research literature on the anti-enzymatic activity of *Eleutherococcus* is rare, and it is hard to make a comparison. There are just a few reports on that provided by Adamczyk or Kuźniewski. Adamczyk et al. [23] investigated the antiacetylcholinesterase and antihyaluronidase activities of *E. senticosus* root extracts, at the concentration of 100 µg/0.16 mL, obtaining the results of 26.10 ± 0.5% inhibition and 10.40 ± 0.60% inhibition, respectively. Kuźniewski et al. [34] found that 75% ethanol extracts from the fall and early spring leaves of *E. senticosus* inhibited Hyal at 74.3 and 33%, respectively, at a concentration of 22 µg/0.16 mL of the reaction mixture. The increased inhibition of autumn leaves extracts may be due to the presence of more polyphenolic substances like tannins.

Liyanaarachchi et al. [35] studied the potential of the 15 ethanol extracts to inhibit hyaluronidase and tyrosinase. Only eight extracts were found to show such an action in the range of 34.8 to 95 percent inhibition. *Curcuma aromatica* rhizoma was the most effective–95.0% inhibition of hyaluronidase at 500 µg/mL; *Artocarpus altilis* and *Artocarpus nobilis* bark extracts inhibited tyrosinase (IC_{50} 27.47 ± 0.45 µg/mL, 53.23 ± 2.65 µg/mL, respectively) and hyaluronidase (68.59%, 44.78% inhibition at 500 µg/mL, respectively). Neimkhum et al. [36] report that the ethanolic *Carissa carandas* extracts from different parts showed a high hyaluronidase inhibition, leaves 97.8 ± 1.6%, and fruit 83.9 ± 2.2%, respectively. In turn, the ethyl acetate extracts from *C. carandas* Linn. have great anti-tyrosinase potential, fruit and leaves extracts inhibited the enzyme in 47.3 ± 4.2% and 47.7 ± 7.1%, resp.

The anti-hyaluronidase activity of aqueous extracts from 12 plant species was studied by Piwowarski [37]. Amongst them, *Lythrum salicaria* L. inhibited the strongest Hyal (64.9%), while *Geum urbanum* L., *Rubus ideus* L., and *Quercus robur* L. had lesser inhibition (25.6%; 21.2%; 20.2%, respectively). According to [38], the methanol extract from the bark of *Schotia brachypetala* inhibits Hyal at 75.1%, while the methanol extract from the leaves of *Psychotria capensis* inhibits Hyal at 52.9%. It is noteworthy that some of the aqueous leaf extracts of common medicinal and culinary plants have been found to be effective, *Rosmarinus officinalis* L., *Origanum majorana* L., and *Ocimum basilicum* L. have inhibited hyaluronidase at the level of 100, 89 and 78%, respectively [39].

To compare our findings with another adaptogenic plant, we looked for data about *S. chinensis* (Turcz.) Baill. Mocan et al. [40] examined the anti-tyrosinase effect of leaves and fruits methanol extracts (15.53 and 10.24 mg kojic acid equivalents (KAE)/g extract). In turn, Choi et al. [41] discovered that ethyl acetate extracts of *S. chinensis* fruits were able to inhibit hyaluronidase (100 U/mL) with the IC_{50} of 2.50 mg/mL. Cha [42] conducted a study, where high anti-enzymatic abilities of methanol *S. chinensis* extracts were confirmed, tyrosinase (220 U/mL) was inhibited by 75.1%, and hyaluronidase (7900 U/mL) was inhibited at 3.2%.

Scutellaria baicalensis Georgi is another interesting adaptogenic plant. Chanaj-Kaczmarek et al. [33] investigated the hyaluronidase-inhibition properties of its hydroalcoholic radix extracts, with the IC_{50} value of 2.00 ± 0.06 mg/mL. Hong et al. [43] discovered that the *S. baicalensis* extracts contain compounds inhibiting tyrosinase (using B16F1-cell assays and tyrosinase activity assays).

There are a lot of results regarding the anti-enzymatic activity of plant-based extracts or metabolites. However, there are also some limitations when it comes to the comparison of the results. It results from the different enzyme activity units used in different experiments and types of extracts. In many cases, the data on plant growth conditions and the method of drying are not provided. Another obstacle is a lack of an appropriate control, in the case of hyaluronidase aescin is recommended, while for tyrosinase kojic acid. We incorporated the enzyme activity unit in the text where it was provided.

2.4. Cytotoxicity

In this study, we have postulated that the intractum and extract may play a physiological role in inhibiting some cancer cell lines. However, the Russian scientific reports have revealed that adaptogens should not act as a cytotoxic agent toward cancers but should stimulate non-specific body resistance, as an adaptogenic stimulant. This theory was based on the knowledge considering the medicinal usage of the *E. senticosus* fruits by the Russians living in Siberia or for the Russian Olympians, as to increase their immunity and physical performance. When it comes to cancers, no direct action on cells should take place but only stimulation of the immune system to destroy cancer cells. To confirm that, we have chosen as an example, two cancer cell lines, FaDu and HepG2.

FaDu is a cell line with epithelial morphology that was recognized from a punch biopsy of a hypopharyngeal tumor patient with squamous cell carcinoma. This cell line is suitable for cancer and immuno-oncology research. HEPG2 (HepG2) cells are human liver cancer cell lines. Because of high cell specialization (both functional and morphological),

the HepG2 and FaDu cells are a suitable model to study cytotoxic activities of xenobiotics in vitro and are appropriate to examine the toxicity [44–46].

As shown in Figure 1, both cell lines' viability after being treated with the intractum and the extract, not only reveals the lack of lowering the cell lines' viabilities, but also a slight increase (Figure 1A,B). The plant and its products should not cause any cytotoxic effect in the living cells in vitro or in vivo.

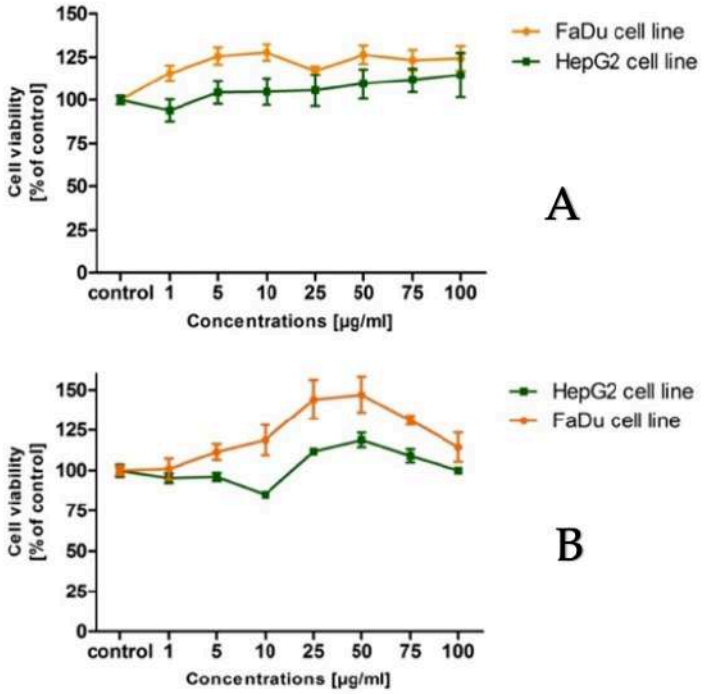


Figure 1. The cytotoxic activity of the samples towards FaDu and HepG2 cell lines. (**A**) cell viabilities with the intractum; (**B**) cell viabilities with the extract. Extract concentration 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 µg/mL.

The cytotoxic assay has shown that both examined samples did not affect cancer cell lines to decrease its viabilities. It is in accordance with the knowledge, that adaptogenic plants and preparations cannot be harmful to living organisms, even cancer cells. It should not cause any toxic effects in the recommended doses, and that regards both healthy and cancer cells. In the case of cancer cells, in the 1960s and 1970s, it was postulated that *E. senticosus* should not directly inhibit cancer cells' growth, but induce and stimulate the immune system to destroy cancer cells. This is in consent with the latest findings by Graczyk et al. [19], who found that *E. senticosus* fruit intractum is non-toxic toward A549 cancer cell lines at a concentration of up to 300 µg/mL. These findings stay in line with our current findings, pointing out that in the case of cancer diseases their administration should be careful and cautious.

Some authors reported cytotoxic activity of the adaptogens toward cell lines [47,48]. It has been reported that the silver nanoparticles of the *Eleutherococcus senticosus* dried stem parts demonstrated substantial cytotoxic and apoptotic effects on A549 lung cancer cells and HT29 colon cancer cells at a concentration of 10 µg/mL. These findings imply that the anticancer potential of Sg-AgNPs is linked to the stimulation of apoptosis via the Caspase-3/p38 MAPK pathway through the creation of ROS [49].

Załuski et al. [50] gave a report about the cytotoxic properties of the *E. senticosus* intractum on five leukemic cell lines, HL-60, HL-60/MX1, HL-60/ MX2, CEM/C1, and CCRF/CEM, informing that the IC_{50} value was in a range of 10.40–50 µg/mL. The author also contributed research, informing about the cytotoxic properties of different *E. senticosus* parts' extracts the IC_{50} values for HL-60 were determined using ethanol extracts from roots, spring and fall leaves at concentrations of 208, 312, and 299 µg/mL [51]. That is further evidence that adaptogens are rather weak anticancer agents and do not directly inhibit the cells' growth.

To compare, another study of an alternative adaptogenic plant–*Schisandra chinensis* proved that the lignans present in fruits present anti-cancer effects by inducing G0/G1 cell cycle arrest in A2780, ovarian cancer cells and decreasing the pro-tumoral phenotype of tumor-associated macrophages (TAMs). The study showed that the IC_{50} value of 27.81 µM for deoxyschizandrin, the main lignan present in *Schisandra* berries, inhibited cell growth [52]. Another result, delivered by Chung et al. [53] tells that ethanol berry extracts of *S. chinensis* in the concertation up to 400 µg/mL, did not exhibit any effect on cell viability of the HepG2 cancer cell lines. That news was also confirmed by Sung et al. [54].

Scutellaria baicalensis is another adaptogenic herb that was also brought up as a counter-argument to our disclosures. Cho et al. [55] estimated with the MTT assay that methanolic extracts exhibited significantly low cytotoxicity at 100 µg/mL and 10 µg/mL on B16 melanoma cells. Ye et al. [56] provided the data that *S. baicalensis* is able to inhibit hepatocellular carcinoma cell growth in vitro. However, that plant extract exhibited a weak decrease in the cell viability of the HepG2 cells with IC_{50} of 360 µg/mL. Previous reports of this author can also confirm the weak *Scutellaria baicalensis* anticancer abilities–plant water extract proved an inhibition of growth in various cancer cell lines (HepG2, MCF-7, PC-3, LNCaP, KM-12, HCT-15, KB and SCC-25) with the IC_{50} of 1.1, 0.90, 0.52, 0.82, 1.1, 1.5, 1.0, 1.2 mg/mL, respectively [57].

Very high concentrations were needed, regardless of whether normal or cancer cells were used, so it is in agreement with the role of an adaptogen, which is thought to be a rather nontoxic substance for normal cell lines and according to some hypotheses, for cancer cells as well [58,59]. Moreover, it is significant that adaptogenic drugs should increase the general immunity of the living organism. Our previous reports show that the intractum promoted peripheral blood leukocytes (PBLs) to increase their proliferation. The increase in the number of leukocytes is in a line with our hypothesis on the adaptogenic activity of the fruits and their preparations [19].

3. Materials and Methods

3.1. Chemicals and Reagents

The standards of quercetin ≥ 95.0%, aescin ≥ 95.0%, donepezil ≥ 98.0%, kojic acid ≥ 97.0%, ascorbic acid ≥ 99.0%, gallic acid ≥ 97.5%, caffeic acid ≥ 98.0%, were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). The sodium carbonate ≥ 99.0%, potassium acetate ≥ 99.0%, were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The sodium molybdate, sodium nitrate, ethyl acetate, hydrochloric acid, sodium hydroxide, aluminum chloride, ferrous chloride, potassium peroxodisulfate were purchased from POCH (Gliwice, Poland).

Methanol (MeOH), ethanol (EtOH) was purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Ultrapure water was prepared using a Millipore Direct-Q3 purification system (Bedford, MA, USA).

1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), DMSO, 2,2′-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid) (ABTS), 3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-p,p′-disulfonic acid monosodium salt hydrate (FerroZine Iron Reagent), bovine albumin, hyaluronidase (Hyal) from bovine testes type I-S, hyaluronic acid, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), 5,5′-dithiobis(2-nitrobenzoic acid (DTNB), acetylcholinesterase (AChE), acetylthiocholine iodide (ACTI), tyrosinase, L-tyrosine, acetate buffer pH 5.35, sodium phosphate buffer pH 7.0, phosphoric buffer pH 6.8, phosphoric buffer pH 7.5 were obtained from Sigma-Aldrich.

FaDu and HepG2 cell lines were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), cultured with EMEM (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 100 U/mL of penicillin and 100 mg/mL of streptomycin (PenStrep, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). All other reagents were of analytical grade or higher.

3.2. Plant Material and Preparation of the Extracts

The matured fruits and roots of *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. were collected at the Garden of Medicinal and Cosmetic Plants in Bydgoszcz (Poland) in September 2020 (N: 53°07′36.55″ E: 18°01′51.64″). The plant sample was deposited at the Department of Pharmaceutical Botany and Pharmacognosy, Collegium Medicum, Bydgoszcz, Poland. The roots after drying were stored under domestic conditions (room temperature, paper bag, dark place).

I: The intractum was prepared according to the method previously described by Graczyk el. al (20). Plant materials' identity was evaluated morphologically and by HPLC-DAD and HPLC-RID analysis, in comparison with reference data. The fresh fruits (20 g) were macerated in 100 mL 40% ethanol for 30 days under domestic conditions (ambient temperature, sunless place). After that, the extract was filtered through Whatman no. 4 filter paper. The solvent was dried with an evaporator under vacuum conditions at 45 °C, next frozen at −20 °C and subjected to lyophilization. The dried residue was stored in an exicator at 4 °C. Sample, for the further analysis, was marked as intractum.

II: The mixture of the chloroform-ethanol extract with naringenin (3:7:5); (combination of lipophilic and hydrophilic active compounds and naringenin). The air-dried roots (5 g each) were soaked in 50 mL 75% methanol for 24 h. Next, the samples were subjected to triple UAE type extraction (ultrasonic bath, Polsonic, Warsaw, Poland) using 1 × 50 mL and 2 × 25 mL of 75% ethanol. The extraction was performed at room temperature for 15 min for each cycle. Finally, 100 mL of each extract was obtained. The solvents were dried with an evaporator under vacuum conditions at 45 °C, next frozen at −20 °C and subjected to lyophilization. The dried residue was stored in an exicator at 4 °C. To obtain the chloroform extract, the roots were extracted in the same way as an extraction with 75% methanol using chloroform. After that, the extracts were combined in a proportion 3:7:5 (chloroform-methanol-naringenin). Sample, for the further analysis, was marked as extract.

3.3. Chemical Composition Assays

3.3.1. Folin-Ciocalteu Method for Polyphenols (TPC)

The Folin–Ciocalteu (F-C) reaction is an antioxidant assay, which measures the reductive capacity of an antioxidant, and is a spectrophotometric method based on the ability of polyphenols to form colored reactions with the Folin-Ciocalteu reagent [60]. The absorbance is proportional to the total content of phenolic compounds in the tested sample [61]. To achieve optimal conditions for our study, the following parameters were used, 25 µL of the extract was mixed with 25 µL of Folin-Ciocalteu reagent. The solution was kept at 25 °C for 5–8 min before adjusting the volume to 200 µL with distilled water and adding 25 µL of sodium carbonate solution. After 60 min, the absorbance was measured at a wavelength of 750 nm with a spectrophotometer. Gallic acid was used as standard for the calibration curve. Total phenolic content was determined with the calibration curve for gallic acid as mg gallic acid equivalents per gram of extract (mg/g).

3.3.2. Total Flavonoids Content (TFC)

The amounts of total flavonoids were determined by Christ and Müller's aluminum chloride method and measured by a colorimetric assay [62]. The original method was adapted to our research with the following factors: 25 µL of examined samples were added to 75 µL of ethanol. Then, 10 µL of 1M potassium acetate was added. After 5 min, 10 µL of 10% aluminum chloride was added. Immediately, the mixture was diluted by the addition of 130 µL distilled water and mixed thoroughly. The absorbance was determined at 510 nm

versus a blank after incubating for 30 min in the darkness. Quercetin was used as standard for the calibration curve. Total flavonoids content of the extract was expressed as mg quercetin equivalents per gram of extract (mg/g).

3.3.3. Total Phenolic Acids Content (TPAC)

Determination of total phenolic acid content by the Arnov method, which is a spectrophotometric method utilizing Arnov's reagent, described by Gwalik-Dziki [63]. The method was adapted to our study with undermentioned parameters: 25 µL of the extracts was mixed with 150 µL of water, 25 µL of hydrochloric acid (18 g/L), 25 µL of Arnov's reagent (10 g of sodium molybdate and 10 g of sodium nitrate dissolved in 100 mL of methanol) and 25 µL of sodium hydroxide solution (40 g/L). Phenolic acid content was calculated as caffeic acid percent measured at wavelength of 490 nm.

3.4. Antioxidant Activity Assays

3.4.1. ABTS Assay

Numerous methods are used to evaluate antioxidant activities of natural compounds in plant-based drugs with varying results. One of them used for determining the antioxidant activity of extracts is using bleu/green ABTS reagent. ABTS assay measures the relative ability of antioxidants to degenerate the ABTS in aqueous phase, as compared with standard [64,65]. Based on the original method, 10 µL of examined samples were incubated for 30 min with 190 µL of ABTS solution in the darkness. Absorbance was measured at wavelength of 734 nm. As the reference compound, ascorbic acid was used. The results were estimated using the following equation:

$$\%_{ABTS} = \left(\frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

A_{blank}—absorbance on the blank
A_{sample}—absorbance of the sample

3.4.2. DPPH Assay

DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) is another method used to measure the antioxidant capacity of examined samples. Its mechanism is based on losing the absorption of violet DPPH solution to colorless in the presence of antioxidant molecules in examined samples [64,66]. To optimize the original method for our research, the following parameters were used: 10 µL of extracts combined with 280 µL of DPPH solution, added 10 µL of methanol, the absorbance was measured for 1 h at 515 nm. As the reference compound, ascorbic acid was used. The results were calculated using the following equation:

$$DPPH = \left(\frac{\left(A_{control} - \left(A_{sample} - A_{blank}\right)\right)}{A_{control}} \right) \times 100\% \quad (2)$$

$A_{control}$—absorbance DPPH
A_{sample}—absorbance extract/standard
A_{blank}—absorbance MeOH

3.4.3. Ferrozine Assay

The iron colorimetric assay was performed to determine the chelating abilities of the iron in diagnosed samples [67,68]. To optimize the method for our research, 75 µL of examined plant extracts samples were incubated for 5 min at 25 °C with 15 µL of $FeCl_2$ solution, topped up to volume 200 µL of reaction mix with ethanol. After that, 15 µL of ferrozine solution was added and incubated for 5 min and temperature 25 °C.

As a result, the reduced ferrozine complex causes blue color. Sample iron percentage of chelation is determined by comparing the 560 nm absorbance of sample wells to the absorbance of ascorbic acid. The results were estimated using the following calculation:

$$\%_{\text{CHELATING EFFECT}} = \left(\frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}}\right) \times 100\% \quad (3)$$

A_{blank}—absorbance on the blank
A_{sample}—absorbance of the sample

3.5. Enzymatic Activity Assays

3.5.1. Tyrosinase Assay

In 96-well plates, tyrosinase inhibitor experiments were carried out using a modified method given by Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) [69]. Tyrosinase is the enzyme that converts L-tyrosinase to L-DOPA and L-DOPA to DOPA-quinone, causing the solution to become brown. 10 µL of sample (1 mg/mL), 140 µL of phosphoric buffer (pH = 6.8), and 25 µL of an enzyme (125 U/mL in phosphoric buffer pH = 6.8) were combined and incubated at room temperature for 10 min. A control lacking the inhibitor was also prepared (Ac). Following incubation, 25 µL of L-tyrosine (0.3 mg/mL) was added to each well, and the absorbance was measured at 510 nm (kinetic model, every 5 min). The graph's linear range was then divided into two time points (t1 and t2). All samples were tested three times. The kojic acid (0.01 mg/mL) was used as a standard. The tyrosinase inhibition was calculated using the following equation:

$$\%_{\text{INHIBITION}} = \frac{\Delta A_c - \Delta A_s}{\Delta A_C} \times 100\% \quad (4)$$

A_C—the difference in absorbance between time T2 and T1 for positive control
A_S—the difference in absorbance between time T2 and T1 for sample

3.5.2. Hyaluronidase Assay

The hyaluronidase inhibitor screening assay (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) is a two-step turbidimetric reaction, measuring the amount of hyaluronic acid that is hydrolyzed by the enzyme. The decrease in turbidity is proportional to the enzymatic activity in the sample [70].

The assay was performed, accordingly to the method, in 96-well plates, by precipitating non-hydrolyzed hyaluronic acid (HA) with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), the activity of the inhibitors was measured. 10 µL of sample (0.5 mg/mL), 15 µL of acetate buffer (Ph = 5.35), 25 µL of incubation buffer (pH = 5.35, 0.1 mg/mL BSA, 4.5 mg/mL NaCl), and 25 µL of enzyme (30 U/mL, incubation buffer) were mixed together. After a 10-min incubation at 37 °C, a hyaluronic acid solution of 25 µL (0.3 mg/mL in acetate buffer pH = 5.35) was added. Plates were then incubated at 37 °C for 45 min. Non-hydrolyzed HA was precipitated by adding 200 µL of 2.5% CTAB after incubation. For 10 min, the plates were maintained at 25 °C. At 600 nm, the intensity of complex formation was measured. The absorbance of solution without inhibitor (AC) and enzyme (AT) were tested to evaluate the existence of inhibition. All samples were tested three times. As a reference, aescin (0.01 mg/mL) was used. The inhibition of hyaluronidase was determined using the following equation:

$$\%_{\text{INHIBITION}} = \frac{A_S - A_C}{A_T - A_C} \times 100\% \quad (5)$$

A_S—absorbance of the HA + sample + enzyme
A_C—absorbance of the HA + enzyme
A_T—absorbance of the HA + sample

3.5.3. Acetylcholinesterase Assay

Acetylcholinesterase (AChE) catalyzes the hydrolysis of the acetylcholine into choline and acetic acid, the inhibitor screening kit (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) method, which is produced by the action of AChE choline presents a yellow color with 5,5′-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), was used. The intensity of the product color is proportional to the enzyme activity in the investigated samples [71]. The assay was performed with 96-well plate, with spectrophotometric multiwell plate reader. 45 µL of enzyme (0.4 U/mL, pH = 7.5 phosphoric buffer) and 5 µL of sample (0.1 mg/mL) were combined and incubated at room temperature for 15 min. After incubation, 150 µL of solution (154 µL of buffer, 1 µL of substrate, and 0.5 µL of DNTB) were added, and absorbance was measured at two points, t0 and t10, at 405 nm. All samples were tested three times. As a standard, physostigmine (0.05 mg/mL) was used. The following equation was used to compute tyrosinase inhibition:

$$\%_{\text{INHIBITION}} = \frac{1 - A_S}{A_C} \times 100\% \quad (6)$$

A_S—absorbance of the acetylcholine + enzyme + sample
A_C—absorbance of the acetylcholine + enzyme

3.6. Cytotoxicity Screening Assay

FaDu and HepG2 cell lines were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and cultured using EMEM (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 100 U/mL of penicillin and 100 mg/mL of streptomycin (PenStrep, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Cell lines were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO_2. Cytotoxic effects of tested extracts and reference substances were examined using MTT assay (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) [72] according to the manufacturer's procedure. Stock solutions of the tested compounds were prepared dissolving in a sterile DMSO. The suspension of cells was prepared at a density of 1×10^5 cells/mL. Cells were incubated for the next 24 h with different concentrations of the tested compounds (1–100 µg/mL). The absorbance was measured at 570 nm using a microplate reader (Epoch, BioTek Instruments, Santa Clara, CA, USA). Each experiment was repeated three times. Results are shown as % of controls cells.

3.7. Statistical Analysis

The results were expressed as the mean ± SEM of three independent experiments performed at least in triplicate. The obtained data were subjected to statistical analysis using Statistica 13.1 (StatSoft, Cracow, Poland). Statistical differences between content of phenolic and polyphenolic compounds in the intractum and extract were estimated by Student's *t*-test. ANOVA test was performed to compare the antioxidant and anti-enzymatic activity of the intractum, extract and reference substance. The Scheffe test was used as a post-hoc analysis. All statistical tests were carried out at significance level of $p = 0.05$.

4. Conclusions

To summarize, our research shows for the first time that the *E. senticosus* fruits and polar and non-polar roots extract, which have traditionally been used as medicine in Russia and China, are a source of secondary plant metabolites, with an anti-hyaluronidase and anti-tyrosinase activity.

The results obtained indicate also that adaptogens are rather nontoxic for normal and cancer cells, which corresponds with some Soviet hypotheses on adaptogens activity. However, those have yet to be explored by means of modern metabolomics techniques, such as HPLC-MS or NMR. Simultaneously, it must be noticed that plant-based extracts in some cases should not be administered without health testing. More studies in in vitro and in vivo models evaluating a deep phytochemical analysis, bioavailability, toxicity, and

also metabolomics-oriented investigations are required and will be included in our future studies, therefore it could help further our understanding of those molecules.

Author Contributions: F.G. provided the plant materials, prepared the samples, performed phytochemical and biological analysis, and drafted the manuscript. J.G. made a correction to the manuscript and reviewed it. A.M.-K. and A.B.-K. performed cytotoxic tests. D.G.-K. made a correction, and statistical analysis. A.A.P. made a correction to the manuscript and reviewed it. S.G. review and correction. D.Z. conceived and supervised the study, and drafted the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Nicolaus Copernicus University under the "Excellence Initiative-Research University" programme, project title: AdaptES as a potential inhibitor of SARS-CoV-2. 2020-2021.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Jin, W.; Wu, F.; Li, X.; Li, H.; Du, H.; Jiang, Q.; You, J.; Li, S.; Xu, Y. Anti-depressant effects of aqueous extract from Acanthopanax senticosus in mice. *Phytother. Res.* **2013**, *27*, 1829–1833. [CrossRef]
2. Schmidt, M.; Thomsen, M.; Kelber, O.; Kraft, K. Myths and facts in herbal medicines: Eleutherococcus senticosus (Siberian ginseng) and its contraindication in hypertensive patients. *Bot. Targets Ther.* **2014**, *4*, 27–32. [CrossRef]
3. Lau, K.M.; Yue, G.G.; Chan, Y.Y.; Kwok, H.F.; Gao, S.; Wong, C.W.; Lau, C. A review on the immunomodulatory activity of Acanthopanax senticosus and its active components. *Chin. Med.* **2019**, *14*, 25. [CrossRef] [PubMed]
4. Shikov, A.N.; Pozharitskaya, O.N.; Makarov, V.G.; Wagner, H.; Verpoorte, R.; Heinrich, M. Medicinal plants of the Russian Pharmacopoeia; their history and applications. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *154*, 481–536. [CrossRef] [PubMed]
5. Soejarto, D.D.; Farnsworth, N.R. The correct name for Siberian ginseng. *Bot. Mus. Leafl.* **1978**, *26*, 339–343. [CrossRef]
6. Domene, A.M. Effects of adaptogen supplementation on sport performance. A recent review of published studies. *J. Hum. Sport Exerc.* **2013**, *8*, 1054–1066. [CrossRef]
7. Watson, D.H. *Performance Functional Foods*; Woodhead Publishing in Food Science and Technology: Cambridge, UK, 2003.
8. Guo, S.; Liu, Y.; Lin, Z.; Tai, S.; Yin, S.; Liu, G. Effects of eleutheroside B and eleutheroside E on activity of cytochrome P450 in rat liver microsomes. *BMC Complement. Altern. Med.* **2014**, *14*, 1–7. [CrossRef]
9. Kim, S.B. Korean Red List of Threatened Species. 2014. Available online: https://www.nationalredlist.org/files/2016/04/Korean-Red-List-of-Threatened-Species-English-compressed-2.pdf (accessed on 15 May 2022).
10. Załuski, D.; Janeczko, Z. Variation in phytochemicals and bioactivity of the fruits of Eleutherococcus species cultivated in Poland. *Nat. Prod. Res.* **2015**, *29*, 2207–2211. [CrossRef]
11. Załuski, D.; Smolarz, H.D.; Chomicki, A. TLC screening for eleutherosides B, E, and E1, and isofraxidin in the roots of six Eleutherococcus species cultivated in Poland. *Acta Chromatogr.* **2010**, *22*, 581–589. [CrossRef]
12. Kim, Y.H.; Cho, L.M.; Kim, D.B.; Shin, G.H.; Lee, J.H.; Lee, J.S.; Park, S.O.; Lee, S.J.; Shin, H.M.; Lee, O.H. The antioxidant activity and their major antioxidant compounds from Acanthopanax senticosus and A. koreanum. *Molecules* **2015**, *20*, 13281–13295. [CrossRef]
13. Zhang, C.; Zhao, X.; Mao, X.; Liu, A.; Liu, Z.; Li, X. Pharmacological evaluation of sedative and hypnotic effects of schizandrin through the modification of pentobarbital-induced sleep behaviors in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *744*, 157–163. [CrossRef]
14. Zhang, P.P.; Guo, Z.F.; Zhang, P.H.; Liu, Z.P.; Song, L.; Zhang, Z.F.; Jia, Y.Z.; Cao, Z.Z.; Ma, J.H. Eleutheroside B, a selective late sodium current inhibitor, suppresses atrial fibrillation induced by sea anemone toxin II in rabbit hearts. *Acta Pharmacol. Sin.* **2020**, *42*, 209–217. [CrossRef]
15. Ma, Y.S.; Hou., Z.J.; Li, Y.; Zheng, B.B.; Wang, J.M.; Wang, W.B. Unveiling the pharmacological mechanisms of eleutheroside E against postmenopausal osteoporosis through UPLC-Q/TOF-MS-based metabolomics. *Front. Pharm.* **2020**, *11*, 1316. [CrossRef]
16. Queisser, K.A.; Mellema, R.A.; Middleton, E.A.; Portier, I.; Kanth, B.; Denorme, F.; Beswick, E.J.; Rondina, M.T.; Campbell, R.A.; Petrey, A.C. COVID-19 generates hyaluronan fragments that directly induce endothelial barrier dysfunction. *JCI Insight* **2021**, *6*, 17. [CrossRef]
17. Ontong, P.; Prachayasittikul, V. Unraveled roles of hyaluronan in severe COVID-19. *Excli. J.* **2021**, *20*, 117–125.
18. Sun, S.H.; Chen, Q.; Gu, H.J.; Yang, G.; Wang, Y.X.; Huang, X.Y.; Liu, S.S.; Zhang, N.N.; Li, X.F.; Xiong, R.; et al. A Mouse Model of SARS-CoV-2 Infection and Pathogenesis. *Cell Host Microbe.* **2020**, *28*, 124–133. [CrossRef]

19. Graczyk, F.O.; Orzechowska, B.; Franz, D.; Strzemski, M.; Verpoorte, R.; Załuski, D. The intractum from the Eleutherococcus senticosus fruits affects the innate immunity in human leukocytes: From the ethnomedicinal use to contemporary evidence-based research. *J. Ethnopharmacol.* **2021**, *268*, 113636. [CrossRef]
20. Gębalski, J.; Graczyk, F.O.; Załuski, D. Paving the way towards effective plant-based inhibitors of hyaluronidase and tyrosinase: A critical review on a structure–activity relationship. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2022**, *37*, 1120–1195. [CrossRef]
21. Jang, D.; Lee, J.; Eom, S.H.; Lee, S.M.; Gil, J.; Lim, H.B.; Kyung, T. Composition, antioxidant and antimicrobial activities of Eleutherococcus senticosus fruit extracts. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2016**, *6*, 126–130. [CrossRef]
22. Shoheal, A.M.; Chakrabarty, D.; Ali, M.B. Enhancement of eleutherosides production in embryogenic cultures of Eleutherococcus sessiliflorus in response to sucrose-induced osmotic stress. *Process Biochem.* **2006**, *41*, 512–518. [CrossRef]
23. Adamczyk, K.; Olech, M.; Abramek, J.; Pietrzak, W.; Kuźniewski, R.; Bogucka-Kocka, A.; Nowak, R.; Ptaszyńska, A.; Rapacka-Gackowska, A.; Skalski, T.; et al. Eleutherococcus Species Cultivated in Europe: A New Source of Compounds with Anti-acetylcholinesterase, Antihyaluronidase, Anti-DPPH, and Cytotoxic Activities. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, 8673521. [CrossRef] [PubMed]
24. Mocan, A.; Crișan, G.; Vlase, L.; Crișan, O.; Vodnar, D.C.; Raita, O.; Gheldiu, A.M.; Oprean, R.; Tilea, I. Comparative Studies on Polyphenolic Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Schisandra chinensis Leaves and Fruits. *Molecules* **2014**, *19*, 15162–15179. [CrossRef] [PubMed]
25. Jeong, S.C.; Tulasi, R.; Koyyalamudi, S.R. Antioxidant Capacities of Hot Water Extracts and Endopolysaccharides of Selected Chinese Medicinal Fruits. *Cancers* **2016**, *8*, 33. [CrossRef]
26. Cheng, N.; Ren, N.; Gao, H.; Lei, X.; Zheng, J.; Cao, W. Antioxidant and hepatoprotective effects of Schisandra chinensis pollen extract on CCl4-induced acute liver damage in mice. *Food Chem. Toxicolog.* **2013**, *55*, 234–240. [CrossRef]
27. Vergun, O.; Svydenko, L.; Grygorieva, O.; Shymanska, O.; Rakhmetov, D.; Brindza, J.; Ivanišová, E. Antioxidant capacity of plant raw material of Scutellaria baicalensis Georgi. *Potravin. Slovak J. Food Sci.* **2019**, *13*, 614–621. [CrossRef]
28. Li, H.B.; Wong, C.C.; Cheng, K.W.; Chen, F. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT-Food Sci. Technol.* **2008**, *41*, 385–390. [CrossRef]
29. Chan, E.; Wong, C.Y.K.; Wan, C.W.; Kwok, C.Y.; Wu, J.H.; So, C.H.; Au, A.S. Evaluation of Anti-Oxidant Capacity of Root of Scutellaria baicalensis Georgi, in Comparison with Roots of Polygonum multiflorum Thunb and Panax ginseng CA Meyer. *Am. J. Chin. Med.* **2010**, *38*, 815–827. [CrossRef]
30. Załuski, D.; Smolarz, H.D. TLC profiling, nutritional and pharmacological properties of Siberian ginseng (Eleutherococcus senticosus) cultivated in Poland. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2016**, *29*, 1497–1502.
31. Załuski, D.; Olech, M.; Kuźniewski, R.; Verpoorte, R.; Nowak, R.; Smolarz, H.D. LC-ESI-MS/MS profiling of phenolics from Eleutherococcus sinflorescences, structureactivity relationship as antioxidants, inhibitors of hyaluronidase and acetylcholinesterase. *Saudi Pharm. J.* **2017**, *25*, 734–743. [CrossRef]
32. Liu, R.; Chu, X.; Su, J.; Fu, X.; Kan, Q.; Wang, X.; Zhang, X. Enzyme-Assisted Ultrasonic Extraction of Total Flavonoids from Acanthopanax senticosus and Their Enrichment and Antioxidant Properties. *Processes* **2021**, *9*, 1708. [CrossRef]
33. Chanaj-Kaczmarek, J.; Rosiak, N.; Szymanowska, D.; Rajewski, M.; Wender-Ozegowska, E.; Piontek-Cielecka, J. The Chitosan-Based System with Scutellariae baicalensis radix Extract for the Local Treatment of Vaginal Infections. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 740. [CrossRef] [PubMed]
34. Kuźniewski, R.; Załuski, D.; Olech, M.; Banaszczak, P.; Nowak, R. LC-ESI-MS/MS profiling of phenolics in the leaves of Eleutherococcus senticosus cultivated in the West Europe and anti-hyaluronidase and anti-acetylcholinestarase activities. *Nat. Prod. Res.* **2018**, *32*, 448–452. [CrossRef] [PubMed]
35. Liyanaarachchi, G.D.; Samarasekera, J.; Mahanamab, K.; Hemalal, K.D.P. Tyrosinase, elastase, hyaluronidase, inhibitory and antioxidant activity of Sri Lankan medicinal plants for novel cosmeceuticals. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *111*, 597–605. [CrossRef]
36. Neimkhum, W.; Anuchapreeda, S.; Lin, W.C.; Lue, S.C.; Lee, K.H.; Chaiyana, W. Effects of Carissa carandas Linn. Fruit, Pulp, Leaf, and Seed on Oxidation, Inflammation, Tyrosinase, Matrix Metalloproteinase, Elastase, and Hyaluronidase Inhibition. *Antioxidants* **2021**, *10*, 9. [CrossRef] [PubMed]
37. Piwowarski, J.P.; Kiss, A.K.; Kozlowska-Wojciechowska, M. Anti-hyaluronidase and anti-elastase activity screening of tannin-rich plant materials used in traditional Polish medicine for external treatment of diseases with inflammatory background. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *137*, 937–941. [CrossRef] [PubMed]
38. Ndlovu, G.; Fouche, G.; Tselanyane, G.M.; Cordier, W.; Steenkamp, V. In vitro determination of the anti-aging potential of four southern African medicinal plants. *BMC Complement. Altern. Med.* **2013**, *13*, 304. [CrossRef]
39. Wahby, A.F.; Mahdy, E.; El-Mezayen, H.; Salama, W.H.; Ebrahim, N.M.; Abdel-Aty, A.M.; Fahmy, A.S. Role of hyaluronidase inhibitors in the neutralization of toxicity of Egyptian horned viper Cerastes cerastes venom. *J. Gen. Engin. Biotechnol.* **2012**, *10*, 213–219. [CrossRef]
40. Mocan, A.; Zengin, G.; Crișan, G.; Molica, A. Enzymatic assays and molecular modeling studies of Schisandra chinensis lignans and phenolics from fruit and leaf extracts. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*, 200–210. [CrossRef]
41. Choi, S.I.; Park, S.R.; Heo, T.R. Matrix degradation inhibitory effect of Schisandra fructus on human articular cartilage and chondrocytes. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *106*, 279–284. [CrossRef]
42. Cha, B.C. Tyrosinase, Hyaluronidase Inhibitory Effect and Antioxidant Activity of Medicinal Plants. *Korean J. Pharmacogn* **2011**, *42*, 89–97.

43. Hong, S.J.; Kim, K.J. Scutellaria baicalensis Georgi (SBG) inhibits Melanin Synthesis in Mouse B16 Melanoma Cells. *J. Korean Orient. Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.* **2009**, *22*, 104–117.
44. Senthilraja, P.; Kathiresan, K. In vitro cytotoxicity MTT assay in Vero, HepG2 and MCF-7 cell lines study of Marine Yeast. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2015**, *5*, 80–84. [CrossRef]
45. Knowles, B.B.; Howe, C.C.; Aden, D.P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* **1980**, *209*, 497–499. [CrossRef]
46. Grever, M.C.B. Cancer drug discovery and development. In *Cancer: Principles and Practice of Oncology*; De Vita, V.H.S., Rosenberg, S.A., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelpia, PA, USA, 2001; pp. 328–339.
47. Atta, W.S.; Al-Ani, N.K. Antimicrobial and cytotoxic activity of Withania somnifera. *J. Al-Nahrain. Univer.* **2015**, *18*, 115–125. [CrossRef]
48. Zhu, L.; Li, B.; Liu, X.; Huang, G.; Meng, X. Isolation and purification of schisandrol A from the stems of Schisandra chinensis and cytotoxicity against human hepatocarcinoma cell lines. *Phcog. Mag.* **2015**, *11*, 131–135. [PubMed]
49. Kim, G.C.; Castro-Aceituno, V.; Abbai, R.; Lee, H.A.; Simu, S.; Han, Y.; Hurh, J.; Kim, Y.; Jang, D.C. Caspase-3/MAPK pathways as main regulators of the apoptotic effect of the phyto-mediated synthesized silver nanoparticle from dried stem of Eleutherococcus senticosus in human cancer cells. *Biomed. Pharm.* **2018**, *99*, 128–133. [CrossRef]
50. Załuski, D.; Olech, M.; Galanty, A.; Verpoorte, R.; Kuźniewski, R.; Nowak, R.; Bogucka-Kocka, A. Phythochemichal Content and Pharma-Nutrition Study on Eleutherococcus senticosus Fruits Intractum. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2016**, *10*, 9270691.
51. Załuski, D.; Smolarz, H.D.; Bogucka-Kocka, A. Cytotoxic activity of ethanolic extracts of Eleutherococcus species culti- vated in Poland on HL60 leukemia cell line. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci.* **2014**, *27*, 41–45. [CrossRef]
52. Lee, K.; Ahn, J.H.; Lee, K.T.; Jang, D.S. Deoxyschizandrin, isolated from Schisandra berries, induces cell cycle arrest in ovarian cancer cells and inhibits the protumoural activation of tumour-associated macrophages. *Nutrients* **2018**, *10*, 91. [CrossRef]
53. Chung, M.Y.; Shin, E.J.; Choi, H.K.; Kim, S.H.; Sung, M.J.; Park, J.H.; Hwang, J.T. Schisandra chinensis berry extract protects against steatosis by inhibiting histone acetylation in oleic acid–treated HepG2 cells and in the livers of diet-induced obese mice. *Nutr. Res.* **2017**, *46*, 1–10. [CrossRef]
54. Sung, M.; Park, S.S.; Kim, S.S.; Han, C.K.; Hur, J.M. Antioxidant activity and hepatoprotective effect of Schizandra chinensis Baill. Extracts containing active components in alcohol-induced HepG2 cells. *Food Sci. Biotechnol.* **2014**, *23*, 1615–1621. [CrossRef]
55. Cho, N.C.; Bai, S.; Chin, J.E. Effects of Scutellaria baicalensis Extracts on Tyrosinase Gene Expression in B16 Melanoma Cells. *Korean J. Food Nutr.* **2010**, *1*, 118–123.
56. Ye, F.; Che, Y.; McMillen, E.; Gorski, J.; Brodman, D.; Saw, D.; Jiang, B.; Zhang, D.Y. The Effect of Scutellaria Baicalensis on the Signaling Network in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Nutr. Cancer* **2009**, *62*, 530–537. [CrossRef] [PubMed]
57. Fei, Y.; Xui, L.; Yi, J.; Zhang, W.; Zhang, D.Y. Anticancer Activity of Scutellaria baicalensis and Its Potential Mechanism. *J. Altern. Complement. Med.* **2004**, *8*, 567–572.
58. Yaremenko, K.V.; Pashinski, V.G. Preparations of natural origin as remedies for prophylactic oncology. New medicinal preparations from plants of Siberia and the Far East. *Tomsk* **1986**, *1*, 171–172.
59. Orzechowska, B.; Antoszków, Z.; Siemieniec, I.; Lorenc, M.; Jatczak, B.; Błach-Olszewska, Z. Baicalin from the extract of Scutellaria baicalensis affects the innate immunity and apoptosis in leukocytes of children with acute lymphocytic leukemia. *Int. Immunopharm.* **2007**, *23*, 558–567. [CrossRef]
60. Chun, O.K.; Kim, D.O.; Lee, C.Y. Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 8067–8072. [CrossRef]
61. Pior, R.L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290–4302. [CrossRef]
62. Christ, B.; Müller, H. Zur serienmäßigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol-Derivaten in Drogen. *Arch. Pharm.* **1960**, *293*, 1033–1042. [CrossRef]
63. Gawlik-Dziki, U.; Dziki, D.; Baraniak, B.; Lin, R. The Effect of Simulated Digestion in Vitro on Bioactivity of Wheat Bread with Tartary Buckwheat Flavones Addition. *LWT—Food Sci. Technol.* **2009**, *42*, 137–143. [CrossRef]
64. Floegel, A.; Dae-Ok, K.; Sang-Jin, C.; Sung, I.K.; Ock, C.K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Compos. Anal.* **2011**, *24*, 1043–1048. [CrossRef]
65. Rice-Evans, C.; Miller, N.J. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol.* **1994**, *234*, 279–293. [PubMed]
66. Blois, M. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* **1958**, *181*, 1199–1200. [CrossRef]
67. Riemer, J.; Hoepken, H.; Czerwinska, H.; Robinson, S.R.; Dringen, R. Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Anal. Biochem.* **2004**, *331*, 370–375. [CrossRef]
68. Stookey, L.L. Ferrozine—A new spectrophotometric reagen for iron. *Anal. Chem.* **1970**, *42*, 779–781. [CrossRef]
69. Product Information Sheet–MAK257. Available online: https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/125/489/mak257bul.pdf (accessed on 1 January 2022).
70. Product Information Sheet-MAK458. Available online: https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/355/214/mak458pis-mk.pdf (accessed on 1 January 2022).

71. Product Information Sheet–MAK119. Available online: https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/130/634/mak119bul.pdf (accessed on 1 January 2022).
72. MTT Cell Growth Assay Kit. Available online: https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/263/797/isscr2017-3dgro-ps-mk.pdf (accessed on 1 January 2022).

14. STRESZCZENIE

Słowa kluczowe: ELEUTHEROCOCCUS, ADAPTOGEN, IMMUNOSTYMULACJA, INTRAKT, FITOCHEMIA

Wytwarzanie nowoczesnych leków pochodzenia naturalnego oparte jest w głównej mierze na wykorzystaniu ekstraktów roślinnych, których jakość zależy od rodzaju użytego do ekstrakcji surowca, jego warunków i środowiska uprawy, a także warunków procesu ekstrakcji. Zachowanie najwyższych norm i standardów produkcyjnych przekłada się na uzyskanie wyciągów o wysokiej zawartości wtórnych metabolitów, cechujących się przewidywanym kierunkiem działania farmakologicznego. Badanie składu jakościowego i ilościowego oraz aktywności biologicznej otrzymywanych ekstraktów są więc jednym z kluczowych etapów produkcji wysokiej jakości leków pochodzenia roślinnego.

W tym też kontekście zwrócono uwagę na obecność pierwotnych i wtórnych metabolitów obecnych w ekstraktach pozyskanych z owoców *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim., a także na ich aktywność na poziomie farmakologicznym. Istotnym problemem, który należy zaakcentować, jest wykorzystywanie korzenia rośliny jako tradycyjnego surowca, którego użycie przekłada się na rosnący wzrost zagrożenia wyginięciem tego gatunku. Dlatego kluczowym aspektem rozważań dotyczących leczniczych surowców roślinnych, jest poszukiwanie takich, które nie oddziaływają ujemnie na populację samej rośliny.

Głównymi założeniami cyklu prac, który został przedstawiony do ewaluacji w ramach rozprawy doktorskiej, była ocena cech farmakognostycznych owoców *E. senticosus*, ich składu chemicznego i aktywności farmakologicznej pod kątem przydatności jako nowego surowca adaptogennego. Nadrzędny cel badań w opisanych pracach stanowiło znalezienie odpowiedzi na pytanie, czy części nadziemne rośliny, takie jak owoce *Eleutherococcus senticosus*, mogą być stosowane zamiennie dla tradycyjnie wykorzystywanych korzeni, z zachowaniem właściwości surowca adaptogennego?

Cel ten został zrealizowany poprzez podzielenie badań na kilka głównych etapów, które obejmowały ocenę farmakognostyczną owoców z wykorzystaniem mikroskopii optycznej, analizę fitochemiczną owoców, a także analizę fitochemiczną intraktu, który został z nich

pozyskany. Wykorzystano do tego takie techniki jak HPLC-PDA, HPLC-RID. Przeprowadzono także oznaczenia całkowitej zawartości flawonoidów, polifenoli czy kwasów fenolowych, z wykorzystaniem metod spektrofotometrycznych i kolorymetrycznych. Dalszy aspekt badań obejmował ocenę farmakologiczną intraktu z owoców pod kątem działania adaptogennego, podczas której posłużono się przede wszystkim metodami spektrofotometrycznymi do oceny właściwości antyoksydacyjnych i przeciwenzymatycznych (ocena inhibicji hialuronidazy, tyrozynazy i acetylocholinoesterazy). Wykorzystane zostały także testy kolorymetryczne MTT do oceny aktywności wirusobójczej, a także do oceny zdolności do wzbudzenia proliferacji leukocytów krwi obwodowej przez intrakt. Ocena stężenia cytokin w komórkach leukocytów krwi obwodowej stymulowanych intraktem została przeprowadzona z wykorzystaniem techniki immunoenzymatycznej – test ELISA. Badania cytotoksyczności, opierały się przede wszystkim na analizach przeżywalności 2 linii komórkowych: FaDu i HepG2 z wykorzystaniem testu MTT.

Na podstawie uzyskanych wyników badań można stwierdzić, że intrakt pozyskany z owoców *E. senticosus* stanowi alternatywę dla zwyczajowo pozyskiwanych ekstraktów z korzenia tej rośliny (wskazania farmakopealne). Jego wykorzystanie może przyczynić się tym samym do bardziej zrównoważonego, ekologicznego podejścia w pozyskiwaniu surowca farmakopealnego, a także do zachowania występowania tej cennej adaptogennej rośliny w naturalnym środowisku.

Uzyskane wyniki pozwoliły także na stwierdzenie, że warunki klimatyczne, które panują na terenie naszego kraju, nie wpłynęły w sposób ujemny na profil fitochemiczny oraz fitofarmakologiczny *Eleutherococcus senticosus*, co wskazuje na pozytywną perspektywę uprawy tej rośliny w Polsce. Ponadto użycie owoców jako surowca leczniczego, przyczyni się do zwiększenia masy surowca pozyskanego z jednego okazu (korzeń ok. 1 kg, natomiast owoce do 10 kg), przyczyniając się tym samym do bardziej zrównoważonego, ekologicznego podejścia w pozyskiwaniu ekstraktów roślinnych.

15. SUMMARY

Keywords: ELEUTHEROCOCCUS, ADAPTOGEN, IMMUNOSTIMULATION, INTRACT, PHYTOCHEMISTRY

The production of modern medicines of natural origin is based mainly on the use of plant extracts, the quality of which depends on the type of plant used for extraction, its conditions and cultivation environment, as well as the conditions of the extraction process. Maintaining the highest standards and production standards translates into obtaining extracts with a high content of secondary plant metabolites, characterized by the expected direction of pharmacological action. Testing the qualitative and quantitative composition as well as the biological activity of the obtained extracts, and from them the final product, are therefore one of the key stages in the production of high-quality medicines of plant origin.

In this context, attention was paid to the presence of primary and secondary metabolites present in extracts obtained from the fruits of *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim., as well as their activity at the pharmacological level. An important aspect that should be emphasized is the problem of using the plant root as a traditional raw material, the use of which translates into a growing threat of extinction of this species. Therefore, the key aspect of considerations regarding medicinal plant raw materials is the search for those that do not negatively affect the population of the plant itself.

The main assumptions of the cycle of works, which was submitted for evaluation as part of the doctoral dissertation, was the assessment of the pharmacognostic features of *E. senticosus* fruits, their chemical composition and pharmacological activity in terms of suitability as a new adaptogenic raw material. The overriding goal of the research in the described works was to find an answer to the question whether the above-ground parts of the plant, such as E. senticosus fruits, can be used interchangeably for traditionally used roots, while maintaining the properties of the adaptogenic raw material?

This goal was achieved by dividing the research into several main stages, which included the pharmacognostic evaluation of fruits using optical microscopy, phytochemical analysis

of *E. senticosus* fruits, as well as phytochemical analysis of the extract obtained from them. Techniques such as HPLC-PDA, HPLC-RID were used for this. The total content of flavonoids, polyphenols and phenolic acids was also determined using spectrophotometric and colorimetric methods. A further aspect of the research included the pharmacological evaluation of the fruit extract in terms of adaptogenic activity, during which spectrophotometric methods were primarily used to assess the antioxidant and anti-enzymatic properties (assessment of the inhibition of hyaluronidase, tyrosinase and acetylcholinesterase enzymes). MTT colorimetric tests were also used to assess virucidal activity, as well as to assess the intract's ability to induce proliferation of peripheral blood leukocytes. The evaluation of the concentration of cytokines in peripheral blood leukocytes stimulated with the intract was carried out using the immunoenzymatic technique - ELISA test. Cytotoxicity studies were based primarily on the survival analyzes of 2 cell lines: FaDu and HepG2, using the MTT test.

Based on the research results, it can be concluded that the intract obtained from the fruit of *E. senticosus* is an alternative to the commonly obtained extracts from the root of this plant (pharmacopoeial indications). Its use can thus contribute to a more sustainable, ecological approach in obtaining pharmacopoeial raw material, as well as to preserving the presence of this valuable adaptogenic plant in the natural environment.

The obtained results also allowed to conclude that the climatic conditions prevailing in our country did not have a negative impact on the phytochemical and phytopharmacological profile of *Eleutherococcus senticosus*, which indicates a positive perspective for the cultivation of this plant in Poland. In addition, the use of fruit as a medicinal raw material will contribute to increasing the weight of the raw material obtained from one specimen (root approx. 1 kg, while fruit up to 10 kg), thus contributing to a more sustainable, ecological approach in obtaining plant extracts.

16. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW O UDZIALE W PUBLIKACJI

mgr farm. Filip Graczyk
Katedra Botaniki Farmaceutycznej i Farmakognozji
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

OŚWIADCZENIE AUTORA

Oświadczam, że jestem autorem poniższych 3 publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej:

1. **The intractum from the *Eleutherococcus senticosus* fruits affects the innate immunity in human leukocytes: From the ethnomedicinal use to contemporary evidence-based research.**
   (**Graczyk F.**, Orzechowska B., Franz D., Strzemski M., Verpoorte R., Załuski D., Journal of Ethnopharmacology. 2021 Mar 25; 268:113636. doi: 10.1016/j.jep.2020.113636. PMID: 33271247.)

Mój udział w przygotowaniu pracy polegał on na opracowaniu konceptu cyklu badań i metodologii, nadzorze, przeprowadzeniu analiz i zabraniu danych naukowych, wizualizacji wyników, opracowaniu manuskryptu i oceniam go na 58%

2. **Pharmacognostic evaluation and HPLC-PDA and HS-SPME/GC-MS metabolomic profiling of *Eleutherococcus senticosus* fruits.**
   (**Graczyk F.**, Strzemski M., Balcerek M., Kozłowska W., Mazurek B., Karakuła M., Sowa I., Ptaszyńska A. A., Załuski D., Molecules. 2021 Mar 31; 26(7):1969. doi: 10.3390/molecules26071969. PMID: 33807364; PMCID: PMC8036712.)

Mój udział w przygotowaniu pracy polegał on na przygotowaniu koncepcji badań, metodologii, przeprowadzeniu analiz biologicznych i fitochemicznych, redakcji manuskryptu i oceniam go na 60%

3. **Phenolic profile, antioxidant, anti-enzymatic and cytotoxic activity of the fruits and roots of *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.**
   (**Graczyk F.**, Gębalski J., Makuch-Kocka A.., Gawenda-Kempczyńska D, Ptaszyńska A. A., Grzyb S., Bogucka-Kocka A., Załuski D., Molecules. 2022 Aug 30; 27(17):5579. doi: 10.3390/molecules27175579)

Mój udział w przygotowaniu pracy polegał na przygotowaniu materiału roślinnego do analiz, przygotowaniu intraktu do badań, przeprowadzeniu badań fitochemicznych, analiz biologicznych, nadzoru nad projektem, opracowaniu manuskryptu i oceniam go na 65%.

Filip Graczyk

31.07.2023 .....

dr hab. Daniel Załuski, prof. UMK
Katedra Botaniki Farmaceutycznej i Farmakognozji
Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

W związku z ubieganiem się mgr Filipa Graczyka o stopień doktora nauk farmaceutycznych, oświadczam, że jestem współautorem poniższych 3 publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej:

1. **The intractum from the *Eleutherococcus senticosus* fruits affects the innate immunity in human leukocytes: From the ethnomedicinal use to contemporary evidence-based research.** **(Graczyk F.,** Orzechowska B., Franz D., Strzemski M., Verpoorte R., **Załuski D**., Journal of Ethnopharmacology. 2021 Mar 25; 268:113636. doi: 10.1016/j.jep.2020.113636. PMID: 33271247

   Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej publikacji związany był z opieką merytoryczną nad doktorantem i miał charakter konsultacji merytorycznych, korekty manuskryptu, a swój udział oceniam na 1%.

2. **Pharmacognostic evaluation and HPLC-PDA and HS-SPME/GC-MS metabolomic profiling of *Eleutherococcus senticosus* fruits.**
   (Graczyk F., Strzemski M., Balcerek M., Kozłowska W., Mazurek B., Karakuła M., Sowa I., Ptaszyńska A. A., **Załuski D**., Molecules. 2021 Mar 31; 26(7):1969. doi: 10.3390/molecules26071969. PMID: 33807364; PMCID: PMC8036712.)

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej publikacji związany był z opieką merytoryczną nad doktorantem i miał charakter konsultacji merytorycznych, korekty manuskryptów, a swój udział oceniam na 5%.

3. **Phenolic profile, antioxidant, anti-enzymatic and cytotoxic activity of the fruits and roots of *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.**
   (Graczyk F., Gębalski J., Makuch-Kocka A., Gawenda-Kempczyńska D, Ptaszyńska A. A., Grzyb S., Bogucka-Kocka A., **Załuski** D., Molecules. 2022 Aug 30; 27(17):5579. doi: 10.3390/molecules27175579)

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej publikacji związany był z opieką merytoryczną nad doktorantem i miał charakter konsultacji merytorycznych, korekty manuskryptów, swój udział oceniam na 5%.

Kierownik
Katedry Botaniki Farmaceutycznej
i Farmakognozji
dr hab. Daniel Załuski, prof. UMK

02.02.2023

.....
data i podpis autora

prof. dr hab. n. farm. Anna Bogucka-Kocka
Katedra i Zakład Biologii z Genetyką
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

W związku z ubieganiem się mgr Filipa Graczyka o stopień doktora nauk farmaceutycznych, oświadczam, że jestem współautorem poniższej publikacji wchodzącej w skład pracy doktorskiej:

Phenolic profile, antioxidant, anti-enzymatic and cytotoxic activity of the fruits and roots of *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.
(Graczyk F., Gębalski J., Makuch-Kocka A., Gawenda-Kempczyńska D, Ptaszyńska A. A., Grzyb S., **Bogucka-Kocka A.**, Załuski D., Molecules. 2022 Aug 30; 27(17):5579. doi: 10.3390/molecules27175579)

Oświadczam, że mój współudział w wyżej wymienionej publikacji polegał na wykonaniu części badań cytotoksycznych i oceniam go na 5%.

Kierownik
Katedry i Zakładu Biologii z Genetyką
Wydziału Farmaceutycznego
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

data i podpis autora

6.02.2025

dr hab. Aneta Ptaszyńska, prof. UMCS
Katedra Immunobiologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

W związku z ubieganiem się mgr Filipa Graczyka o stopień doktora nauk farmaceutycznych, oświadczam, że jestem współautorem poniższych 2 publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej:

1. **Pharmacognostic evaluation and HPLC-PDA and HS-SPME/GC-MS metabolomic profiling of *Eleutherococcus senticosus* fruits.**
   (Graczyk F., Strzemski M., Balcerek M., Kozłowska W., Mazurek B., Karakuła M., Sowa I., **Ptaszyńska A. A.,** Załuski D., Molecules. 2021 Mar 31; 26(7):1969. doi: 10.3390/molecules26071969. PMID: 33807364; PMCID: PMC8036712.)

2. **Phenolic profile, antioxidant, anti-enzymatic and cytotoxic activity of the fruits and roots of *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.**
   (Graczyk F., Gębalski J., Makuch-Kocka A., Gawenda-Kempczyńska D, **Ptaszyńska A. A.,** Grzyb S., Bogucka-Kocka A., Załuski D., Molecules. 2022 Aug 30; 27(17):5579. doi: 10.3390/molecules27175579)

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionych publikacjach miał charakter konsultacji merytorycznych, wsparciu w wizualizacji wyników, częściowej korekcie manuskryptu i oceniam go na 5%.

02.02.2023r. ……
data i podpis autora

prof. dr hab. n. farm. Ireneusz Sowa
Zakład Chemii Analitycznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

W związku z ubieganiem się mgr Filipa Graczyka o stopień doktora nauk farmaceutycznych, oświadczam, że jestem współautorem poniższej publikacji wchodzącej w skład pracy doktorskiej:

Pharmacognostic evaluation and HPLC-PDA and HS-SPME/GC-MS metabolomic profiling of *Eleutherococcus senticosus* fruits.
(Graczyk F., Strzemski M., Balcerek M., Kozłowska W., Mazurek B., Karakuła M., **Sowa I.,** Ptaszyńska A. A., Załuski D., Molecules. 2021 Mar 31; 26(7):1969. doi: 10.3390/molecules26071969. PMID: 33807364; PMCID: PMC8036712.)

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej publikacji związany był z częściową wizualizacją wyników i oceniam go na 5%.

Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Katedra Chemii, Zakład Chemii Analitycznej
prof. dr hab. n. farm. Ireneusz Sowa

07.02.2023
data i podpis autora

dr hab. n. farm. Maciej Strzemski, prof. UML
Zakład Chemii Analitycznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

W związku z ubieganiem się mgr Filipa Graczyka o stopień doktora nauk farmaceutycznych, oświadczam, że jestem współautorem poniższych 2 publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej:

1. **The intractum from the *Eleutherococcus senticosus* fruits affects the innate immunity in human leukocytes: From the ethnomedicinal use to contemporary evidence-based research.**
   (Graczyk F., Orzechowska B., Franz D., **Strzemski M.**, Verpoorte R., Załuski D., Journal of Ethnopharmacology, 2021 Mar 25; 268:113636. doi: 10.1016/j.jep.2020.113636. PMID: 33271247.)

Mój udział w przygotowaniu pracy polegał on na współprzeprowadzeniu analizy fitochemicznej i oceniam go na 1%.

2. **Pharmacognostic evaluation and HPLC-PDA and HS-SPME/GC-MS metabolomic profiling of *Eleutherococcus senticosus* fruits.**
   (Graczyk F., **Strzemski M.**, Balcerek M., Kozłowska W., Mazurek B., Karakuła M., Sowa I., Ptaszyńska A. A., Załuski D., Molecules. 2021 Mar 31; 26(7):1969. doi: 10.3390/molecules26071969. PMID: 33807364; PMCID: PMC8036712.)

Mój udział w przygotowaniu pracy polegał na współprzeprowadzeniu analizy chromatograficznej i oceniam go na 5%.

Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Katedra Chemii, Zakład Chemii Analitycznej
3.02.2023
dr hab. n. farm. Maciej Strzemski

.....
data i podpis autora

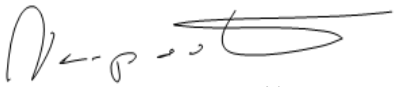
Professor Robert Verpoorte
Natural Products Laboratory,
Institute of Biology, Leiden University

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

W związku z ubieganiem się mgr Filipa Graczyka o stopień doktora nauk farmaceutycznych, oświadczam, że jestem współautorem poniższej publikacji wchodzącej w skład pracy doktorskiej:

The intractum from the Eleutherococcus senticosus fruits affects the innate immunity in human leukocytes: From the ethnomedicinal use to contemporary evidence-based research.
(Graczyk F., Orzechowska B., Franz D., Strzemski M., **Verpoorte R**., Załuski D., Journal of Ethnopharmacology. 2021 Mar 25; 268:113636. doi: 10.1016/j.jep.2020.113636. PMID: 33271247.)

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej publikacji miał charakter konsultacji merytorycznych, korekty manuskryptu i oceniam go na 5%.



2-2-2023, Leiden

……

data i podpis autora

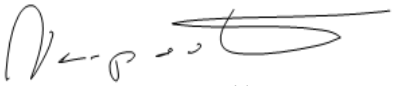
Professor Robert Verpoorte
Natural Products Laboratory,
Institute of Biology, Leiden University

CO-AUTHOR STATEMENT

Due to Filip Graczyk's application for the degree of Doctor of Pharmaceutical Sciences, I declare that I am a co-author of a joint publication in the composition of the doctoral thesis:

The intractum from the Eleutherococcus senticosus fruits affects the innate immunity in human leukocytes: From the ethnomedicinal use to contemporary evidence-based research.
(Graczyk F., Orzechowska B., Franz D., Strzemski M., **Verpoorte R**., Załuski D., Journal of Ethnopharmacology. 2021 Mar 25; 268:113636. doi: 10.1016/j.jep.2020.113636. PMID: 33271247.)

I declare that my participation in the above-mentioned publication was in the form of substantive assessments, correction of the manuscript and I rate it at 5%.



2-2-2023, Leiden

……

date and author's signature

dr Dorota Gawenda-Kempczyńska
Katedra Botaniki Farmaceutycznej i Farmakognozji
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

W związku z ubieganiem się mgr Filipa Graczyka o stopień doktora nauk farmaceutycznych, oświadczam, że jestem współautorem poniższej publikacji wchodzącej w skład pracy doktorskiej:

Phenolic profile, antioxidant, anti-enzymatic and cytotoxic activity of the fruits and roots of *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.
(Graczyk F., Gębalski J., Makuch-Kocka A., **Gawenda-Kempczyńska D**, Ptaszyńska A. A., Grzyb S., Bogucka-Kocka A., Załuski D., Molecules. 2022 Aug 30; 27(17):5579. doi: 10.3390/molecules27175579)

Oświadczam, że mój współudział w wyżej wymienionej publikacji związany był z przeprowadzeniem analizy statystycznej i oceniam go na 5%.

6.02.2023r. .....
data i podpis autora

dr Weronika Kozłowska
Katedra Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

W związku z ubieganiem się mgr Filipa Graczyka o stopień doktora nauk farmaceutycznych, oświadczam, że jestem współautorem poniższej publikacji wchodzącej w skład pracy doktorskiej:

Pharmacognostic evaluation and HPLC-PDA and HS-SPME/GC-MS metabolomic profiling of *Eleutherococcus senticosus* fruits.
(Graczyk F., Strzemski M., Balcerek M., **Kozłowska W.**, Mazurek B., Karakuła M., Sowa I., Ptaszyńska A. A., Załuski D., Molecules. 2021 Mar 31; 26(7):1969. doi: 10.3390/molecules26071969. PMID: 33807364; PMCID: PMC8036712.)

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej publikacji związany był analizą chromatograficzną związków lotnych, z integracją i wizualizacją zebranych danych doświadczalnych i oceniam go na 5%.

03.02.2023 Weronika Kozłowska
data i podpis autora

dr n. farm. Anna Makuch-Kocka
Zakład Farmakologii
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

W związku z ubieganiem się mgr Filipa Graczyka o stopień doktora nauk farmaceutycznych, oświadczam, że jestem współautorem poniższej publikacji wchodzącej w skład pracy doktorskiej:

Phenolic profile, antioxidant, anti-enzymatic and cytotoxic activity of the fruits and roots of *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.
(Graczyk F., Gębalski J., **Makuch-Kocka A**., Gawenda-Kempczyńska D, Ptaszyńska A. A., Grzyb S., Bogucka-Kocka A., Załuski D., Molecules. 2022 Aug 30; 27(17):5579. doi: 10.3390/molecules27175579)

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej publikacji polegał na częściowym przeprowadzeniu analiz cytotoksycznych i oceniam go na 5%.

02.02.2023

A. Makuch-Kocka

……
data i podpis autora

dr Beata Orzechowska
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk

OŚWIADCZENIE AUTORA

W związku z ubieganiem się mgr Filipa Graczyka o stopień doktora nauk farmaceutycznych, oświadczam, że jestem współautorem poniższej publikacji wchodzącej w skład pracy doktorskiej:

The intractum from the *Eleutherococcus senticosus* fruits affects the innate immunity in human leukocytes: From the ethnomedicinal use to contemporary evidence-based research.
(Graczyk F., **Orzechowska B.**, Franz D., Strzemski M., Verpoorte R., Załuski D., Journal of Ethnopharmacology. 2021 Mar 25; 268:113636. doi: 10.1016/j.jep.2020.113636. PMID: 33271247.)

Oświadczam, że mój współudział w przygotowaniu pracy polegał on na częściowym przeprowadzeniu badań cytologicznych i wirusologicznych i oceniam go na 30%.

8.02.2023 .....
data i podpis autora

dr Maciej Balcerek
Katedra Botaniki Farmaceutycznej i Farmakognozji
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

W związku z ubieganiem się mgr Filipa Graczyka o stopień doktora nauk farmaceutycznych, oświadczam, że jestem współautorem poniższej publikacji wchodzącej w skład pracy doktorskiej:

Pharmacognostic evaluation and HPLC-PDA and HS-SPME/GC-MS metabolomic profiling of *Eleutherococcus senticosus* fruits.
(Graczyk F., Strzemski M., **Balcerek M.**, Kozlowska W., Mazurek B., Karakuła M., Sowa I., Ptaszyńska A. A., Załuski D., Molecules. 2021 Mar 31; 26(7):1969. doi: 10.3390/molecules26071969. PMID: 33807364; PMCID: PMC8036712.)

Oświadczam, że mój współudział w wyżej wymienionej publikacji związany był z wizualizacją zebranych danych i oceniam go na **5%**.

.....
data i podpis autora

dr n. chem. Sebastian Grzyb
Wyższa Szkoła Inżynierii i Zdrowia w Warszawie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

W związku z ubieganiem się mgr Filipa Graczyka o stopień doktora nauk farmaceutycznych, oświadczam, że jestem współautorem poniższej publikacji wchodzącej w skład pracy doktorskiej:

Phenolic profile, antioxidant, anti-enzymatic and cytotoxic activity of the fruits and roots of *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.
(Graczyk F., Gębalski J., Makuch-Kocka A., Gawenda-Kempczyńska D, Ptaszyńska A. A., **Grzyb S.,** Bogucka-Kocka A., Załuski D., Molecules. 2022 Aug 30; 27(17):5579. doi: 10.3390/molecules27175579)

Oświadczam, że mój współudział w wyżej wymienionej publikacji związany był z weryfikacją merytoryczną i korektą części manuskryptu i oceniam go na 5%.

1.02.2023 Sebastian Grzyb
data i podpis autora

mgr Dominika Franz
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

W związku z ubieganiem się mgr Filipa Graczyka o stopień doktora nauk farmaceutycznych, oświadczam, że jestem współautorem poniższej publikacji wchodzącej w skład pracy doktorskiej:

The intractum from the Eleutherococcus senticosus fruits affects the innate immunity in human leukocytes: From the ethnomedicinal use to contemporary evidence-based research.
(Graczyk F., Orzechowska B., **Franz D.,** Strzemski M., Verpoorte R., Załuski D., Journal of Ethnopharmacology. 2021 Mar 25; 268:113636. doi: 10.1016/j.jep.2020.113636. PMID: 33271247.)

Mój udział w przygotowaniu pracy polegał on na przeprowadzeniu badań wirusologicznych i oceniam go na 5%.

07.02.23 Franz
data i podpis autora

mgr Barbara Mazurek
Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Nowych Syntez Chemicznych
Al. Tysiąclecia Państwa Polskiego 13a
24-110 Puławy

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

W związku z ubieganiem się mgr Filipa Graczyka o stopień doktora nauk farmaceutycznych, oświadczam, że jestem współautorem poniższej publikacji wchodzącej w skład pracy doktorskiej:

Pharmacognostic evaluation and HPLC-PDA and HS-SPME/GC-MS metabolomic profiling of *Eleutherococcus senticosus* fruits.
(Graczyk F., Strzemski M., Balcerek M., Kozłowska W., **Mazurek B.,** Karakuła M., Sowa I., Ptaszyńska A. A., Załuski D., Molecules. 2021 Mar 31; 26(7):1969. doi: 10.3390/molecules26071969. PMID: 33807364; PMCID: PMC8036712.)

Oświadczam, że mój współudział w wyżej wymienionej publikacji związany był z współinterpretacją i wizualizacją zebranych danych doświadczalnych i oceniam go na 5%.

Barbara Mazurek

03.02.2023r. Barbara Mazurek
data i podpis autora

mgr Jakub Gębalski
Katedra Botaniki Farmaceutycznej i Farmakognozji
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

W związku z ubieganiem się mgr Filipa Graczyka o stopień doktora nauk farmaceutycznych, oświadczam, że jestem współautorem poniższej publikacji wchodzącej w skład pracy doktorskiej:

Phenolic profile, antioxidant, anti-enzymatic and cytotoxic activity of the fruits and roots of *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.
(Graczyk F., **Gębalski J**., Makuch-Kocka A., Gawenda-Kempczyńska D, Ptaszyńska A. A., Grzyb S., Bogucka-Kocka A., Załuski D., Molecules. 2022 Aug 30; 27(17):5579. doi: 10.3390/molecules27175579)

Oświadczam, że mój współudział w wyżej wymienionej publikacji polegał na częściowym przeglądzie i korekcie manuskryptu i oceniam go na 5%.

08.02.23

data i podpis autora

mgr Michał Karakuła
Zakład Chemii Analitycznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

W związku z ubieganiem się mgr Filipa Graczyka o stopień doktora nauk farmaceutycznych, oświadczam, że jestem współautorem poniższej publikacji wchodzącej w skład pracy doktorskiej:

Pharmacognostic evaluation and HPLC-PDA and HS-SPME/GC-MS metabolomic profiling of *Eleutherococcus senticosus* fruits.
(Graczyk F., Strzemski M., Balcerek M., Kozłowska W., Mazurek B., **Karakuła M.,** Sowa I., Ptaszyńska A. A., Załuski D., Molecules. 2021 Mar 31; 26(7):1969. doi: 10.3390/molecules26071969. PMID: 33807364; PMCID: PMC8036712.)

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej publikacji związany był z integracją i wizualizacją zebranych danych i oceniam go na 5%.

07.02.2023 Michał Karakuła
data i podpis autora

17. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy

KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 536/2017 Bydgoszcz, 13.06.2017r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U.Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(skład podano w załączeniu), na posiedzeniu w dniu **13.06.2017r.** przeanalizowała wniosek, który złożył kierownik badania:

dr n. med. Elżbieta Piskorska
Katedra Patobiochemii i Chemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

z zespołem w składzie:

- dr hab. n. med. Dorota Olszewska-Słonina, dr hab. Krzysztof Busko, dr n. med. Elżbieta Piskorska, dr n. med. Piotr Kaczorowski, mgr Anna Cwynar, mgr Jan Mieszkowski, mgr Bartłomiej Niespodziński,

w sprawie badania:

„Wpływ suplementacji witaminowej na przebieg supramaksymalnego wysiłku fizycznego oraz na zmiany wybranych parametrów laboratoryjnych u osób regularnie uprawiających sport."

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania Komisja podjęła

Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku

w sprawie przeprowadzenia badań, w zakresie określonym we wniosku pod warunkiem:

- poinformowania uczestników badania w tym również uczestników stanowiących grupę kontrolną o celu oraz zakresie badań i uzyskania od każdego z nich osobnej, pisemnej, świadomej zgody na udział w badaniu, zgodnie z obowiązującymi przepisami, datowanej najpóźniej na moment rozpoczęcia badania, a nie wcześniej niż data uzyskania z Komisji Bioetycznej zgody na takie badanie;
- zapewnienia, że osoby uczestniczące w eksperymencie badawczym nie są ubezwłasnowolnione, nie są żołnierzami służby zasadniczej, nie są osobami pozbawionymi wolności, nie pozostają w zależności służbowej, dydaktycznej lub innej z prowadzącym badanie;
- UWAGA! Uczestnicy badania stanowiący grupę kontrolną nie mogą być rekrutowani spośród studentów lub pracowników podlegających zależności służbowej lub dydaktycznej z badaczami.
- zachowania tajemnicy wszystkich danych, w tym danych osobowych pacjentów, umożliwiających ich identyfikację w ewentualnych publikacjach;

- sugerujemy uzyskanie podpisu uczestnika badania pod informacją o badaniu, lub sporządzenie formularza informacji i świadomej zgody na udział w badaniu na jednej kartce.

Jednocześnie informujemy, iż „Zgoda na udział w badaniu" winna zawierać m.in.: imię i nazwisko badanej osoby; Nr historii choroby pacjenta (L.ks.gł. Oddziału/Poradni) oraz datę i podpis badanej osoby, a także klauzule, że uczestnik badania wyraża zgodę na przetwarzanie danych osobowych dotyczących realizacji tematu badawczego, z wyjątkiem publikacji danych osobowych.

Kierownik badania zobowiązany jest do przechowywania wszystkich dokumentów dotyczących badania przez okres dwudziestu lat.

Zgoda obowiązuje od daty posiedzenia (13.06.2017 r.) do końca 2020 r.

Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii. Wnioskodawca zobowiązany jest do informowania o wszelkich poprawkach, które mogłyby mieć wpływ na opinię Komisji oraz poinformowania o zakończeniu badania.

Od niniejszej uchwały podmiot zamierzający przeprowadzić eksperyment medyczny, kierownik zakładu opieki zdrowotnej, w której eksperyment medyczny ma być przeprowadzony, mogą wnieść odwołanie do Odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministrze Zdrowia, za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, w terminie 14 dni od daty otrzymania niniejszej Uchwały.

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:
dr n. med. Elżbieta Piskorska
Katedra Patobiochemii i Chemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Lista obecności

na posiedzeniu Komisji Bioetycznej

w dniu 13.06.2017 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	przewodniczący	
2.	Prof. dr hab. Adam Buciński	z-ca przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń		
4.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska		
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec		
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk		
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK		
8.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM		
9.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska		
10.	Dr hab. n med. Maria Kłopocka		
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka		
12.	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas		
13.	Mgr piel. Hanna Ziemniarska		

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA
Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 536/2017 Bydgoszcz, 25.09.2018 r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz. U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(której skład podano w załączeniu) na posiedzeniu w dniu **25.09.2018 r.** przeanalizowała prośbę o wyrażenie zgody na rozszerzenie tematu badawczego w zakresie:

1. Włączenia dodatkowych analiz, na leukocytach ludzkiej krwi obwodowej, mających na celu określenie działania immunostymulującego i zwiększenia odporności wrodzonej, testami:
- immunodetekcyjnymi (ELISA); poziom IL-2 i IL-10,
- testem MTT; wpływ na proliferację leukocytów (odporność wrodzona),

którą złożyła:

dr n. med. Elżbieta Piskorska
Katedra Patobiochemii i Chemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

w sprawie badania:

„Wpływ suplementacji witaminowej na przebieg supramaksymalnego wysiłku fizycznego oraz na zmiany wybranych parametrów laboratoryjnych u osób regularnie uprawiających sport."

Po zapoznaniu się ze złożonym dokumentem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania jawnego Komisja przyjęła do wiadomości podane informacje i wyraża zgodę na powyższe pod warunkami określonymi w uchwale Komisji podjętej w dniu 13.06.2017 r oraz w ewentualnych aneksach do tejże uchwały.

Zgoda na kontynuowanie przedmiotowego badania obowiązuje do końca 2020 r.

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:
dr n. med. Elżbieta Piskorska
Katedra Patobiochemii i Chemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Lista obecności

na posiedzeniu Komisji Bioetycznej

w dniu 25.09.2018 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	Przewodniczący	
2.	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas	Z – ca przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska		
4.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń		
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec		
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk		
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK		
8.	Dr hab. n med. Maria Kłopocka		
9.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM		
10.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska		
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka		
12.	Mgr farm. Aleksandra Adamczyk		
13.	Mgr Lidia Iwińska-Tarczykowska		

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA
Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 536/2017 Bydgoszcz, 29.01.2019 r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz. U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(której skład podano w załączeniu) na posiedzeniu w dniu **29.01.2019 r.** przeanalizowała prośbę o wyrażenie zgody na:

- rozszerzenie zespołu badawczego o lek. Mikołaja Pernaka oraz Filipa Graczyka

którą złożyła:

dr n. med. Elżbieta Piskorska
Katedra Patobiochemii i Chemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

w sprawie badania:

„Wpływ suplementacji witaminowej na przebieg supramaksymalnego wysiłku fizycznego oraz na zmiany wybranych parametrów laboratoryjnych u osób regularnie uprawiających sport."

Po zapoznaniu się ze złożonym dokumentem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania jawnego Komisja przyjęła do wiadomości podane informacje i wyraża zgodę na powyższe pod warunkami określonymi w uchwale Komisji podjętej w dniu 13.06.2017 r oraz w ewentualnych aneksach do tejże uchwały.

Zgoda na kontynuowanie przedmiotowego badania obowiązuje do końca 2020 r.

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:
dr n. med. Elżbieta Piskorska
Katedra Patobiochemii i Chemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Lista obecności

na posiedzeniu Komisji Bioetycznej

w dniu 29.01.2019 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	Przewodniczący	
2.	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas	Z – ca przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska		
4.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń		
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec		
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk		
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK		
8.	Dr hab. n med. Maria Kłopocka		
9.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM		
10.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska		
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka		
12.	Mgr farm. Aleksandra Adamczyk		
13.	Mgr Lidia Iwińska-Tarczykowska		