UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

mgr farm. Anna Magiera

Profil polifenolowy i aktywność biologiczna ekstraktów ze świeżych i suszonych owoców *Prunus spinosa* L. – analiza porównawcza

Rozprawa doktorska w oparciu o cykl publikacji naukowych

Praca wykonana w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
we współpracy z
Katedrą Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii
(obecnie Zakład Biologii i Farmakognozji)
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor: dr hab. n. farm. Monika A. Olszewska, prof. UM (UMED)
Promotor pomocniczy: dr hab. n. farm. Monika E. Czerwińska (WUM)

Łódź 2022

Podziękowania

Prezentowana rozprawa doktorska przygotowana została pod opieką naukową Pani dr hab. n. farm. Moniki A. Olszewskiej, prof. UM oraz Pani dr hab. n. farm. Moniki E. Czerwińskiej, którym pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania za okazaną pomoc, cierpliwość oraz cenne uwagi i wskazówki merytoryczne, które wpłynęły na ostateczny kształt niniejszej dysertacji.

Chciałabym podkreślić, że cykl eksperymentów wchodzących w skład prezentowanej rozprawy doktorskiej był pracą zespołową i bez pomocy wielu innych osób nie mógłby zostać zakończony pomyślnie. Dlatego dziękuję wszystkim pozostałym współautorom publikacji będących podstawą niniejszej rozprawy doktorskiej, w osobach Pana prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Sebastiana Granicy, Pani dr hab. n. biol. Joanny Kołodziejczyk-Czepas, prof. UŁ, Pani dr n. farm. Anny Marchelak, Pana dr n. farm. Piotra Michela, Pani dr n. farm. Aleksandry Owczarek, Pani mgr farm. Aleksandry Prokop, Pani dr n. farm. Magdaleny Rutkowskiej oraz Pani mgr Karoliny Skrobacz.

Dziękuję również wszystkim pracownikom Katedry Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz Katedry Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii (obecnie Zakład Biologii i Farmakognozji) Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego za pomoc i przyjazną atmosferę w pracy.

Spis treści

Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej 5
Wykaz skrótów 7
Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej 11
Cele naukowe pracy 19
Część doświadczalna 21
Materiał roślinny i przygotowanie ekstraktów/frakcji 21
Metodyka badań 21
Analiza profilu chemicznego 21
Analiza *in vitro* aktywności biologicznej 22
Ocena statystyczna wyników 23
Realizacja celów naukowych – wyniki i dyskusja 25
Analiza profilu chemicznego suchych ekstraktów uzyskanych ze świeżych i suszonych owoców *P. spinosa* 25
Analiza *in vitro* aktywności biologicznej suchych ekstraktów ze świeżych i suszonych owoców *P. spinosa* 26
Podsumowanie wyników 31
Wnioski 33
Perspektywy i kierunki dalszych badań 35
Streszczenie 37
Summary 41
Piśmiennictwo 45
Kopie publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej (Publikacje I-III) 49
Oświadczenia osoby ubiegającej się o stopień doktora 141
Oświadczenia współautorów 144
Wykształcenie i całkowity dorobek naukowy osoby ubiegającej się o stopień doktora 155

Publikacje naukowe będące podstawą rozprawy doktorskiej

Poniżej przedstawiono wykaz oryginalnych publikacji naukowych stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej pt. „Profil polifenolowy i aktywność biologiczna ekstraktów ze świeżych i suszonych owoców *Prunus spinosa* L. – analiza porównawcza". Sumaryczny **IF** (*ISI Journal Citation Reports*) cyklu zgodny z rokiem opublikowania jest równy **15.069**, natomiast punktacja **MEiN$_{2021}$** wynosi **380**.

- **Publikacja I**

  Magiera A., Czerwińska M.E., Owczarek A., Marchelak A., Granica S., Olszewska M.A. (2022). Polyphenol-enriched extracts of *Prunus spinosa* fruits: Anti-inflammatory and antioxidant effects in human immune cells ex vivo in relation to phytochemical profile. *Molecules*, 27(5), 1691, doi: 10.3390/ molecules27051691.

  IF$_{2021}$ = 4.927, MEiN$_{2021}$ = 140

- **Publikacja II**

  Magiera A., Czerwińska M.E., Owczarek A., Marchelak A., Granica S., Olszewska M.A. (2022). Polyphenols and Maillard reaction products in dried *Prunus spinosa* fruits: Quality aspects and contribution to anti-inflammatory and antioxidant activity in human immune cells ex vivo. *Molecules*, 27(10), 3302, doi: 10.3390/molecules27103302.

  IF$_{2021}$ = 4.927, MEiN$_{2021}$ = 140

- **Publikacja III**

  Magiera A., Kołodziejczyk-Czepas J., Skrobacz K., Czerwińska M.E., Rutkowska M., Prokop A., Michel P., Olszewska M.A. (2022). Valorisation of the inhibitory potential of fresh and dried fruit extracts of *Prunus spinosa* L. towards carbohydrate hydrolysing enzymes, protein glycation, multiple oxidants and oxidative stress-induced changes in human plasma constituents. *Pharmaceuticals*, 15(10), 1300, doi: 10.3390/ph15101300.

  IF$_{2021}$ = 5.215, MEiN$_{2021}$ = 100

Wyniki badań prezentowane w ramach niniejszej dysertacji zostały także przedstawione w formie 4 komunikatów zjazdowych (3 posterów i 1 referatu ustnego) na krajowych i międzynarodowych sympozjach naukowych.

- **Magiera A.**, Czerwińska M.E., Kołodziejczyk-Czepas J., Olszewska M.A. Wielokierunkowa aktywność świeżych i suszonych owoców *Prunus spinosa* L. – uwarunkowania fitochemiczne. V Krajowa Konferencja Naturalne Substancje Roślinne – Aspekty Strukturalne i Aplikacyjne, Puławy (Polska), 2019, referat ustny.

Referat został wyróżniony nagrodą dla autora najlepszej prezentacji.

- **Magiera A.**, Czerwińska M.E., Olszewska M.A. Analiza profilu polifenolowego ekstraktów ze świeżych i suszonych owoców *Prunus spinosa* L. oraz ocena ich wpływu na sekrecję wybranych czynników pro- i przeciwzapalnych. Kopernikańskie E-Seminarium Doktoranckie, Toruń (Polska), 2020, poster.

- **Magiera A.**, Prokop A., Czerwińska M.E., Rutkowska M., Olszewska M.A. Evaluation of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) fruits activities targeting management of diabetes and related complications using *in vitro* models. International Conference on Plant Systems Biology and Biotechnology (ICPSBB), Złote Piaski (Bułgaria), 2021, poster.

- **Magiera A.**, Czerwińska M.E., Olszewska M.A. *In vitro* anti-inflammatory activity of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) fruits extracts in human immune cells. International Conference on Plant Systems Biology and Biotechnology (ICPSBB), Złote Piaski (Bułgaria), 2021, poster.

Wykaz skrótów

3-NT	3-nitrotyrozyna (*ang. 3-nitrotyrosine*)
ABTS	kwas 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy) (*ang. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*)
AGEs	zaawansowane produkty glikacji (*ang. advanced glycation end-products*)
ASE	przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika (*ang. accelerated solvent extraction*)
BSA	surowicza albumina bydlęca (*ang. bovine serum albumin*)
BFD	frakcja *n*-butanolu (ekstraktu metanolowo-wodnego) z owocu suszonego (*ang. n-butanol fraction of dried fruit*)
BFF	frakcja *n*-butanolu (ekstraktu metanolowo-wodnego) z owocu świeżego (*ang. n-butanol fraction of fresh fruit*)
CDs	choroby cywilizacyjne (*ang. civilisation diseases*)
COSY	spektroskopia korelacyjna (*ang. correlation spectroscopy*)
DEFD	frakcja eteru dietylowego (ekstraktu metanolowo-wodnego) z owocu suszonego (*ang. diethylether fraction of dried fruit*)
DEFF	frakcja eteru dietylowego (ekstraktu metanolowo-wodnego) z owocu świeżego (*ang. diethylether fraction of fresh fruit*)
DPPH	2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (*ang. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*)
EAFD	frakcja octanu etylu (ekstraktu metanolowo-wodnego) z owocu suszonego (*ang. ethyl acetate fraction of dried fruit*)
EAFF	frakcja octanu etylu (ekstraktu metanolowo-wodnego) z owocu świeżego (*ang. ethyl acetate fraction of fresh fruit*)
IC50	stężenie inhibitora hamujące badany czynnik w 50% (*ang. half inhibitory concentration*)
ELA-2	elastaza typu 2 (*ang. type 2 elastase*)
ELISA	test immunoenzymosorpcyjny (*ang. enzyme-linked immunosorbent assay*)
ESI-MS	spektrometria mas z jonizacją typu elektrosprej (*ang. electrospray ionizationmass spectrometry*)
***f*-MLP**	*N*-formylometionylo-leucylo-fenyloalanina (*ang. N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine*)
FRAP	test zdolności do redukcji jonów żelaza Fe^{3+} (*ang. ferric reducing antioxidantpower assay*)
GAE	ekwiwalenty kwasu galusowego (*ang. gallic acid equivalents*)
H_2O_2	nadtlenek wodoru (*ang. hydrogen peroxide*)
HClO	kwas podchlorawy (*ang. hypochlorous acid*)
HMBC	heterojądrowa korelacja dalekiego zasięgu (*ang. heteronuclear multiple bondcoherence*)
HMF	hydroksymetylofurfural (*ang. hydroxymethylfurfural*)
HMQC	heterojądrowa korelacja z detekcją przejść wielokwantowych (*ang.heteronuclear multiple quantum coherence*)

HO•	rodnik hydroksylowy (*ang. hydroxyl radical*)
ICAM-1	cząsteczka adhezji międzykomórkowej typu 1 (*ang. intercellular adhesion molecule 1*)
IL	interleukina (*ang. interleukin*)
LPS	lipopolisacharyd (*ang. lipopolysaccharide*)
MED	ekstrakt metanolowo-wodny z owocu suszonego (75:25, *v/v*) (*ang. methanol-water (*75:25*, v/v) extract of dried fruit*)
MEF	ekstrakt metanolowo-wodny z owocu świeżego (75:25, *v/v*) (*ang. methanol-water (*75:25*, v/v) extract of fresh fruit*)
MRPs	produkty reakcji Maillarda (*ang. Maillard reaction products)*
NBT	błękit nitrotetrazoliowy (*ang. nitrotetrazolium blue*)
NEAC	nieenzymatyczna pojemność antyoksydacyjna osocza (*ang. non-enzymaticantioxidant capacity of plasma*)
NF-κB	jądrowy czynnik transkrypcyjny NF-κB (*ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)
NO•	tlenek azotu (*ang. nitric oxide*)
NMR	spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (*ang. nuclear magnetic resonance*)
NRF2	jądrowy czynnik transkrypcyjny NRF2 (*ang. nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)
$O_2^{\bullet-}$	anionorodnik ponadtlenkowy (*ang. superoxide anion radical*)
$ONOO^-$	nadtlenoazotyn (*ang. peroxynitrite*)
ORAC	zdolność do pochłaniania reaktywnych form tlenu/pojemność antyoksydacyjna (*ang. oxygen radical absorbance capacity*)
PBMCs	jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (*ang. peripheral blood mononuclear cells*)
ROS	reaktywne formy tlenu (*ang. reactive oxygen species*)
SC_{50}	stężenie analitu "zmiatające" ROS w 50% (*ang. half scavenging concentration*)
s.m.	sucha masa (*ang. dw, dry weight*)
ś.m.	świeża masa (*ang. fw, fresh weight*)
TBARS	substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym (*ang. thiobarbituric acid-reactive substances*)
TPC	całkowita zawartość polifenoli (*ang. total phenolic content*) oznaczona metodą Folina-Ciocalteu'a (*ang. Folin-Ciocalteu assay*)
TPH	całkowita zawartość polifenoli oznaczona metodą HPLC-PDA (*ang. total contents of polyphenolic compounds*)
TNF-α	czynnik martwicy nowotworów (*ang. tumor necrosis factor α*)
(U)HPLC-PDA	(ultra)wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją fotodiodową (*ang.(ultra)-high-performance liquid chromatography with photodiode array detection*)

VCAM-1	cząsteczka adhezji komórek naczyń typ 1 (*ang. vascular cell adhesion molecule 1*)
WRD	pozostałość wodna (ekstraktu metanolowo-wodnego) z owocu suszonego (*ang. water residue of dried fruit*)
WRF	pozostałość wodna (ekstraktu metanolowo-wodnego) z owocu świeżego (*ang. water residue of fresh fruit*)

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

Nieustannie zwiększające się zapotrzebowanie na zasoby systemu opieki zdrowotnej (tj. nakłady finansowe związane z diagnostyką, monitorowaniem i leczeniem pacjentów, dostępność do technologii medycznej i personelu medycznego) generuje stałą potrzebę implementacji skutecznej prewencji chorób, w szczególności tych, które określane są mianem chorób cywilizacyjnych (CDs)/przewlekłych. Termin ten odnosi się do powszechnie występujących schorzeń o zasięgu globalnym, których etiologia ściśle związana jest z negatywnymi skutkami życia w warunkach szybkiego rozwoju przemysłu i dynamicznej urbanizacji oraz z nieracjonalnym stylem życia (źle zbilansowaną, bogatą w wysoko przetworzoną żywność dietą, niewystarczającą aktywnością fizyczną, chronicznym stresem, czy nadużywaniem substancji psychoaktywnych). Do najczęściej wymienianych schorzeń w tej grupie zaliczają się zaburzenia metaboliczne (m.in. cukrzyca, otyłość), patologie układu krążenia (tj. nadciśnienie tętnicze, miażdżyca), choroby układu pokarmowego (np. choroba wrzodowa żołądka, nieswoiste zapalne choroby jelit), zaburzenia psychiczne (zwłaszcza depresja i zaburzenia lękowe), a także niektóre choroby nowotworowe (np. tytonio- i alkoholozależne). Jak wynika z szacunków Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), CDs w 2019 r. były przyczyną 71% zgonów (41 mln osób), z czego prawie 40% stanowiły zgony przedwczesne (World Health Organization, 2022). W badaniach prowadzonych w ostatnich dekadach dowiedziono, iż patomechanizm większości chorób cywilizacyjnych i ich powikłań jest bardzo złożony, jednak w istotnym stopniu powiązany z chronicznym stresem oksydacyjnym, czyli utrzymującą się zaburzoną równowagą pomiędzy generacją rodnikowych i nierodnikowych reaktywnych form tlenu (ROS) a zdolnościami antyoksydacyjnymi organizmu. ROS wykazują wielokierunkowe, niszczące działanie wobec biocząsteczek funkcjonalnych. Doprowadzają m.in. do chemicznych modyfikacji (peroksydacji, agregacji, denaturacji) białek i lipidów, indukują też zmiany w strukturze DNA, prowadzące do efektów cytotoksycznych bądź mutacji. Co więcej, ROS stanowią również ważny element aktywacji komórkowych szlaków sygnałowych i czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w powstawanie przewlekłego stanu zapalnego (Rani i wsp., 2016; Liguori i wsp., 2018). Podstawowa strategia terapeutyczna współczesnej medycyny zakłada, iż pojedyncza substancja aktywna trafia w cel, którym jest źródło choroby, doprowadzając do jego wyeliminowania. W farmakoterapii CDs w wielu przypadkach ten model postępowania leczniczego często się nie sprawdza, gdyż jak wzmiankowano powyżej ich mechanizmy patogenne są złożone i wiążą się z zaburzeniami homeostazy całego organizmu. Leczenie CDs obejmuje więc wiele celów farmakologicznych i oparte jest na zastosowaniu przynajmniej kilku środków leczniczych, co wymaga bardzo uważnej kontroli i naraża pacjenta na ryzyko wystąpienia niepożądanych reakcji polekowych.

Uwzględniając zatem względy epidemiologiczne i ekonomiczne oraz niedoskonałość terapii lekami syntetycznymi, istnieje konieczność zwiększenia nacisku na profilaktykę opartą o racjonalne odżywianie oraz wysokiej jakości żywność, a także uzupełnienie konwencjonalnej farmakoterapii racjonalną fitoterapią. W tym aspekcie szczególne znaczenie ma poszerzenie wiedzy na temat prozdrowotnego działania surowców/substancji roślinnych stosowanych tradycyjnie w lecznictwie i żywieniu oraz udoskonalenie sposobów ich otrzymywania i przetwarzania (Roberfroid, 2000; Rani i wsp., 2016). Spośród dostępnych

substancji roślinnych szczególnie dużym zainteresowaniem w kontekście zastosowania w profilaktyce pierwotnej i wtórnej CDs cieszą się produkty bogate w polifenole (Cory i wsp., 2018; Tresserra-Rimbau i wsp., 2018; Koch, 2019).

Profilaktyczny i terapeutyczny wpływ polifenoli roślinnych na postęp CDs jest głównie związany z ich normalizująco-regulującym wpływem na procesy oksydacyjne i zapalne oraz zaburzenia metaboliczne zachodzące w żywych komórkach, stanowiące elementarne czynniki etiologiczne CDs. Plejotropowe właściwości farmakologiczne polifenoli są wynikiem złożoności ich mechanizmu działania, w tym zdolności do interferencji z szeregiem układów enzymatycznych, komórkowych szlaków sygnałowych, białek funkcjonalnych oraz wpływem na ekspresję genów w komórkach (Hussain i wsp., 2016; Tresserra-Rimbau i wsp., 2018; Koch, 2019). Związki polifenolowe wykazują także zdolność do bezpośredniej redukcji ROS, m.in. anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\bullet-}$), nadtlenku wodoru (H_2O_2), rodnika hydroksylowego ($HO^{\bullet}$), kwasu podchlorawego (HClO), tlenku azotu ($NO^{\bullet}$) czy nadtlenoazotynu ($ONOO^-$). Hamują także aktywność enzymów biorących udział w tworzeniu ROS, m.in. oksydazy ksantynowej, oksydazy NADPH, mieloperoksydaz i syntazy tlenku azotu, jak również regulują aktywność białek (enzymatycznych i nieenzymatycznych) zaangażowanych w procesy oksydoredukcyjne. Równie znaczącym aspektem działania biologicznego polifenoli jest ich zdolność do modyfikacji funkcji komórek układu immunologicznego. Związki te mogą wpływać na sekrecję prozapalnych cytokin, m.in. interleukin (IL), w szczególności IL-1β, IL-6 i IL-8, czynnika nekrozy nowotworów (TNF-α), prozapalnych enzymów remodelujących składniki macierzy zewnątrzkomórkowej, m.in. neutrofilowej elastazy 2 (ELA2), prowadzących do eskalacji procesu zapalnego; jednocześnie mogą nasilać wydzielanie cytokin przeciwzapalnych, m.in. IL-10. Za kluczowy molekularny mechanizm działania polifenoli uważa się ich wpływ na ekspresję jądrowych czynników transkrypcyjnych, w tym głównie NF-κB, zaangażowanego w ekspresję genów dla prozapalnych cytokin i enzymów, białek ostrej fazy i cząsteczek adhezyjnych, oraz NRF2, regulatora ekspresji enzymatycznych i nieenzymatycznych białek endogennego systemu antyoksydacyjnego. Ponadto, związki polifenolowe mogą bezpośrednio hamować aktywność enzymów o działaniu prozapalnym, w tym cyklooksygenaz, fosfolipaz wydzielniczych, lipooksygenaz i hialuronidazy (Hussain i wsp., 2016; Yahfoufi i wsp., 2018). W kontekście profilaktyczno-leczniczym CDs duże znaczenie ma także regulujący wpływ polifenoli na metabolizm spożywanych węglowodanów, który jest m.in. wynikiem ich zdolności do inhibicji glikolitycznych enzymów trawiennych: α-amylazy i α-glukozydazy (Ombra i wsp., 2018).

Mając na uwadze złożoność procesów patologicznych odpowiedzialnych za rozwój CDs, wielość mechanizmów działania polifenoli roślinnych stoi za ich skutecznością w prewencji pierwotnej i wtórnej CDs. Spośród dostępnych substancji roślinnych bogatych w polifenole szczególnym zainteresowaniem cieszą się owoce, zwykle chętnie spożywane w postaci świeżej lub przetworzonej. Niektóre z nich znajdują także zastosowanie w medycynie tradycyjnej, co wskazuje na ich znaczny potencjał profilaktyczno-leczniczy. Jednakże, pomimo plejotropowego działania polifenoli wiadomym jest, iż nie każdy produkt roślinny bogaty w te związki wykazuje satysfakcjonującą efektywność terapeutyczną. Liczne badania pokazują, iż aktywność biologiczna frakcji polifenolowych surowców roślinnych jest uwarunkowana obecnością specyficznej palety związków w odpowiednich proporcjach. Stąd podstawą racjonalnego stosowania substancji roślinnych jest ich pełna charakterystyka –

wskazanie składników warunkujących aktywność, standaryzacja fitochemiczna, ustalenie mechanizmów działania, parametrów aktywności i właściwego dawkowania oraz wykluczenie toksyczności.

Uwzględniając powyższe przesłanki, obiektem mojego zainteresowania i przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej stał się owoc *Prunus spinosa* L. – surowiec polifenolowy, wymieniany w lecznictwie tradycyjnym, jako substancja o plejotropowych właściwościach biologicznych.

P. spinosa L. (śliwa tarnina) jest ciernistym krzewem lub niewielkim drzewem należącym do rodziny Rosaceae, charakterystycznym dla flory Europy, północno-zachodniej Afryki i południowo-zachodniej Azji. Ponadto gatunek ten został naturalizowany na obszarze Nowej Zelandii i Tasmanii oraz w Ameryce Północnej (Rycina 1). Na terenie naszego kraju rośnie na obszarze całego niżu i w dolnych partiach górskich. Roślina spotykana jest głównie na brzegach lasów, skarpach, miedziach oraz słabo eksploatowanych łąkach czy pastwiskach. Tarnina pomimo tego, iż preferuje stanowiska nasłonecznione i ciepły klimat jest rośliną mrozo- i suszoodporną. Roślina najlepiej rozwija się w miejscach o glebach żyznych, próchniczych, mineralnych, o dużej zawartości wapnia i słabo zasadowym odczynie (Rumińska i Ożarowski, 1990; Poonam i wsp., 2011; Popescu i Caudullo, 2016).

Rycina 1. Obszar występowania gatunku *P. spinosa* L. (źródło: https://www.cwrnl.nl/en/CWRnl-1/CWRbybotanicalname/Prunus-spinosa-L.-1.htm; dostęp: 26.07.2022)

Śliwa tarnina dostarcza jadalnych owoców oraz szeregu innych substancji roślinnych (kwiatów, liści, owoców, młodych pędów, kory) cenionych z uwagi na walory terapeutyczne już od czasów starożytnych. Świeże owoce tarniny są spożywane głównie w formie przetworów (konfitur, soków, syropów, kompotów, nalewek, likierów i win), zawierających wartościowe składniki odżywcze, witaminy i minerały; z kolei suszone owoce wykorzystuje się do przygotowywania leczniczych herbat ziołowych. Zarówno świeże, jak i suszone owoce mają status tradycyjnej roślinnej substancji leczniczej (brak monografii farmakopealnej),

polecanej w terapii stanów zapalnych przewodu pokarmowego, pęcherza i dróg moczowych, biegunek, chorób metabolicznych, m.in. cukrzycy i otyłości, a także jako środek wspomagający pracę układu krążenia, w tym hipotensyjny. Doświadczenia etnomedycyny wskazują na różnice w aktywności owoców świeżych i suszonych – odwary z suszu wykorzystuje się głównie w terapii miejscowych stanów zapalnych przewodu pokarmowego, nieżytach żołądka i jelit oraz biegunkach, zaś owoce świeże w kierunkach o charakterze ogólnoustrojowym (Rumińska i Ożarowski, 1990; Kültür, 2007; Poonam i wsp., 2011; Alarcón i wsp., 2015; Jarić i wsp., 2015).

Mimo udokumentowanego zastosowania, do czasu opublikowania prac stanowiących niniejszą rozprawę, skład chemiczny owoców pozostawał rozpoznany jedynie fragmentarycznie, a kwestia ewentualnej zmiany składu w procesie suszenia nie była przedmiotem żadnych badań. Przyjmowano jednak, że główne składniki farmakologicznie aktywne owoców tarniny to polifenole, szczególnie antocyjany, ale także kwasy fenolowe i flawonoidy, które w większości zidentyfikowane były jedynie częściowo (Barros i wsp., 2010; Guimarães i wsp., 2013; Jaiswal i wsp., 2013; Velickovic i wsp., 2014; Mikulic-Petkovsek i wsp., 2016; Popović i wsp., 2020). Szczątkowe były także dane na temat aktywności biologicznej owoców tarniny. Wcześniejsze badania koncentrowały się głównie na ocenie aktywności przeciwutleniającej świeżych owoców tarniny, w większości z wykorzystaniem prostych, chemicznych testów *in vitro*, tj. DPPH, ABTS, FRAP, TBARS i ORAC, których wyniki trudno odnieść do warunków *in vivo*. Z drugiej strony sugerowały one wysoki potencjał antyoksydacyjny owoców, w tym ich istotną aktywność redukującą i zdolność do inhibicji oksydacji lipidów (modelowego kwasu linolenowego) (Barros i wsp., 2010; Guimarães i wsp., 2013; Velickovic i wsp., 2014; Pinacho i wsp., 2015), co zachęcało do pogłębienia analiz, szczególnie, że w jedynym dostępnym dotychczas badaniu właściwości przeciwutleniających w modelu komórkowym (ludzkich promonocytów U937) wykazano istotne i zależne od dawki właściwości ochronne soku z owoców tarniny (zwiększoną przeżywalność) w warunkach stresu oksydacyjnego generowanego H_2O_2 (Fraternale i wsp., 2009). W przypadku działania przeciwzapalnego jedynie Sabatini i wsp. (2020) oraz Tiboni i wsp. (2020) wykazali, że ekstrakt etanolowy z świeżych owoców tarniny może zwiększać poziom ekspresji miR-126 i miR-146a, a tym samym zmniejszać ekspresję prozapalnej cytokiny IL-6 i cząsteczek adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1 w stymulowanych ludzkich komórkach śródbłonka (HUVEC). Brakowało jednak informacji na temat wpływu owoców tarniny na funkcje prozapalne i prooksydacyjne prawidłowych ludzkich komórek układu immunologicznego, których nadmierna aktywacja jest czynnikiem krytycznymi w procesach zapalnych *in vivo*, będących podłożem wielu jednostek chorobowych. Z kolei w kontekście aktywności przeciwcukrzycowej Popović i wsp. (2020) wykazali, że ekstrakty alkoholowe ze świeżych owoców tarniny mogą hamować działanie α-glukozydazy i α-amylazy. Przyglądając się bliżej wyżej przedstawionym, obiecującym doniesieniom naukowym postawiono hipotezę, że owoce tarniny mogą posiadać istotny potencjał prozdrowotny i przydatność do produkcji funkcjonalnych produktów żywnościowych lub preparatów terapeutycznych. Weryfikacja tej hipotezy wymagała jednakże rozszerzenia i uzupełnienia wcześniejszych badań.

Tabela 1. Charakterystyka botaniczna *P. spinosa* L.

CECHY MORFOLOGICZNE	
POKRÓJ Tarnina to gęsto rozgałęziony, ciernisty (łac. *spinosus* – kolczasty, ciernisty), krzew lub małe drzewo o wysokości od 1 do 3 m (niekiedy do 8 m); tworzy liczne odrośla korzeniowe, powstałe na rozrastających się szeroko i płytko pod powierzchnią ziemi korzeniach, efektem czego roślina formuje gęste zarośla (tzw. czyżnie), będące miejscami lęgowymi dla ptaków i ssaków.	
PĘD I KORA Pęd główny o średnicy do 8 cm; młode pędy są szarobrązowe i kutnerowato owłosione, z czasem stają się gładkie, połyskujące i przyjmują zabarwienie oliwkowozielone lub ciemnobrązowe, często posiadają drobne, jasne punkty; pędy boczne są krótkie i prostopadle odstają od pędu głównego, zakończone długimi cierniami; pączki liściowe i kwiatowe są liczne, niewielkie, kształtu wąsko-jajowatego, osadzone pojedynczo lub po 2-3 obok siebie (skrajne pąki najczęściej są kwiatowe); łuski pąków z reguły orzęsione posiadają kolor brunatnoczerwony; kora barwy brunatnej, fioletowo nabiegła, na starszych pniach lekko spękana w wąskie pasma.	
LIŚĆIE Liście ułożone skrętolegle, pojedyncze, krótkoogonkowe (ogonki mają do 1,5 cm długości), u nasady ogonka znajdują się wąskie, owłosione przylistki o brzegu ząbkowanym; blaszki liściowe o dużej rozpiętości kształtów: lancetowate, szeroko-eliptyczne, podłużnie-eliptyczne lub odwrotnie-jajowate; brzeg pojedynczo lub podwójnie ostro piłkowano-ząbkowany; nasada klinowato zwężona; szczyt zaostrzony lub lekko stępiony; górna blaszka liściowa jest ciemnozielona, naga i matowa, natomiast blaszka dolna jest jasnozielona, owłosiona (w szczególności w okolicach nerwów); blaszka liściowa ma długość od 1,5 do 6,5 cm i szerokość od 1 do 3 cm.	

KWIATY

Kwiaty są pięciokrotne, średnicy 1,2-1,8 cm, osadzone na krótkich (do 9 mm długości), nagich, sztywnych, wzniesionych szypułkach, z reguły pojedynczo, rzadziej po dwa do pięciu; kielich składa się z pięciu nieodgiętych, jajowato-trójkątnych, na brzegu orzęsionych działek o długości do 2,5 mm; płatki korony jajowate lub podługowato-jajowate, długości 6-8 mm, barwy białej; pręciki w liczbie około 20, długości 4-6 mm, osadzone na białych nitkach, na końcu których usytuowane są żółte, pomarańczowe lub czerwone pylniki; słupek pojedynczy, dolny i nagi. Tarnina kwitnie między marcem a majem, kwiaty pojawiają się zwykle wcześniej niż liście, kwiaty tarniny są miododajne.

OWOCE I NASIONA

Owocem tarniny jest mały (o długości od 10 do 15 mm i szerokości od 8 do 12 mm), kulisty lub jajowaty pestkowiec (zwany tarką), posiadający sztywną, prosto wzniesioną, krótką szypułkę; barwa owocu jest granatowa niebieskoczarna lub sinoczarna z fioletowo-niebieskim woskowym nalotem; miąższ jest zwarty, żółto-zielonkawy, cierpki i gorzkawy w smaku; wewnątrz owocu znajduje się zwykle silnie zrośnięta z miąższem, eliptyczna, jasnobrązowa lub żółtobrązowa pestka, długości ok. 10 mm, szerokości od 6 do 9 mm i grubości około 5 mm, z ostrym wierzchołkiem i zaokrągloną lub szpiczastą podstawą, na jej powierzchni znajdują się podłużne żeberka; nasiona kształtem przypominają migdał, są jasnobrązowe, długości 6 mm i szerokości 4 mm; owoc dojrzewa późnym latem (sierpień/wrzesień), pozostaje na gałęziach do późnej jesieni (listopad/grudzień). Do celów spożywczych owoce zbierane są w październiku/ listopadzie po pierwszych przymrozkach.

Źródła zdjęć: Robert Vernon: https://treesandshrubsonline.org/articles/prunus/prunus-spinosa/ (dostęp: 26.07.2022); Stefan Lefnaer: https://pl.wikipedia.org/wiki/%C5%9Aliwa_tarnina#/media/Plik: Prunus_spinosa_sl6.jpg (dostęp: 26.07.2022); Fernando Losada Rodríguez: https://pl.wikipedia.org/wiki/%C5%9 Aliwa_tarnina#/media/Plik:Prunus_spinosa.001_-_Serra_de_Enci%C3%B1a_de_Lastra.JPG (dostęp: 26.07.2022); Kenraiz: https://pl.wikipedia.org/wiki/%C5%9Aliwa_tarnina#/media/Plik:Prunus_spinosa_leaf_kz1.jpg (dostęp: 26.07.2022); Stefan Lefnaer: https://de.wikipedia.org/wiki/Schlehdorn#/media/Datei:Prunus_spinosa_sl2.jpg (dostęp: 10.08.2022); Summa: https://pixabay.com/pl/photos/tarnina-wiosna-kwiaty-bia%c5%82e-1236126/ (dostęp: 10.08.2022); Jhenning: https://pixabay.com/pl/photos/kwiaty-tarnina-wzrost-kwiat-7115492/ (dostęp: 10.08.2022); Pavlofox: https://pixabay.com/pl/photos/tarnina-owoc-ga%c5%82%c4%85zka-1621554/ (dostęp: 10.08.2022); Logga Wiggler: https://pixabay.com/pl/photos/tarnina-schlehdorn-%c5%9bliwka-spinosa-509753/ (dostęp: 10.08.2022); Hans: https://pixabay.com/pl/photos/tarnina-jagoda-niebieski-krzak-693938/ (dostęp: 10.08.2022).

Według obecnych wymagań stawianych substancjom/preparatom roślinnym stosowanym w celach dietetycznych bądź farmaceutycznych, konieczne jest przeprowadzenie szczegółowej analizy ich składu chemicznego (ocena jakościowa i ilościowa) oraz standaryzacja przy pomocy odpowiednio dobranych i poddanych walidacji metod analitycznych. Równie istotnym aspektem badań materiału roślinnego jest dokonanie szczegółowej i kompleksowej analizy aktywności biologicznej z użyciem modeli *in vitro* komórkowych i bezkomórkowych, modeli zwierzęcych *in vivo* oraz badań klinicznych, celem dokładnego określenia skuteczności terapeutycznej i jednoznacznego zdefiniowania mechanizmów działania tejże substancji roślinnej i odpowiednich jej preparatów. Dokładna ocena obejmująca weryfikację fitochemiczną i farmakologiczną przekłada się na postać preparatu leczniczego/funkcjonalnego oraz umożliwia dobór odpowiedniego dawkowania, gwarantującego skuteczność i bezpieczeństwo terapii, w konsekwencji prowadząc do otrzymania wysokiej jakości produktu leczniczego lub dietetycznego.

Uwzględniając powyższe przesłanki, prezentowana rozprawa doktorska stanowi pierwszy etap wieloaspektowego projektu badawczego, zmierzającego do pełnej charakterystyki świeżych i suszonych owoców *P. spinosa*, a także pochodnych ekstraktów/frakcji polifenolowych, jako potencjalnego składnika żywności funkcjonalnej/preparatów leczniczych o plejotropowym działaniu i potencjalnych cechach profilaktyczno-terapeutycznych wobec chorób cywilizacyjnych, takich jak choroby zapalne jelit oraz cukrzyca i jej powikłania naczyniowe.

Realizacja celu naukowego

Celem niniejszej dysertacji była analiza porównawcza profilu fitochemicznego ekstraktów pozyskanych ze świeżych i suszonych owoców tarniny z identyfikacją składników aktywnych, a także porównanie potencjalnej aktywności przeciwutleniającej, przeciwzapalnej i przeciw-cukrzycowej ekstraktów w kontekście profilaktyki i terapii chorób zapalnych jelit oraz cukrzycy i jej powikłań naczyniowych.

Cel naukowy rozprawy został zrealizowany poprzez przeprowadzenie komplementarnych analiz fitochemicznych i aktywności biologicznej z wykorzystaniem szeregu komórkowych i bezkomórkowych modeli *in vitro*. Na plan badawczy składały się:

1. Przygotowanie suchych ekstraktów/frakcji z świeżych i suszonych owoców *P. spinosa* oraz analiza ich profilu chemicznego, w tym:

- standaryzacja jakościowa profilu polifenolowego (UHPLC–PDA–ESI–MS^3) – **Publikacje I i II**,
- ocena całkowitej zawartości związków polifenolowych i garbników (metody spektrofotometryczne); optymalizacja i rewalidacja metody HPLC-PDA-fingerprint analizy związków polifenolowych w badanym materiale roślinnym oraz ocena zawartości poszczególnych związków niskocząsteczkowych (kwasów fenolowych, aldehydów, antocyjanów i flawonoidów), a także ich sumy – **Publikacje I i II**,
- izolacja i określenie struktury chemicznej składników niepolifenolowych, tj. produktów reakcji Maillarda (MRPs) powstających podczas suszenia (NMR, UHPLC–PDA–ESI–MS^3); optymalizacja i rewalidacja metody HPLC-PDA-fingerprint analizy tych związków w badanym materiale roślinnym oraz ocena zawartości głównego składnika (hydroksymetylofurfuralu, HMF), a także sumy MRPs – **Publikacja II**,
- wytypowanie związków modelowych dla dominujących grup składników świeżych i suszonych owoców do badań aktywności biologicznej – **Publikacje I i II**,
- analiza porównawcza składu chemicznego owoców świeżych i suszonych – **Publikacja II**.

2. Analiza *in vitro* aktywności biologicznej suchych ekstraktów/frakcji ze świeżych i suszonych owoców *P. spinosa* oraz związków modelowych, w tym:

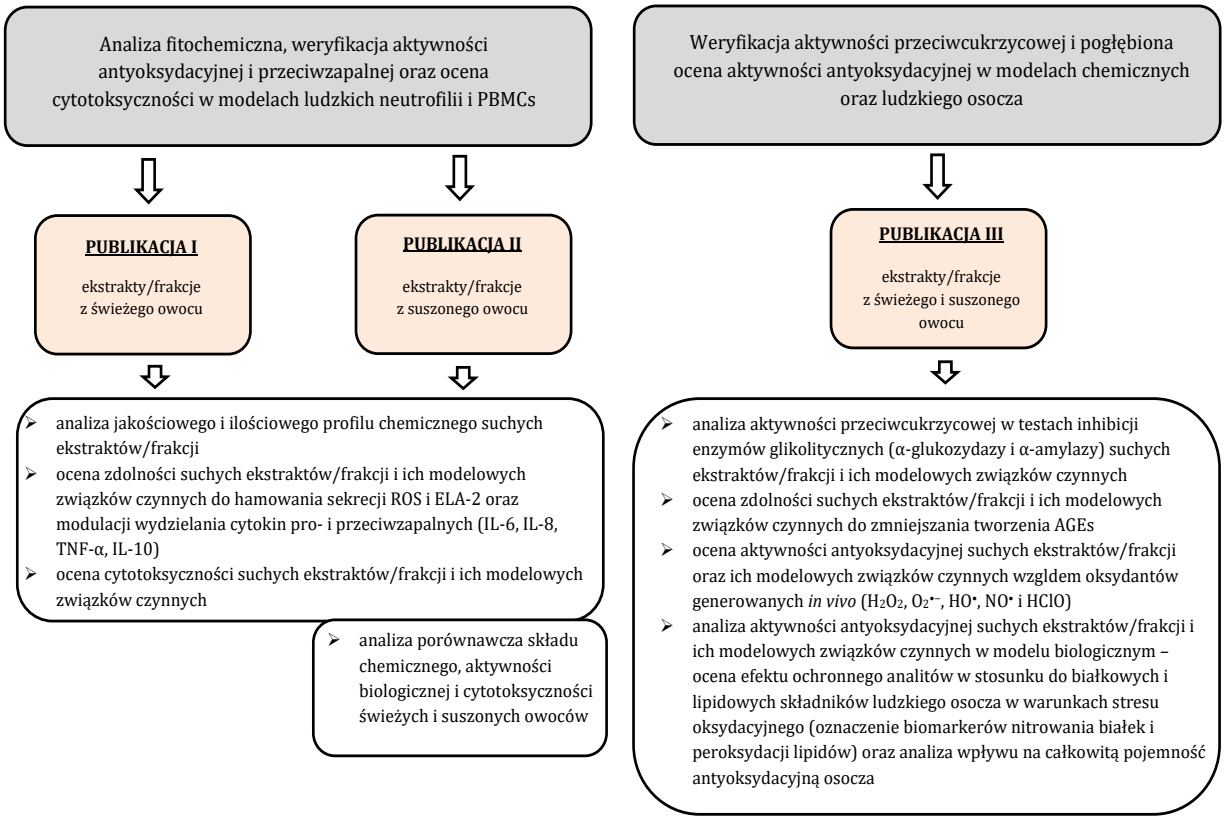
- ocena wpływu analitów na prooksydacyjne i prozapalne funkcje neutrofili (stymulowanych *f*-MLP/LPS/*f*-MLP+cytochalazyną B), tj. generowanie ROS w procesie wybuchu tlenowego oraz sekrecję enzymu prozapalnego ELA-2 i cytokin prozapalnych (IL-8, TNF-α) – **Publikacje I i II**,
- ocena wpływu analitów na pro- i przeciwzapalne funkcje jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMCs) po stymulacji LPS, w tym uwalnianie cytokin prozapalnych (IL-6 i TNF-α) i przeciwzapalnych (IL-10) – **Publikacje I i II**,
- weryfikacja zdolności analitów do bezpośredniego hamowania enzymów związanych

z trawieniem węglowodanów (α-glukozydazy i α-amylazy) – **Publikacja III**,

- weryfikacja zdolności analitów do zmiatania ROS generowanych *in vivo*, tj. H_2O_2, $O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$, $NO^{\bullet}$ i HClO – **Publikacja III**,
- ocena zdolności analitów do hamowania nieenzymatycznej glikacji białek – **Publikacja III**,
- ocena działania ochronnego analitów w stosunku do białkowych i lipidowych składników ludzkiego osocza w warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego $ONOO^-$, w tym oznaczenie biomarkerów nitrowania białek (3-NT) i peroksydacji lipidów (TBARS) oraz analiza wpływu analitów na całkowitą pojemność antyoksydacyjną osocza (NEAC) – **Publikacja III**.
- analiza porównawcza aktywności biologicznej świeżych i suszonych owoców – **Publikacja I, II i III**.

3. Analiza *in vitro* bezpieczeństwa komórkowego (potencjalnej cytotoksyczności) suchych ekstraktów/frakcji z świeżych i suszonych owoców *P. spinosa* oraz związków modelowych:

- testy przeżywalności neutrofilii i PBMCs z analizą porównawczą wpływu świeżych i suszonych owoców – **Publikacja I i II.**



Rycina 2. Ogólny schemat przeprowadzonych badań.

Część doświadczalna

1. Materiał roślinny i przygotowanie ekstraktów/frakcji

Wyjściowym materiałem badawczym wykorzystanym do analiz składu chemicznego oraz oceny parametrów aktywności biologicznej były dojrzałe owoce *P. spinosa*, które zebrano w październiku 2018 r. z krzewów naturalnie rosnących w Krasnobrodzie (w pobliżu Roztoczańskiego Parku Narodowego). Optymalny czas pozyskania owoców został wytypowany na podstawie zaleceń medycyny tradycyjnej, która sugeruje, że do sporządzania przetworów leczniczych i spożywczych zbiera się surowiec w stanie dojrzałym w październiku/listopadzie po pierwszych przymrozkach. Tożsamość taksonomiczna materiału roślinnego została potwierdzona przez dr hab. n. farm. Monikę A. Olszewską, prof. UM.

Po zbiorze surowiec podzielono na dwie części; pierwszą część poddano suszeniu w warunkach typowych dla produkcji ziołowych produktów leczniczych (suszenie konwekcyjne w temperaturze nie wyższej niż 60°C), z kolei drugą część surowca stanowiły nieprzetworzone owoce świeże. Z obu partii materiału roślinnego w pierwszym etapie przygotowano niezależne ekstrakty metanolowo-wodne (75:25, *v/v*). Następnie, mając na celu szczegółowe poznanie profilu chemicznego oraz dokładną identyfikację związków/grup związków odpowiedzialnych za weryfikowane kierunki aktywności biologicznej, a także uwzględniając, iż coraz częściej składnikami fitofarmaceutyków i żywności funkcjonalnej są ekstrakty/frakcje wysoko skoncentrowane, wyjściowe wyciągi metanolowo-wodne poddano frakcjonowanej ekstrakcji rozpuszczalnikami o wzrastającej polarności (eter dietylowy, octan etylu, *n*-butanol), uzyskując niezależne wzbogacone frakcje oraz pozostałość wodną. Do celów izolacji MRPs z suszonych owoców sporządzono odrębny ekstrakt metanolowo-wodny (75:25, *v/v*), z którego przygotowano wyłącznie frakcję octanu etylu. Szczegółowy opis dotyczący obróbki materiału roślinnego oraz metod ekstrakcji/frakcjonowania i izolacji zamieszczono w **Publikacjach I i II**.

2. Metodyka badań

2.1. Analiza profilu chemicznego

Standaryzację jakościową przeprowadzono metodą UHPLC-PDA-ESI-MS^3 z wykorzystaniem chromatografu sprzężonego ze spektrometrem mas typu pułapki jonowej. Piki polifenoli zidentyfikowano z wykorzystaniem bazy literaturowej oraz kolekcji wzorców Katedry Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, w tym wyizolowanych z kwiatów i liści tarniny (Olszewska i Wolbiś, 2001; Olszewska i Wolbiś, 2002a; Olszewska i Wolbiś, 2002b; Owczarek i wsp., 2017; Marchelak i wsp., 2020); MRPs wstępnie zidentyfikowano strukturalnie z wykorzystaniem bazy literaturowej.

Izolację MRPs przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografii preparatywnej HPLC-PDA, z kolei struktury wyizolowanych i oczyszczonych związków szczegółowo określono metodami spektroskopowymi (^{1}H NMR, ^{13}C NMR, COSY, HMBC, HMQC).

Standaryzacja ilościowa objęła m.in. oznaczenie całkowitej zawartości polifenoli metodą Folina Ciocalteu'a (wg Marchelak i wsp., 2017) oraz całkowitej zawartości garbników metodą HCl+wanilina (wg Sun i wsp., 1998). Ponadto, zawartość indywidualnych polifenoli i MRPs,

a także ich sumy, określono wg procedury opracowanej wcześniej dla kwiatów tarniny (Marchelak i wsp., 2020) i zrewalidowanej w zakresie składników typowych dla owoców.

Dokładną charakterystykę zastosowanych metod, odczynników, aparatury i warunków analiz przedstawiono w **Publikacjach I i II**.

2.2. Analiza *in vitro* aktywności biologicznej w modelach komórkowych i bezkomórkowych

Komórkową aktywność antyoksydacyjną i przeciwzapalną analitów (ekstraktów, frakcji i substancji wzorcowych) badano w modelu ludzkich neutrofilii i jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMCs). Ww. komórki układu immunologicznego były izolowane w 2019 r. (niewymagana zgoda Komisji Bioetycznej) przez sedymentację dekstranem, hipotoniczną lizę erytrocytów i wirowanie w gradiencie Ficoll-Hypaque z kożuszków leukocytarno-płytkowych uzyskanych komercyjnie w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (RCKK) w Warszawie, jak opisano wcześniej (Michel i wsp., 2019; Olszewska i wsp., 2020). Zdolność do zmniejszania wytwarzania ROS przez neutrofile stymulowane *f*-MLP (*N*-formylo-metionylo-leucylo-fenylo-alaniną) analizowano metodą chemiluminescencyjną z zastosowaniem luminolu jako luminoforu (wg Michel i wsp., 2019). Wpływ na hamowanie uwalniania prozapalnego enzymu elastazy (ELA-2) przez stymulowane *f*-MLP+cytochalazyną B neutrofile badano spektrofotometrycznie poprzez monitorowanie poziomu *p*-nitrofenolu powstałego z substratu, którym był *N*-sukcynylo-alanino-alanino-walinino-*p*-nitroanilid, wg zmodyfikowanej, wcześniej opublikowanej procedury (Michel i wsp., 2019). Wpływ analitów na wydzielanie IL-8 i TNF-α przez neutrofile stymulowane LPS oraz wpływ na sekrecję IL-6, TNF-α i IL-10 przez PBMCs stymulowane LPS analizowano metodami immunoenzymatycznymi (ELISA) z wykorzystaniem testów komercyjnych (**Publikacje I i II**).

Potencjalne działanie przeciwcukrzycowe zweryfikowano w testach inhibicji enzymów glikolitycznych (α-glukozydazy i α-amylazy) oraz w teście zahamowania tworzenia zaawansowanych produktów glikacji (AGEs). Zdolność do inhibicji α-glukozydazy została sprawdzona w oparciu o spektrofotometryczny pomiar poziomu *p*-nitrofenolu jako produktu powstałego z α–D–glukopiranozydu-*p*-nitrofenolu na skutek działania enzymu. Z kolei aktywność hamującą α-amylazę oceniono metodą fluorescencyjną (wg Truba i wsp., 2020) przy użyciu komercyjnego zestawu EnzChek™ Ultra Amylase Assay Kit. Metoda ta opierała się na pomiarze fluorescencyjnych produktów powstałych po hydrolitycznym rozszczepieniu przez enzym substratu skrobiowego DQ™ (znakowanego barwnikiem BODIPY® FL o wygaszonej fluorescencji). Wpływ analitów na nieenzymatyczną glikację białek sprawdzony został wg Rutkowskiej i wsp. (2021) przez fluorymetryczne oznaczenie poziomu AGEs w środowisku surowiczej albuminy bydlęcej (BSA) i fruktozy (**Publikacja III**).

Zweryfikowano również aktywność antyoksydacyjną analitów wobec najważniejszych niskocząsteczkowych ROS odpowiadających *in vivo* za generowanie stresu oksydacyjnego i jego konsekwencji funkcjonalnych, w tym m.in. powikłań naczyniowych cukrzycy, tj. $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2, $NO^{\bullet}$, HClO i $HO^{\bullet}$ – badania prowadzono przy pomocy zmodyfikowanych spektro/fluorymetrycznych metod *in vitro*. Zdolność do zmiatania $O_2^{\bullet-}$ oceniono poprzez pomiar stężenia zredukowanych form błękitu nitrotetrazoliowego (NBT) wytworzonych w reakcji NBT z $O_2^{\bullet-}$, powstałym w reakcji oksydazy ksantynowej z ksantyną (wg Granica i wsp. 2013). Zdolność do wychwytywania H_2O_2 analizowano w teście tworzenia

chinonoiminy w obecności peroksydazy chrzanowej, katalizującej reakcję fenolu, 4-aminoantypiryny i H_2O_2 (wg Fernando i Soysa, 2015). Zdolność do zmiatania NO• oceniono poprzez pomiar poziomu triazofluoresceiny powstałej w wyniku reakcji 4,5-diamino-fluoresceiny z NO• (wg Czerwińska i wsp., 2012). Efekt zmiatania HOCl określono poprzez zbadanie poziomu kwasu 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoesowego, będącego produktem utleniania kwasu 5-tio-2-nitrobenzoesowego w obecności HClO (wg Czerwińska i wsp., 2012). Zdolność do zmiatania HO• analizowano przez ocenę poziomu dihydroksypochodnych kwasu benzoesowego, powstałych w reakcji kwasu salicylowego z HO•, generowanego w reakcji nadtlenku wodoru i jonów żelaza (II) (wg Fu i wsp., 2014) (**Publikacja III**).

Efekt protekcyjny badanych analitów w stosunku do składników ludzkiego osocza w warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego $ONOO^-$ weryfikowano spektro/fluorymetrycznie i immunoenzymatycznie. Analizowano wpływ analitów na poziomy biomarkerów stresu oksydacyjnego powstające w wyniku uszkodzeń białek i lipidów osocza, tj. poziom 3-nitro-tyrozyny (3-NT) wg Olas i wsp. (2006) oraz poziom substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) wg Gay i Gebicki (2000) i Kołodziejczyk-Czepas i wsp. (2011, 2017). Ponadto sprawdzono wpływ analitów na nieenzymatyczną pojemność antyoksydacyjną osocza (NEAC) mierząc zdolność osocza do redukcji jonów żelaza (III) (metodą FRAP) wg Kołodziejczyk-Czepas i wsp. (2014) (**Publikacja III**).

Bezpieczeństwo komórkowe (potencjalną cytotoksyczność) analitów wobec neutrofili i PBMCs analizowano cytometrycznie oceniając przeżywalność ww. komórek metodą barwienia jodkiem propidyny kwasów nukleinowych uwolnionych z uszkodzonych jąder martwych komórek (**Publikacja I i II**).

Badania w modelach bezkomórkowych były prowadzone w min. 5 stężeniach ekstraktów/frakcji z wyznaczeniem wartości IC_{50}/SC_{50}. Badania w modelach biologicznych wykonano w min. 3 stężeniach ekstraktów/frakcji w zakresie 1-100 μg/mL, obejmujących zarówno zakresy fizjologiczne dla polifenoli w osoczu (1-5 μg/mL), jak i wyższe w celu uchwycenia wszystkich możliwych efektów działania. Wszystkim testom aktywności poddano także związki modelowe dla dominujących grup składników owoców tarniny (kwas chlorogenowy dla fenolokwasów; kwercetynę i izokwercytrynę, tj. 3-*O*-glukozyd kwercetyny, dla flawonoidów; 3-*O*-glukozyd cyjanidyny dla antocyjanów; procyjanidynę B2 dla procyjanidyn i garbników; oraz 5-hydroksymetylofurfural dla MRPs). Ponadto, w testach aktywności biologicznej stosowano kontrolę pozytywną w postaci substancji referencyjnych o odpowiednim typie działania, stosowanych jako komponenty aktywne produktów leczniczych, tj. akarabozę (lek diabetologiczny), kwas askorbinowy (przeciwutleniacz) oraz deksametazon (glikokortykosteroid o działaniu przeciwzapalnym) (**Publikacje I, II, III**).

2.3. Ocena statystyczna wyników

Wyniki uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej były weryfikowane pod kątem istotności statystycznej różnic i korelacji na poziomie istotności min. $\alpha = 0.05$ przy pomocy programu Statistica13Pl (StatSoft). Szczegółowe informacje odnoszące się do zastosowanych testów statystycznych przedstawiono w załączonych publikacjach (**Publikacje I, II, III**).

Realizacja celów naukowych – wyniki i dyskusja

1. Analiza profilu chemicznego suchych ekstraktów uzyskanych ze świeżych i suszonych owoców *P. spinosa*

Na podstawie wstępnych analiz optymalizacyjnych (doboru właściwych ekstrahentów) oraz uwzględniając wyniki wcześniejszych badań dotyczących owoców *P. spinosa* (Barros i wsp., 2010; Guimarães i wsp., 2013; Mikulic-Petkovsek i wsp., 2016), do badań fitochemicznych i aktywności biologicznej z materiału świeżego i suszonego przygotowano niezależnie wyjściowe ekstrakty metanolowo-wodne (75:25, *v/v*), a następnie, stosując ekstrakcję frakcjonowaną, także ich frakcje octanu etylu, eteru dietylowego i *n*-butanolu. Liczne publikacje naukowe wskazują, że frakcjonowana ekstrakcja rozpuszczalnikami o różnej polarności pozwala na przygotowanie frakcji wzbogaconych w poszczególne związki/grupy związków, a tym samym ułatwia z jednej strony identyfikację jakościową składników obecnych w surowcu, z drugiej zaś umożliwia ocenę wpływu poszczególnych komponentów na działanie farmakologiczne surowca (Marchelak i wsp., 2017; Olszewska i wsp., 2020; Rutkowska i wsp. 2021).

Przeprowadzona w ramach niniejszej dysertacji szczegółowa analiza jakościowa LC-PDA-ESI-MS^3, umożliwiła identyfikację po raz pierwszy składników obecnych w suszonych owocach, a ponadto znacznie zwiększyła wiedzę na temat związków czynnych świeżych owoców tarniny. Dzięki koncentracji analitów i dysponowaniu szeroką paletą substancji wzorcowych określono strukturę łącznie 57 i 45 składników polifenolowych, odpowiednio w świeżym i suszonym materiale roślinnym. Pośród zidentyfikowanych polifenoli znajdowały się kwasy fenolowe, pochodne kwasów kawoilo- i feruilochinowego, kawoiloszikimowego, benzoesowego i cynamonowego; glikozydy flawonolowe, w tym rzadko występujące w przyrodzie mono- i dipentozydy kwercetyny i kemferolu; jak również antocyjaniny, glikozydy cyjanidyny i peonidyny). Sumarycznie udało się wykryć 35 nowych związków polifenolowych dla owoców tarniny, wnosząc tym samym istotną nowość w zakresie fitochemii tego surowca. Generalnie, suszone owoce charakteryzowały się mniejszą różnorodnością w obrębie składników polifenolowych niż owoce świeże – podczas obróbki termicznej doszło do utraty 19 składników i pojawienia się tylko 7. Polifenole uległy całkowitemu lub częściowemu rozkładowi w wyniku, m.in., rozszczepienia wiązań glikozydowych, izomeryzacji, depolimeryzacji, czy oksydacyjnego sprzęgania.

W przypadku świeżych owoców, całkowita zawartość polifenoli w ekstraktach/frakcjach mieściła się w zakresie 64,6–126,5 mg GAE/g s.m. w oznaczeniach wykonanych metodą Folina–Ciocalteu (TPC) oraz 6,1–104,0 mg/g s.m. w pomiarach przeprowadzonych techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (TPH). Z kolei w ekstraktach/frakcjach uzyskanych z suszonych owoców TPC wyniosło 26,8–124,0 mg GAE/g s.m., natomiast TPH oscylowało w przedziale 9,6–109,1 mg/g s.m. Niniejsze badania wykazały po raz pierwszy, że owoce tarniny suszone w warunkach typowych dla produkcji leków ziołowych zawierają niższe poziomy wszystkich rodzajów polifenoli w porównaniu ze świeżymi owocami. Najbardziej dramatycznie zmieniły się zawartości antocyjanów i proantocyjanidyn, a ich łączny poziom w suszu spadł, odpowiednio, o prawie 100% i 76%. Niemniej jednak, oznaczone poziomy TPC w świeżych (1,37 g GAE/100 g ś.m.) oraz suszonych owocach tarniny (0,55 g/100 g ś.m.) były porównywalne lub przekroczyły wartości TPC podawane literaturowo dla innych owoców cenionych ze względu na właściwości prozdrowotne

w kontekście chorób cywilizacyjnych, jak np. żurawina (0,45 g/100 g), czarne jagody (0,13 g/ 100 g), czy aronia (ok. 1,01 g/100 g) (Mikulic-Petkovsek i wsp., 2012).

Głównymi składnikami wyjściowego ekstraktu metanolowo-wodnego otrzymanego ze świeżego materiału roślinnego (MEF), a tym samym głównymi polifenolami świeżych owoców, były garbniki (skondensowane procyjanidyny), a następnie kwasy fenolowe, antocyjany i flawonoidy. Z kolei w ekstrakcie metanolowo-wodnym uzyskanym z suszonych owoców (MED) głównymi związkami były kwasy fenolowe i garbniki, następnie flawonoidy, natomiast antocyjany znajdowały się poniżej granic wykrywalności (LOD). Podział MEF pomiędzy rozpuszczalniki o różnej polarności doprowadził do skoncentrowania antocyjanów we frakcji *n*-butanolu (BFF), flawonoidów głównie we frakcji eteru dietylowego (DEFF), kwasów fenolowych we frakcjach octanu etylu (EAFF) i DEFF, zaś garbników w pozostałości wodnej (WRF). Z kolei frakcjonowanie MED przyczyniło się do koncentracji kwasów fenolowych we frakcjach eteru dietylowego (DEFD), octanu etylu (EAFD) i *n*-butanolu (BFD), garbników w pozostałości wodnej (WRD), a flawonoidów głównie w DEFD. Antocyjany znaleziono w śladowych ilościach tylko w BFD.

Suszone owoce tarniny charakteryzowały się także obecnością trzech MPRs powstałych w wyniku reakcji Maillarda, w tym 3-hydroksy-2,3-dihydromaltolu, 5-hydroksymetylofurfuralu (HMF) i (5-hydroksymetylofur-2-ylo)-metoksymetanolu. Dwa ostatnie związki musiały zostać wyizolowane w celu przeprowadzenia identyfikacji strukturalnej. Wszystkie MRPs zostały po raz pierwszy wykryte w owocach *P. spinosa*, lecz wcześniej zidentyfikowano je w wielu udomowionych gatunkach *Prunus* (Madrau i wsp., 2010). MRPs występują także powszechnie w innych produktach spożywczych, tj. różnych suszonych owocach, sokach owocowych, kawie, miodach, czy produktach piekarniczych. Z uwagi na potencjalną wysoką ekspozycję na te związki oraz niepokojące wyniki wstępnych badań toksykologicznych (w modelach komórkowych oraz zwierzęcych), które sygnalizowały, iż MRPs mogą charakteryzować się działaniem hepato-, nefro-, cyto- i genotoksycznym (Abraham i wsp., 2011; Pastoriza de la Cueva i wsp., 2017; Choudhary i wsp., 2021), zalecane jest, by ich zawartość w przetworzonej żywności była monitorowana. W związku z tym, w ramach niniejszej pracy doktorskiej określono zawartość ww. składników w suszonych owocach tarniny przy pomocy metody HPLC-PDA (zrewalidowanej metody wg. Marchelak i wsp., 2020, wykorzystywanej także do analizy zawartości polifenoli w badanym materiale). Zawartość MRPs w owocach tarniny wynosiła 460 mg/kg s.m., co mieściło się w dolnym przedziale szerokiego zakresu 1-2200 mg/kg s.m., raportowanego w literaturze dla innych, powszechnie spożywanych suszonych owoców, uznawanych za bezpieczne, takich jak jabłka, morele, daktyle czy śliwki (Murkovic i Pichler, 2006; Madrau i wsp., 2010; Shapla i wsp., 2018).

2. Analiza *in vitro* aktywności biologicznej suchych ekstraktów ze świeżych i suszonych owoców *P. spinosa*

Mając na uwadze, że świeże i suszone owoce tarniny posiadają status tradycyjnej roślinnej substancji leczniczej, polecanej w terapii stanów zapalnych przewodu pokarmowego (Alarcón i wsp., 2015), a także uwzględniając krytyczną rolę, jaką przypisuje się komórkom układu immunologicznego, tj. neutrofilom i PBMCs, w patogenezie i progresji chorób zapalnych przewodu pokarmowego, w tym chronicznych, nieswoistych zapaleń jelit (Zhang

i wsp., 2018), w pierwszym etapie badań aktywności biologicznej oceniono wpływ ekstraktów z owoców tarniny oraz związków modelowych na sekrecję przez neutrofile i PBMCs wybranych, kluczowych mediatorów stanu zapalnego, tj. ROS, ELA-2, TNF-α, IL-8, IL-6 i IL-10. Otrzymane wyniki dla poszczególnych ekstraktów/frakcji uzyskanych zarówno z owocu świeżego, jak i suszonego, a także efekty zaobserwowane dla modelowych związków polifenolowych oraz przeprowadzone analizy korelacji, wyraźnie wskazywały na związek pomiędzy aktywnością ekstraktów/frakcji a zawartością polifenoli. Zasadniczo najbardziej aktywnymi analitami były frakcje eteru dietylowego (DEFF, DEFD) i octanu etylu (EAFF, EAFD) o najwyższych wartościach TPC i TPH, wzbogacone w kwasy fenolowe i flawonoidy. Wysoką skutecznością odznaczała się także frakcja *n*-butanolu z owocu świeżego (BFF), która charakteryzowała się najwyższą zawartością antocyjanów. Badane ekstrakty/frakcje najskuteczniej hamowały sekrecję ROS, prozapalnych ELA-2 i TNF-α oraz nasilały wydzielanie przeciwzapalnej IL-10. Tytułem przykładu: wszystkie ekstrakty/frakcje, uzyskane zarówno z owocu świeżego, jak i suszonego, obniżały poziom ROS przynajmniej o 69% w stężeniu 100 μg/mL, zaś DEFF, DEFD, EAFF i EAFD o co najmniej 93% przy 100 μg/mL i 43% przy 2,5 μg/mL. W teście inhibicji sekrecji ELA-2, podobnie, wszystkie badane anality cechowały się wysoką skutecznością, przy czym najbardziej aktywne frakcje (DEFF, DEFD, EAFF, EAFD i BFF) zmniejszały produkcję ELA-2 o 38-58% już w stężeniu 5 μg/mL. W przypadku hamowania wydzielania TNF-α najwyraźniejsze efekty zaobserwowano dla ekstraktów/frakcji badanych w stężeniach 50-100 μg/mL, przy czym najskuteczniejsze anality (DEFF, DEFD, EAFF, EAFD i BFF) w stężeniu 100 μg/mL obniżały sekrecję tego czynnika o 35-75%. Frakcje DEFF, DEFD, EAFF i EAFD w stężeniu 100 μg/mL nasilały także wytwarzanie przeciwzapalnej IL-10 o 20-50%. Jak pokazują przedstawione wyniki, badane ekstrakty/frakcje charakteryzowały się bardzo wysoką skutecznością modulacji wydzielania mediatorów stanu zapalnego, zarówno w stężeniach 1–5 μg/mL, które są nominalnie osiągalne w osoczu, jak i tych występujących w przewodzie pokarmowym (25–100 μg/mL) po podaniu doustnym bogatych w polifenole produktów (Scalbert i Williamson, 2000; Manach i wsp., 2005), można zatem oczekiwać, iż mogą one łagodzić stan zapalny zarówno ogólnoustrojowo, jak i lokalnie w przewodzie pokarmowym. Generalnie, ekstrakty/frakcje uzyskane z suszonych owoców wykazywały nieco mniejszą aktywność niż te z owoców świeżych. Analiza uzyskanych efektów wskazuje, iż kluczowe znaczenie dla osłabienia działania ekstraktów/frakcji suszonych owoców miała degradacja antocyjanów i zmniejszenie stężenia garbników. Na przykład w testach wydzielania ROS i TNF-α przez neutrofile ekstrakty/frakcje, w których zawartość antocyjanów i garbników zmniejszyła się najbardziej były, odpowiednio, do 19% i 21% mniej aktywne w porównaniu do odpowiednich frakcji świeżych owoców. Z drugiej strony, częściowa degradacja flawonoidów była prawdopodobnie odpowiedzialna za słabsze działanie frakcji pozbawionych antocyjanów i procyjanidyn. Na przykład spadek zawartości flawonoidów w DEFD w porównaniu z DEFF skutkowało słabszą stymulacją produkcji IL-10 w PBMCs. Jednakże stwierdzone różnice w aktywnościach pomiędzy ekstraktami z owoców suszonych i świeżych nie były krytyczne, a suszony materiał roślinny zachował zdolność do istotnego modulowania odpowiedzi zapalnej w obydwu typach komórek odpornościowych.

Po raz pierwszy oceniono także wpływ HMF (przedstawiciel MRPs obecnych w suszonych owocach) na funkcje prozapalne i prooksydacyjne ludzkich neutrofili i PBMCs. Dostępne dane literaturowe sugerują, iż poza wcześniej wspomnianymi efektami toksycznymi, HMF posiada

także słabe właściwości antyoksydacyjne oraz znaczącą aktywność przeciwzapalną, które jednak udokumentowano, jak dotąd, wyłącznie na modelach komórek zwierzęcych (Kong i wsp., 2019; Uchida i wsp., 2020). W ramach prezentowanej dysertacji, wykazano, iż ww. związek w stężeniach 5-50 μM (0,63-6,3 μg/mL) zmniejszał wytwarzanie ROS w neutrofilach o ok. 15%. W najwyższym testowanym stężeniu (50 μM), HMF nieznacznie (o 9-15%) zmniejszał również wydzielanie niektórych czynników prozapalnych przez badanie komórki, w tym ELA-2, IL-6 i IL-8. Odnośnie wydzielania TNF-α, efekty HMF były różne w zależności od typu komórki. Wydzielanie tej cytokiny wzrastało w neutrofilach (o 24% przy 50 μM), ale spadało w PBMC (do 40% przy 50 μM), co może być spowodowane różnicami w mechanizmach biosyntezy/sekrecji cytokin w różnych komórkach. Ponadto HMF znacząco hamował uwalnianie przeciwzapalnej cytokiny IL-10 z PBMCs (nawet o 29% w stężeniu 50 μM). Co ciekawe, frakcja DEFD, charakteryzująca się najwyższą zawartością HMF i MRPs, wykazywała odwrotną tendencję w kontekście modulacji wydzielania IL-10, co sugeruje, że wpływ tych związków na działanie suszonych owoców tarniny pod względem wydzielania IL-10 można uznać za znikomy i zniwelowany przez obecność składników polifenolowych. Z drugiej strony, HMF może być współodpowiedzialny za zmniejszone uwalnianie TNF-α w PBMCs pod wpływem ekstraktów z owoców *P. spinosa*.

Drugi etap analiz aktywności biologicznej obejmował weryfikację zasadności wskazań etnomedycyny, co do pomocniczego stosowania owoców tarniny w terapii cukrzycy (Kültür, 2007). Ten etap badań przebiegał kilkupoziomowo. W pierwszej kolejności zbadano zdolność ekstraktów/frakcji ze świeżych i suszonych owoców do inhibicji enzymów glikolitycznych – α-glukozydazy i α-amylazy. Enzymy te odpowiadają za hydrolizę węglowodanów złożonych w jelicie; tym samym, zahamowanie ich aktywności opóźnia proces trawienia, a więc prowadzi do zmniejszenia uwalniania glukozy i w konsekwencji ogranicza wzrost jej poposiłkowego stężenia we krwi (Lovegrove i wsp., 2017).

Wszystkie przebadane ekstrakty/frakcje, zarówno te otrzymane ze świeżego, jak i z suszonego materiału roślinnego, odznaczały się większą zdolnością do inhibicji α-glukozydazy niż referencyjny lek przeciwcukrzycowy – akarboza. Najbardziej aktywne były wyjściowy ekstrakt metanolowo-wodny ze świeżych owoców (MEF) oraz DEFF i DEFD. Ich wartości IC_{50} wynosiły 15,4-26,8 μg/mL i tym samym były aż 6,6-11,5 razy niższe niż w przypadku akarbozy. W tym miejscu warto zauważyć, iż dostępna literatura naukowa wskazuje tylko kilka gatunków owoców, których wartości IC_{50} w teście inhibicji α-glukozydazy są niższe lub plasują się na podobnym poziomie co IC_{50} akarbozy. Takie efekty osiągnięto jak dotąd m.in. dla ekstraktów alkoholowych z morwy białej (Wang i wsp., 2013), rokitnika zwyczajnego (Li i wsp., 2019), kilku gatunków dereni (Truba i wsp., 2020), brzoskwini zwyczajnej (Bento i wsp., 2018) i czereśni (Papoutsis i wsp., 2021). Z kolei w teście inhibicji α-amylazy, ekstrakty/frakcje z owoców tarniny wykazały się przeciętną aktywnością – najaktywniejsze ekstrakty/frakcje ze świeżych owoców (MEF, DEFF, EAFF) hamowały enzym 7-14 razy słabiej niż lek referencyjny.

Zważywszy na fakt, iż nadprodukcja ROS modyfikuje główne procesy biochemiczne, stanowiące podłoże patogenetyczne mikro- i makronaczyniowych powikłań cukrzycowych, m.in. szlak polioliowy i heksozaminowy, a także aktywację kinazy białkowej C i jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-κB (Giacco i Brownlee 2010), w kolejnym kroku po raz pierwszy oceniono aktywność ekstraktów/frakcji ze świeżych i suszonych owoców tarniny

wobec szeregu rodnikowych i nierodnikowych oksydantów generowanych *in vivo*, w tym $O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$, H_2O_2, $NO^{\bullet}$ i HOCl. Tym samym etap ten stanowił także uszczegółowienie przeprowadzonych badań aktywności antyoksydacyjnej w modelu ludzkich neutrofilii. Wykazano wysoki, zależny od dawki i skorelowany z zawartością polifenoli potencjał neutralizacyjny ekstraktów/frakcji z owoców świeżych i suszonych względem wszystkich badanych ROS, przy czym najwyższą efektywność zaobserwowano w stosunku do $NO^{\bullet}$, HOCl i $O_2^{\bullet-}$. Na przykład wartości SC_{50} dla wszystkich ekstraktów (wyjątek WRD) w teście zmiatania $O_2^{\bullet}$ były 1,3-4,6 razy niższe niż wartość SC_{50} dla Troloxu (kontrola pozytywna). Wartości SC_{50} wyrażone w µg GAE/mL dla wszystkich frakcji (przeliczone na podstawie oryginalnych parametrów aktywności przeciwutleniającej i zawartości TPC) wykazały, że polifenole owoców tarniny są skuteczne nawet przy bardzo niskich stężeniach. W wyżej przytoczonym w teście zmiatania $O_2^{\bullet-}$ wartości SC_{50} wyniosły 2,7-7,0 µg GAE/mL, podczas gdy odpowiednie parametry dla kwasu askorbinowego i Troloxu® (kontrole pozytywne) wyniosły odpowiednio 5,3 µg/mL i 135,3 µg/mL. Podobnie, jak w teście sekrecji ROS w modelu ludzkich neutrofilii, we wszystkich testach bezkomórkowych najsilniejsze efekty przeciwutleniające stwierdzono dla DEFF, DEFD, EAFF i EAFD.

Idąc dalej w rozważaniach dotyczących wpływu nadprodukcji ROS na rozwój przewlekłych powikłań cukrzycy nie sposób nie wspomnieć, iż w warunkach ponadfizjologicznych stężeń glukozy przyspieszają one glikację białek, lipidów i tworzenie AGEs. I tak, na przykład w następstwie glikacji kolagenu odpowiedzialnego za strukturę błony podstawnej naczyń, dochodzi do utraty elastyczności ściany naczyniowej – zmiany angiopatycznej typowej dla niewyrównanej metabolicznie cukrzycy. Co więcej, związanie się AGEs ze swoistym receptorem końcowych produktów zaawansowanej glikacji staje się sygnałem, m.in., dla aktywacji prozapalnych i prooksydacyjnych czynników transkrypcyjnych oraz szlaków sygnałowych, co dalej pogłębia zjawisko stresu oksydacyjnego (Tan i wsp., 2011; Singh i wsp., 2014). Zatem mając na względzie powyższe, w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej oceniono zdolność ekstraktów/frakcji ze świeżych i suszonych owoców *P. spinosa* do hamowania nieenzymatycznej glikacji białek. Wszystkie badane anality zapobiegały powstawaniu AGEs, a ich skuteczność była porównywalna lub wyższa niż referencyjnej aminoguanidyny (substancji o właściwościach przeciwglikacyjnych). Najefektywniejsze okazały się ekstrakt i frakcja ze świeżego owocu bogate w antocyjany i procyjanidyny – MEF oraz BFF.

W ostatnim etapie badawczym, zweryfikowano ochronne działanie ekstraktów/frakcji z owoców tarniny przed oksydacyjnym uszkodzeniem biomolekuł ludzkiego osocza w warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego $ONOO^-$, który jest najbardziej toksyczną formą ROS powstającą w środowisku hiperglikemicznym. Po wygenerowaniu, $ONOO^-$ indukuje strukturalne modyfikacje funkcjonalnych białek i lipidów w śródbłonku naczyń, mięśniach gładkich naczyń i osoczu, w tym nitrację i dimeryzację reszt tyrozyny, utlenianie grup tiolowych cysteiny i peroksydację lipidów, co ostatecznie prowadzi do przewlekłych dysfunkcji sercowo-naczyniowych (Pacher i Szabó, 2006). Po wnikliwej ocenie wyników uzyskanych z testów hamowania enzymów glikolitycznych, inhibicji tworzenia AGEs oraz zmiatania ROS, które wskazywały, że świeże owoce tarniny charakteryzuje silniejszy efekt farmakologiczny, do ostatniego etapu badań szczegółowych wybrano ekstrakt i frakcje ze świeżego materiału roślinnego. Ponadto, dla ogólnego porównania analizom poddano także

wyjściowy metanolowo-wodny ekstrakt z owoców suszonych. Wykazano, że badane ekstrakty/frakcje skutecznie zwiększały całkowitą, nieenzymatyczną pojemność antyoksydacyjną ludzkiego osocza (NEAC) oraz wykazywały efekt ochronny wobec składników osocza, wyrażony poprzez obniżenie stężenia biomarkerów osoczowego stresu oksydacyjnego, takich jak produkty nitrowania białek oraz peroksydacji lipidów. Najefektywniejszymi środkami chroniącymi osocze okazały się ponownie ekstrakty/frakcje o najwyższej zawartości fenoli (DEFF, EAFF, MEF), zwłaszcza te wzbogacone w kwasy fenolowe i flawonoidy (DEFF, EAFF). Szczególnie silne efekty biologiczne zaobserwowano w teście redukcji nitrowania tyrozyny, gdzie stwierdzono, iż testowane anality w stężeniach fizjologicznych (1-5 μg/mL) są w stanie zmniejszyć poziomy markerów nitrowania nawet o ponad 40%. W przypadku testów weryfikujących działanie przeciwcukrzycowe i ochronne przeciwko stresowi oksydacyjnemu, analizy korelacji oraz wyniki otrzymane dla modelowych polifenoli jednoznacznie wskazują, iż związki fenolowe są głównymi determinantami tych kierunków aktywności owoców tarniny. Przedstawiciel MRPs – HMF – nie wykazywał efektów biologicznych w ww. analizach.

Wielowiekowe zastosowanie owoców *P. spinosa* w lecznictwie tradycyjnym jest niewątpliwie potwierdzeniem bezpieczeństwa jego leczniczego stosowania. Niemniej jednak ze względu na możliwe, terapeutyczne wykorzystanie ekstraktów/frakcji z badanego surowca w ich skoncentrowanej postaci, w ramach prezentowanej dysertacji przeprowadzona została ocena ich potencjalnej toksyczności wobec neutrofilii i PBMCs. Nie stwierdzono aby 24-48-godzinna ekspozycja komórek układu immunologicznego na ekstrakty/frakcje z owoców tarniny w stężeniach 5-100 μg/mL wpłynęła na ich żywotność, co pozwala wstępnie uznać badane anality za bezpieczne.

Podsumowanie wyników

W ramach realizacji rozprawy doktorskiej:

- wykazano zależność pomiędzy profilem fitochemicznym otrzymanych ekstraktów/frakcji, a rodzajem zastosowanego ekstrahenta;
- wyselekcjonowano ekstrakty/frakcje z owocu świeżego i suszonego o najwyższej całkowitej zawartości polifenoli oraz frakcje wzbogacone w odpowiednie związki lub grupy związków polifenolowych;
- wykazano, iż zarówno świeże, jak i suszone owoce tarniny charakteryzuje bogaty i złożony profil polifenolowy, dokonano całkowitej lub częściowej identyfikacji 57 i 45 związków z tej grupy, odpowiednio dla owocu świeżego i suszonego, w tym 35 składników wykryto po raz pierwszy w badanym materiale roślinnym;
- wykazano istotne zmiany w składzie jakościowym i ilościowym polifenoli świeżej i wysuszonej substancji roślinnej;
- wykazano, iż podczas suszenia owoców tarniny dochodzi także do powstania MRPs, dokonano ich izolacji w skali preparatywnej i oznaczono struktury, a ponadto przeprowadzono ocenę zawartości sumy MRPs oraz ich głównego składnika – HMF;
- przeprowadzono optymalizację i rewalidację metody HPLC-PDA-fingerprint analizy związków polifenolowych i niepolifenolowych, która może znaleźć zastosowanie w kontroli jakości świeżych i suszonych owoców *P. spinosa* oraz pochodnych ekstraktów;
- w modelach ludzkich neutrofilii oraz PBMCs *ex vivo* wykazano wysoki potencjał przeciwzapalny i antyoksydacyjny (w szczególności hamowanie sekrecji ROS, ELA-2 i TNF-α oraz nasilanie wydzielania IL-10) badanych ekstraktów/frakcji z owoców świeżych i suszonych oraz modelowych związków czynnych wchodzących w ich skład;
- w modelach chemicznych *in vitro* wykazano wysoką zdolność ekstraktów/frakcji oraz ich głównych składników do bezpośredniej inhibicji enzymów glikolitycznych (w szczególności α-glukozydazy);
- wykazano *in vitro*, że ekstrakty/frakcje z owoców świeżych i suszonych oraz ich markery aktywne cechuje zdolność do efektywnego zmiatania szerokiego spektrum oksydantów operujących *in vivo*, tj. $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2, $NO^{\bullet}$, HClO i $HO^{\bullet}$;
- w modelu chemicznym *in vitro* wykazano wysoką zdolność ekstraktów/frakcji z owoców świeżych i suszonych oraz ich markerów aktywnych do hamowania nieenzymatycznej glikacji białek;
- wykazano ochronny wpływ ekstraktów/frakcji z owoców świeżych oraz ich modelowych związków czynnych na białkowe i lipidowe składniki ludzkiego osocza oraz ich zdolność do zwiększania nieenzymatycznej pojemności antyoksydacyjnej osocza w warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego $ONOO^-$;
- wykazano brak działania cytotoksycznego ekstraktów/frakcji z owoców świeżych i suszonych i ich markerów aktywnych wobec ludzkich neutrofilii i PBMCs w badanym

zakresie stężeń;

- po raz pierwszy przeprowadzono ocenę aktywności i cytotoksyczności w ww. modelach biologicznych przedstawiciela MRPs – HMF;
- dokonano porównawczej oceny aktywności biologicznej ekstraktów/frakcji z owoców świeżych oraz suszonych, która wykazała, iż zarówno świeży jak i suszony materiał roślinny charakteryzuje się znacznym potencjałem farmakologicznym, chociaż świeże owoce w większości testów cechowała wyższa skuteczność;
- wysoką i wielokierunkową aktywność biologiczną ekstraktów/frakcji z owoców świeżych i suszonych wykazano zarówno dla stężeń potencjalnie możliwych do osiągnięcia ogólnoustrojowo, jak i lokalnie w przewodzie pokarmowym.

Wnioski

- Świeże i suszone owoce *P. spinosa* stanowią bogate źródło zróżnicowanych strukturalnie związków polifenolowych, w tym kwasów fenolowych, skondensowanych procyjanidyn, flawonoidów i antocyjanów, które w znacznym stopniu warunkują aktywność antyoksydacyjną i przeciwzapalną ekstraktów z owoców oraz ich zdolność do hamowania aktywności enzymów glikolitycznych i tworzenia zaawansowanych produktów glikacji białek.
- Suszenie świeżego materiału roślinnego znacząco obniża zawartość polifenoli, indukuje zmiany ich profilu jakościowego i prowadzi do powstania produktów reakcji Maillarda, co ostatecznie skutkuje osłabieniem aktywności biologicznej owoców suszonych w stosunku do owoców świeżych, które tym samym powinny być preferowane do zastosowań leczniczych i funkcjonalnych.
- Zaobserwowana zdolność ekstraktów z owoców tarniny do hamowania sekrecji ROS, ELA-2 i TNF-α oraz stymulacji wydzielania IL-10 przez komórki układu immunologicznego, jak również zdolność do bezpośredniej neutralizacji szerokiej palety oksydantów operujących *in vivo*, działanie ochronne na składniki ludzkiego osocza w warunkach stresu ochronnego i hamowanie aktywności α-glukozydazy i procesu glikacji białek mogą częściowo wyjaśniać i uzasadniać wskazania medycyny tradycyjnej w zakresie stosowania przetworów z owoców w stanach zapalnych przewodu pokarmowego i cukrzycy.
- Uzyskane wyniki wskazują na wysoką wartość ekstraktów z owoców *P. spinosa* w kontekście potencjalnej profilaktyki i terapii uzupełniającej CDs i mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych, rozszerzonych badań fitochemicznych, farmakologicznych i toksykologicznych, koniecznych do dokonania pełnej charakterystyki surowca, weryfikacji jego skuteczności terapeutycznej i bezpieczeństwa stosowania, a ostatecznie do opracowania wartościowych produktów funkcjonalnych lub preparatów terapeutycznych.

Perspektywy i kierunki dalszych badań

Przeprowadzone w ramach niniejszej dysertacji analizy fitochemiczne i aktywności biologicznej *in vitro* doprowadziły do uzyskania wyników, które potwierdzają istotny potencjał aplikacyjny owoców *P. spinosa* w kontekście profilaktyki pierwotnej i wtórnej CDs. Jednakże, aby ww. materiał roślinny mógł zostać w pełni wykorzystany do otrzymywania wysokiej jakości funkcjonalnych produktów spożywczych bądź preparatów terapeutycznych konieczne są dalsze rozszerzone badania dotyczące zarówno składników czynnych jak i aktywności biologicznej. Stąd też, w kolejnym etapie badań zaplanowano opracowanie procedury ekstrakcji (po uprzednim przeprowadzeniu szeroko zakrojonej optymalizacji w połączeniu z metodami statystycznymi), umożliwiającej wyodrębnienie maksymalnej ilości związków bioaktywnych z surowca roślinnego. Ten etap badań jest kluczowy z uwagi na fakt, iż aktywnymi związkami owoców tarniny są polifenole, które są wysoce zróżnicowaną pod względem fizyko-chemicznym grupą metabolitów roślinnych; z tego względu standardowe procedury ekstrakcji najczęściej prowadzą tylko do ich częściowego wydobycia z substancji roślinnej. Do tej części badań wybrano technikę ekstrakcji przyspieszonej (ASE). ASE to zautomatyzowana, szybka, dokładna, powtarzalna, wysokoprzepustowa metoda ekstrakcji próbek stałych za pomocą ciekłych rozpuszczalników w kontrolowanej temperaturze i podwyższonym ciśnieniu, umożliwiająca dogłębną penetrację materiału roślinnego przez rozpuszczalnik i wydobycie maksymalnych ilości jego składników czynnych. W kontekście przyszłych badań nad aktywnością biologiczną planowane jest przeprowadzenie pogłębionej weryfikacji wartości owoców *P. spinosa* jako potencjalnego składnika żywności funkcjonalnej przeznaczonej do zapobiegania i leczenia wspomagającego przewlekłych stanów zapalnych przewodu pokarmowego, w szczególności jelit. Planowane badania będą zmierzać do ustalenia wpływu trawienia na aktywność biologiczną ekstraktu oraz do dokładniejszego rozpoznania potencjalnych mechanizmów molekularnych tej aktywności. W tym celu, przygotowany metodą ASE, wysokoskoncentrowany ekstrakt z surowca zostanie poddany procesowi symulowanego trawienia *in vitro* (obejmującego etapy zachodzące we wszystkich częściach przewodu pokarmowego, tj. jamie ustnej, żołądku, jelicie cienkim i jelicie grubym), dzięki czemu uzyskana zostanie frakcja, która dociera do miejsc zmienionych chorobowo. Aktywność tej frakcji zostanie przetestowana w modelach komórek ściśle zaangażowanych w powstawanie i progresję stanów zapalnych jelit, tj. komórek układu immunologicznego, a także w modelu ludzkich komórek jelitowych (enterocytów). Zaplanowane analizy obejmować będą m.in. weryfikację wpływu frakcji po trawieniu na funkcje pro- i przeciwzapalne oraz pro- i antyoksydacyjne wyżej wspomnianych komórek, w tym przewidywana jest ocena wpływu na sekrecję ROS, enzymów pro-i antyoksydacyjnych (iNOS, XO, COX-2, SOD1, SOD2, CAT), enzymów prozapalnych (ELA-2, MMP-9), cytokin i chemokin (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, TNF-α, MCP-1, MIF). Wykonana zostanie także ocena wpływu tej frakcji na ekspresję kluczowych w kontekście rozwoju stanu zapalnego czynników transkrypcyjnych (NF-κB1, NF-κB2 i Nrf2) oraz białek tworzących ścisłe połączenia w jelitach (CLDN1, ZO-1, OCLN). Poza pogłębioną oceną aktywności biologicznej, frakcja po trawieniu poddana będzie także szczegółowej analizie fitochemicznej, co pozwoli na określenie, jakim transformacjom ulegają polifenole owoców tarniny w przewodzie pokarmowym, a tym samym możliwe będzie wskazanie ich aktywnych metabolitów. Uzyskane w ten sposób

wyniki umożliwią wybór analitów do badań biodostępności oraz wskażą właściwe cele molekularne dla ekstraktów z owoców *P. spinosa*, a tym samym pozwolą na wybór dalszych kierunków i modeli do badań *in vivo*.

Streszczenie

Według szacunków Światowej Organizacji Zdrowia choroby cywilizacyjne (CDs) są obecnie przyczyną 71% zgonów, z czego prawie 40% stanowią zgony przedwczesne. Ze względu na masowość występowania CDs i wiążące się z tym znaczne obciążenie systemów opieki zdrowotnej, istnieje potrzeba zwrócenia baczniejszej uwagi na profilaktykę, w tym zastosowanie wysokiej jakości żywności i produktów funkcjonalnych, a także uzupełnienie konwencjonalnej farmakoterapii racjonalną fitoterapią, co mogłoby istotnie obniżyć koszty ekonomiczne i społeczne CDs. W tym kontekście specjalne zainteresowanie budzą produkty roślinne bogate w związki polifenolowe, które wykazują dobrze udokumentowaną aktywność biologiczną o szerokim spektrum, odpowiadającą złożonej patofizjologii CDs, i występują powszechnie w roślinach użytkowych i leczniczych. Profilaktyczny i terapeutyczny wpływ polifenoli roślinnych na postęp CDs jest m.in. związany z ich normalizująco-regulującym wpływem na procesy oksydacyjne i zapalne oraz zaburzenia metaboliczne, stanowiące elementarne czynniki etiologiczne CDs. Spośród dostępnych substancji roślinnych bogatych w polifenole szczególnym zainteresowaniem cieszą się owoce, chętnie spożywane w postaci świeżej lub przetworzonej. Niektóre z nich znajdują także zastosowanie w medycynie tradycyjnej, co sugeruje ich znaczny potencjał profilaktyczno-leczniczy. Dostępne badania pokazują jednak, iż aktywność biologiczna frakcji polifenolowych substancji roślinnych jest uwarunkowana obecnością specyficznej palety związków w odpowiednich proporcjach. Stąd podstawą racjonalnego stosowania substancji roślinnych/preparatów roślinnych jest ich pełna charakterystyka, w tym wskazanie składników warunkujących aktywność, standaryzacja fitochemiczna, wykluczenie toksyczności oraz ustalenie mechanizmów działania, parametrów aktywności i właściwego dawkowania, gwarantującego skuteczność i bezpieczeństwo terapii.

Uwzględniając powyższe przesłanki, przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej stał się owoc *Prunus spinosa* L. – produkt spożywczy i jednocześnie surowiec polifenolowy, wymieniany w lecznictwie tradycyjnym, jako substancja o plejotropowych właściwościach biologicznych. Świeże owoce tarniny są spożywane głównie w formie przetworów (m.in. soków, nalewek), z kolei suszone owoce wykorzystuje się do przygotowywania leczniczych herbat ziołowych. Zarówno świeże, jak i suszone owoce mają status tradycyjnej roślinnej substancji leczniczej. Doświadczenia etnomedycyny wskazują jednak na różnice w aktywności owoców świeżych i suszonych – odwary z suszu wykorzystuje się głównie w terapii miejscowych stanów zapalnych przewodu pokarmowego, zaś owoce świeże w kierunkach o charakterze ogólnoustrojowym, np. w terapii chorób metabolicznych, m.in. cukrzycy. Mimo udokumentowanego zastosowania, do czasu opublikowania prac stanowiących niniejszą rozprawę, skład chemiczny owoców pozostawał rozpoznany jedynie fragmentarycznie, a kwestia jego ewentualnej zmiany w procesie suszenia nie była przedmiotem żadnych badań. Przyjmowano jednak, że główne składniki farmakologicznie aktywne owoców tarniny to polifenole, które w większości zidentyfikowane były jedynie częściowo. Szczątkowe były także dane na temat aktywności biologicznej owoców tarniny. Wcześniejsze badania koncentrowały się głównie na ocenie aktywności przeciwutleniającej świeżych owoców tarniny, w większości z wykorzystaniem prostych, chemicznych testów *in vitro*, których wyniki trudno odnieść do warunków *in vivo*. Z drugiej strony sugerowały one wysoki potencjał antyoksydacyjny owoców, co zachęcało do pogłębienia analiz, szczególnie,

że w jedynym dostępnym dotychczas badaniu właściwości przeciwutleniających w modelu komórkowym (ludzkich promonocytów U937) wykazano istotne i zależne od dawki właściwości ochronne soku z owoców tarniny w warunkach stresu oksydacyjnego. W przypadku działania przeciwzapalnego dotychczas wykazano jedynie, iż ekstrakt etanolowy ze świeżych owoców tarniny może poprzez pośrednie mechanizmy zmniejszać ekspresję prozapalnej cytokiny IL-6 i czynników adhezyjnych w stymulowanych ludzkich komórkach śródbłonka. Z kolei w kontekście aktywności przeciwcukrzycowej dowiedziono, że ekstrakty alkoholowe ze świeżych owoców tarniny mogą hamować działanie α-glukozydazy i α-amylazy.

Mając na względzie powyższe, celem niniejszej dysertacji była identyfikacja składników aktywnych ekstraktów/frakcji pozyskanych ze świeżych i suszonych owoców tarniny, a także porównawcza analiza ich profilu fitochemicznego oraz potencjalnej aktywności przeciwutleniającej, przeciwzapalnej i przeciwcukrzycowej w kontekście profilaktyki i terapii chorób zapalnych jelit, cukrzycy i jej powikłań naczyniowych.

W części fitochemicznej pracy doktorskiej przeprowadzono szczegółową analizę profilu polifenolowego suchych ekstraktów/frakcji otrzymanych owoców tarniny. Analiza profilu jakościowego metodą LC-PDA-ESI-MS^3, umożliwiła identyfikację po raz pierwszy składników obecnych w suszonych owocach oraz znacznie zwiększyła wiedzę na temat związków czynnych świeżych owoców tarniny. Zidentyfikowano łącznie 57 i 45 składników polifenolowych, odpowiednio w świeżym i suszonym materiale roślinnym. Sumarycznie udało się wykryć 35 nowych związków polifenolowych dla owoców tarniny. Suszone owoce charakteryzowały się mniejszą różnorodnością w obrębie składników polifenolowych niż owoce świeże. Analiza całkowitej zawartości polifenoli (TPC) potwierdziła, że badane owoce stanowią bogate ich źródło, chociaż te suszone w warunkach typowych dla produkcji leków ziołowych zawierały niższe wartości TPC w porównaniu z owocami świeżymi. W suszonych owocach tarniny potwierdzono również po raz pierwszy obecność trzech związków powstałych w wyniku reakcji Maillarda (MPRs). Z uwagi na potencjalną wysoką ekspozycję na te związki w typowej diecie oraz niepokojące wyniki wstępnych badań toksykologicznych, zalecane jest, by ich zawartość w żywności była kontrolowana. W badaniach przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej wykazano, iż zawartość MRPs w owocach tarniny mieści się w dolnym przedziale zakresu raportowanego w literaturze dla innych, powszechnie spożywanych suszonych owoców, uznawanych za bezpieczne.

Uwzględniając krytyczną rolę, jaką przypisuje się komórkom układu immunologicznego, tj. neutrofilom i jednojądrzastym komórkom krwi obwodowej (PBMCs) w patogenezie i progresji chorób zapalnych, m.in. przewodu pokarmowego, w pierwszym etapie badań aktywności biologicznej oceniono wpływ ekstraktów/frakcji z owoców tarniny oraz związków modelowych na sekrecję przez neutrofile i PBMCs kluczowych mediatorów stanu zapalnego, tj. ROS, ELA-2, TNF-α, IL-8, IL-6 i IL-10. Badane ekstrakty/frakcje charakteryzowały się bardzo wysoką skutecznością modulacji wydzielania mediatorów stanu zapalnego, zarówno w stężeniach 1–5 μg/ml, które są nominalnie osiągalne dla polifenoli w osoczu, jak i tych występujących w przewodzie pokarmowym (25–100 μg/mL) po podaniu doustnym bogatych w polifenole produktów; można zatem oczekiwać, iż mogą one łagodzić stan zapalny zarówno ogólnoustrojowo, jak i lokalnie w przewodzie pokarmowym. Badane anality najskuteczniej hamowały sekrecję ROS, prozapalnych ELA-2 i TNF-α oraz zwiększały

wydzielanie przeciwzapalnej IL-10.

Drugi etap analiz aktywności biologicznej obejmował weryfikację zasadności wskazań etnomedycyny, co do pomocniczego stosowania owoców tarniny w terapii cukrzycy. W pierwszej kolejności zbadano zdolność ekstraktów/frakcji owoców do inhibicji enzymów glikolitycznych – α-glukozydazy i α-amylazy. Wszystkie przebadane ekstrakty/frakcje, zarówno te otrzymane ze świeżego, jak i z suszonego materiału roślinnego, odznaczały się większą zdolnością do inhibicji α-glukozydazy niż referencyjny lek przeciwcukrzycowy – akarboza. Z kolei w teście inhibicji α-amylazy, ekstrakty/frakcje z owoców tarniny wykazały się przeciętną aktywnością. Zważywszy na fakt, iż nadprodukcja ROS modyfikuje główne procesy biochemiczne, stanowiące podłoże patogenetyczne naczyniowych powikłań cukrzycowych, w tym glikację różnych biomolekuł i tworzenie zaawansowanych produktów glikacji (AGEs), w kolejnym etapie pracy udokumentowano szerokie spektrum działania ekstraktów/frakcji ze świeżych i suszonych owoców tarniny wobec szeregu rodnikowych i nierodnikowych oksydantów generowanych *in vivo*, w tym $O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$, H_2O_2, $NO^{\bullet}$ i HOCl. Ponadto wykazano, iż badane ekstrakty/frakcje porównywalnie lub skuteczniej niż aminoguanidyna (substancja o właściwościach przeciwglikacyjnych) hamują tworzenie AGEs. W ostatnim etapie pracy udowodniono ponadto, że badane anality zapobiegają uszkodzeniom składników ludzkiego osocza (białek i lipidów) w warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego $ONOO^-$, a także posiadają dużą zdolność do zwiększenia nieenzymatycznej pojemności antyoksydacyjnej osocza.

W większości przeprowadzonych testów aktywności biologicznej, ekstrakty/frakcje uzyskane z suszonych owoców wykazywały niższą skuteczność niż te z owoców świeżych, jednak stwierdzone różnice nie były krytyczne, a suszony materiał roślinny również charakteryzował się istotnym potencjałem antyoksydacyjnym, przeciwzapalnym i przeciwcukrzycowym. Wyniki oznaczeń dla polifenolowych markerów aktywnych oraz przeprowadzone analizy korelacji wykazały także, iż obserwowane efekty w znacznym stopniu determinowane są obecnością związków polifenolowych. Z drugiej strony, badania aktywności modelowego MRPs – HMF – sugerowały, że choć MPRs dają częściowo przeciwstawne efekty w porównaniu do polifenoli, głównie w zakresie modyfikacji funkcji prozapalnych ludzkich neutrofili i PBMCs (w kierunku stymulacji sekrecji TNF-α przez neutrofile i hamowania sekrecji IL-10 przez PBMCs), to ich obecność nie wpływa negatywnie na wartość terapeutyczną badanych ekstraktów/frakcji z uwagi na niewysokie stężenie. Ponadto, testy przeżywalności neutrofilii i PBMCs pozwoliły na wstępne zakwalifikowanie badanych ekstraktów/frakcji i ich markerów aktywnych jako bezpiecznych.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej dysertacji dowodzą wysokiej wartości ekstraktów z owoców *P. spinosa* w kontekście potencjalnej profilaktyki i terapii uzupełniającej CDs. Uzyskane rezultaty mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych, rozszerzonych badań fitochemicznych, farmakologicznych i toksykologicznych, prowadzących do pełnej farmakognostycznej charakterystyki surowca, a w przyszłości do opracowania wartościowych funkcjonalnych produktów żywnościowych lub preparatów terapeutycznych.

Summary

According to the World Health Organization, diseases of affluence/noncommunicable diseases (NCDs) currently cause 71% of deaths globally, almost 40% of which are premature deaths. Due to the high prevalence of NCDs and the associated massive demand on the healthcare systems, there is a need to pay more attention to prophylaxis, including the use of high-quality food and functional products, as well as supplementing conventional pharmacotherapy with rational phytotherapy, which might decrease the economic and social costs of NCDs. In this context, particularly interesting are plant products rich in polyphenols, widespread in food and medicinal plants, and showing a well-documented biological activity of a broad spectrum, corresponding to the complex pathophysiology of NCDs. It is acknowledged that the prophylactic and therapeutic influence of plant polyphenols on the progression of NCDs is associated with their normalizing and regulating effect on oxidative and inflammatory processes as well as metabolic disorders occurring in living cells, which are the elementary etiological factors of NCDs. Among the polyphenol-abundant plant materials, fruits are especially auspicious as they are willingly consumed fresh or processed. Some of them are also used in traditional medicine, which suggests their significant preventive and therapeutic potential. However, the available research demonstrates that the biological activity of plant phenolic fractions is conditioned by the presence of a specific range of compounds in appropriate proportions. Hence, the rational use of plant substances/preparations requires their complete characterization, including the establishment of their active components and mechanisms of action, phytochemical standardization, and activity parameters, as well as evaluation of toxicity and formulation/dosage to guarantee the effectiveness and safety of the therapy.

Considering the above premises, the subject of this dissertation is the fruit of *Prunus spinosa* L. (sloe, blackthorn) – a dietary product and a polyphenolic plant material, mentioned in traditional medicine as a substance with pleiotropic biological properties. For dietary purposes, fresh sloe fruits are consumed mainly as preserves (including juices and tinctures), while dried fruits are used to prepare herbal teas. Both fresh and dried fruits have the status of traditional herbal medicines. However, the ethnomedical sources suggest differences in the activity of both materials. For instance, dried fruit decoctions are mainly used to treat gastrointestinal tract inflammation; in contrast, fresh fruit preparations are recommended for systemic disorders, e.g., metabolic diseases, like diabetes. Despite the documented therapeutic application, until the publication of the manuscripts constituting this dissertation, the chemical composition of the fruit remained only fragmentarily recognized, and the impact of drying on its composition was not the subject of any research. However, it has been assumed that the primary pharmacologically active molecules of sloe fruits are polyphenols, most of which have been only partially identified. The data on the biological activity of sloe fruits was also incomplete. The previous studies have focused mainly on the antioxidant activity of fresh blackthorn fruits but they primarily used simple *in vitro* chemical tests, which are difficult to relate to *in vivo* conditions. On the other hand, the accumulated research suggested a high antioxidant potential of the fruit, encouraging further studies on the subject, especially because the only one available study of the antioxidant properties in a cellular model (U937 human promonocytes) showed significant and dose-dependent protective

properties of sloe juice in the conditions of oxidative stress. Concerning the anti-inflammatory effect, the ethanol extract of fresh sloes has only been demonstrated to reduce the expression of the pro-inflammatory cytokine IL-6 and some adhesion factors in stimulated human endothelial cells. Moreover, in the context of antidiabetic properties, the alcoholic extracts of fresh blackthorn fruits have been proven to inhibit α-glucosidase and α-amylase *in vitro*.

Considering the above, this dissertation aimed to identify biologically active components of extracts/fractions obtained from fresh and dried *P. spinosa* fruits as well as compare their phytochemical profile and their potential antioxidant, anti-inflammatory and antidiabetic effects *in vitro* in the context of the prevention and treatment of inflammatory bowel diseases, diabetes, and its vascular complications.

In the phytochemical part of the research, a detailed analysis of the polyphenolic profile of dry extracts/fractions from fresh and dried blackthorn fruits was carried out. The qualitative profiling, performed by the LC-PDA-ESI-MS^3 method, allowed for the first time to identify the dried fruit constituents and significantly increased the knowledge about the active components of fresh sloes. In total, 57 and 45 polyphenols were identified in fresh and dried plant material, respectively, including 35 polyphenolic compounds new for *P. spinosa* fruits. A less diversified polyphenolic composition was observed for the dried compared to the fresh fruits. The dried material also contained lower total polyphenolic content (TPC) than the fresh one; however, the determinations confirmed sloes as a rich source of these phytochemicals. Apart from polyphenols, three compounds formed through the dehydration of sugars in the Maillard reaction (MPRs) were also confirmed for the first time in dried sloe fruits. Due to the potential high exposure to these compounds in a standard human diet and the alarming results of preliminary toxicological studies available in the literature, it is generally recommended to control the MPRs content in food. However, the present dissertation revealed that the content of MRPs in blackthorn fruits is at the lower range limit reported in the literature for numerous commonly consumed fruits, including prunes, and the fruits might be thus regarded safe.

Taking into account the critical role of immune cells, such as neutrophils and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), in the pathogenesis and progression of inflammatory diseases, including gastrointestinal tract inflammations, the influence of blackthorn extracts/fractions and model compounds on the secretion of key inflammatory mediators, i.e., ROS, ELA-2, TNF-α, IL-8, IL-6 and IL-10 by neutrophils and PBMCs was evaluated in the first step of biological activity studies. The tested extracts/fractions were characterized by a high modulation efficiency of pro-inflammatory and pro-oxidant functions of immune cells, both at concentrations of 1–5 μg/ml, which are nominally achievable for plasma polyphenols, and those found in the gastrointestinal tract (25–100 μg/mL) after oral administration of polyphenol-rich products. It might, therefore, be expected that they may be able to alleviate both systemic and local inflammation. Among the tested factors, the analytes most effectively inhibited the secretion of ROS, pro-inflammatory ELA-2 and TNF-α, and increased the secretion of anti-inflammatory IL-10.

The second step of biological activity studies included the verification of ethnomedical indications of sloe fruits in the treatment of diabetes. First, the potential of fruit extracts/fractions to inhibit glycolytic enzymes α-glucosidase and α-amylase was examined.

All extracts/fractions from fresh and dried plant material presented a higher ability to inhibit α-glucosidase than acarbose, a reference antidiabetic drug. In turn, the fruit extracts/fractions had only moderate activity in the α-amylase inhibition test. Moreover, because the overproduction of ROS modifies the main biochemical processes underlying the pathogenesis of diabetic vascular complications, including the glycation of various biomolecules and the formation of advanced glycation products (AGEs), a broad scavenging activity towards a range of *in vivo* generated free radical and non-radical oxidants, including $O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$, H_2O_2, $NO^{\bullet}$ and HOCl, was documented for extracts/fractions from fresh and dried sloe fruits in the next step. Furthermore, the tested extracts/fractions were proven to inhibit the formation of AGEs with similar or higher effectiveness than aminoguanidine, a reference standard with anti-glycation properties. In the last step of activity studies, the analytes were tested in a human plasma model exposed to $ONOO^-$-induced oxidative stress. It was documented that the tested analytes effectively prevent the oxidative/nitrative damage to human plasma components (proteins and lipids) *in vitro*, and also have a high ability to increase the non-enzymatic antioxidant capacity of plasma.

In most of the performed biological activity tests, the extracts/fractions obtained from dried fruits presented slightly lower effectiveness than those from fresh fruits. However, the observed activity differences between dried and fresh fruit extracts were not critical, and the dried plant material was also characterized by a high antioxidant, anti-inflammatory and anti-diabetic potential. The activity parameters achieved for model polyphenols and the correlation studies showed that the presence of polyphenols determines the biological activity of sloe fruits. On the other hand, the activity tests of a model MRPs – HMF – suggested that these compounds exhibit partially opposite effects to polyphenols, especially towards immune cells (they stimulated the secretion of TNF-α and inhibited the release of IL-10); however, their presence did not influence negatively the therapeutic value of the analyzed extracts/fractions due to the low concentration. Eventually, the viability tests of neutrophils and PBMCs enabled the preliminarily confirmation of the cellular safety of the tested extracts/fractions and their model compounds.

The results of this dissertation prove the high potential of *P. spinosa* fruit extracts in the context of prophylaxis and complementary therapy of NCDs. Moreover, the obtained data may become the starting point for further, extended phytochemical, pharmacological and toxicological studies leading to the complete characterization of the plant material and, finally, to the development of valuable functional food products or therapeutic preparations.

Piśmiennictwo

Abraham K, Gürtler R, Berg K, Heinemeyer G, Lampen A, Appel KE. Toxicology and risk assessment of 5-Hydroxymethylfurfural in food. Mol Nutr Food Res. 2011;55(5):667-678.

Alarcón R, Pardo-de-Santayana M, Priestley C, Morales R, Heinrich M. Medicinal and local food plants in the south of Alava (Basque Country, Spain). J Ethnopharmacol. 2015;176:207-224.

Barros L, Carvalho AM, Sá Morais J, Ferreira ICFR. Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. Food Chem. 2010;120(1):247-254.

Bento C, Gonçalves AC, Silva B, Silva LR. Assessing the phenolic profile, antioxidant, antidiabetic and protective effects against oxidative damage in human erythrocytes of peaches from Fundão. J Funct Foods 2018;43:224-233.

Choudhary A, Kumar V, Kumar S, Majid I, Aggarwal P, Suri S. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) formation, occurrence and potential health concerns: recent developments. Toxin Reviews 2021:40(4):545-561.

Cory H, Passarelli S, Szeto J, Tamez M, Mattei J. The role of polyphenols in human health and food systems: A mini-review. Front Nutr. 2018;5:87.

Czerwińska M, Kiss AK, Naruszewicz M. A comparison of antioxidant activities of oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacein. Food Chem. 2012;131(3):940-947.

Fernando CD, Soysa P. Optimized enzymatic colorimetric assay for determination of hydrogen peroxide (H_2O_2) scavenging activity of plant extracts. MethodsX. 2015;2:283-291.

Fraternale D, Giamperi L, Bucchini A, Sestili P, Paolillo M, Ricci D. *Prunus spinosa* fresh fruit juice: antioxidant activity in cell-free and cellular systems. Nat Prod Commun. 2009;4(12):1665-1670.

Fu R, Zhang Y, Guo Y, Liu F, Chen F. Determination of phenolic contents and antioxidant activities of extracts of *Jatropha curcas* L. seed shell, a by-product, a new source of natural antioxidant. Ind Crops Prod. 2014;58:265-270.

Gay C, Gebicki JM. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay. Anal Biochem. 2000;284(2):217-220.

Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. Circ Res. 2010;107(9):1058-1070.

Granica S, Czerwińska ME, Piwowarski JP, Ziaja M, Kiss AK. Chemical composition, antioxidative and anti-inflammatory activity of extracts prepared from aerial parts of *Oenothera biennis* L. and *Oenothera paradoxa* Hudziok obtained after seeds cultivation. J Agric Food Chem. 2013;61(4):801-810.

Guimarães R, Barros L, Dueñas M, et al. Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. Food Chem. 2013;141(4):3721-3730.

Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MC, Rahu N. Oxidative stress and inflammation: What polyphenols can do for us?. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:7432797.

Jaiswal R, Karaköse H, Rühmann S, et al. Identification of phenolic compounds in plum fruits (*Prunus salicina* L. and *Prunus domestica* L.) by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry and characterization of varieties by quantitative phenolic fingerprints. J Agric Food Chem. 2013;61(49):12020-12031.

Jarić S, Mačukanović-Jocić M, Djurdjević L, et al. An ethnobotanical survey of traditionally used plants on Suva planina mountain (south-eastern Serbia). J Ethnopharmacol. 2015;175:93-

108.

Koch W. Dietary Polyphenols-Important Non-nutrients in the prevention of chronic noncommunicable diseases. A Systematic Review. Nutrients. 2019;11(5):1039.

Kołodziejczyk J, Olas B, Wachowicz B, Szajwaj B, Stochmal A, Oleszek W. Clovamide-rich extract from *Trifolium pallidum* reduces oxidative stress-induced damage to blood platelets and plasma. J Physiol Biochem. 2011;67(3):391-399.

Kołodziejczyk-Czepas J, Nowak P, Kowalska I, Stochmal A. Biological activity of clovers - free radical scavenging ability and antioxidant action of six Trifolium species. Pharm Biol. 2014;52(10):1308-1314.

Kołodziejczyk-Czepas J, Krzyżanowska-Kowalzyk J, Sieradzka M, Nowak P, Stochaml A. Clovamide and clovamide-rich extracts of three Trifolium species as antioxidants and moderate antiplatelet agents *in vitro*. Phytochemistry 2017;143, 54-63.

Kong F, Lee BH, Wei K. 5-Hydroxymethylfurfural mitigates lipopolysaccharide-stimulated inflammation via suppression of MAPK, NF-κB and mTOR activation in RAW 264.7 Cells. Molecules 2019;24:275.

Kültür S. Medicinal plants used in Kirklareli Province (Turkey). J Ethnopharmacol. 2007;111:341-364.

Li R, Wang Q, Zhao M, Yang P, Hu X, Ouyang D. Flavonoid glycosides from seeds of *Hippophae rhamnoides subsp. sinensis* with α-glucosidase inhibition activity. Fitoterapia. 2019;137:104248.

Liguori I, Russo G, Curcio F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. Clin Interv Aging. 2018;13:757-772.

Lovegrove A, Edwards CH, De Noni I, et al. Role of polysaccharides in food, digestion, and health. Crit Rev Food Sci Nutr. 2017;57(2):237-253.

Madrau MA, Sanguinetti AM, Caro AD, Fadda C, Piga A. Contribution of melanoidins to the antioxidant activity of prunes. J Food Qual. 2010;33(s1):155-170.

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. Am J Clin Nutr. 2005;81(1 Suppl):230S-242S.

Marchelak A, Owczarek A, Matczak M, et al. Bioactivity potential of *Prunus spinosa* L. flower extracts: Phytochemical profiling, cellular safety, pro-inflammatory enzymes inhibition and protective effects against oxidative stress *in vitro*. Front Pharmacol. 2017;8:680.

Marchelak A, Olszewska MA, Owczarek A. Simultaneous quantification of thirty polyphenols in blackthorn flowers and dry extracts prepared thereof: HPLC-PDA method development and validation for quality control. J Pharm Biomed Anal. 2020;184:113121.

Michel P, Granica S, Magiera A, et al. Salicylate and procyanidin-rich stem extracts of *Gaultheria procumbens* L. inhibit pro-inflammatory enzymes and suppress pro-inflammatory and pro-oxidant functions of human neutrophils *ex vivo*. Int J Mol Sci. 2019;20(7):1753.

Mikulic-Petkovsek M, Schmitzer V, Slatnar A, Stampar F, Veberic R. Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species. J Food Sci. 2012;77(10):C1064-C1070.

Mikulic-Petkovsek M, Stampar F, Veberic R, Sircelj H. Wild Prunus fruit species as a rich source of bioactive compounds. J Food Sci. 2016;81(8):C1928-C1937.

Murkovic M, Pichler N. Analysis of 5-hydroxymethylfurfual in coffee, dried fruits and urine. Mol Nutr Food Res. 2006;50(9):842-846.

Olas B, Nowak P, Kołodziejczyk J, Ponczek M, Wachowicz B. Protective effects of resveratrol against oxidative/nitrative modifications of plasma proteins and lipids exposed to peroxynitrite. J Nutr Biochem. 2006;17(2):96-102.

Olszewska M, Wolbiś M. Flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. Acta Pol Pharm. 2001;58(5):367-372.

Olszewska M, Wolbiś M. Further flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. Acta Pol Pharm. 2002a;59(2):133-137.

Olszewska M, Wolbiś M. Flavonoids from the leaves of *Prunus spinosa* L. Polish Journal of Chemistry 2002b;76(7):967-974.

Olszewska MA, Granica S, Kołodziejczyk-Czepas J, Magiera A, Czerwińska ME; Nowak P, Rutkowska M, Wasiński P, Owczarek A. Variability of sinapic acid derivatives during germination and their contribution to antioxidant and antiinflammatory effects of broccoli sprouts in human plasma and human peripheral blood mononuclear cells. Food Funct. 2020;11:7231-7244.

Ombra MN, d'Acierno A, Nazzaro F, et al. Alpha-amylase, α-glucosidase and lipase inhibiting activities of polyphenol-rich extracts from six common bean cultivars of Southern Italy, before and after cooking. Int J Food Sci Nutr. 2018;69(7):824-834.

Owczarek A, Magiera A, Matczak M, Piotrowska DG, Olszewska MA, Marchelak A. Optimisation of preparative HPLC separation of four isomeric kaempferol diglycosides from *Prunus spinosa* L. by application of the response surface methodology. Phytochem Lett. 2017;20:415-424.

Pacher P, Szabó C. Role of peroxynitrite in the pathogenesis of cardiovascular complications of diabetes [published correction appears in Curr Opin Pharmacol. 2006 Jun;6(3):319]. Curr Opin Pharmacol. 2006;6(2):136-141.

Papoutsis K, Zhang J, Bowyer MC, Brunton N, Gibney ER, Lyng J. Fruit, vegetables, and mushrooms for the preparation of extracts with α-amylase and α-glucosidase inhibition properties: A review. Food Chem. 2021;338:128119.

Pastoriza de la Cueva S, Álvarez J, Végvári Á, et al. Relationship between HMF intake and SMF formation *in vivo*: An animal and human study. Mol Nutr Food Res. 2017;61(3):10.1002/mnfr.201600773.

Pinacho R, Cavero RY, Astiasaran I, Ansorena D, Calvo MI. Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of *in vitro* digestion on their antioxidant capacity. J Funct Foods 2015;19(A):49-62

Poonam V, Raunak Kumar G, Reddy LCS, Jain R, Sharma SK, Parmar VS. Chemical constituents of the genus Prunus and their medicinal properties. Curr Med Chem. 2011;18(25):3758-3824.

Popescu I, Caudullo G. Prunus spinosa in Europe: Distribution, habitat, usage and threats. In European Atlas of Forest Tree Species; San-Miguel-Ayanz J, de Rigo D, Caudullo G, Houston Durrant T, Mauri A. Eds.; Publications Office of the EuropeanUnion: Luxembourg, 2016; s. e01aa69+. Available online: https://w3id.org/mtv/FISE-Comm/v01/e01aa69 (dostęp 29.07.2022).

Popović BM, Blagojević B, Ždero Pavlović R, et al. Comparison between polyphenol profile and bioactive response in blackthorn (*Prunus spinosa* L.) genotypes from north Serbia-from raw data to PCA analysis. Food Chem. 2020;302:125373.

Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav UC. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. Life Sci. 2016;148:183-193.

Roberfroid MB. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. Am J Clin Nutr. 2000;71(6 Suppl):1660S-5S.

Rumińska A, Ożarowski A. Leksykon roślin leczniczych. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 1990, s. 487.

Rutkowska M, Kołodziejczyk-Czepas J, Owczarek A, Zakrzewska A, Magiera A, Olszewska MA. Novel insight into biological activity and phytochemical composition of *Sorbus aucuparia* L. fruits: Fractionated extracts as inhibitors of protein glycation and oxidative/nitrative damage of human plasma components. Food Res Int. 2021;147:110526.

Sabatini L, Fraternale D, Di Giacomo B, et al. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activity of *Prunus spinosa* L. fruit ethanol extract. J Funct Foods 2020;67:103885.

Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. J Nutr. 2000;130(8S Suppl):2073S-85S.

Shapla UM, Solayman M, Alam N, Khalil MI, Gan SH. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: Effects on bees and human health. Chem Cent J. 2018;12(1):35.

Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced glycation end products and diabetic complications. Korean J Physiol Pharmacol. 2014;18(1):1-14.

Sun B, Ricardo-da-Silva JM, Spranger I. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. J Agric Food Chem. 1998;46:4267-4274.

Tan KC, Shiu SW, Wong Y, Tam X. Serum advanced glycation end products (AGEs) are associated with insulin resistance. Diabetes Metab Res Rev. 2011;27(5):488-492.

Tresserra-Rimbau A, Lamuela-Raventos RM, Moreno JJ. Polyphenols, food and pharma. Current knowledge and directions for future research. Biochem Pharmacol. 2018;156:186-195.

Truba J, Stanisławska I, Walasek M, et al. Inhibition of digestive enzymes and antioxidant activity of extracts from fruits of *Cornus alba, Cornus sanguinea subsp. hungarica* and *Cornus florida*-A comparative study. Plants 2020;9(1):122.

Uchida R, Kato M, Hattori Y, et al. Identification of 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) as an active component *Citrus Jabara* that suppresses FcεRI-mediated mast cell activation. Int J Mol Sci. 2020;21(7):2472.

Velickovic JM, Kostic DA, Stojanovic GS, Mitic SS, Mitic MN, Randelovic SS, Dordevic AS. Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit, Hem Ind 2014;68(3):297-303.

Wang Y, Xiang L, Wang C, Tang C, He X. Antidiabetic and antioxidant effects and phytochemicals of mulberry fruit (*Morus alba* L.) polyphenol enhanced extract. PLoS One 2013;8(7):e71144.

World Health Organization, WHO. Noncommunicable diseases. 2021. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases (dostęp 20.07.2022).

Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar C. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. Nutrients. 2018;10(11):1618.

Zhang C, Shu W, Zhou G, et al. Anti-TNF-α therapy suppresses proinflammatory activities of mucosal neutrophils in inflammatory bowel disease. Mediators Inflamm. 2018;2018:3021863.

➢ Publikacja I

Magiera A., Czerwińska M.E., Owczarek A., Marchelak A., Granica S., Olszewska M.A. (2022). Polyphenol-enriched extracts of *Prunus spinosa* fruits: Anti-inflammatory and antioxidant effects in human immune cells ex vivo in relation to phytochemical profile. *Molecules*, 27(5), 1691, doi: 10.3390/ molecules27051691, **IF_{2021} = 4.927, $MEiN_{2021}$ = 140**

molecules

MDPI

Article

Polyphenol-Enriched Extracts of *Prunus spinosa* Fruits: Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects in Human Immune Cells Ex Vivo in Relation to Phytochemical Profile

Anna Magiera [1,*], Monika Ewa Czerwińska [2,3], Aleksandra Owczarek [1], Anna Marchelak [1], Sebastian Granica [4] and Monika Anna Olszewska [1]

1 Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, 1 Muszynskiego St., 90-151 Lodz, Poland; aleksandra.owczarek@umed.lodz.pl (A.O.); anna.marchelak@umed.lodz.pl (A.M.); monika.olszewska@umed.lodz.pl (M.A.O.)

2 Department of Biochemistry and Pharmacogenomics, Medical University of Warsaw, 1 Banacha St., 02-097 Warsaw, Poland; monika.czerwinska@wum.edu.pl

3 Centre for Preclinical Research, Medical University of Warsaw, 1B Banacha St., 02-097 Warsaw, Poland

4 Microbiota Lab, Centre for Preclinical Studies, Department of Pharmacognosy and Molecular Basis of Phytotherapy, Medical University of Warsaw, 1 Banacha St., 02-097 Warsaw, Poland; sgranica@wum.edu.pl

* Correspondence: anna.magiera@umed.lodz.pl; Tel.: +48-503-316-997

check for updates

Citation: Magiera, A.; Czerwińska, M.E.; Owczarek, A.; Marchelak, A.; Granica, S.; Olszewska, M.A. Polyphenol-Enriched Extracts of *Prunus spinosa* Fruits: Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects in Human Immune Cells Ex Vivo in Relation to Phytochemical Profile. *Molecules* **2022**, *27*, 1691. https://doi.org/10.3390/molecules27051691

Academic Editors: Agnieszka Szewczyk and Inga Kwiecien

Received: 15 February 2022
Accepted: 2 March 2022
Published: 4 March 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/).

Abstract: The fresh fruits of *Prunus spinosa* L., a wild plum species, are traditionally used for dietary purposes and medicinal applications in disorders related to inflammation and oxidative stress. This study aimed to investigate the phytochemical composition of the fruits in the function of fractionated extraction and evaluate the biological potential of the extracts as functional products in two models of human immune cells ex vivo. Fifty-seven phenolic components were identified in the extracts by UHPLC-PDA-ESI-MS^3, including twenty-eight new for the analysed fruits. Fractionation enabled the enrichment of polyphenols in the extracts up to 126.5 mg gallic acid equivalents/g dw total contents, 91.3 mg/g phenolic acids (caffeoyl-, coumaroyl-, and feruloylquinic acids), 41.1 mg/g flavonoids (mostly quercetin mono-, di- and triglycosides), 44.5 mg/g condensed proanthocyanidins, and 9.2 mg/g anthocyanins (cyanidin and peonidin glycosides). The hydroalcoholic extract and phenolic-enriched fractions of the fruits revealed significant ability to modulate pro-oxidant, pro-inflammatory, and anti-inflammatory functions of human neutrophils and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs): they strongly downregulated the release of reactive oxygen species, TNF-α, and neutrophils elastase, upregulated the secretion of IL-10, and slightly inhibited the production of IL-8 and IL-6 in the cells stimulated by *f*MLP, *f*MLP+cytochalasin B, and LPS, depending on the test. Correlation studies and experiments on the pure compounds indicated a significant contribution of polyphenols to these effects. Moreover, cellular safety was confirmed for the extracts by flow cytometry in a wide range of concentrations. The results support the traditional use of fresh blackthorn fruits in inflammatory disorders and indicate extracts that are most promising for functional applications.

Keywords: blackthorn fruits; LC-MS; phenolic compounds; oxidative stress; inflammation; functional foods

1. Introduction

A lot of epidemiological data provide solid evidence for the health benefits of diets rich in fruits and vegetables, mainly due to their bioactive constituents, including polyphenols, exhibiting the well-documented potential to resolve the interconnected pathological processes of inflammation and oxidative stress [1,2]. The essential hallmark of inflammation is the infiltration and hyperactivation of the primary immune cells, such as neutrophils and mononuclear cells (monocytes/macrophages) in the tissue site and the production of inflammatory mediators, including cytokines (interleukins, IL; tumour necrosis factor α,

TNF-α), proteolytic enzymes (elastase, ELA-2), growth factors, arachidonic acid metabolites, and a vast diversity of reactive oxygen species (ROS), which collectively contribute to tissue dysfunction [3]. Failure to control this process is linked to many acute and chronic human disorders, such as bowel diseases, atherosclerosis, rheumatoid arthritis, and kidney diseases [3,4]. The conventional treatment for these health problems involves synthetic drugs, which often have emerging side effects. Therefore, global emphasis is on searching for plant-based foods as alternative options to prevent chronic inflammation with dietary intervention [5].

In the search of foods with anti-inflammatory activity, increased attention has been recently paid to the fruit of *Prunus spinosa* L. (blackthorn, sloe). It is a small rosaceous tree occurring primarily in south-central Europe but extending to the Scandinavian Peninsula, western Asia, and north-western Africa. The plant has also been introduced and locally naturalised in New Zealand, Tasmania, and North America, and is one of the most popular wild *Prunus* species worldwide [6]. The blackthorn fruit is a small, spherical, bluish-black drupe with a purple-blue frostlike bloom and yellow-greenish pulp. When fresh, the sloe plums have an astringent flavour; thus, they are harvested after being mellowed by frost and preferably consumed after processing into jams, jellies, juices, and alcoholic beverages, including wines, liqueurs, and tinctures [7].

In many countries, blackthorn fruit is a traditional herbal remedy recommended to treat inflammation-related disorders within the gastrointestinal and urinary tracts, respiratory system, and topically in oral and pharyngeal mucosa inflammation. Moreover, the fruit is used to treat diarrhoea, metabolic diseases (including diabetes and obesity) and as a heart-strengthening and anti-hypertensive agent [8–10]. It is believed that polyphenols are active components of the fruits, including anthocyanins, phenolic acids, and flavonoids [11–17]. However, the chemical composition of sloes is still insufficiently recognised as the reported fruit profiles are significantly less complex as expected compared to other organs of the same plant, such as flowers, leaves and stems [18–20].

The previous research on the biological activity of *P. spinosa* fruits has focused mainly on their antioxidant potential [11,14,21,22], with some data available on the antidiabetic, antimicrobial, anti-inflammatory and anticancer activity [15,17,23–25]. The accumulated results suggest the high value of blackthorn fruits as health-promoting food and source material for the production of functional supplements, but further research is required to characterise the underlying mechanisms, which might be relevant to their in vivo effects. To date, the antioxidant activity of the fruits has been studied in vitro mainly using simple chemical, non-cellular tests, such as the DPPH, ABTS, FRAP, and TBARS tests [11,14,21,22]. The cellular antioxidant potential has been demonstrated only for sloe juice in human malignant promonocytes (U937 cells) exposed to H_2O_2, with increased cellular viability being observed in the presence of the juice [21]. In the case of anti-inflammatory effects, Sabatini et al. [24] reported that the ethanol extract from blackthorn fruits could upregulate miR-126 and miR-146a expression levels and therefore downregulate the expression of the pro-inflammatory cytokine IL-6 and adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human endothelial cells (HUVEC). However, no information is available on the impact of blackthorn fruits on pro-inflammatory and pro-oxidant functions of normal human immune cells, which are critical factors in the inflammatory processes in vivo.

Several previous studies suggested that some technological treatments, such as fractionation [26] or loading in nanoparticles [25], might increase the anti-inflammatory effects of crude extracts from different fruits. In addition, fractionation might also improve the effectiveness of phytochemical profiling of the fruit extracts and studies on the contribution of particular compounds to their anti-inflammatory and antioxidant activity [26].

Therefore, the aim of the present study was (a) to characterise in details the polyphenolic profile of the fresh blackthorn fruits in the function of fractionated extraction; (b) to investigate the antioxidant and anti-inflammatory activity of the fruit extracts in human immune cells ex vivo, including neutrophils and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs);

(c) to select extracts that are most promising for their potential use as anti-inflammatory agents and functional products; and (d) to identify compounds responsible for the observed biological effects. A wide range of analytical techniques (UHPLC- PDA-ESI-MS^3, HPLC-PDA, and UV-spectrophotometric methods) and authentic standards isolated from *P. spinosa* were used for phytochemical profiling to enable in-depth characterisation of secondary fruit metabolites. Moreover, the release of a series of pro-oxidant, pro-inflammatory and anti-inflammatory factors (ROS, IL-8, IL-6, TNF-α, ELA-2 and IL-10) was monitored during the cellular tests and the effects of the extracts were compared to those of a panel of positive standards including native blackthorn polyphenols. Furthermore, the cellular safety of the extracts was evaluated by flow cytometry.

2. Results

2.1. LC-PDA-ESI-MS^3 Metabolite Profiling

The phenolic profile of the fractionated extracts from fresh *P. spinosa* fruits was investigated by LC-PDA-ESI-MS^3. The analytes were structurally characterised based on comparing their chromatographic and spectral properties with the literature data or reference standards, both commercial and isolated in our laboratory from flowers and leaves of *P. spinosa* ([18] and references therein). The enrichment of the phenolic fractions by fractionation of the source methanol-water (75:25, *v*/*v*) extract (MEF) with solvents of different polarity (diethyl ether, ethyl acetate, *n*-butanol, and water) allowed for the detection of 63 peaks in total (Figure 1, peaks **1–63**; Table S1) and full or tentative identification of 57 phenolic constituents, including 28 analytes found for the first time in sloes (the primary structures are shown in Figure S1). The identified compounds belonged to three main classes of polyphenols: (a) phenolic acids and aldehydes, (b) flavonols, and (c) anthocyanins.

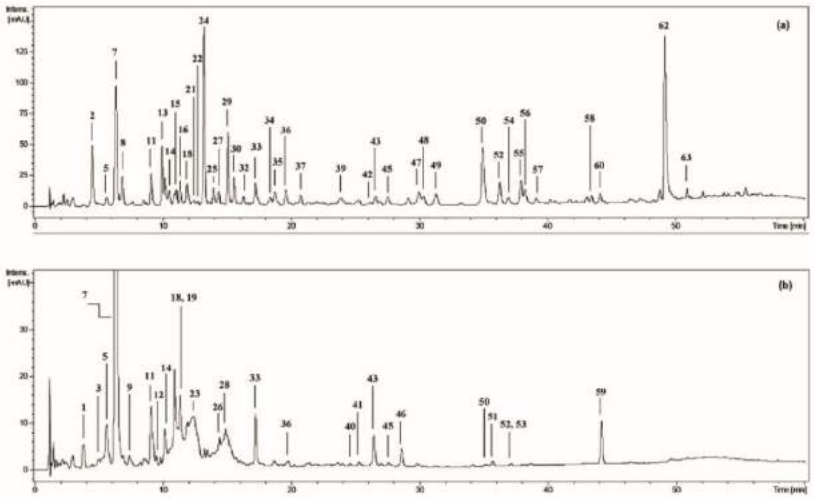


Figure 1. Representative UHPLC chromatograms at 280 nm of (**a**) diethyl ether fraction from fresh fruits of *P. spinosa*, DEFF; and (**b**) *n*-butanol fraction from fresh fruits, BFF. Peak numbers refer to those implemented in the Supplementary Table S1.

2.1.1. Phenolic Acids and Aldehydes

The leading and most structurally diversified group of polyphenols in sloes were phenolic acids (28 analytes; peaks: **1**, **2**, **5–16**, **18**, **20–22**, **24**, **27**, **29–35**, **39**, **59**) with UV-Vis absorption maxima in the range of 250–325 nm. Eight representatives of this group were identified by comparison with standards as protocatechuic (**2**), *p*-hydroxybenzoic

(**8**), vanillic (**13**), caffeic (**16**), *p*-coumaric (**30**), and isomeric chlorogenic acids (**7**, **14**, **18**). The MS/MS data of compound **5** was similar to that of 3-*O*-caffeoylquinic acid (**7**), but its retention time was somewhat shorter; according to Jaiswal, Sovdat, Vivan and Kuhnert [27], it was identified as the *cis*-isomer of **7**. Compounds **6** and **9** revealed deprotonated molecular ions $[M–H]^-$ at m/z 515 and MS^2 base peaks at m/z 353 $[M–H–hexose\ moiety]^-$, whose further fragmentation was consistent with that of **7**; thus, they were tentatively assigned as 3-*O*-caffeoylquinic acid hexosides [28]. According to the literature hierarchical discrimination keys [27,29], the peaks showing parent $[M–H]^-$ ions at m/z 335, 337 and 367 were identified as isomeric caffeoylshikimic acids (**29**, **33**, **35**), *p*-coumaroylquinic acids (**11**, **21**, **27**) and feruloylquinic acids (**15**, **22**, **31**), respectively. Likewise, compound **39** with $[M–H]^-$ at m/z 319 and a fragment ion at m/z 163 $[p\text{-coumaric acid–H}]^-$ was identified as *p*-coumaroylshikimic acid [30]. The analytes **32** and **34** (m/z 501), due to the presence of the MS^2 base peaks at m/z 223, typical for sinapic acid derivatives, and the neutral losses of 162 Da and 116 Da, diagnostic for a malate hexose moiety [31], were identified as sinapoyl malate hexosides. Analogously, compound **10**, with fragments at m/z 329 $[M–H–116]^-$ and 167 $[M–H–116–162]^-$ was identified as vanillic acid malate hexoside. Some other compounds representing phenolic acids (**1**, **12**, **20**) also revealed the loss of a hexose moiety ($[M–162–H]^-$). Among them, compounds **12** and **20** with fragment ions at m/z 179 $[\text{caffeic acid–H}]^-$ and 135 $[\text{caffeic acid–H–}CO_2]^-$ were identified as isomeric caffeic acid 3/4-*O*-hexosides. Likewise, peak **1** showed a fragment ion at m/z 167 $[\text{vanillic acid–H}]^-$, which suggested the presence of vanillic acid *O*-hexoside [32]. In addition to phenolic acids, one phenolic aldehyde (vanillin, **24**) was detected and identified with standard.

2.1.2. Flavonoids

The second group of polyphenols in sloes was formed by flavonols, revealing two UV-Vis absorption maxima at 270 and 350–370 nm. Their MS spectra in a negative ion mode showed the presence of fragment ions at m/z 301, 285, and 315, typical for quercetin (**62**), kaempferol and isorhamnetin aglycones, respectively. Flavonol mono-, di- and triglycosides (**36**, **38**, **40–58**, **60–61**) were discriminated based on the number and character of neutral losses of hexose (−162 Da), rhamnose (−146 Da), and pentose (−132 Da) moieties. Among them, nine quercetin glycosides were identified with standards as hyperoside (**42**), rutin (**44**), isoquercitrin (**45**), quercetin 3-*O*-(2″-*O*-*β*-D-glucopyranosyl)-*α*-L-arabino-furanoside (**46**), reinutrin (**47**), guaiaverin (**48**), avicularin (**50**), multinoside A (**51**), and quercitrin (**52**). Five other quercetin glycosides (**49**, **55–57**, **61**) fragmented with the neutral losses of malyl (−116 Da) or acetyl (−42 Da) moieties and were identified as the appropriate esters.

2.1.3. Anthocyanins

Only four anthocyanins—glycosides of cyanidin (**19**, **23**) and peonidin (**26**, **28**)—with different sugar moieties were detected in the fruit extracts. Three compounds were identified with standards: **19** as cyanidin 3-*O*-*β*-D-glucopyranoside (CYG), **23** as cyanidin-3-*O*-rutinoside and **26** as peonidin-3-*O*-*β*-D-glucopyranoside. Peak **28**, showing the UV-Vis absorption maxima at 280 and 515 nm, typical for anthocyanins, and MS spectra characteristic for peonidin rhamnohexosides with a $[M–H]^-$ ion at m/z 607 and a fragment ion at m/z 299 (aglycone moiety), resulting from the neutral loss of 308 Da ($[M–132–162–H]^-$), was assigned as peonidin 3-*O*-rutinoside [33].

2.2. *Quantitative Profile of the Extracts/Fractions*

The quantitative profiles of the fruit extracts/fractions differed depending on the extraction solvent (Table 1). The total phenolic content varied in the range of 64.6–126.5 mg GAE/g dw (TPC, determined by the Folin–Ciocalteu method) and 6.1–104.0 mg/g dw (TPH, determined by HPLC-PDA) with the highest values observed for DEFF and EAFF fractions. In all extracts/fractions, the TPC levels surpassed the TPH values, which represent the sum of low-molecular-weight polyphenols, including total flavonoids (TFL), total anthocyanins (TAC) and total phenolic acids (TPA). This gap came primarily from the presence of high-

molecular-weight tannin-type proanthocyanidins (TTC). Figure 2 presents the relative ratio of particular families of polyphenols to the TPH+TTC levels that reflect the actual total phenolic level of the blackthorn extracts. The results indicated that the main constituents of MEF (Table 1, Figure 2) and thereby the primary polyphenols of fresh fruits (Table S2) were tannins, followed by phenolic acids, anthocyanins and flavonoids. Partitioning of MEF between solvents of different polarities led to the concentration of anthocyanins in BFF, flavonoids mainly in DEFF, phenolic acids in DEFF, EAFF and BFF, and tannins in WRF.

Table 1. Quantitative profile of the *P. spinosa* fruit extracts (mg/g dw).

	MEF	DEFF	EAFF	BFF	WRF
Total contents:					
TPC (GAE)	87.57 ± 3.54^{b}	126.49 ± 1.41^{a}	123.63 ± 3.68^{a}	68.23 ± 0.12^{c}	64.59 ± 0.61^{c}
TPH	28.56 ± 0.58^{d}	81.83 ± 0.80^{b}	104.02 ± 1.92^{a}	43.17 ± 1.14^{c}	6.07 ± 0.14^{e}
TPA	19.67 ± 0.33^{d}	35.15 ± 1.12^{b}	91.26 ± 2.16^{a}	29.62 ± 1.10^{c}	4.79 ± 0.08^{e}
TAC	4.64 ± 0.11^{b}	n.d.	n.d.	9.17 ± 0.33^{a}	0.96 ± 0.06^{c}
TFL	4.25 ± 0.21^{c}	41.11 ± 0.41^{a}	12.21 ± 0.32^{b}	4.38 ± 0.17^{c}	0.32 ± 0.02^{d}
TTC (PB2)	44.53 ± 1.93^{a}	n.d.	n.d.	8.02 ± 0.23^{c}	28.36 ± 0.41^{b}
Individual compounds:					
Avicularin (**50**)	1.32 ± 0.14^{c}	2.52 ± 0.02^{b}	2.98 ± 0.14^{a}	0.41 ± 0.06^{d}	n.d.
Guaiaverin (**48**)	n.d.	1.05 ± 0.05^{a}	0.61 ± 0.06^{b}	n.d.	n.d.
Hyperoside (**42**)	0.11 ± 0.005^{c}	0.94 ± 0.07^{b}	1.51 ± 0.03^{a}	n.d.	n.d.
Isoquercitrin (**45**)	0.09 ± 0.004^{c}	0.21 ± 0.01^{b}	0.97 ± 0.07^{a}	0.12 ± 0.01^{c}	n.d.
Reinutrin (**47**)	n.d.	0.38 ± 0.02^{a}	0.24 ± 0.02^{b}	n.d.	n.d.
Rutin (**44**)	1.60 ± 0.02^{c}	0.29 ± 0.04^{d}	2.25 ± 0.27^{b}	2.93 ± 0.11^{a}	0.22 ± 0.03^{d}
Quercitrin (**52**)	$0.15 \pm 0.01^{c,d}$	1.66 ± 0.04^{b}	1.91 ± 0.11^{a}	0.13 ± 0.01^{d}	n.d.
Quercetin (**62**, QU)	n.d.	27.45 ± 0.09^{a}	1.25 ± 0.13^{b}	n.d.	n.d.
Cyanidin 3-*O*-glucoside (**19**, CYG)	1.96 ± 0.12^{b}	n.d.	n.d.	4.46 ± 0.12^{a}	0.55 ± 0.06^{c}
Cyanidin 3-*O*-rutinoside (**23**)	1.39 ± 0.07^{b}	n.d.	n.d.	2.28 ± 0.10^{a}	0.41 ± 0.05^{c}
Peonidin-3-*O*-glucoside (**26**)	0.99 ± 0.04^{b}	n.d.	n.d.	1.68 ± 0.07^{a}	n.d.
Protocatechuic acid (**2**)	n.d.	5.22 ± 0.11^{a}	0.63 ± 0.02^{b}	n.d.	n.d.
p-Hydroxybenzoic acid (**8**)	n.d.	0.51 ± 0.06^{a}	0.47 ± 0.01^{a}	n.d.	n.d.
Vanillic acid (**13**)	n.d.	3.37 ± 0.19^{a}	n.d.	n.d.	n.d.
p-Coumaric acid (**30**)	n.d.	0.52 ± 0.03^{a}	n.d.	n.d.	n.d.
Neochlorogenic acid (**7**)	15.56 ± 0.30^{c}	10.93 ± 0.84^{d}	49.62 ± 1.51^{a}	24.47 ± 1.07^{b}	3.40 ± 0.15^{e}
Chlorogenic acid (**14**, CHA)	0.94 ± 0.02^{b}	0.62 ± 0.02^{c}	4.75 ± 0.03^{a}	0.39 ± 0.01^{d}	n.d.
Cryptochlorogenic acid (**18**)	1.57 ± 0.07^{d}	4.85 ± 0.10^{b}	28.74 ± 0.37^{a}	3.63 ± 0.12^{c}	n.d.
Vanillin (**24**)	n.d.	5.57 ± 0.38^{a}	0.55 ± 0.04^{b}	n.d.	n.d.

Results are presented as means ± SD ($n = 3$). Numbers in parentheses (first column, in bold) refer to those in Figure 1 and Supplementary Table S1. For each parameter, different superscript letters (a–e) indicate significant differences ($p < 0.05$) in Tukey's HSD test. MEF, methanol-water (75:25, v/v) extract of fresh fruits; DEFF, diethyl ether fraction of MEF; EAFF, ethyl acetate fraction of MEF; BFF, *n*-butanol fraction of MEF; WRF, water residue of MEF; TPC, total phenolic contents in gallic acid equivalents (GAE); TPH, total contents of low-molecular-weight phenols determined by HPLC-PDA; TPA, total phenolic acids; TAC, total anthocyanins; TFL, total flavonoids; TTC, total tannins in procyanidin B2 (PB2) equivalents. n.d.: below the limits of quantitation (LOQ) or detection (LOD).

The TPA levels varied between 4.8 and 91.3 mg/g dw with the peak values in EAFF, where derivatives of phenolic acids prevailed (constituted 88% of the TPH+TTC contents). Pseudodepsides of quinic and shikimic acids (in both free and glycosylated forms), especially chlorogenic acids (**5**, **7**, **14**, **18**), were the most abundant compounds forming 47–96% TPAs. Neochlorogenic acid (**7**) dominated among the individual analytes with levels up to 15.6 mg/g dw in MEF and 49.6 mg/g dw in EAFF. Apart from pseudodepsides, the fruits contained simple cinnamic and benzoic acids (free and glycosylated). Their levels in the source extract were below the quantitation limits, but they were concentrated in DEFF, where protocatechuic acid (**2**) and vanillic acid (**13**) formed 24% of TPAs.

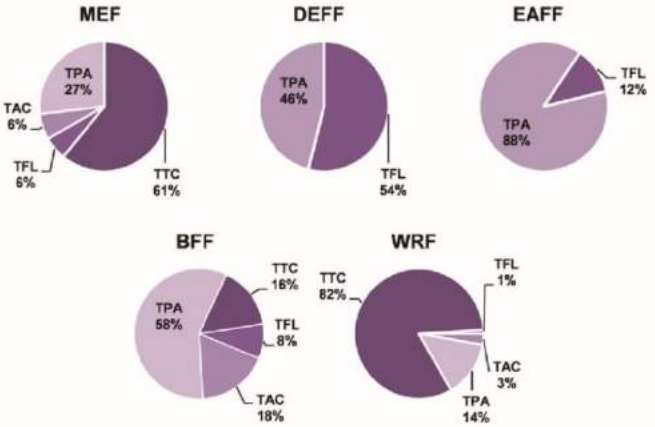


Figure 2. Contribution of individual groups of compounds to total phenolic contents in *P. spinosa* fruit extracts. TPA, TAC, and TFL: total contents of phenolic acids, anthocyanins, and flavonoids, respectively, determined by HPLC-PDA; TTC: total content of condensed tannins in procyanidin B2 (PB2) equivalents. For extracts codes, see Table 1.

Anthocyanins are the primary pigments of fresh sloes. High levels of anthocyanins were revealed in MEF (4.6 mg/g dw) and after fractionation in BFF (9.2 mg/g dw). With the contents up to 42–49% of the TAC values, the dominant compound was CYG.

The levels of flavonoids were 0.3–41.1 mg/g dw, with the peak values in DEFF, where TFLs formed 50% TPH+TTCs. The profile of individual flavonoids varied significantly among particular extracts/fractions. Quercetin (QU) dominated in DEFF (formed 67% TFL), whereas glycosides prevailed in other fractions: avicularin (quercetin 3-*O*-α-L-arabinofuranoside, **50**) in EAFF (24% TFL) and rutin (**44**) in BFF (67% TFL). Avicularin and rutin were also the major flavonoids of the source extract MEF.

2.3. Influence on Cells Viability

The viability of neutrophils and PBMCs after 24–48 h of incubation with the fruit extracts/fractions and reference compounds was 85.0–93.4%, except for DEFF at 50–100 μg/mL, for which the cells' viability was 72.4–82.8%. For the LPS-stimulated and control (non-stimulated) cells, this value was 91.8–96.4% and 92.9–94.4%, respectively (Figure S2).

2.4. Antioxidant Effect: Influence on ROS Production by Neutrophils

For antioxidant activity testing, ROS were produced by cells after stimulation by *f*MLP. As shown in Figure 3, all analysed extracts/fractions revealed significant and dose-dependent antioxidant effects and reduced the oxidative burst in stimulated human neutrophils by at least 70% at 100 μg/mL. The most potent activity was observed for fractions enriched in phenolic acids and flavonoids (DEFF and EAFF), which downregulated the ROS release by at least 93% at 100 μg/mL and 43% at 2.5 μg/mL. The source extract MEFF effectively inhibited the ROS production at the levels 25–100 μg/mL ($p < 0.05$). For instance, at 50 μg/mL, it reduced the ROS release to 15%. This allowed for reaching the physiological value of ROS generation, which in non-stimulated cells was 21%. Among the reference compounds, the strongest antioxidant effects were revealed for CYG and chlorogenic acid (CHA), followed by QU (a positive standard), which downregulated the ROS production already at 5 μM (1.5–2.5 μg/mL).

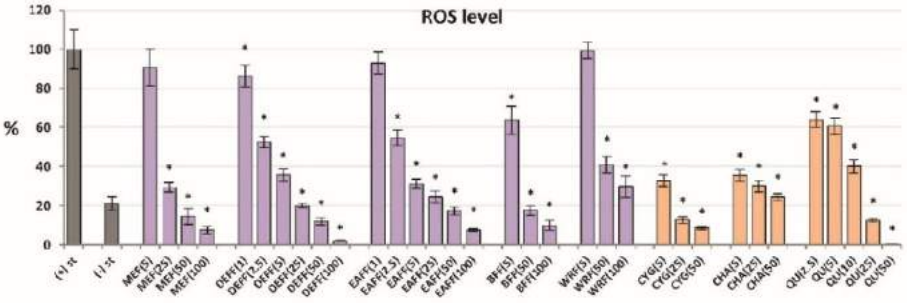


Figure 3. Effect of fruit extracts/fractions (1–100 μg/mL) and standards (5–50 μM) on the release of ROS, reactive oxygen species; Positive controls: QU, quercetin. For extracts codes see Table 1. Data expressed as means ± SD of five independent experiments performed with cells isolated from five independent donors. Statistical significance in Dunnett's test: * $p < 0.05$ compared with the stimulated control.

2.5. *Inhibition of ELA-2 Release by Neutrophils*

All of the tested extracts/fractions and reference compounds effectively inhibited the secretion of ELA-2 from neutrophils stimulated by *f*MLP+cytochalasin B, and in general their effects depended on the concentration (Figure 4a). The polyphenol-rich fractions (DEFF, EAFF, BFF), CYG, CHA and QU (a positive standard) reduced the enzyme release most strongly, by up to 71% at 100 μg/mL for DEFF, compared to control cells (untreated by the extracts). These analytes were also active at a low concentration of 5 μg/mL, and some of them even at 1–2.5 μg/mL ($p < 0.05$). For example, BFF reduced the ELA-2 secretion by 38% at 5 μg/mL. The source hydroalcoholic extract was less effective, but able to decrease the enzyme release by about 33% at 100 μg/mL.

2.6. *Inhibition of IL-8 and TNF-α Production by Human Neutrophils*

As shown in Figure 4b, all analysed extracts/fractions inhibited the secretion of TNF-α from LPS-stimulated neutrophils at 50–100 μg/mL ($p < 0.05$). The highest reduction (by up to 57%) was recorded for DEFF. At the lowest levels (5 μg/mL), BFF was most effective and downregulated the production of this cytokine by 26%. A similar range of activity was demonstrated for pure polyphenols. The effects on IL-8 release (Figure 4c) were weak and statistically significant only for selected extracts at 50–100 μg/mL, especially for BFF, which reduced the IL-8 levels by up to 39% at 100 μg/mL. Among pure polyphenols, CYG and QU were the most effective. Dexamethasone (DEX), a model anti-inflammatory drug (5–50 μM), significantly decreased the release of both TNF-α and IL-8.

2.7. *Influence on TNF-α, IL-6 and IL-10 Production by Human PBMCs*

The analysed extracts/fractions and pure polyphenols downregulated the release of TNF-α from LPS-stimulated PBMCs in a dose-dependent manner, and their effects were stronger than those revealed in the neutrophil model (Figure 5a). All of the extracts/fractions were effective even at 5 μg/mL ($p < 0.05$), and the most active were fractions enriched in anthocyanins, phenolic acids and flavonoids (BFF, DEFF and EAFF). For instance, EAFF reduced the TNF-α level by 16% at 5 μg/mL and 75% at 100 μg/mL, compared to LPS-stimulated control cells ($p < 0.05$). Similarly, all pure polyphenols also showed remarkable anti-TNF-α effects. In contrast, the effects on IL-6 secretion (Figure 5b) were statistically significant only for QU, DEFF and EAFF, which decreased the IL-6 levels by up to 33% at 100 μg/mL ($p < 0.05$). Concerning IL-10, the blackthorn extracts/fractions varied significantly in the ability to modulate the production of this cytokine (Figure 5c). In general, MEF did not influence its secretion ($p > 0.05$ in the entire concentration range), DEFF and EAFF stimulated its release, whereas BFF and WRF decreased its production

(at 50–100 μg/mL). The stimulatory effect reached a maximum (50% increase) for DEFF and the inhibitory effect (32% decrease) for WRF at 100 μg/mL. Interestingly, pure polyphenols upregulated the IL-10 release at 5 μM, but their effects were insignificant at higher concentrations, except for QU, which strongly reduced the IL-10 levels at 50 μM. The positive control DEX significantly reduced the levels of both TNF-α and IL-6 but did not modulate the release of IL-10.

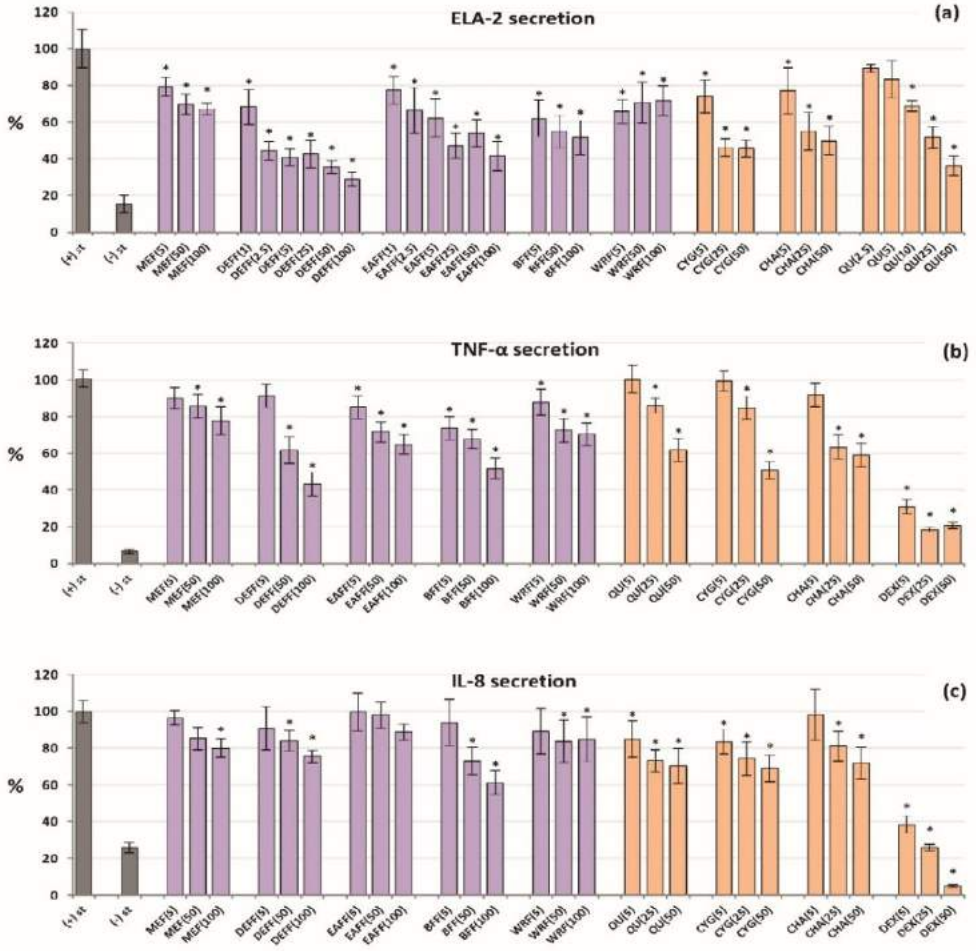


Figure 4. Effect of fruit extracts/fractions (1–100 μg/mL) and standards (5–50 μM) on pro-inflammatory functions of stimulated human neutrophils: effects on the release of (**a**) ELA-2, neutrophils elastase; (**b**) TNF-α, tumour necrosis factor α; and (**c**) IL-8, interleukin 8. Positive controls: QU, quercetin; DEX, dexamethasone. For extracts codes see Table 1. Data expressed as means ± SD of five independent experiments performed with cells isolated from five independent donors. Statistical significance in Dunnett's test: * $p < 0.05$ compared with the stimulated control.

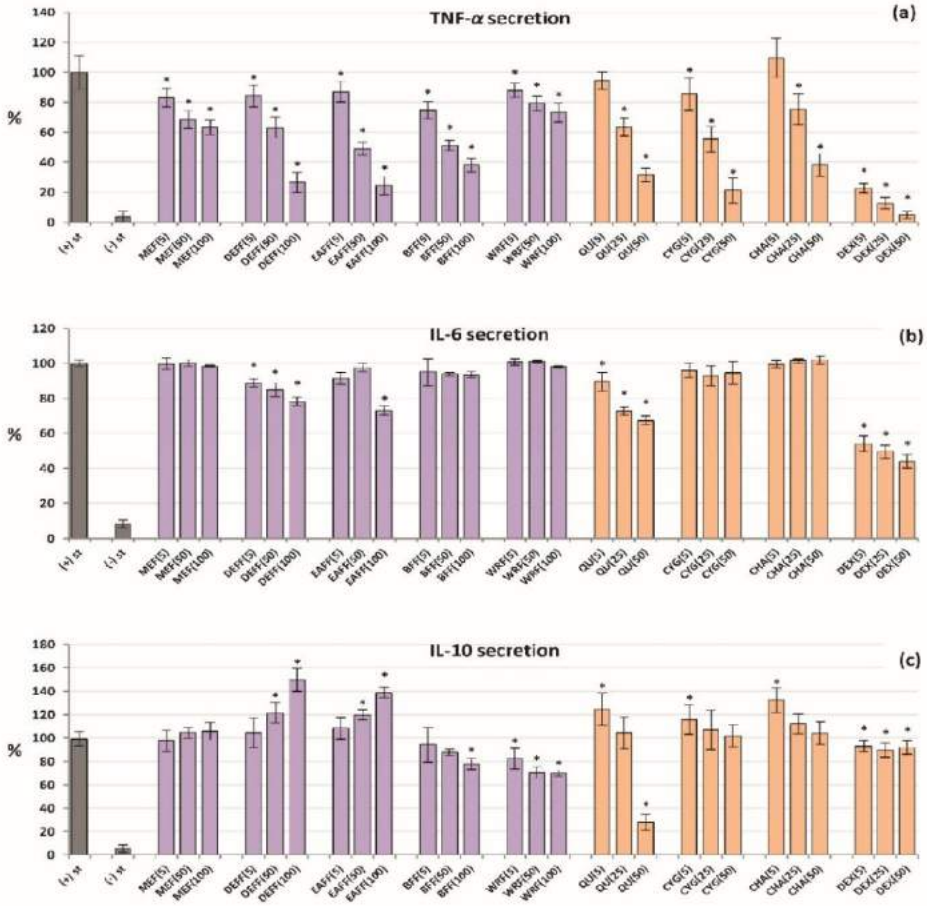


Figure 5. Effect of fruit extracts/fractions (5–100 μg/mL) and standards (5–50 μM) on pro-inflammatory and anti-inflammatory functions of stimulated human PBMCs: effects on the secretion of (**a**) TNF-α, tumour necrosis factor α; (**b**) IL-6 interleukin 6; and (**c**) IL-10, interleukin 10. Positive control: DEX, dexamethasone. For extracts codes see Table 1. Data expressed as means ± SD of five independent experiments performed with cells isolated from five independent donors. Statistical significance in Dunnett's test: * $p < 0.05$ compared with the stimulated control.

3. Discussion

Edible fruits are among the best sources of dietary polyphenols, and their regular intake is connected with the prevention and slowed development of oxidative stress and inflammation-related chronic human disorders [1,2]. For dietary intervention, fruits may be consumed fresh or processed into specialised functional products, including standardised extracts, which exhibit the most potent biological effects due to the increased content of polyphenols [34]. In this context, this work focused on the fruits of a wild European plum species—*P. spinosa*—and investigated their chemical profile as well as antioxidant and anti-inflammatory activity in the function of fractionated extraction. This is the first detailed phytochemical and bioactivity study of blackthorn fruits and the first comprehensive phytochemical survey of sloes harvested in central Europe (Poland).

Based on preliminary experiments and previous studies on sloes [11,12,15,16,22], for phytochemical analysis the fresh fruits were first extracted with methanol–water (75:25,

v/v) to achieve high recovery of the target phenolic compounds. In accordance with the profiles reported for the fruits from other parts of Europe [12,13,16,17], the presence of four main polyphenolic classes, including phenolic acids, anthocyanins, flavonols and flavanols (condensed proanthocyanidins), was revealed (Table 1, Tables S1 and S2). However, thanks to the fractionation of crude hydroalcoholic extract and enrichment of the fractions in selected analytes, we were able to describe the composition of sloes in more detail and fully or tentatively identify 57 polyphenols, among which 28 compounds, mainly flavonoids and phenolic acids, were found for the first time (Figure 1a,b; Table S1). In consequence, the fruit profile appeared similarly complex as that of blackthorn flowers (57 identified constituents according to Marchelak et al. [18]) and significantly more diversified than stems and leaves of the plant (25 and 21 identified components, respectively [19,20]). In comparison to other plant parts, the blackthorn fruits may be distinguished by the presence of anthocyanins and lack of low-molecular-weight flavanols. Nevertheless, high and comparable complexity of the polyphenolic fractions of fruits and flowers might explain the popularity of both plant materials in traditional phytotherapy [8–10].

The TPC levels in sloes were in good agreement with some previous reports, both in the case of dry extract MEF (87.57 mg GAE/g dw versus 83.40 mg GAE/g dw [11]) and fresh fruits (13.69 mg GAE/g fw versus 17.69 mg GAE/g fw [15]). The total level of low-molecular-weight phenols (TPH) in fresh fruits (4.46 mg/g; Table S2) was higher than the literature values (2.29–3.37 mg/g fw; [16,22,24]), probably because of more detailed profiling. Moreover, a large fraction of condensed proanthocyanidins was detected (6.96 mg PCB2/g fw) that previously has been quantified in sloes at significantly lower levels (1.85 mg GAE/g fw; [16]). Recently, Popović et al. [17] suggested that the variability of polyphenolic profiles in sloes harvested in different geographic areas might be due to changing climatic and genetic factors, and the relative ratio between different classes of polyphenols might be especially prone to change. Indeed, we observed the shares of anthocyanins and phenolic acids to the TPH levels (16.2 and 68.9%, respectively) similar to those found earlier for the fruits collected in colder parts of Europe [17] but significantly different from those revealed in the south of the continent [16,22,24], where anthocyanins (50–70%) clearly prevailed over phenolic acids (15–32%). Nevertheless, as the TPC of fresh sloes (1.37 g GAE/100 g fw; Table S2) surpassed the literature levels in fruits valued for their health-promoting properties and anti-inflammatory effects in humans, such as cranberries (0.45 g/100 g), blueberries (0.13 g/100 g) and chokeberries (about 1.01 g/100 g) [35], the present study confirms the significant potential of blackthorn fruits for industrial and functional applications.

Ethnopharmacological sources suggest that blackthorn fruits may control systemic and local inflammation, especially within the digestive tract, but also in the urinary tract and cardiovascular system [8–10]. Recent preclinical and epidemiological studies of polyphenol-rich fruits of similar composition, such as cherries or blueberries, have confirmed their exceptional effectiveness against gastrointestinal inflammation [36–38]. Those effects might be connected with the oral bioavailability profile of polyphenols. It is well established that the absorption of polyphenols in the upper digestive tract is relatively moderate and results in at most micromolar (1–5 μM) phenolic levels in the bloodstream, while 90–95% of the bolus reaches the colon and accumulates in the millimolar range, making the activity most dramatic for gastrointestinal disorders [39]. In the case of primary *P. spinosa* polyphenols, their millimolar levels (taking into account their molecular masses) might range from 130–180 μg/mL for phenolic acids to 500–700 μg/mL for glycosides and pseudodepsides (Table S1). Therefore, the antioxidant and anti-inflammatory activity of the blackthorn extracts in the models of human immune cells was tested during the present study in a wide range of concentrations (1–100 μg/mL). This range was a good compromise between the cells' viability (Figure S2) and the polyphenolic levels that might be achieved in plasma (1–5 μg/mL) and in local compartments of the digestive tract (25–100 μg/mL) after oral administration of the fruits or extracts.

Neutrophil migration and massive infiltration into the colon mucosa and lamina propria is a hallmark of numerous inflammatory disorders of the digestive tract, for example inflammatory bowel disease (IBD) [40]. The excessive or prolonged activation of neutrophils promotes an increased mobilisation of monocytes differentiating into macrophages that are attracted to the damaged tissues where they extend inflammatory reactions [3]. The present study revealed that the extracts from fresh *P. spinosa* fruits significantly and in a dose-dependent manner modulate the pro-oxidant and pro-inflammatory functions of human neutrophils and monocytes (PBMCs) ex vivo with the most spectacular effects towards the release of ROS, TNF-α, ELA-2 and IL-10.

Oxidative stress is a crucial feature of digestive tract inflammation. The chief cause of oxidative stress in IBD is the overproduction of ROS such as $ONOO^-$, $NO^\bullet$, $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2, $HO^\bullet$ and HClO by neutrophils in the process of oxidative burst, which cause progressive damage of the intestinal mucosa and stimulate tissue inflammation [5]. We observed that the blackthorn extracts significantly inhibited the oxidative burst of stimulated neutrophils, and the ROS release correlated negatively with the phenolic levels, both TPC and TPH+TTC ($r_{max} = -0.7398$, $p < 0.001$; Table S3). As the polyphenol-rich fractions (DEFF, EAFF, BFF) strongly reduced the ROS production at even 2.5–5 μg/mL, and their activity was up to 50-fold stronger than that of phenolic-poor WRF, the polyphenolic constituents might be considered primarily responsible for these effects. This was confirmed by the potent activity of pure blackthorn polyphenols CYG and CHA compared to the positive control.

The cellular antioxidant effects of polyphenols may be related to their direct ROS-scavenging potential or to some indirect mechanisms, including the regulation of transcription factors, such as NF-κB, and the secretion of regulatory cytokines, including TNF-α, which can prime neutrophils for oxidative burst [26]. Indeed, Fraternale et al. [21] showed that sloe juice exhibits cytoprotective activity and significantly increases the viability of H_2O_2-treated human promonocytes U937, probably due to H_2O_2 scavenging. Recently, we have reported that polyphenols of *P. spinosa* flowers are able to effectively scavenge several other in vivo-relevant ROS, such as $O_2^{\bullet-}$, $ONOO^-$, $HO^\bullet$ and HClO [41]. On the other hand, Sabatini et al. [24] and Tiboni et al. [25] have demonstrated that the ethanol extracts from sloes decrease the expression of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK-1) in stimulated U937 cells, which plays a crucial role in regulating signalling cascades and NF-κB activation. In the present study, we observed that the sloe extracts significantly diminished the release of TNF-α from both neutrophils and PBMCs. TNF-α is a master cytokine of the NF-κB pathway and potent priming agonist of immune cells that orchestrate the inflammatory response and stimulate the release of numerous pro-inflammatory mediators, including ROS [42]. TNF-α is also a key cytokine in the pathogenesis of IBD and a therapeutic target in modern anti-inflammatory therapies [40]. It is worth noting that the blackthorn extracts were especially effective downregulators of the TNF-α secretion in PBMCs, the leading producers of this cytokine in vivo [42]. Polyphenols contributed primarily to the anti-TNF-α effects as a significant negative correlation was found between the phenolic levels (TPC or TPH+TTC) and TNF-α release in PBMCs ($r_{max} = -0.8689$, $p < 0.001$; Table S3).

An important finding of the present study is also the potent ability of the blackthorn extracts to inhibit the secretion of ELA-2 from stimulated neutrophils. This enzyme is a serine protease that breaks the extracellular matrix by degrading its main components, such as elastin and collagen [26]. In IBD patients, ELA-2 increases tissue permeability, potentiates the inflammatory response, impairs mucosal regeneration, and is closely associated with disease progression [43]. The blackthorn polyphenols seem essential for the release inhibition of ELA-2, but because the relationship between their levels (TPC or TPH+TTC) and the enzyme secretion was relatively weak, although significant ($r_{max} = -0.4481$, $p < 0.05$; Table S3), the synergistic effects of non-phenolic components of sloes should be taken into consideration. Nevertheless, strong anti-TNF-α, anti-ROS and anti-ELA-2 effects of the extracts might partly explain the traditional indication of sloes in gastrointestinal inflamma-

tion, and the TPC level might be recommended as a simple quality marker of the extracts for their functional application.

ROS, TNF-α and ELA-2 appeared to be the main targets for the sloe extracts, but the influence on the secretion of IL-10 might also be relevant. IL-10 is the primary anti-inflammatory cytokine in humans that inhibits the release of pro-inflammatory cytokines and attenuates the inflammatory process in the mucosa [3]. Therefore, intense stimulation of the IL-10 production by DEFF and EAFF might be beneficial in the context of their future use. Interestingly, other fractionated extracts (BFF and WRF) exhibited the opposite effects. This fact might suggest that low-molecular-weight blackthorn polyphenols (TPH), enriched in DEFF and EAFF, indeed stimulate this cytokine, while non-phenolic compounds or TTC (enriched in hydrophilic fractions) inhibit its secretion, but further investigation is required to confirm this hypothesis.

The previous studies on sloes concluded that anthocyanins are mainly responsible for the anti-inflammatory and cellular antioxidant activity of the fruits [21,24,25]. This might indeed be true for fruits collected in Mediterranean regions as anthocyanins dominated in their phenolic fractions [16,22,24]. However, the impact of other polyphenols, especially phenolic acids and flavonoids, should not be overlooked. As evidenced by our results, the fractions rich in these types of polyphenols and anthocyanin-free (DEFF and EAFF) had stronger or comparable effects to the anthocyanin-rich BFF. Hence, it might be considered that phenolic acids are primary active components of sloes collected in continental climate regions such as Poland, where it seems they prevailed over anthocyanins, but other polyphenols have an additive or synergistic impact.

4. Materials and Methods

4.1. Plant Material

Fruit samples of *P. spinosa* L. in the phase of full ripeness (Figure S3) were collected in October 2018 by hand picking from shrubs naturally growing in Krasnobród (50°32′41″ N and 23°12′55″ E), Poland (near the Roztocze National Park). The plant material was authenticated by prof. M.A. Olszewska according to Popescu and Caudullo [6]. The voucher specimen (no. KFG/HB/18006-PSP-FRUIT) was deposited in the herbarium of the Department of Pharmacognosy, Medical University in Lodz, Poland. After collecting, the fresh fruits were immediately and directly frozen and stored at −15 °C until use.

4.2. Extracts Preparation

A sample of fresh fruits (1008.0 g) was poured with a small amount of heated methanol–water (75:25, *v*/*v*), ground in a blender and refluxed three times with methanol-water (75:25, *v*/*v*; 1.5 L and 20 min each). The solvent was filtered off and the filtrates were combined to give the source extract MEF (157.6 g dw). Next, the sample of MEF (145.8 g dw) was suspended in warm (40 °C) water (1.5 L) and subjected to sequential liquid–liquid extraction with organic solvents (10 × 200 mL each) to yield diethyl ether fraction (DEFF, 1.6 g dw), ethyl acetate fraction (EAFF, 1.8 g dw), *n*-butanol fraction (BFF, 9.2 g dw) and water residue (WRD, 9.7 g dw). The organic solvent extracts were dried by vacuum evaporation (Rotavapor R-200, Büchi®, Flawil, Switzerland) and the water-containing fractions were lyophilised (Alpha 1–2/LD Plus freeze dryer; Christ, Osterode, Germany). All solvents were of analytical grade (Avantor Performance Materials, Gliwice, Poland).

4.3. Phytochemical Profiling

4.3.1. Qualitative LC-MS/MS Profiling

The LC-PDA-ESI-MS^3 analysis was performed on a UHPLC-3000 RS system (Dionex, Dreieich, Germany) coupled with a diode array detector (Dionex) and an AmaZon SL ion trap mass spectrometer with an ESI interface (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). Separations were carried out on a Kinetex XB-C18 column (1.7 µm, 150 mm × 2.1 mm i.d.; Phenomenex, Torrance, CA, USA) at 25 °C. The mobile phase consisted of solvent A (water/formic acid, 100:0.1, *v*/*v*) and solvent B (acetonitrile) with the elution profile as

follows: 0–10 min, 6–13% B (*v*/*v*); 10–15 min, 13% B (*v*/*v*); 15–19 min, 13–15% B (*v*/*v*); 19–28 min, 15% B (*v*/*v*); 28–44 min, 15–23% B (*v*/*v*); 44–55 min, 23–40% B (*v*/*v*); 55–60 min, 40% B (*v*/*v*); 60–65 min, 40–6% B (*v*/*v*); 65–80 min, 6% B (*v*/*v*). All gradients were linear. The flow rate was 0.3 mL/min. Before injection, sample extract solutions (10.0 mg/1.5 mL) were filtered through a PTFE syringe filter (13 mm, 0.2 µm, Whatman, Pittsburgh, PA, USA). UV-Vis spectra were recorded over a range of 200–600 nm. The LC eluate was introduced directly into the ESI interface without splitting and analysed in both negative and positive ion modes. ESI parameters: the nebulizer pressure was 40 psi; dry gas flow 9 L/min; dry temperature 300 °C; and capillary voltage 4.5 kV. MS^2 and MS^3 fragmentations were obtained in Auto MS/MS mode for the most abundant ions at the time. Analysis was carried out scanning from m/z 200 to 2200. Identification of the analytes was confirmed by comparing the retention times and spectra (UV-Vis, MS/MS) with standards and/or literature data. All solvents were of HPLC grade (Avantor Performance Materials, Gliwice, Poland). For reference standards, see Supplementary S.2.

4.3.2. Quantitative Profiling

The total contents of polyphenols (TPC) and condensed tannins (proanthocyanidins, TTC) were determined spectrophotometrically by Folin–Ciocalteu and vanillin assay, as described previously by Marchelak et al. [18] and Sun et al. [44], respectively. The results were expressed as equivalents of HPLC-grade standards (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) of gallic acid (GAE) and procyanidin B2 (PB2) per dw of the extracts.

The quantitative HPLC-PDA analyses were performed on a Shimadzu Prominence-i LC-2030C 3D chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan) according to the method validated previously for the fingerprint analysis of the flower extracts of *P. spinosa* [45], modified slightly for the study of the fruit matrix. Separations were carried out on a C18 Ascentis® Express column (2.7 µm, 150 mm × 4.6 mm; Supelco, Bellefonte, PA, USA) with a C18 Ascentis® 2.7 Micron Guard Cartridge (2.7 µm, 5 mm × 4.6 mm; Supelco). Samples of the tested extracts (2.5–20 mg) were dissolved in 10 mL of methanol–water (75:25, *v*/*v*), filtered through a polytetrafluoroethylene (PTFE) syringe filter (25 mm, 0.2 µm, Ahlstrom, Helsinki, Finland), and the filtrate was directly injected (5 µL) into the HPLC system. The elution system consisted of solvent A (0.5% water solution of orthophosphoric acid, *w*/*v*), solvent B (acetonitrile) and solvent C (tetrahydrofuran). The elution profile is presented in Table 2. The flow rate was 1.0 mL/min, the column was maintained at 25 °C, and the injection volume was 5 µL.

Table 2. Elution profile for HPLC-PDA quantitation of the fruit polyphenols.

Solvent B (Acetonitrile)		Solvent C (Tetrahydrofuran)	
Time (min)	**Concentration (%, *v*/*v*)**	**Time (min)**	**Concentration (%, *v*/*v*)**
0–1	3.0 (isocratic elution)	0–8	2.5 (isocratic elution)
1–25	3.0 → 20.5 (linear gradient)	8–9	2.5 → 6.5 (linear gradient)
25–45	20.5 → 50.0 (linear gradient)	9–19	6.5 (isocratic elution)
45–50	50.0 (isocratic elution)	19–24	6.5 → 9.0 (linear gradient)
50–52	50.0 → 3.0 (return to initial condition)	24–50	9.0 (isocratic elution)
52–60	3.0 (equilibration)	50–52	9.0 → 2.5 (return to initial condition)
		52–60	2.5 (equilibration)

The UV-Vis spectra were recorded over a range of 190–550 nm. The wavelength for detection and quantification was set to 250 nm for hydroxybenzoic acid derivatives, 325 nm for caffeic acid derivatives, 310 nm for other hydroxycinnamic acid derivatives, 350 nm for flavonol glycosides, 350 nm for flavonol aglycones, and 520 nm for anthocyanins. The peak purity was assessed based on the degree of similarity of the UV spectra across the peak over the whole data collection range using a LabSolutions software (Shimadzu, Kyoto, Japan). Calibration was performed with the use of 24 authentic standards and the method was re-validated according to Marchelak et al. [18]. The validation parameters

for 7 fruit-specific standards (not involved in the previous study) are shown in Table 3. The analytes were quantified as equivalents of external standards per dw of the extracts, depending on their structures and UV-Vis spectra: protocatechuic acid for hydroxybenzoic acid derivatives, CHA for monocaffeoylquinic acid isomers, cynarin for dicaffeoylquinic acid isomers, caffeic acid or *p*-coumaric acid for other hydroxycinnamic acid derivatives; isoquercitrin for flavonoid monoglycosides, rutin for flavonoid diglycosides, and CYG for anthocyanins. All quantitative results were recalculated for the fresh weight (fw) of fruits using the extraction yield of MEF.

Table 3. Validation parameters for HPLC-PDA quantitative method.

Analyte	λ (nm)	Regression (Linear Model)		*r*	Linear Range (μg/mL)	*F*-Test	LOD (μg/mL)
		Equation	*n*				
Protocatechuic acid	260	y = 15884.45x	6	0.9998	0.64–63.7	19979.99	0.398
p-Hydroxybenzoic acid	260	y = 25596.21x	6	0.9997	0.63–62.8	13094.52	0.365
Vanillic acid	260	y = 16884.29x	6	0.9997	0.56–55.5	15385.86	0.373
Vanillin	280	y = 18673.22x	6	0.9999	0.67–66.8	32063.03	0.389
Cyanidin 3-*O*-*β*-D-glucopyranoside	520	y = 17908.10x	6	0.9990	0.52–52.3	4091.50	0.339
Cyanidin 3-*O*-rutinoside	520	y = 10946.63x	6	0.9997	0.51–51.0	12466.71	0.325
Peonidin 3-*O*-*β*-D-glucopyranoside	520	y = 12604.30x	6	0.9956	0.48–48.5	906.70	0.340

λ, detection wavelength; y, peak area; x, concentration of standard in (μg/mL); *n*, number of concentration levels (data points) used for construction of the regression equation; *F*-test, value of the statistical Fisher variance ratio for the experimental data.

4.4. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity in Cellular Models

4.4.1. Isolation of Human Neutrophils and PBMCs

The buffy coat fractions (a by-product of blood fractionation for transfusions) were obtained from the Warsaw Blood Donation Centre, where they were collected from adult male donors (18–35 years old). The donors were non-smokers, were clinically recognised to be healthy, and did not take any medications. The study conformed to the principles of the Declaration of Helsinki. As it involved commercially available biological material, it did not require approval of a bioethics committee.

Neutrophils were isolated by dextran sedimentation, hypotonic lysis of erythrocytes and, centrifugation in a Ficoll–Hypaque gradient (PAA Laboratories, Pasching, Austria) according to Michel et al. [46]. PBMCs were isolated by a Ficoll–Hypaque gradient centrifugation as described previously [47]. After isolation, the cells were suspended in RPMI 1640 culture medium, (Ca^{2+})-free phosphate-buffered saline (PBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), or (Ca^{2+})-free Hanks' balanced salt solution (HBSS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and were maintained at 4 °C before use.

4.4.2. Neutrophils and PBMCs Viability

The potential cytotoxicity of the extracts, fractions and pure compounds (analytes) was examined by standard flow cytometry (BD FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) with propidium iodide (PI) staining and Triton X-100 solution as a positive control [46]. The analytes were tested at the final concentrations of 1–100 μg/mL for the extracts/fractions and 5–50 μM for pure compounds. The analyses were performed after 24h of incubation for neutrophils, and after 48h of incubation for PBMCs.

4.4.3. ROS Generation by Human Neutrophils

The inhibition of ROS production was analysed by the luminol-dependent chemiluminescence method after *N*-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (*f*-MLP) stimulation [46]. The changes in chemiluminescence were measured in 96-well plates over a 40 min period at intervals of 2 min using a microplate reader (Synergy 4, BioTek, Winooski, VT, USA). The percentage of ROS secretion was calculated in comparison to the control untreated by

the investigated analytes. Quercetin (5–50 μM) was used as a positive control. All reagents were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

4.4.4. ELA-2 Release by Human Neutrophils

The ELA-2 secretion by *f*-MLP-cytochalasin B-stimulated neutrophils was determined using *N*-succinyl-alanine-alanine-valine-*p*-nitroanilide (SAAVNA) as a substrate according to Michel et al. [46] with some modifications. Briefly, 200 μL of cell suspension (4×10^6/mL) in HBSS was pre-incubated in 96-well plates for 30 min at 37 °C with 5% CO_2 in the presence of an analyte (50 μL) dissolved in HBSS. The final levels of the analytes were the same as those used in the viability tests. The liberated *p*-nitrophenol was measured at 412 nm over a period of 300 min with 20 min intervals using a microplate reader (SYNERGY 4, BioTek, Winooski, VT, USA). The percentage of the ELA-2 release was calculated in comparison to the control untreated by the investigated analytes. Quercetin (5–50 μM) was used as a positive control. All reagents were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

4.4.5. Secretion of IL-8, IL-6, TNF-α and IL-10 by Immune Cells

The release of pro- and anti-inflammatory cytokines by LPS-stimulated cells was analysed as described earlier [46,47], with slight modifications. Briefly, the working cell concentration was 2×10^6/mL for neutrophils and 4×10^6/mL for PBMCs, and the incubation time was 24 h for analyte-treated neutrophils and 48 h for analyte-treated PBMCs. The final levels of the analytes were the same as those used in the viability tests. Dexamethasone (5–50 μM) was applied as a positive control. LPS (from Escherichia coli O111:B4) was purchased from Merck Millipore (Billerica, MA, USA), and all other reagents from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

4.5. Statistics and Data Analysis

Results were expressed as means ± standard deviation (SD) for replicate determinations. The statistical analyses (calculation of SD, one-way analysis of variance, HSD Tukey's HSD test, Dunnett's test) were carried out using the Statistica13.1Pl software for Windows (StatSoft, Krakow, Poland) at a significance level of $\alpha = 0.05$.

5. Conclusions

This is the first report on the antioxidant and anti-inflammatory activity of fresh fruits of *P. spinosa* in normal human immune cells. With 57 identified constituents (28 new for the fruits), the study also introduces significant novelty to the phytochemistry of sloes. The results indicate that fresh blackthorn fruits from Poland (continental climate) accumulate high contents of polyphenols, mainly condensed proanthocyanidins and phenolic acids, followed by anthocyanins and flavonols. As evidenced by correlation studies, polyphenols significantly contribute to the antioxidant and anti-inflammatory effects of the fruit extracts. The biological effects of the extracts are significant and most pronounced for the release of some key pro-inflammatory (ROS, TNF-α, ELA-2) and anti-inflammatory (IL-10) factors, which are down- and upregulated, respectively, in immune cells. Considering the fact that native polyphenols accumulate to a large extent in the intestines, these observations might explain the traditional application of blackthorn fruits in chronic inflammatory diseases within the gastrointestinal tract. The study also documents the role of fractionation for effective phytochemical profiling and concentration of active fruit polyphenols. Due to the superior phenolic contents and activity parameters, the DEFF, EAFF and BFF appear to be the most advantageous for functional applications. Nonetheless, further studies of their activity mechanisms, potential toxicity and in vivo effects, including intestinal metabolism, are required to verify their health benefits.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded online. S.1. Results: Table S1. UHPLC-PDA-ESI-MS^3 identification data of compounds detected in the extracts from fresh fruits of *P. spinosa*; Table S2. Quantitative profile of the *P. spinosa* fruit (mg/g fw); Table S3. Correlation (r) coefficients and probability p-Values of linear relationships between antioxidant and anti-inflammatory activity parameters and phenolic contents of *P. spinosa* fruit extracts; Figure S1. Structures of the dominant polyphenolic compounds of *P. spinosa* fruits extracts; Figure S2. Effect of the *P. spinosa* fruit extracts and pure compounds on viability (membrane integrity) of human immune cells; S.2. Reference Standards; S.3. Plant Material: Figure S3. Representative image of a sample of fresh *P. spinosa* fruits. References [48–51] are cited in the supplementary materials.

Author Contributions: Conceptualization, A.M. (Anna Magiera) and M.AO.; Investigation, A.M. (Anna Magiera), A.O. and A.M. (Anna Marchelak); Methodology, A.M. (Anna Magiera), M.E.C., A.O., S.G. and M.A.O.; Data curation, A.M. (Anna Magiera); Formal analysis, A.M. (Anna Magiera); Project administration, A.M. (Anna Magiera); Validation, A.M. (Anna Magiera) and M.A.O.; Resources, M.E.C., S.G. and M.A.O.; Supervision, M.E.C. and M.A.O.; Funding Acquisition, M.A.O.; Writing—original draft, A.M. (Anna Magiera); Writing—review and editing, M.A.O., M.E.C., A.O., S.G. and M.A.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Medical University of Lodz (grant number 503/3-022-01/503-31-001).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: This project was carried out using CePT infrastructure financed by the European Regional Development Fund within the Operational Programme "Innovative economy" for 2007–2013. The authors would like to thank Ewelina Ziemba for helping with preparation of the extracts.

Conflicts of Interest: No potential conflicts of interest were reported by the authors.

Sample Availability: Samples of the fruits and extracts are available from the authors.

Abbreviations

BFF	*n*-butanol fraction of MEF
CHA	chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid)
CYG	cyanidin 3-*O*-*β*-D-glucopyranoside
DEFF	diethyl ether fraction of MEF
DEX	dexamethasone
dw	dry weight
EAFF	ethyl acetate fraction of MEF
ELA-2	elastase 2 (neutrophils elastase)
*f*MLP	*N*-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine
FRAP	ferric reducing antioxidant power
fw	fresh weight
GAE	gallic acid equivalents
IBD	inflammatory bowel disease
IL	interleukin
LOD	limits of detection
LOQ	limits of quantitation
LPS	bacterial lipopolysaccharide
MEF	methanol-water (75:25, v/v) extract of fresh fruits
PB2	procyanidin B2
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
QU	quercetin
ROS	reactive oxygen species
TAC	total content of anthocyanins
TFL	total content of flavonoids
TNF-α	tumour necrosis factor α
TPA	total content of phenolic acids

TPC	total phenolic content (Folin–Ciocalteu assay)
TPH	total phenolic content (sum of individual phenolics by HPLC)
TTC	total content of tannin-type proanthocyanidins
WRF	water residue of MEF after fractionated extraction

References

1. Minihane, A.M.; Vinoy, S.; Russell, W.R.; Baka, A.; Roche, H.M.; Tuohy, K.M.; Teeling, J.L.; Blaak, E.E.; Fenech, M.; Vauzour, D.; et al. Low-grade inflammation, diet composition and health: Current research evidence and its translation. *Br. J. Nutr.* **2015**, *114*, 999–1012. [CrossRef]
2. Yahfoufi, N.; Alsadi, N.; Jambi, M.; Matar, C. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients* **2018**, *10*, 1618. [CrossRef] [PubMed]
3. Prame Kumar, K.; Nicholls, A.J.; Wong, C.H.Y. Partners in crime: Neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease. *Cell Tissue Res.* **2018**, *371*, 551–565. [CrossRef] [PubMed]
4. Chen, L.; Deng, H.; Cui, H.; Fang, J.; Zuo, Z.; Deng, J.; Li, Y.; Wang, X.; Zhao, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* **2018**, *9*, 7204–7218. [CrossRef]
5. Bourgonje, A.R.; Feelisch, M.; Faber, K.N.; Pasch, A.; Dijkstra, G.; van Goor, H. Oxidative stress and redox-modulating therapeutics in inflammatory bowel disease. *Trends Mol. Med.* **2020**, *26*, 1034–1046. [CrossRef] [PubMed]
6. Popescu, I.; Caudullo, G. *Prunus spinosa* in Europe: Distribution, habitat, usage and threats. In *European Atlas of Forest Tree Species*; San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A., Eds.; Publications Office of the European Union: Luxembourg, 2016; p. e01aa69+. Available online: https://w3id.org/mtv/FISE-Comm/v01/e01aa69 (accessed on 10 December 2021).
7. Facciola, S. *Cornucopia II: A Source Book of Edible Plants*, 2nd ed.; Kampong Publications: Vista, CA, USA, 1998; p. 204.
8. Kültür, S. Medicinal plants used in Kirklareli Province (Turkey). *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *111*, 341–364. [CrossRef] [PubMed]
9. Alarcón, R.; Pardo-de-Santayana, M.; Priestley, C.; Morales, R.; Heinrich, M. Medicinal and local food plants in the south of Alava (Basque Country, Spain). *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *176*, 207–224. [CrossRef]
10. Jarić, S.; Mačukanović-Jocić, M.; Djurdjević, L.; Mitrović, M.; Kostić, O.; Karadžić, B.; Pavlović, P. An ethnobotanical survey of traditionally used plants on Suva planina mountain (south-eastern Serbia). *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *175*, 93–108. [CrossRef]
11. Barros, L.; Carvalho, A.M.; Sá Morais, J.; Ferreira, I.C.F.R. Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chem.* **2010**, *120*, 247–254. [CrossRef]
12. Guimarães, R.; Barros, L.; Dueñas, M.; Carvalho, A.M.; Queiroz, M.J.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I.C. Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. *Food Chem.* **2013**, *141*, 3721–3730. [CrossRef]
13. Jaiswal, R.; Karaköse, H.; Rühmann, S.; Goldner, K.; Neumüller, M.; Treutter, D.; Kuhnert, N. Identification of phenolic compounds in plum fruits (*Prunus salicina* L. and *Prunus domestica* L.) by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry and characterization of varieties by quantitative phenolic fingerprints. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 12020–12031. [CrossRef] [PubMed]
14. Morales, P.; Ferreira, I.C.F.R.; Carvalho, A.M.; Fernández-Ruiz, V.; Cortes Sánchez-Mata, M.; Cámara, M.; Morales, R.; Tardío, J. Wild edible fruits as a potential source of phytochemicals with capacity to inhibit lipid peroxidation. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2013**, *115*, 176–185. [CrossRef]
15. Veličković, J.M.; Kostić, D.A.; Stojanović, G.S.; Mitić, S.S.; Mitić, M.N.; Randelović, S.S.; Dordević, A.S. Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit. *Hem. Ind.* **2014**, *68*, 297–303. [CrossRef]
16. Mikulic-Petkovsek, M.; Stampar, F.; Veberic, R.; Sircelj, H. Wild *Prunus* fruit species as a rich source of bioactive compounds. *J. Food Sci.* **2016**, *81*, C1928–C1937. [CrossRef] [PubMed]
17. Popović, B.M.; Blagojević, B.; Ždero Pavlović, R.; Mićić, N.; Bijelić, S.; Bogdanović, B.; Mišan, A.; Duarte, C.M.M.; Serra, A.T. Comparison between polyphenol profile and bioactive response in blackthorn (*Prunus spinosa* L.) genotypes from north Serbia-from raw data to PCA analysis. *Food Chem.* **2020**, *302*, 125373. [CrossRef] [PubMed]
18. Marchelak, A.; Owczarek, A.; Matczak, M.; Pawlak, A.; Kolodziejczyk-Czepas, J.; Nowak, P.; Olszewska, M.A. Bioactivity potential of *Prunus spinosa* L. flower extracts: Phytochemical profiling, cellular safety, pro-inflammatory enzymes inhibition and protective effects against oxidative stress in vitro. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 680. [CrossRef]
19. Pinacho, R.; Cavero, R.Y.; Astiasarán, I.; Ansorena, D.; Calvo, M.I. Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of in vitro digestion on their antioxidant capacity. *J. Funct. Foods* **2015**, *19*, 49–62. [CrossRef]
20. Owczarek, A.; Magiera, A.; Matczak, M.; Piotrowska, D.G.; Olszewska, M.A.; Marchelak, A. Optimisation of preparative HPLC separation of four isomeric kaempferol diglycosides from *Prunus spinosa* L. by application of the response surface methodology. *Phytochem. Lett.* **2017**, *20*, 415–424. [CrossRef]
21. Fraternale, D.; Giamperi, L.; Bucchini, A.; Sestili, P.; Paolillo, M.; Riccia, D. *Prunus spinosa* fresh fruit juice: Antioxidant activity in cell-free and cellular systems. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*, 1665–1670. [CrossRef]
22. Ruiz-Rodríguez, B.M.; De Ancos, B.; Sánchez-Moreno, C.; Fernández-Ruiz, V.; De Cortes Sánchez-Mata, M.; Cámara, M.; Tardío, J. Wild blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) fruits as valuable sources of antioxidants. *Fruits* **2014**, *69*, 61–73. [CrossRef]

23. Condello, M.; Pellegrinia, E.; Spugnini, E.P.; Baldi, A.; Amadio, B.; Vincenzi, B.; Occhionero, G.; Delfine, S.; Mastrodonato, F.; Meschini, S. Anticancer activity of "Trigno M", extract of *Prunus spinosa* drupes, against in vitro 3D and in vivo colon cancer models. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *118*, 109281. [CrossRef]
24. Sabatini, L.; Fraternale, D.; Di Giacomo, B.; Mari, M.; Albertini, M.C.; Gordillo, B.; Rocchi, M.B.L.; Sisti, D.; Coppari, S.; Semprucci, F.; et al. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activity of *Prunus spinosa* L. fruit ethanol extract. *J. Funct. Foods* **2020**, *67*, 103885. [CrossRef]
25. Tiboni, M.; Coppari, S.; Casettari, L.; Guescini, M.; Colomba, M.; Fraternale, D.; Gorassini, A.; Verardo, G.; Ramakrishna, S.; Guidi, L.; et al. *Prunus spinosa* extract loaded in biomimetic nanoparticles evokes in vitro anti-inflammatory and wound healing activities. *Nanomaterials* **2020**, *11*, 36. [CrossRef] [PubMed]
26. Michel, P.; Granica, S.; Rosińska, K.; Rojek, J.; Poraj, Ł.; Olszewska, M.A. Biological and chemical insight into *Gaultheria procumbens* fruits: A rich source of anti-inflammatory and antioxidant salicylate glycosides and procyanidins for food and functional application. *Food Funct.* **2020**, *11*, 7532–7544. [CrossRef] [PubMed]
27. Jaiswal, R.; Sovdat, T.; Vivan, F.; Kuhnert, N. Profiling and characterization by LC-MSn of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in maté (*Ilex paraguariensis*). *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 5471–5481. [CrossRef]
28. Jaiswal, R.; Müller, H.; Müller, A.; Karar, M.G.; Kuhnert, N. Identification and characterization of chlorogenic acids, chlorogenic acid glycosides and flavonoids from *Lonicera henryi* L. (Caprifoliaceae) leaves by LC-MS^n. *Phytochemistry* **2014**, *108*, 252–263. [CrossRef]
29. Clifford, M.N.; Johnston, K.L.; Knight, S.; Kuhnert, N. Hierarchical scheme for LC-MS^n identification of chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2900–2911. [CrossRef]
30. Ben Said, R.; Hamed, A.I.; Mahalel, U.A.; Al-Ayed, A.S.; Kowalczyk, M.; Moldoch, J.; Oleszek, W.; Stochmal, A. Tentative Characterization of Polyphenolic Compounds in the Male Flowers of *Phoenix dactylifera* by Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry and DFT. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 512. [CrossRef]
31. Morreel, K.; Saeys, Y.; Dima, O.; Lu, F.; Van de Peer, Y.; Vanholme, R.; Ralph, J.; Vanholme, B.; Boerjan, W. Systematic structural characterization of metabolites in *Arabidopsis* via candidate substrate-product pair networks. *Plant Cell* **2014**, *26*, 929–945. [CrossRef]
32. Catarino, M.D.; Silva, A.M.S.; Saraiva, S.C.; Sobral, A.B.J.F.N.; Cardoso, S.M. Characterization of phenolic constituents and evaluation of antioxidant properties of leaves and stems of *Eriocephalus africanus*. *Arab. J. Chem.* **2018**, *11*, 62–69. [CrossRef]
33. Colombo, F.; Di Lorenzo, C.; Regazzoni, L.; Fumagalli, M.; Sangiovanni, E.; de Sousa, L.P.; Bavaresco, L.; Tomasi, D.; Bosso, A.; Aldini, G.; et al. Phenolic profiles and anti-inflammatory activities of sixteen table grape (*Vitis vinifera* L.) varieties. *Food Funct.* **2019**, *10*, 1797–1807. [CrossRef] [PubMed]
34. Adefegha, S.A. Functional foods and nutraceuticals as dietary intervention in chronic diseases; Novel perspectives for health promotion and disease prevention. *J. Dietary Suppl.* **2018**, *15*, 977–1009. [CrossRef] [PubMed]
35. Mikulic-Petkovsek, M.; Schmitzer, V.; Slatnar, A.; Stampar, F.; Veberic, R. Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species. *J. Food Sci.* **2012**, *77*, C1064–C1070. [CrossRef] [PubMed]
36. Pervin, M.; Hasnat, M.A.; Lim, J.H.; Lee, Y.M.; Kim, E.O.; Um, B.H.; Lim, B.O. Preventive and therapeutic effects of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) extract against DSS-induced ulcerative colitis by regulation of antioxidant and inflammatory mediators. *J. Nutr. Biochem.* **2016**, *28*, 103–113. [CrossRef] [PubMed]
37. Raafat, K.; El-Darra, N.; Saleh, F.A. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of *Prunus cerasus* phytochemicals and their possible mechanisms of action. *J. Tradit. Complement. Med.* **2020**, *10*, 345–353. [CrossRef] [PubMed]
38. Wu, X.; Song, M.; Cai, X.; Neto, C.; Tata, A.; Han, Y.; Wang, Q.; Tang, Z.; Xiao, H. Chemopreventive Effects of whole cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) on colitis-associated colon tumorigenesis. *Food Funct.* **2018**, *62*, 1800942. [CrossRef] [PubMed]
39. Ozdal, T.; Sela, D.A.; Xiao, J.; Boyacioglu, D.; Chen, F.; Capanoglu, E. The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients* **2016**, *8*, 78. [CrossRef] [PubMed]
40. Zhang, C.; Shu, W.; Zhou, G.; Lin, J.; Chu, F.; Wu, H.; Liu, Z. Anti-TNF-α therapy suppresses pro-inflammatory activities of mucosal neutrophils in inflammatory bowel disease. *Mediat. Inflamm.* **2018**, *2018*, 3021863. [CrossRef]
41. Marchelak, A.; Owczarek, A.; Rutkowska, M.; Michel, P.; Kolodziejczyk-Czepas, J.; Nowak, P.; Olszewska, M.A. New insights into antioxidant activity of *Prunus spinosa* flowers: Extracts, model polyphenols and their phenolic metabolites in plasma towards multiple in vivo-relevant oxidants. *Phytochem. Lett.* **2019**, *30*, 288–295. [CrossRef]
42. Sanchez-Munoz, F.; Dominguez-Lopez, A.; Yamamoto-Furusho, J.K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **2008**, *14*, 4280–4288. [CrossRef] [PubMed]
43. Kuno, Y.; Ina, K.; Nishiwaki, T.; Tsuzuki, T.; Shimada, M.; Imada, A.; Nishio, Y.; Nobata, K.; Suzuki, T.; Ando, T.; et al. Possible involvement of neutrophil elastase in impaired mucosal repair in patients with ulcerative colitis. *J. Gastroenterol.* **2002**, *37*, 22–32. [CrossRef] [PubMed]
44. Sun, B.; Ricardo-da-Silva, J.M.; Spranger, I. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4267–4274. [CrossRef]
45. Marchelak, A.; Olszewska, M.A.; Owczarek, A. Simultaneous quantification of thirty polyphenols in blackthorn flowers and dry extracts prepared thereof: HPLC-PDA method development and validation for quality control. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *184*, 113121. [CrossRef]

46. Michel, P.; Granica, S.; Magiera, A.; Rosińska, K.; Jurek, M.; Poraj, Ł.; Olszewska, M.A. Salicylate and procyanidin-rich stem extracts of *Gaultheria procumbens* L. inhibit pro-inflammatory enzymes and suppress pro-inflammatory and pro-oxidant functions of human neutrophils ex vivo. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1753. [CrossRef]
47. Olszewska, M.A.; Granica, S.; Kołodziejczyk-Czepas, J.; Magiera, A.; Czerwińska, M.E.; Nowak, P.; Rutkowska, M.; Wasiński, P.; Owczarek, A. Variability of sinapic acid derivatives during germination and their contribution to antioxidant and anti-inflammatory effects of broccoli sprouts in human plasma and human peripheral blood mononuclear cells. *Food Funct.* **2020**, *11*, 7231–7244. [CrossRef]
48. Wu, Z.J.; Ma, X.L.; Fang, D.M.; Qi, H.Y.; Ren, W.J.; Zhang, G.L. Analysis of caffeic acid derivatives from *Osmanthus yunnanensis* using electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2009**, *15*, 415–429. [CrossRef]
49. Clifford, M.N.; Knight, S.; Kuhnert, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS^n. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3821–3832. [CrossRef]
50. Olszewska, M.; Wolbiś, M. Further flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Acta Pol. Pharm.* **2002**, *59*, 133–137. [PubMed]
51. Olszewska, M.; Wolbiś, M. Flavonoids from the leaves of *Prunus spinosa* L. *Pol. J. Chem.* **2002**, *76*, 967–974.

molecules MDPI

Supplementary Material for:

Polyphenol-Enriched Extracts of *Prunus spinosa* Fruits: Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects in Human Immune Cells Ex Vivo in Relation to Phytochemical Profile

Anna Magiera [1,*], Monika Ewa Czerwińska[2,3], Aleksandra Owczarek[1], Anna Marchelak[1], Sebastian Granica[4] and Monika Anna Olszewska[1]

[1] Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, 1 Muszynskiego St., 90-151 Lodz, Poland
[2] Department of Biochemistry and Pharmacogenomics, Medical University of Warsaw, 1 Banacha St., 02-097 Warsaw, Poland
[3] Centre for Preclinical Research, Medical University of Warsaw, 1B Banacha St., 02-097 Warsaw, Poland
[4] Microbiota Lab, Centre for Preclinical Studies, Department of Pharmacognosy and Molecular Basis of Phy-totherapy, Medical University of Warsaw, 1 Banacha St., 02-097 Warsaw, Poland
* Correspondence: anna.magiera@umed.lodz.pl (A. Magiera); Tel.: +48 503316997

Supplementary Material

Table of Contents

S.1. Results

Table S1. UHPLC-PDA-ESI-MS[3] identification data of compounds detected in the dry extracts from fresh and dried fruits of *P. spinosa*.

Figure S1. Structures of the dominant polyphenolic compounds of *P. spinosa* fruits extracts.

Table S2. Quantitative profile of the *P. spinosa* fruit (mg/g fw).

Figure S2. Effect of the fruit extracts and pure compounds on viability (membrane integrity) of human immune cells.

Table S3. Correlation (r) coefficients and probability (p) values of linear relationships between antioxidant and anti-inflammatory activity parameters and phenolic contents of *P. spinosa* fruits extracts.

S.2. Reference Standards

S.3. Plant Material

Figure S3. Representative image of a sample of fresh *P. spinosa* fruits.

References

S.1. Results

Table S1. UHPLC-PDA-ESI-MS^3 identification data of compounds detected in the extracts from fresh fruits of *P. spinosa*.

Peak	Analyte	*Rt* (min)	UV λ_{max} (nm)	$[M–H]^-$ (m/z)	Fragmentary ions	$[M–H]^+$ (m/z)	Fragmentary ions	Fruit extracts	References
1	Vanillic acid *O*-hexoside	3.9	250 290	329	167	-	-	BFF, EAFF, MEF, WRF	-
2	Protocatechuic acid[a,b]	4.6	260 295	153	153	155	155	DEFF, EAFF	-
3	Unidentified	5.2	325	517	335	-	-	BFF, MEF	-
4	Unidentified	5.2	275	315	179, 161	-	-	WRF	-
5	cis-3-*O*-Caffeoylquinic acid[b]	5.7	322	353	191, 179	-	-	EAFF, MEF, WRF	[1]
6	3-*O*-Caffeoylquinic acid hexoside[b]	6.2	325 295	515	353 (MS^3: 191, 179), 335, 341, 179			BFF	[2]
7	3-*O*-Caffeoylquinic acid (neochlorogenic acid)[a]	6.7	325 265 211	353	191, 179, 135	-	-	BFF, DEFF, EAFF, MEF, WRF	[3]
8	*p*-Hydroxybenzoic acid[a]	7.1	267 290	137	-	-	-	DEFF, EAFF	-
9	3-*O*-Caffeoylquinic acid hexoside[b]	7.8	210 325 270	515	353 (MS^3: 191, 179), 191, 341	-	-	BFF, EAFF	[2]
10	Vanilloyl malate hexoside[b]	8.9	260	445	329, 167	-	-	EAFF	-
11	3-*O*-*p*-Coumaroylquinic acid	9.2	310	337	163, 191	-	-	BFF, DEFF, EAFF, MEF, WRF	[1]
12	Caffeic acid 3/4-*O*-hexoside	9.5	317 285	341	179, 135	-	-	BFF	-
13	Vanillic acid[a]	10.1	216 260 290	167	167	169	169	DEFF	-
14	5-*O*-Caffeoylquinic acid (chlorogenic acid, CHA)[a]	10.6	325	353	191, 179	-	-	BFF, DEFF, EAFF, MEF	[3]
15	*cis*-3-*O*-Feruloylquinic acid[b]	11.0	215 325 293	367	193	-	-	DEFF, EAFF	[1]
16	Caffeic acid[a]	11.2	323 214 286	179	-	-	-	DEFF	-
17	Unidentified	11.2	300 225	415	293	-	-	BFF	-
18	4-*O*-Caffeoylquinic acid (cryptochlorogenic acid)[a]	11.5	325 215	353	173, 191, 179	-	-	BFF, DEFF, EAFF, MEF	[3]
19	Cyanidin 3-*O*-glucoside (CYG)[a]	11.6	515 280	447	285, 401	449	287	BFF, MEF, WRF	-

20	Caffeic acid 3/4-*O*-hexoside	12.1	320	341	179, 135	-	-	EAFF	-
21	4-*O*-*p*-Coumaroylquinic acid	12.3	310	337	173	-	-	DEFF	[1]
22	3-*O*-Feruloylquinic acid	12.5	322	367	193	-	-	DEFF, EAFF	[1]
23	Cyanidin 3-*O*-rutinoside[a]	12.6	515 280	593	285, 467	595	287	BFF, MEF, WRF	-
24	Vanillin[a,b]	13.3	285	-	-	153	153	DEFF, EAFF	-
25	Unidentified	14.1	216 262	295	251	-	-	DEFF	-
26	Peonidin 3-*O*-glucoside[a]	14.4	515 280	607	299	-	301	BFF, MEF	[4]
27	*cis*-3-*O*-*p*-Coumaroylquinic acid[b]	14.6	305	337	163	-	-	DEFF, EAFF	[1]
28	Peonidin 3-*O*-rutinoside	15.0	515 280	607	299	-	301	BFF, MEF, WRF	[4]
29	4-*O*-Caffeoylshikimic acid[b]	15.2	325	335	179, 135	-	-	DEFF, EAFF	[1]
30	*p*-Coumaric acid[a]	15.8	310	163	-	-	-	DEFF	-
31	4-*O*-Feruloylquinic acid[b]	16.5	320 217	367	176	-	-	EAFF	[1]
32	Sinapoyl malate hexoside[b]	16.5	280 313	501	223	-	-	DEFF	-
33	Caffeoylshikimic acid[b]	17.4	280	335	161, 135, 179	-	-	BFF, DEFF, EAFF, MEF, WRF	[1]
34	Sinapoyl malate hexoside[b]	18.5	275	501	223, 339	-	-	DEFF	[5]
35	Caffeoylshikimic acid[b]	18.9	215	335	161, 179	-	-	DEFF, EAFF	[1]
36	Quercetin dirhamnoside-hexoside[b]	19.7	350	755	301, 609	-	303	BFF	-
37	Unidentified	20.9	280	317	287	-	-	DEFF	-
38	Kaempferol dihexoside[b]	23.3	280 330	609	447, 285	-	287	MEF	-
39	*p*-Coumaroylshikimic acid[b]	23.8	300 205	319	119, 145, 275, 163, 257	-	-	DEFF, EAFF	[6]
40	Quercetin hexoside-pentoside	24.7	354	595	301, 433	-	303	BFF, MEF	-
41	Quercetin rhamnoside-hexoside	25.6	355	609	301	-	303	BFF, MEFF	-
42	Quercetin 3-*O*-*β*-D-galactoside (hyperoside)[a]	26.2	264 355	463	301	-	303	DEFF, EAFF, MEF	-
43	Kaempferol rhamoside-dihexoside	26.3	280 350	755	593, 285	-	287	WRF	-
44	Quercetin 3-*O*-(6″-*O*-*α*-L-rhamnopyranosyl)-*β*-D-glucopyranoside (rutin)[a]	26.6	265 350	609	301	-	303	BFF, DEFF, EAFF, MEF, WRF	-
45	Quercetin 3-*O*-*β*-D-glucopyranoside (isoquercitrin)[a]	27.7	260 355	463	301	-	303	BFF, DEFF, EAFF, MEF	-
46	Quercetin 3-*O*-(2″-*O*-*β*-D-glucopyranosyl)-*α*-L-arabinofuranoside[a,b]	28.7	255 355	595	433, 301	-	303	BFF, MEF, WRF	-
47	Quercetin 3-*O*-*α*-D-xylopyranoside (reinutrin)[a,b]	30.1	256 356	433	301	435	303	DEFF, EAFF	-
48	Quercetin 3-*O*-*α*-L-arabinopyranoside (guaiaverin)[a,b]	30.4	255 355	433	301	435	303	DEFF, EAFF	-

49	Quercetin acetyl-dihexoside[b]	31.5	266 350	667	301	-	303	DEFF	-
50	Quercetin 3-*O*-*α*-L-arabinofuranoside (avicularin)[a,b]	35.1	255 355	433	301	435	303	BFF, DEFF, EAFF, MEF	-
51	Quercetin 3-*O*-(4″-*O*-*β*-D-glucopyranosyl)-*α*-L-rhamnopyranoside (multinoside A)[a,b]	35.8	254 355	609	447, 301	611	449, 303	BFF, EAFF, MEF	-
52	Quercetin 3-*O*-*α*-L-rhamnopyranoside (quercitrin)[a]	36.5	255 355	447	301	449	303	BFF, DEFF, EAFF, MEF	-
53	Isorhamnetin rhamnoside-hexoside (Isorhamnetin rutinoside)	37.2	260 350	623	315	-	-	BFF, MEF	-
54	Isorhamnetin rhamnoside[b]	37.2	350	461	315	-	-	DEFF	-
55	Quercetin malyl-pentoside[b]	38.0	254 350	549	433, 301	-	435, 303	DEFF, EAFF	-
56	Quercetin acetyl-hexoside	38.4	250 350	505	301	-	303	DEFF, MEF	-
57	Quercetin malyl-pentoside[b]	39.3	255 355	549	433, 301	-	435, 303	DEFF	-
58	Quercetin pentoside	43.7	255 350	433	301	435	303	DEFF	-
59	Caffeoylquinic acid butyl ester[b]	44.2	325 292	409	161, 135, 191	-	-	BFF	[7]
60	Kaempferol hexoside[b]	44.4	255 355	447	285	-	287	DEFF	-
61	Quercetin acetyl-hexoside-rhamoside	46.5	254 350	651	609, 301	-	303	EAFF, MEF	-
62	Quercetin (QU)[a]	49.2	255 356	301	-	-	303	DEFF, EAFF	-
63	Unidentified	50.9	350	337	322	-	-	DEFF	-

[a] Identified with authentic standards. [b] Detected in *P. spinosa* fruits for the first time. *Rt*, retention times. UV λ_{max}, absorbance maxima in UV-Vis spectra. $[M–H]^-$, deprotonated molecular ions in MS spectra recorded in a negative ion mode. $[M+H]^+$, protonated molecular ions in MS spectra recorded in a positive ion mode. Nomenclature of quinic acid esters including chlorogenic acid isomers is according to IUPAC rules adopted by Clifford et al. [3,8].

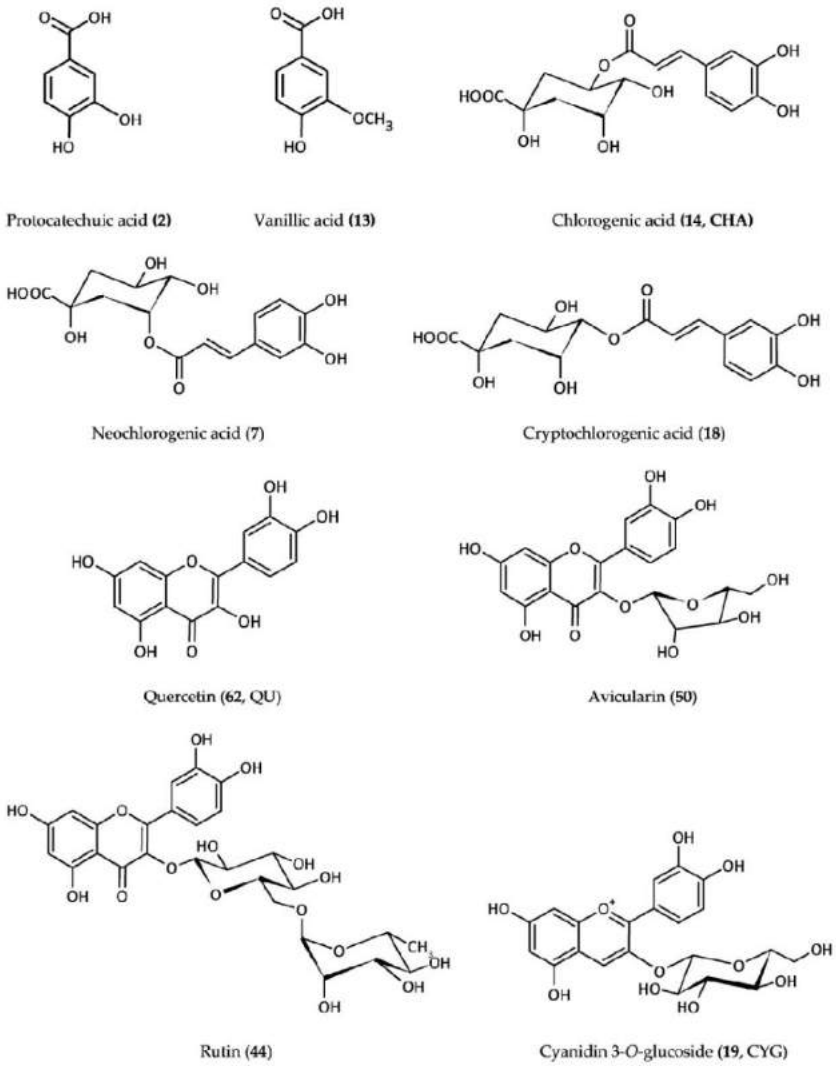


Figure S1. Structures of the dominant polyphenolic compounds of *P. spinosa* fruits extracts. Numbers in parentheses (bold font) refer to those in Figure 1 (main article) and supplementary Table S1.

Table S2. Quantitative profile of the *P. spinosa* fruit (mg/g fw).

Total contents	
TPC (GAE)	13.69 ± 0.55
TPH	4.46 ± 0.09
TPA	3.07 ± 0.05
TAC	0.72 ± 0.02
TFL	0.66 ± 0.03
TTC (PB2)	6.96 ± 0.30
Individual compounds	
Avicularin (**50**)	0.21 ± 0.02
Hyperoside (**42**)	0.03 ± 0.0007
Isoquercitrin (**45**)	0.01 ± 0.0006
Rutin (**44**)	0.25 ± 0.003
Quercitrin (**52**)	0.02 ± 0.001
Cyanidin 3-O-glucoside (**19**, CYG)	0.31 ± 0.02
Cyanidin 3-O-rutinoside (**23**)	0.22 ± 0.01
Peonidin-3-O-glucoside (**26**)	0.15 ± 0.01
Neochlorogenic acid (**7**)	2.43 ± 0.05
Chlorogenic acid (**14**, CHA)	0.15 ± 0.003
Cryptochlorogenic acid (**18**)	0.24 ± 0. 01

Results are presented as means ± SD (n = 3). Numbers in parentheses (first column, in bold) refer to those in Figure 1 (main article) and supplementary Table S1. TPC, total phenolic contents in gallic acid equivalents (GAE); TPH, total contents of low-molecular-weight phenols determined by HPLC-PDA; TPA, total phenolic acids; TAC, total anthocyanins; TFL, total flavonoids; TTC, total tannins in procyanidin (PB2) B2 equivalents.

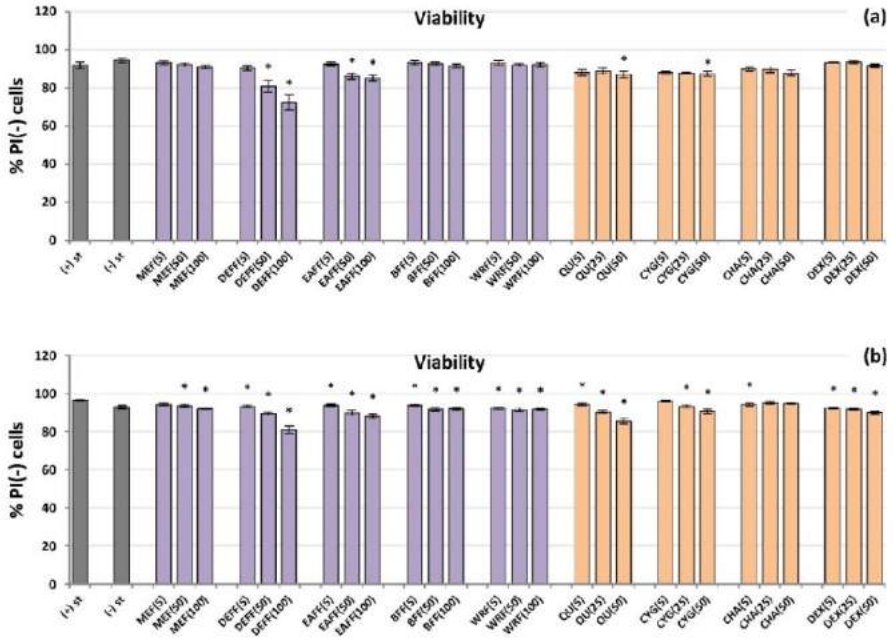


Figure S2. Effect of fruit extracts/fractions (5-100 μg/mL) and standards (5-50 μM) on viability (membrane integrity) of human immune cells expressed as a percentage of PI(-) cells (propidium iodide-negative): **(a)** effect on viability of neutrophils after 24 h incubation; **(b)** effect on viability of PBMCs after 48 h incubation. Standards: DEX, dexamethasone; QU, quercetin; CYG, cyanidin 3-*O*-glucoside; CHA, chlorogenic acid; Positive control: Triton X-100 solution (98.6% of PI(+) cells). Data expressed as means ± SD of five independent experiments performed with cells isolated from five independent donors. Statistical significance in Dunnett's test: $^{*}p < 0.05$ compared with the stimulated control.

Table S3. Correlation (r) coefficients and probability (p) values of linear relationships between biological activity parameters and phenolic contents of *P. spinosa* fruits extracts.

		Neutrophils		
r (p) for	**ROS level**	**TNF-α secretion**	**ELA-2 secretion**	**IL-8 secretion**
TPC	-0.7455 (0.000)*	-0.7463 (0.001)*	-0.4777 (0.029)*	-0.4545 (0.089)
TPH+TTC	-0.7398 (0.000)*	-0.6504 (0.009)*	-0.4481 (0.042)*	-0.3927 (0.148)
		PBMCs		
r (p) for		**TNF-α secretion**	**IL-10 secretion**	**IL-6 secretion**
TPC		-0.8689 (0.000)*	0.5787 (0.024)*	-0.6200 (0.014)*
TPH+TTC		-0.8761 (0.000)*	0.6116 (0.015)*	-0.6070 (0.016)*

Values calculated using activity and concentration parameters reported in Table 1 and Figures 3-5. TPC, total phenolic contents in gallic acid equivalents (GAE); TPH, total contents of low-molecular-weight phenols determined by HPLC-PDA; TTC, total tannins in procyanidin (PB2) B2 equivalents. Asterisks mean statistical significance of the linear relationships ($p < 0\ 05$).

S.2. Reference Standards

All standards used for phytochemical profiling and biological activity tests were of HPLC grade (purity at least 95%). The standards of dexamethasone, protocatechuic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid (neochlorogenic acid), 4-*O*-caffeoylquinic acid (cryptochlorogenic acid), 5-*O*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid, CHA), cynarin, *p*-coumaric acid, caffeic acid, vanillic acid, vanillin, quercetin (QU), quercetin 3-*O*-*α*-L-arabinofuranoside (avicularin), quercetin 3-*O*-*β*-D-galactopyranoside (hyperoside), quercetin 3-*O*-*β*-D-glucopyranoside (isoquercitrin), quercetin 3-*O*-(6″-*O*-*α*-L-rhamnopyranosyl)-*β*-D-glucopyranoside (rutin) and (-)-epicatechin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The standards of cyanidin 3-*O*-*β*-D-glucopyranoside (CYG), cyanidin 3-*O*-rutinoside and peonidin 3-*O*-*β*-D-glucopyranoside were purchased from PhytoLab (Vestenbergsgreuth, Germany). All other standards, such as quercetin 3-*O*-*α*-L-arabinopyranoside (guaiaverin), quercetin 3-*O*-*β*-D-xylopyranoside (reinutrin), quercetin 3-*O*-*α*-L-rhamnofuranoside (quercitrin), quercetin 3-*O*-(4″-*O*-*β*-D-glucopyranosyl)-*α*-L-rhamnopyranoside and quercetin 3-*O*-(2″-*O*-*β*-D-glucopyranosyl)-*α*-L-arabinofuranoside were isolated previously in our laboratory from flowers and leaves of *P. spinosa* with at least 95% HPLC purity [9,10].

S.3. Plant Material

Figure S3. Representative image of a sample of fresh *P. spinosa* fruits.

References

1 Jaiswal, R.; Sovdat, T.; Vivan, F.; Kuhnert, N. Profiling and characterization by LC-MSn of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in maté (*Ilex paraguariensis*). *J. Agri. Food Chem.* **2010**, *58*, 5471-5481.

2 Jaiswal, R.; Müller, H.; Müller, A.; Karar, M. G.; Kuhnert, N. Identification and characterization of chlorogenic acids, chlorogenic acid glycosides and flavonoids from *Lonicera henryi* L. (Caprifoliaceae) leaves by LC-MS^n. *Phytochemistry* **2014**, *108*, 252–263.

3 Clifford, M.N.; Johnston, K.L.; Knight, S.; Kuhnert, N. Hierarchical scheme for LC-MS^n identification of chlorogenic acids. *J. Agri. Food Chem.* **2003**, *51*, 2900-2911.

4 Colombo, F.; Di Lorenzo, C.; Regazzoni, L.; Fumagalli, M.; Sangiovanni, E.; de Sousa, L.P.; Bavaresco, L.; Tomasi, D.; Bosso, A.; Aldini, G.; Restani, P.; Dell'Agli, M. Phenolic profiles and anti-inflammatory activities of sixteen table grape (*Vitis vinifera* L.) varieties. *Food Funct.* **2019**, *10*, 1797.

5 Morreel, K.; Saeys, Y.; Dima, O.; Lu, F.; Van de Peer, Y.; Vanholme, R.; Ralph, J.; Vanholme, B.; Boerjan, W. Systematic structural characterization of metabolites in Arabidopsis via candidate substrate-product pair networks. *Plant Cell* **2014**, *26*, 929–945.

6 Ben Said, R.; Hamed, A.I.; Mahalel, U.A.; Al-Ayed, A.S.; Kowalczyk, M.; Moldoch, J.; Oleszek, W.; Stochmal, A. Tentative Characterization of Polyphenolic Compounds in the Male Flowers of *Phoenix dactylifera* by Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry and DFT. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, **18**, E512.

7 Wu, Z.J.; Ma, X.L.; Fang, D.M.; Qi, H,Y.; Ren, W.J.; Zhang, G.L. Analysis of caffeic acid derivatives from *Osmanthus yunnanensis* using electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2009**, *15*, 415–429.

8 Clifford, M.N.; Knight, S.; Kuhnert, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS^n. *J. Agri. Food Chem.* **2005**, *53*, 3821–3832.

9 Olszewska, M.; Wolbiś, M. Further flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Acta Pol. Pharm.* **2002a**, *59*, 133-137.

10 Olszewska, M.; Wolbiś, M. Flavonoids from the leaves of *Prunus spinosa* L. *Pol. J. Chem.* **2002b**, *76*, 967–974.

➢ Publikacja II

Magiera A., Czerwińska M.E., Owczarek A., Marchelak A., Granica S., Olszewska M.A. (2022). Polyphenols and Maillard reaction products in dried *Prunus spinosa* fruits: Quality aspects and contribution to anti-Inflammatory and antioxidant activity in human immune cells ex vivo. *Molecules*, 27(10), 3302, doi: 10.3390/molecules27103302, **IF_{2021} = 4.927, $MEiN_{2021}$ = 140**

molecules MDPI

Article

Polyphenols and Maillard Reaction Products in Dried *Prunus spinosa* Fruits: Quality Aspects and Contribution to Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity in Human Immune Cells Ex Vivo

Anna Magiera [1,*], Monika Ewa Czerwińska [2,3], Aleksandra Owczarek [1], Anna Marchelak [1], Sebastian Granica [4] and Monika Anna Olszewska [1]

1 Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, 1 Muszynskiego St., 90-151 Lodz, Poland; aleksandra.owczarek@umed.lodz.pl (A.O.); anna.marchelak@umed.lodz.pl (A.M.); monika.olszewska@umed.lodz.pl (M.A.O.)
2 Department of Biochemistry and Pharmacogenomics, Medical University of Warsaw, 1 Banacha St., 02-097 Warsaw, Poland; monika.czerwinska@wum.edu.pl
3 Centre for Preclinical Research, Medical University of Warsaw, 1B Banacha St., 02-097 Warsaw, Poland
4 Microbiota Lab, Centre for Preclinical Studies, Department of Pharmacognosy and Molecular Basis of Phytotherapy, Medical University of Warsaw, 1 Banacha St., 02-097 Warsaw, Poland; sgranica@wum.edu.pl
* Correspondence: anna.magiera@umed.lodz.pl; Tel.: +48-503-316-997

check for updates

Citation: Magiera, A.; Czerwińska, M.E.; Owczarek, A.; Marchelak, A.; Granica, S.; Olszewska, M.A. Polyphenols and Maillard Reaction Products in Dried *Prunus spinosa* Fruits: Quality Aspects and Contribution to Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity in Human Immune Cells Ex Vivo. *Molecules* **2022**, *27*, 3302. https://doi.org/10.3390/molecules27103302

Academic Editors: Rudolf Bauer and Jelena S. Katanic Stankovic

Received: 12 April 2022
Accepted: 18 May 2022
Published: 20 May 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/).

Abstract: Dried *Prunus spinosa* fruits (sloes) are folk phytotherapeutics applied to treat chronic inflammatory disorders. However, their pharmacological potential, activity vectors, and drying-related changes in bioactive components remain unexplored. Therefore, the present research aimed to evaluate the anti-inflammatory and antioxidant effects of dried sloes in ex vivo models of human neutrophils and peripheral blood mononuclear cells (PMBCs) and establish their main active components. It was revealed that the fruit extracts significantly and dose-dependently inhibited the respiratory burst, downregulated the production of elastase (ELA-2) and TNF-α, and upregulated the IL-10 secretion by immune cells under pro-inflammatory and pro-oxidant stimulation. The slightly reduced IL-6 and IL-8 secretion was also observed. The structural identification of active compounds, including 45 phenolics and three Maillard reaction products (MRPs) which were formed during drying, was performed by an integrated approach combining LC-MS/MS, preparative HPLC isolation, and NMR studies. The cellular tests of four isolated model compounds (chlorogenic acid, quercetin, procyanidin B2, and 5-hydroxymethylfurfural), supported by statistical correlation studies, revealed a significant polyphenolic contribution and a slight impact of MRPs on the extracts' effects. Moreover, a substantial synergy was observed for phenolic acids, flavonoids, condensed proanthocyanidins, and MPRs. These results might support the phytotherapeutic use of dried *P. spinosa* fruits to relieve inflammation and establish the quality control procedure for the extracts prepared thereof.

Keywords: *Prunus spinosa* fruits; LC–MS; NMR; phenolics; 5-hydroxymethylfurfural; drying; ROS; inflammatory mediators

1. Introduction

Prunus spinosa L. (blackthorn) is a small to medium-sized thorny tree of the rose family, native to Europe, Western Asia, and Northern Africa, and locally naturalised in New Zealand, Tasmania, and eastern North America [1]. The plant is one of few wild rosaceous species yielding edible fruits. They are tiny, globose, purple plums, which, when fresh, are widely used to produce various preserves, such as jams, juices, wines, brandy or liquors, while when dried, they are added to herbal teas [2]. Moreover, blackthorn fruits (sloes), both fresh and dried, are traditional herbal medicines recommended mostly to treat chronic inflammation-related disorders, especially those within the gastrointestinal and

urinary tracts, but also diarrhoea, hypertension, and metabolic diseases, such as diabetes and obesity [3–6].

Although ethnopharmacological sources do not differentiate the application range of fresh and dried sloes, to date scientific interest has focused almost exclusively on fresh fruits [7–14], and information on the dried *P. spinosa* plums is extremely scarce [15–17]. On the other hand, fresh sloes have been relatively deeply studied, primarily in terms of the mechanisms of their anti-inflammatory and antioxidant effects. In our previous study, we have documented that the fresh fruit extracts significantly modulate the functions of human immune cells, neutrophils and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) involved in the pathogenesis of inflammation. They downregulate the secretion of reactive oxygen species (ROS), pro-inflammatory cytokines (tumour necrosis factor α, TNF-α) and enzymes (elastase, ELA-2), and stimulate the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 [13]. Moreover, according to Sabatini et al. [14], the alcoholic extracts of fresh sloe plums can decrease the expression of IL-6 and adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in human endothelial cells (HUVEC). Furthermore, the high antioxidant potential of fresh *P. spinosa* plums was revealed in human malignant promonocytes [7] and non-cellular in vitro models [8,10–12].

The accumulated research suggests that the main active components of fresh sloes are polyphenols. A rich fraction of various polyphenols with more than 50 individual compounds has been revealed in the fresh plant material, including condensed proanthocyanidins, phenolic acids, anthocyanins, and flavonols [13]. It is known that the biological activity of fruit polyphenolic fractions depends on the presence of specific individual compounds and their proportions [18]. Post-harvest technological processing may influence these factors, leading to structural changes of polyphenols and changes in their quantity and bioavailability. For instance, thermal treatment can result in transformation/isomerisation, enzymatic breakdown, or degradation of labile compounds. Additionally, the release of polyphenols bound with polysaccharides, proteins, or lipids may occur during drying. All these changes may have a dualistic effect on the plant material's final activity. On the one hand, the loss of some polyphenolic components may reduce its pharmacological potential, but on the other hand, the newly formed or released compounds may reveal higher biological effects [19–22].

Thermal fruit processing may also induce the formation of non-polyphenolic compounds, such as Maillard reaction products (MRPs). They are aromatic derivatives formed in a multistep, non-enzymatic reaction between amino acids and reducing sugars when dehydration occurs at high temperatures. Since MPRs from food, especially low-molecular-weight ones such as furans, are orally ingested by humans and absorbed into the bloodstream, their biological activity is of great interest [23]. To date, both the harmful properties (genotoxic, mutagenic, carcinogenic) and the beneficial health effects (antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial) of these compounds have been revealed [24,25]. However, the reported data are conflicting, and further research is required to assess their pharmacological activity [23]. Moreover, the quantitative determination of MPRs in various processed plant materials is required to ensure their safety.

Extraction of a fruit matrix is crucial in developing fruit-based medicines and functional products [26]. The fractionated extraction enables the concentration of the active plant components and facilitates their identification through selective isolation and comparative activity studies [13,18].

Therefore, the aim of the present study was: (a) to characterise for the first time the phytochemical composition of dried *P. spinosa* fruits in the function of fractionated extraction with particular emphasis on individual polyphenols and MPRs and their drying-related molecular transformation; (b) to investigate the antioxidant and anti-inflammatory activity of the fruit extracts and their main pure components in human neutrophils and PBMCs ex vivo; (c) to select extracts with the highest potential as anti-inflammatory agents; and (d) to evaluate the contribution of polyphenols and MPRs to the observed biological effects. The phytochemical profiling was performed using various analytical techniques, includ-

ing LC–MS/MS, preparative HPLC isolation, and subsequent spectroscopic identification (NMR) of primary MPRs formed during drying. The cellular tests covered the release assessment of a series of pro-oxidant, pro-inflammatory, and anti-inflammatory factors (ROS, TNF-α, ELA-2, IL-8, IL-6, and IL-10). Moreover, the cellular safety of the extracts and pure compounds was evaluated by flow cytometry.

2. Results and Discussion

2.1. Fractionated Extraction and Phytochemical Composition of the Extract/Fractions

As *P. spinosa* dried fruits are primarily used as a traditional herbal remedy [3–5], for the present study, the fresh fruits were dried in the typical conditions of herbal medicinal products [27]. The same fresh plant material batch and the same extraction procedure as in our previous work on fresh fruits [13] were used for direct result comparison. In the first step, the dried fruits were extracted with methanol-water (75:25, v/v) to maximise recovery of polyphenols [13] and reflect the composition of tinctures, the most popular medicinal preparations of dried sloes [3–5]. Then, the obtained source hydroalcoholic extract (MED) was partitioned by fractionated extraction to yield the fractions of diethyl ether (DEFD), ethyl acetate (EAFD), *n*-butanol (BFD), and water residue (WRD).

The qualitative LC-PDA-ESI-MS^3 assay revealed the presence of 54 constituents in the extracts/fractions (Figure 1, peaks 1−54; Table S1, Figure S1), among which 45 polyphenols and four non-phenolic compounds were fully or tentatively identified by comparing their retention properties, UV–vis spectra, and MS/MS fragmentation patterns with reference compounds or literature data (Table S1).

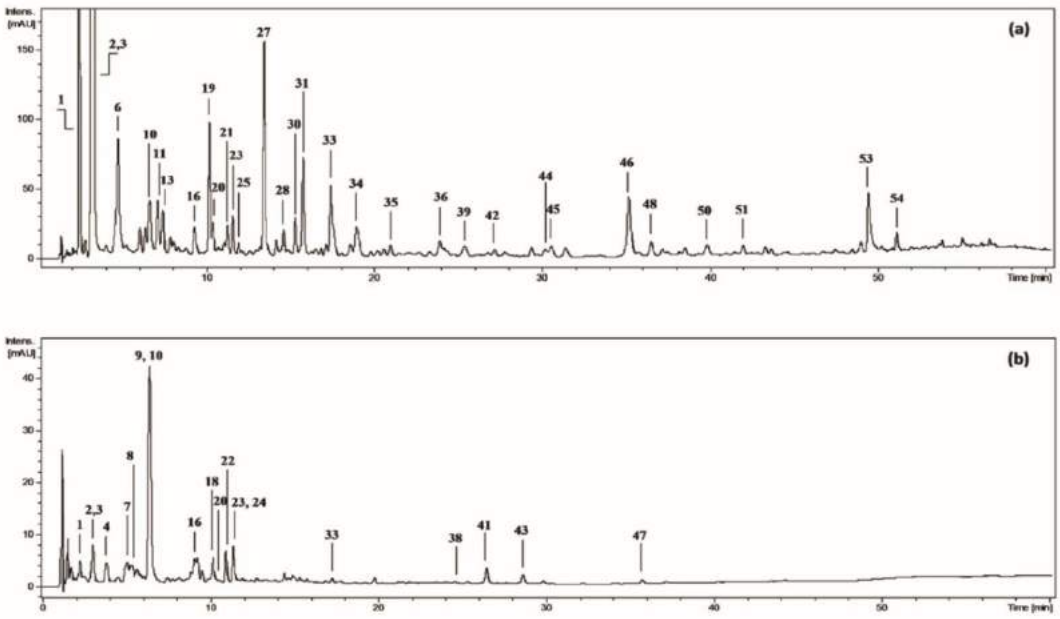


Figure 1. Representative UHPLC chromatograms at 280 nm of (**a**) diethyl ether fraction from dried fruits of *Prunus spinosa*, DEFD, and (**b**) *n*-butanol fraction from dried fruits, BFD. Peak numbers refer to those implemented in Table S1 (Supplementary Materials).

2.1.1. Polyphenolic Profile

The polyphenolic constituents represented two main classes: phenolic acids and aldehydes (27 analytes, peaks 4−6, 8−11, 14−17, 19−21, 23, 25−34, 36, 39) and flavonols (16 analytes, peaks 37, 38, 40−53). Moreover, one anthocyanin (24) and one flavanol (13) were

found. Phenolic acids were the most structurally diversified group that comprised caffeoyl-, coumaroyl-, and ferulolylquinic acids (8, 10, 16, 20, 21, 23, 26, 32); caffeoylquinic acid hexoside (9); shikimic acid derivatives (14, 30, 33, 34, 36, 39); *p*-coumaric acid (31) and its hexoside (17); caffeic acid hexoside (25); and benzoic acid derivatives including *p*-hydroxybenzoic acid (11), protocatechuic acid (6) and its hexoside (5), vanillic acid (19) and its hexoside (4) and malate hexoside (15). The phenolic aldehyde (27) was identified as vanillin. Among flavonols, one aglycone quercetin (53), thirteen quercetin mono-, di-, and triglycosides (38, 40−48), including malyl (49, 50) and acetyl esters (52), one kaempferol hexoside (51) and one dihydrokaempferol hexoside (aromadendrin hexoside, 37) were found. The sole anthocyanin detected (24) was cyanidin 3-*O*-*β*-D-glucopyranoside, while the single flavanol (13) was tentatively identified as an (epi)catechin derivative.

The polyphenolic profiles of the extracts/fractions from dried sloes differed significantly from those observed previously for fresh fruits [13]. With 45 versus 57 identified compounds, the dried sloes revealed a less rich composition and lesser variety of flavonols (17 vs. 24 analytes) and anthocyanins (one vs. four compounds). Moreover, the dried material was distinguished by the loss of 19 constituents present in fresh fruits and the appearance of seven polyphenols (13, 14, 17, 29, 37, 39, 51) newly formed during drying and thus detected for the first time in *P. spinosa*. The lost compounds, including several derivatives of sinapic and caffeic acids, as well as isorhamnetin, kaempferol, cyanidin, and peonidin glycosides, occurred in the fresh material at low or trace levels and were probably destroyed by thermal processing. Some other compounds decomposed partly; for example, cleavage of glycosidic bonds might explain the appearance of kaempferol hexoside (51) instead of two kaempferol di- and triglycosides from fresh fruits. Moreover, partial isomerisation of pseudodepsides could also take place; an example is the case of *p*-coumaroylshikimic acids (36, 39), among which one was present in both materials (36) but second only in dried sloes (39). Furthermore, three other drying-related processes, such as the oxidative coupling of caffeoylquinic acids [28], depolymerisation of condensed proanthocyanidins [21], and recovery of polyphenols from lignified stone tissue [29] were probably responsible for the presence of caffeoylquinic acid dehydrodimer (29), (epi)catechin derivative (13), and aromadendrin hexoside (37) in dried fruits, respectively.

The quantitative profiles of polyphenols in the extracts/fractions of dried fruits differed significantly depending on the extraction solvent (Table 1). The total phenolic levels amounted to 26.8−124.0 mg GAE/g dw (TPC, determined by the Folin-Ciocalteu method) and 9.6−109.1 mg/g dw (TPH, assayed by HPLC–PDA), with the highest values observed for DEFD and EAFD. In all extracts/fractions (except EAFD), the TPC levels exceeded the TPH values, determined as the sum of individual low-molecular-weight polyphenols, including total phenolic acids (TPA), total flavonoids (TFL), and total anthocyanins (TAC). For instance, the TPC value in the source extract MED was about 3-times higher than TPH. This gap might be explained by the presence of high-molecular-weight tannin-type proanthocyanidins, which are undetectable by standard RP-LC procedures due to high polarity. Therefore, their content was estimated by a procyanidin-specific spectrophotometric assay (TTC). Consequently, the sum TPH+TTC better represents the genuine total phenolic contents of the sloe extracts. A similar relationship was previously revealed for the fresh fruit extracts [13], which means that drying did not affect the TPC/TPH ratio. Similarly, as in the fresh fruit [13], only one low-molecular-weight flavan-3-ol was detected, which is also in accordance with the works of Guimarães et al. [9] and Mikulić-Petkovsek et al. [12], who did not detect such compounds in sloes at all or only a few representatives.

On the other hand, the thermal treatment significantly influenced the levels and proportions between individual compounds and their fractions (Figure 2). The major compounds occurring in MED were phenolic acids and tannins, while flavonoids constituted less than 10% of the extract, and anthocyanins were below the detection limits (Table 1, Figure 2). Partitioning of MED between solvents of different polarities led to the concentration of phenolic acids in DEFD, EAFD, and BFD, tannins in WRD, and flavonoids mainly in DEFD. Anthocyanins were found in trace amounts only in BFD. The TPA levels varied between

0.8−102.5 mg/g dw with the peak values in EAFD, where derivatives of phenolic acids prevailed (constituted 93% TPH+TTC). The most abundant compounds from this group were pseudodepsides of quinic acids, especially chlorogenic acids (10, 20, 23), forming 37−100% TPAs. Among the individual analytes, cryptochlorogenic acid (23) dominated in EAFD with a level of 50.8 mg/g dw, while in the other extracts/fractions, the primary compound was neochlorogenic acid (10) with the peak content in BFD (16.2 mg/g dw). Apart from pseudodepsides, the fruits also contained simple benzoic and cinnamic acids. Only traces of these compounds were found in the source extract, but they were concentrated in DEFD, where protocatechuic acid (6) and vanillic acid (22) formed 40% TPAs. The flavonoid contents amounted to 0.3−41.1 mg/g dw, with the highest values in DEFD, where TFL formed 32% TPH+TTC. The particular extracts/fractions significantly varied in the flavonoid profiles. Quercetin (53) dominated in DEFD (formed 63% TFL), whereas glycosides prevailed in other fractions: isoquercitrin (quercetin 3-*O*-*β*-D-glucopyranoside, 42) in EAFD (16% TFL), rutin (quercetin 3-*O*-(6″-*O*-*α*-L-rhamnopyranosyl)-*β*-D-glucopyranoside, 41) in BFD (68% TFL), and avicularin (quercetin 3-*O*-*α*-L-arabinofuranoside, 46) in MED (45% TFL). Regarding tannins, they are only present in MED and WRD but at relatively high levels of 46% and 87% TTC+TPH, respectively.

Table 1. Quantitative profile of the *Prunus spinosa* dried fruit extracts (mg/g dw).

	MED	DEFD	EAFD	BFD	WRD
Total contents:					
TPC (GAE)	26.77 ± 0.47 ^{d}	**124.01 ± 0.70** ^{a}	107.43 ± 4.08 ^{b}	46.58 ± 2.28 ^{c}	22.59 ± 0.05 ^{d}
TPH	9.61 ± 0.60 ^{d}	80.24 ± 1.16 ^{b}	**109.91 ± 1.26** ^{a}	28.49 ± 0.96 ^{c}	0.78 ± 0.01 ^{e}
TPA	8.19 ± 0.51 ^{d}	47.51 ± 1.50 ^{b}	**102.53 ± 0.85** ^{a}	25.16 ± 0.80 ^{c}	0.78 ± 0.01 ^{e}
TAC	n.d.	n.d.	n.d.	**0.22 ± 0.01** ^{a}	n.d.
TFL	1.43 ± 0.09 ^{d}	**25.99 ± 0.77** ^{a}	6.69 ± 0.46 ^{b}	3.12 ± 0.24 ^{c}	n.d.
TTC (PB2)	**8.17 ± 0.24** ^{a}	n.d.	n.d.	n.d.	5.37 ± 0.11 ^{b}
MRPs	0.92 ± 0.07 ^{c}	**37.75 ± 2.39** ^{a}	13.53 ± 0.78 ^{b}	1.37 ± 0.03 ^{c}	0.26 ± 0.003 ^{c}
Individual compounds:					
Avicularin (**46**)	0.64 ± 0.09 ^{b}	**4.44 ± 0.22** ^{a}	0.83 ± 0.14 ^{b}	n.d.	n.d.
Guaiaverin (**45**)	n.d.	**0.91 ± 0.05** ^{a}	0.48 ± 0.03 ^{b}	n.d.	n.d.
Hyperoside (**40**)	n.d.	n.d.	**0.84 ± 0.04** ^{a}	n.d.	n.d.
Isoquercitrin (**42**)	n.d.	0.13 ± 0.01 ^{b}	**1.10 ± 0.14** ^{a}	n.d.	n.d.
Reinutrin (**44**)	n.d.	0.41 ± 0.003 ^{b}	**0.71 ± 0.07** ^{a}	n.d.	n.d.
Rutin (**41**)	0.41 ± 0.03 ^{c}	n.d.	0.74 ± 0.03 ^{b}	**2.13 ± 0.20** ^{a}	n.d.
Quercitrin (**48**)	0.11 ± 0.01 ^{c}	**1.40 ± 0.07** ^{a}	0.67 ± 0.03 ^{b}	n.d.	n.d.
Quercetin (**53**, QU)	0.06 ± 0.01 ^{c}	**16.41 ± 0.40** ^{a}	0.63 ± 0.04 ^{b}	n.d.	n.d.
Cyanidin 3-*O*-glucoside (**24**)	n.d.	n.d.	n.d.	**0.22 ± 0.01** ^{a}	n.d.
Protocatechuic acid (**6**)	n.d.	**11.04 ± 0.96** ^{a}	0.57 ± 0.02 ^{b}	n.d.	n.d.
p-Hydroxybenzoic acid (**11**)	n.d.	**1.47 ± 0.12** ^{a}	0.57 ± 0.04 ^{b}	n.d.	n.d.
Vanillic acid (**19**)	n.d.	**7.85 ± 0.31** ^{a}	n.d.	n.d.	n.d.
p-Coumaric acid (**31**)	n.d.	**1.89 ± 0.18** ^{a}	n.d.	n.d.	n.d.
Neochlorogenic acid (**10**)	4.52 ± 0.34 ^{d}	11.10 ± 0.40 ^{c}	**29.28 ± 0.86** ^{a}	16.19 ± 0.50 ^{b}	0.78 ± 0.01 ^{e}
Chlorogenic acid (**20**, CHA)	0.14 ± 0.01 ^{b}	0.28 ± 0.01 ^{b}	**3.56 ± 0.21** ^{a}	0.20 ± 0.01 ^{b}	n.d.
Cryptochlorogenic acid (**23**)	2.11 ± 0.03 ^{c}	6.40 ± 0.40 ^{b}	**50.85 ± 1.29** ^{a}	7.65 ± 0.49 ^{b}	n.d.
Vanillin (**27**)	n.d.	**6.74 ± 0.47** ^{a}	0.69 ± 0.05 ^{b}	n.d.	n.d.
5-Hydroxymethylfurfural (**2**, HMF)	0.78 ± 0.05 ^{c}	**32.08 ± 2.03** ^{a}	11.50 ± 0.66 ^{b}	1.16 ± 0.03 ^{c}	0.22 ± 0.002 ^{c}

Results are presented as means ± SD ($n = 3$). Numbers in parentheses (first column, in bold) refer to those in Figure 1 and Supplementary Table S1. For each parameter, different superscript letters ($^{a-e}$) indicate significant differences ($p < 0.05$) in Tukey's HSD test. MED, methanol-water (75:25, *v*/*v*) extract of dried fruits; DEFD, diethyl ether fraction of MED; EAFD, ethyl acetate fraction of MED; BFD, *n*-butanol fraction of MED; WRD, water residue of MED; TPC, total phenolic contents in gallic acid equivalents (GAE); TPH, total contents of low-molecular-weight phenols determined by HPLC-PDA; TPA, total phenolic acids; TAC, total anthocyanins; TFL, total flavonoids; TTC, total tannins in procyanidin B2 (PB2) equivalents. n.d.: below the quantitation (LOQ) or detection (LOD) limits.

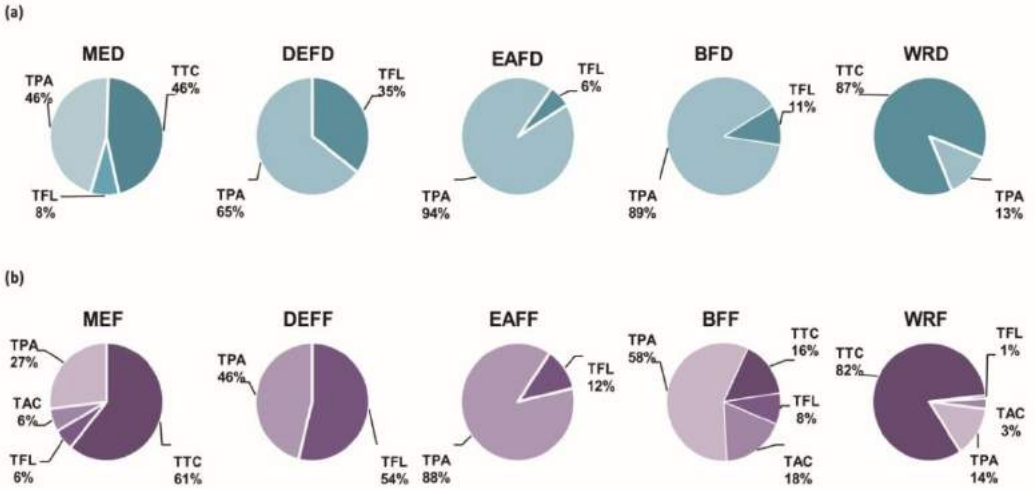


Figure 2. Contribution of individual groups of compounds to total phenolic contents (TPH+TTC) in *Prunus spinosa* fruit extracts: (**a**) dried fruits and (**b**) fresh fruits. TPA, TAC, and TFL: total contents of phenolic acids, anthocyanins, and flavonoids, respectively, determined by HPLC-PDA; TTC: total content of condensed tannins in procyanidin B2 (PB2) equivalents; TPH, sum of individual polyphenols by HPLC. For extract codes, see Table 1 and Section Abbreviations. The extracts/fractions from dried fruits were coded by the last letter "D", while those from fresh fruits by "F". For detailed experimental data on fresh fruits, see Magiera et al. [13].

The qualitative and quantitative profiles of bioactive fruit components may change during thermal processing [30]. The present research showed for the first time that sloes dried in the conditions typical for the production of herbal medicines contain lower levels of all types of polyphenols compared to fresh fruits [13]. Among different compounds, anthocyanins and proanthocyanidins changed most dramatically, and their total levels in the dried fruits dropped by almost 100% and 76%, respectively (Table S2, Supplementary Materials). This observation is consistent with the earlier reports on the relatively low thermal stability of anthocyanins and proanthocyanidins in various fruits, including grapes, bilberries, blueberries, and domesticated plums [19,31,32]. Phenolic acids and flavonols are less sensitive to drying [33], which also seems true in sloes, as their total amounts decreased by 46% and 56%, respectively (Table S2). Interestingly, in contrast to the majority of most individual polyphenols, the levels of some simple phenolic acids (e.g., protocatechuic, vanillic, *p*-coumaric, and *p*-hydroxybenzoic acids) and cryptochlorogenic acid were higher in dried than in fresh fruits. The first case suggests that cleavage of some phenolic esters might have taken place during drying. In the second case, as the levels of other chlorogenic acid isomers decreased in line with the general trend, their partial isomerisation might be one possible explanation for the higher content of cryptochlorogenic acid in the dried fruits. All these changes corresponded to the differences in the TPC and TPH levels, which in dried fruits were about 3-times lower than in fresh sloes (Table S2). Nevertheless, the TPC levels of dried blackthorn fruits (0.55 g GAE/100 g fw and 1.3 g GAE/100 g dw) were similar to or surpassed the values reported for fruits valued in phytotherapy for their beneficial health effects and anti-inflammatory activity, such as cranberries (0.45 g/100 g fw), blueberries (0.13 g/100 g fw) or hawthorn fruits (2.1 g GAE/100 g dw) [12,15].

2.1.2. Non-Phenolic Compounds

Apart from polyphenols, the dried blackthorn fruits were also distinguished by the presence of traces of a cyanogenic glycoside amygdalin (18) and three MPRs formed by dehydration of sugars and Maillard reaction, including 3-hydroxy-2,3-dihydromaltol (1)

and two furfural derivatives (peak 2 and 3). The last two compounds had to be isolated for structural identification. The isolation was carried out by preparative HPLC. The isolates were obtained with high yield and identified after thorough spectral profiling (^{1}H NMR, ^{13}C NMR, COSY, HMBC, and HMQC). Their structures and NMR data were shown in Figure 3 and Table 2.

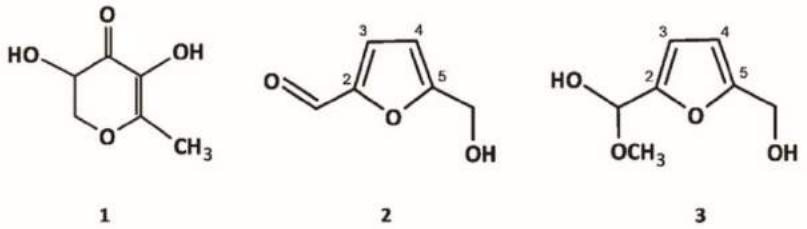


Figure 3. Structures of MRPs identified in dried *Prunus spinosa* fruits.

Table 2. ^{1}H NMR and ^{13}C NMR spectral data of the compounds isolated from the fruits of *Prunus spinosa* (methanol-d_4) [a].

Position/ Group [b]	Compound 2		Compound 3	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
C-2	163.8	–	154.8	–
C-3	112.9	6.62 (1H, *d*, *J* = 3.1)	107.6	6.39 (1H, *d*, *J* = 3.0)
C-4	129.3	7.42 (1H, *d*, *J* = 3.1)	108.9	6.31 (1H, *d*, *J* = 3.0)
C-5	154.9	-	155.2	-
-OCHO-	-	-	98.2	5.41 (1H, *s*)
-CH_2O-	58.2	4.62 (1H, *s*)	67.0	4.52 (2H, *s*)
-OCH_3		-	55.9	3.37 (3H, *s*)
-CHO	182.6	9.56 (1H, *s*)	-	-

[a] Data acquired with TMS as the internal standard, δ in ppm. Multiplicities and coupling constants (in Hz) are given in parentheses. [b] For trivial atom numbering, see Figure 3.

The ^{1}H NMR spectra of compound 3 revealed the presence of two one-proton doublets at δ 6.31 ppm and δ 6.39 ppm with a small coupling constant (J = 3.0 Hz). The heteronuclear correlation experiments (HSQC, HMBC) showed one-bond correlations of the proton resonances with the carbon signals at δ 108.8 ppm and δ 107.6 ppm, respectively, and two-bond correlations with carbon resonances at δ 155.2 ppm and δ 154.2 ppm, respectively. This set of signals is characteristic of a 2,5-disubstituted furan ring [34]. The substituent at C-2 was interpreted as a –CH_2OH group due to a two-proton singlet at δ 4.52 ppm in the ^{1}H NMR spectrum and a corresponding ^{13}C NMR carbon resonance at δ 67.0 ppm. The substituent at C-5 gave in ^{1}H NMR one-proton singlet at δ 5.41 ppm with the corresponding carbon signal at δ 98.2 ppm, suggesting the presence of a –$CH(OH)_2$ group. Additionally, the proton resonance at δ 3.37 ppm (3H, *s*) correlated with the carbon signal of the –$CH(OH)_2$ group, which indicated that one of the hydroxyl groups is methylated. Eventually, compound 3 was identified as (5-hydroxymethylfur-2-yl)-methoxymethanol [35]. The spectral data of compound 2 were similar to those of compound 3. However, all the ^{1}H NMR resonances of the furan ring were downshifted, suggesting at least one substituent of higher electronegativity. Indeed, the ^{1}H NMR high-field signal of the substituent in the C-5 position at δ 9.56 ppm (1H, *s*) and its corresponding ^{13}C carbon resonance at δ 182.6 ppm indicated an aldehyde group. Thus, compound 2 was identified as 5-hydroxymethylfurfural (HMF) [36].

All three MRPs were revealed for the first time in *P. spinosa* fruits but are known in numerous domesticated *Prunus* species [33]. The MRPs have also been found in various food products like other dried fruits, juices, coffee, bakery products, or honey. These by-products, particularly HMF, have gained much interest due to the doubt on their safety and health potential [37]. The toxicological effects of HMF, such as hepato-, nephro-, cyto-, and genotoxic effects, as well as mutagenic and carcinogenic properties, have been

preliminarily demonstrated in experimental animals and cultured mammalian cells [37–39], however, the reported data are inconclusive [23]. Because of the potential high exposure and possible toxicity of MRPs, their content in processed foods and medicinal products, should be monitored to assess health hazards. Specific, accurate methods should thus be developed and validated for the task. In the present study, the HPLC-PDA method, previously developed for the quality control of fresh sloes [13], was revalidated for the dried fruit matrix, and MRPs were determined in all extracts/fractions thereof (Table 1), with the peak concentration in DEFD and EAFD. The content of these compounds in sloes was 460 mg/kg dw (Table S2), which is within the wide range of 1−2200 mg/kg dw reported for other commonly consumed dried fruits generally recognised as safe, such as apples, apricots, dates, and plums [25,33,40]. Moreover, blackthorn fruits contained significantly lower MPRs levels than typically observed (1100−2200 mg/kg dw) for widely consumed prunes (from *Prunus domestica*) [40]. However, further studies on the biological effects of MRPs are required to verify their safety.

2.2. *Bioactivity of the Extracts/Fractions and Model Compounds in Human Immune Cells Ex Vivo*

2.2.1. Cellular Models

Accumulated research strongly suggests that low-grade inflammation is a critical player in the progression of chronic human disorders, such as bowel diseases, vascular abnormalities, cancer, diabetes, obesity, metabolic syndrome, and neurodegenerative diseases [41]. In humans, chronic inflammatory processes are linked with continuous up-regulation of pro-oxidant and pro-inflammatory functions of immune cells, primarily neutrophils and PBMCs differentiating into macrophages. Upon activation, the immune cells produce and release a wide range of pro-inflammatory and pro-oxidant mediators, including chemokines/cytokines (i.e., IL-8, IL-6, TNF-α), tissue-remodelling enzymes (i.e., ELA-2) and ROS, which collectively contribute to tissue dysfunction [42]. On the other hand, these cells can also secrete some anti-inflammatory factors (such as IL-10), which help to limit inflammation [43]. Considering their primary and complementary roles in inflammatory reactions, both neutrophils and PBMCs were chosen as cellular models for the present ex vivo study of antioxidant and anti-inflammatory effects of *P. spinosa* fruit extracts. Because sloes are recommended by traditional medicine to treat various types of inflammatory disorders, both local in the digestive tract and systemic [3–6], the extracts were tested in a wide concentration range of 1−100 μg/mL to cover the polyphenolic levels potentially achievable in the bloodstream (1−5 μg/mL) and gastrointestinal tract (25−100 μg/mL) after oral intake of polyphenol-rich products. A broader discussion on the bioavailability of orally administrated polyphenols was published earlier [13,44]. Apart from the extracts, pure chlorogenic acid, quercetin, procyanidin B2, and HMF were tested as model compounds, representative of the fruit phenolic acids, flavonoids, proanthocyanidins, and MPRs.

2.2.2. Effects on Viability of Neutrophils and PBMCs

The potential cytotoxicity of the model compounds and extracts/fractions was checked by flow cytometry and propidium iodide staining. The viability of neutrophils and PBMCs after 24−48 h of incubation with the analytes, except for DEFD at 50−100 μg/mL, was 85.0−95.1% and did not differ significantly ($p > 0.05$) from that of LPS-stimulated (91.8−96.4%) and control, non-stimulated (92.9−94.4%) cells (Figure S2). Only for DEFD at the highest concentration, the cells' viability was slightly lower and amounted to 76.9−83.5%. Nevertheless, all analytes might be regarded as non-cytotoxic to the tested cells.

2.2.3. Influence on Pro-Oxidant Functions of Human Neutrophils: Antioxidant Effect

Neutrophils are the most abundant immune cells in human blood and one of the first responders to pro-inflammatory stimuli. The activated neutrophils start the process of respiratory burst that results in excessive production of ROS, especially $O_2^{\bullet-}$, which is then transformed into other highly toxic molecules, including $^{\bullet}OH$, H_2O_2, $NO^{\bullet}$, $ONOO^-$, and

HClO. These oxidants form an aggressive cocktail that may generate persistent oxidative stress, leading to chronic inflammation [42]. The elevated levels of ROS and oxidative stress-related biomarkers are observed in the blood or inflamed tissues of patients with various chronic diseases, including digestive tract inflammatory disorders [45], diabetes and its vascular complications [46], which are within the traditional application range of sloes [3–6]. The accumulated research on fresh *P. spinosa* fruits strongly suggests that their antioxidant activity at the cellular level might be partly responsible for their beneficial health effects [7,13,14]. The present study monitored the impact of the dried sloe extracts on an oxidative burst of the neutrophils using luminol as a universal detector of the whole array of ROS produced in this process. The results revealed for the first time that dried sloes also exhibit significant and concentration-dependent antioxidant effects in cellular models. All analysed extracts/fractions reduced the ROS production in *f*-MLP-stimulated human neutrophils by up to 69−99% at 100 μg/mL (Figure 4a). Moreover, the source extract MED (the extractable dried fruit matrix) effectively inhibited the ROS release at 25–100 μg/mL ($p < 0.05$), limiting at the highest concentration the ROS levels to their physiological values observed for non-stimulated control neutrophils. Out of the tested extracts, the DEFD and EAFD (the polyphenol-richest fractions) were the most active, interfering with the ROS secretion by at least 99% at 100 μg/mL and 49% at 2.5 μg/mL. It might suggest the substantial contribution of polyphenols to the observed antioxidant effects. Indeed, the linear correlation between the ROS release and total phenolic levels, both TPC and TPH+TTC, was negative and statistically significant ($r_{max} = -0.7099$, $p < 0.001$; Table S3). In contrast, the correlations for the polyphenolic subgroups (TTC, TPA, TFL) were insignificant ($p > 0.05$), but the potent antioxidant effects of the model polyphenols (chlorogenic acid, procyanidin B2, and quercetin) at even the lowest tested concentration of 2.5–5 μM (0.8–2.9 μg/mL) might indicate the synergic contribution of all relevant classes of polyphenols to the cellular antioxidant activity of the extracts, with the most outstanding impact of phenolic acids and tannins due to their prevalence in the extracts (Figure 2). For instance, the most active chlorogenic acid lowered the ROS release to 65% at 5 μM and 21% at 50 μM (Figure 4a).

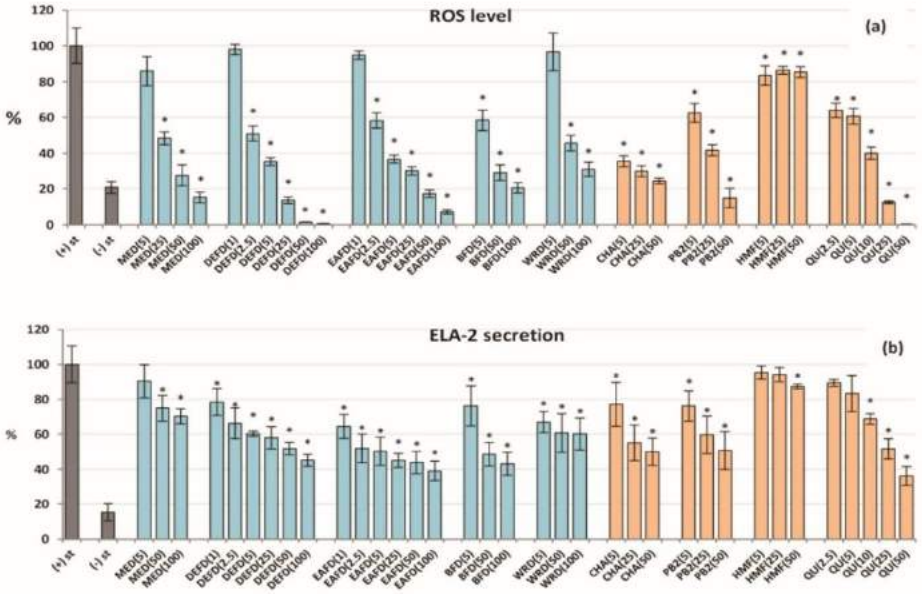


Figure 4. Effect of fruit extracts/fractions (1–100 μg/mL) and standards (2.5–50 μM) on the release of (**a**) ROS, reactive oxygen species; (**b**) ELA-2, neutrophils elastase from human neutrophils. Pure compounds:

CHA, chlorogenic acid; PB2, procyanidin B2; HMF, 5-hydroxymethylfurfural; QU, quercetin (positive control). For extracts codes see Table 1. Data expressed as means ± SD of five independent experiments performed with cells isolated from five independent donors. Statistical significance in Dunnett's test: * $p < 0.05$ compared with the stimulated control.

2.2.4. Effect on the ELA-2 Release by Human Neutrophils

After stimulation, neutrophils release a wide range of tissue-remodelling enzymes potentiating inflammation by increasing the extracellular matrix permeability for pro-inflammatory mediators. As a key enzyme hydrolysing elastin, one of the major extracellular matrix components, ELA-2 triggers numerous inflammatory diseases, e.g., it impairs regeneration of the colon mucosa in digestive tract disorders [47] and contributes to the pathological vascular permeability in diabetes [48]. As shown in Figure 4b, the dried fruit extracts significantly and in a dose-dependent manner inhibited the ELA-2 generation by the *f*MLP+cytochalasin B-stimulated neutrophils. The most potent inhibitory effect was detected for the polyphenolic-richest fractions DEFD, EAFD, and BFD, active even at low concentrations of 1−5 μg/mL ($p < 0.05$). For instance, EAFD downregulated the ELA-2 secretion by 35% at 1 μg/mL and 50% at 5 μg/mL. Similarly, to the case of ROS production, the strong activity of chlorogenic acid, procyanidin B2, and quercetin at 5–10 μM (3.0–5.8 μg/mL) and the significant correlation between the phenolic levels (TPC or TPH+TTC) and ELA-2 release ($r_{max} = -0.6510$, $p < 0.005$; Table S3) suggested the synergic contribution of phenolic acids, tannins, and flavonoids to the observed effects. The most active polyphenol in the test was quercetin, which reduced the ELA-2 secretion to 64% at 50 μM compared to the stimulated control.

2.2.5. Influence on the Cytokine Secretion by Human Neutrophils and PBMCs

Cytokines are small signalling proteins and primary controllers of the growth and activity of immune cells. Several different cell types coordinate their functions as a part of the immune system, including neutrophils and PBMCs differentiating into macrophages [49]. The master cytokine in the network is TNF-α – a priming agonist of immune cells and a pro-inflammatory mediator orchestrating the neutrophil-PBMC/macrophage interplay during inflammation [50]. As shown in Figure 5, all analysed extracts/fractions (except MED in neutrophils) downregulated the TNF-α secretion in both cell types at 50–100 μg/mL ($p < 0.05$) with a more robust response from LPS-stimulated PBMCs, the leading TNF-α producers in humans. For instance, DEFD at 100 μg/mL reduced the TNF-α release by 34% in neutrophils and 63% in PBMCs. Interestingly, some variations in the anti-TNF-α activity of individual extracts in both cellular models existed: the most active were DEFD and EAFD in PBMCs but BFD in neutrophils. Moreover, in PBMCs, a significant reduction in the TNF-α level ($p < 0.05$) was also seen for DEFD, EAFD, and BFD at 5 μg/mL, while in neutrophils, only BFD revealed a similar effect. The extracts' effects reflected the activity of pure compounds, which were also more effective in PBMCs than in neutrophils. Interestingly, all three pure polyphenols revealed comparable effects in neutrophils, while quercetin and chlorogenic acid were slightly more potent than procyanidin B2 in PBMCs. Nevertheless, the synergistic effects of all polyphenols might be concluded from the significant correlations between the activity parameters, TPC and TPH+TTC values of the extracts/fractions ($r_{min} = -0.9116$ in PBMCs, $p < 0.001$; Table S3).

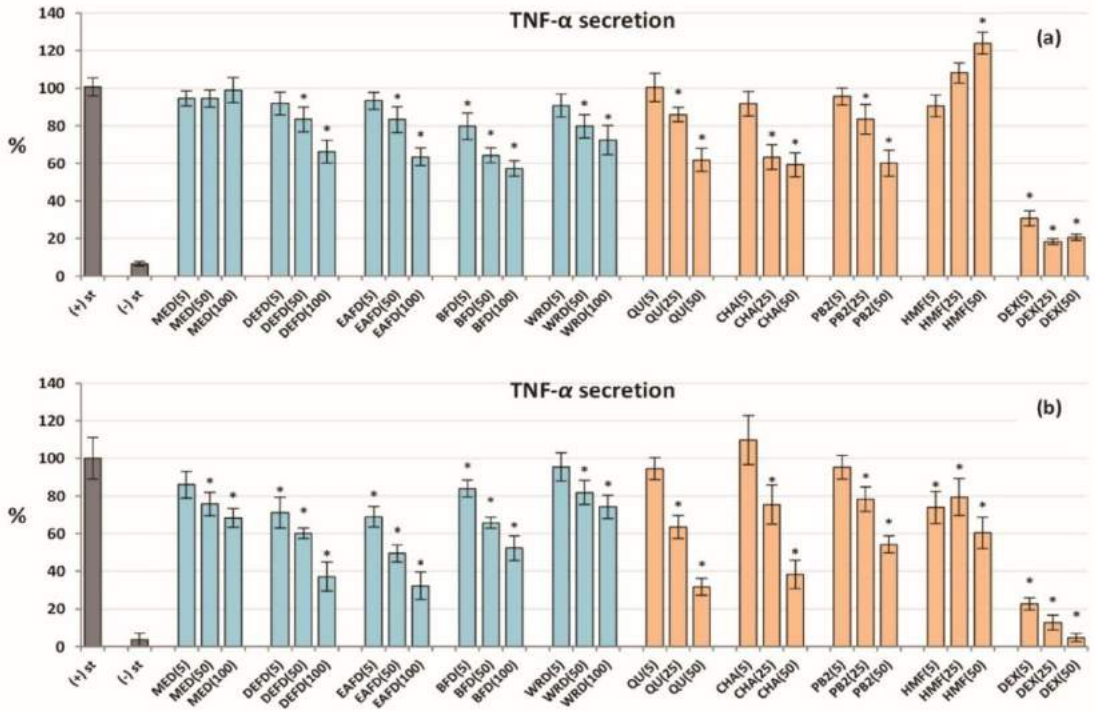


Figure 5. Effect of fruit extracts/fractions (1–100 μg/mL) and standards (5–50 μM) on the release of tumour necrosis factor α (TNF-α) from stimulated human immune cells: (**a**) neutrophils; and (**b**) PBMCs. Standards: QU, quercetin; CHA, chlorogenic acid; PB2, procyanidin B2; HMF, 5-Hydroxymethylfurfural. Positive control: DEX, dexamethasone. For extracts codes see Table 1. Data expressed as means ± SD of five independent experiments performed with cells isolated from five independent donors. Statistical significance in Dunnett's test: * $p < 0.05$ compared with the stimulated control.

Apart from TNF-α, the impact of the extracts/fractions on the secretion of two other pro-inflammatory (IL-8, IL-6) and one anti-inflammatory interleukin (IL-10) was tested. IL-8, also known as the neutrophil chemotactic factor, stimulates the migration and adhesion of neutrophils to the endothelium [42]. IL-6, released mostly by monocytes and macrophages, affects various immune system functions, including the production of neutrophils in the bone marrow. Monocytes/macrophages also release IL-10, the most important endogenous inhibitor of cytokine synthesis that ensures protection from the over-exuberant inflammatory response and associated tissue damage [51].

As shown in Figure 6, the analysed extracts/fractions affected mainly the IL-10 secretion, while their effects on IL-8 and IL-6 were less pronounced. Interestingly, the extracts modulated the IL-10 release in different directions: DEFD and EAFD up-regulated its secretion, BFF and WRF inhibited its production, while MED did not alter this cytokine release compared to the LPS-stimulated cells (Figure 6a). The stimulatory effect reached a maximum (33% increase) for EAFD, while the inhibitory effect (52% decrease) was maximal for WRD at 100 μg/mL. Moreover, EAFD and WRF revealed significant effects at 5−50 μg/mL ($p < 0.05$).

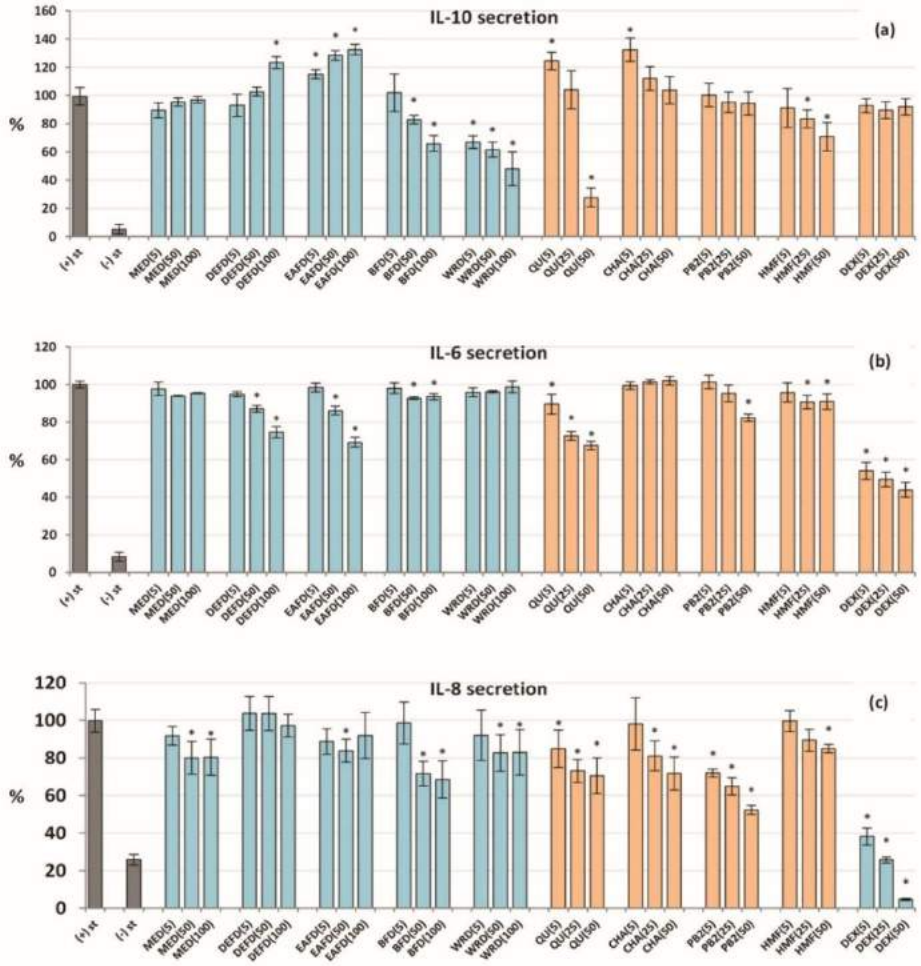


Figure 6. Effects of fruit extracts/fractions (5–100 μg/mL) and standards (5–50 μM) on the secretion of anti-inflammatory and pro-inflammatory interleukins from the stimulated human immune cells: (**a**) IL-10 from PBMCs; (**b**) IL-6 from PBMCs; and (**c**) IL-8 from neutrophils. Standards: QU, quercetin; CHA, chlorogenic acid; PB2, procyanidin B2; HMF, 5-Hydroxymethylfurfural. Positive control: DEX, dexamethasone. For extracts codes see Table 1. Data expressed as means ± SD of five independent experiments performed with cells isolated from five independent donors. Statistical significance in Dunnett's test: * $p < 0.05$ compared with the stimulated control.

Together with the activity of model polyphenols, this dichotomy suggested that only low-molecular-weight polyphenols, especially phenolic acids and flavonoids (abundant in DEFD and EAFD, and represented by chlorogenic acid and quercetin at lower levels), might contribute to the potentiated IL-10 secretion. Consequently, a significant correlation between the phenolic contents and IL-10 secretion ($r_{min} = 0.5549$, $p < 0.05$) was primarily due to the substantial stimulatory effects of DEFD and EAFD, relatively the richest in phenolic acids and flavonoids (Table 2, Figure 2). It might reinforce the suggestion of their primary contribution to the up-regulation of IL-10. In contrast, condensed procyanidins (represented by procyanidin B2) or some non-phenolic compounds (enriched in hydrophilic

fractions, especially WRF) might act as IL-10 inhibitors. The structure and activity profile of these compounds should be explained in detail in future studies.

Concerning IL-8 and IL-6, the extracts/fractions tended to inhibit their secretion from both LPS-stimulated neutrophils and PBMCs (Figure 6b,c), but the statistically significant effects were visible ($p < 0.05$) only for selected fractions or at elevated concentration levels of 50–100 μg/mL. BFD downregulated the IL-8 release most strongly among the extracts, by 31% at 100 μg/mL, while DEFD and EAFD were the most influential anti-IL-6 factors, inhibiting its production by 25% and 31%, respectively. The correlation tests confirmed that the production of IL-6 was inversely associated with the TPC and TPH+TTC values ($r_{min} = -0.9378$, $p < 0.001$; Table S3). Surprisingly, pure polyphenols, especially procyanidin B2, exhibited relatively potent activity in the IL-8 secretion test, which resulted in a lack of correlation between phenolic levels and activity parameters (Table S3). It might suggest some interference from non-phenolic compounds, which requires future studies.

Dexamethasone (DEX), a potent anti-inflammatory drug (5−50 μM), significantly ($p < 0.05$) reduced the release of all pro-inflammatory cytokines in both cellular models but did not influence ($p > 0.05$) the IL-10 production in PBMCs (Figures 5 and 6).

2.2.6. Drying-Related Differences in Biological Capacity of Dried and Fresh Fruits

A comparison of the results obtained for dried sloes with those presented earlier for fresh blackthorn fruits [13] indicated that drying-related changes in their polyphenolic composition significantly influenced their anti-inflammatory and antioxidant activity. In general, the dried fruit extracts presented slightly lower activity, and the degradation of anthocyanins and partial loss of proanthocyanidins seem to be of key importance for their reduced effectiveness. For instance, in the ROS and TNF-α secretion tests in neutrophils, the extracts/fractions in which the TAC and TTC contents fell the most (MED, BFD, WRD) were up to 19% and 21% less active, respectively, compared to the respective fractions of fresh fruits (MEF, BFF, WRF). On the other hand, the partial flavonoid degradation was probably responsible for the lowered effects of anthocyanin- and procyanidin-free fractions (DEFD/EAFD vs. DEFF/EAFF). For example, a 37% slide of TFL in DEFD vs. DEFF resulted in an 18% lower stimulation of IL-10 production in PBMCs. However, despite variations in their phytochemical profiles, the activity differences between dried and fresh fruit extracts are not critical, and the dried fruits retained the ability to significantly modulate the inflammatory response of both types on immune cells.

2.2.7. Biological Effects of HMF

The present study is the first attempt to assess the effects of HMF, a model MRP, on the viability and pro-inflammatory and pro-oxidant functions of human neutrophils and PBMCs. As shown in Figure S2, the viability of HMF-treated cells was 85.1–86.6% and 94.9–95.5% for neutrophils and PBMCs, respectively, and did not differ significantly from the control range. Therefore, HMF at 5−50 μM (0.6–6.0 μg/mL) can be considered non-cytotoxic to the tested immune cells. As the average exposure to HMF in a regular human diet is 44 μM per day [52], this observation might be useful for the general assessment of HMF-related health hazards. It is compatible with the recent reports [53] pointing to significant antiproliferative effects of HMF on human gastric mucosal epithelial cells only in concentrations higher than 4 mM (504 μg/mL).

Figure 4a showed that HMF at 5−50 μM decreased the ROS generation by LPS-stimulated neutrophils by about 15%. At the highest tested concentration (50 μM), HMF also slightly (by 9−15%) reduced the secretion of some pro-inflammatory factors, including ELA-2, IL-6, and IL-8 (Figures 4b and 6b,c). On the other hand, the compound significantly downregulated the release of the anti-inflammatory cytokine IL-10 by up to 29% (Figure 6a). Concerning TNF-α secretion, the HMF effects varied with the cell type (Figure 5); the secretion of this cytokine increased in neutrophils (by up to 24% at 50 μM) but decreased in PBMCs (by up to 40% at 50 μM), which may be due to differences in the cytokine production mechanisms in various cells. In comparison to model polyphenols, HMF was

distinguished by the stimulation of the TNF-α production in neutrophils and anti-IL-10 effects in PBMCs. Because the extract richest in HMF and MRPs (DEFD) revealed the opposite trend, the contribution of these compounds to the biological effects of dried sloes in terms of IL-10 secretion might be considered negligible or reversed by the presence of other constituents. On the other hand, HMF might be co-responsible for the downregulation of TNF-α release by PBMCs.

The observed low antioxidant potential of HMF is consistent with the previous reports of Kong et al. [54], which demonstrated that this compound (0.25−1 μM) reduced the ROS production in the murine macrophage-like cell line RAW 264.7 by about 10%. However, in the same cellular model, HMF at 1 μM strongly inhibited the production of IL-1β, IL-6, and TNF-α, even by more than 50% in the case of IL-6 [54]. Moreover, Uchida et al. [55] showed that HMF could downregulate the IL-6 secretion from bone-marrow-derived murine mast cells by up to 70% at high concentrations (200 μg/mL, 1.59 mM). Interestingly, our results revealed only a 10% decrease in the IL-6 level in human PBMCs treated with 50 μM HMF, which strongly supports the use of human cells in biological activity studies of foods and herbal medicines.

3. Materials and Methods

3.1. Plant Material and Extracts Preparation

Mature fruits of *P. spinosa* were collected in October 2018 by handpicking from bushes naturally growing in Krasnobród (50° 32′ 41″N and 23° 12′ 55″E), Poland (near the Roztocze National Park). Prof. M. A. Olszewska authenticated the fruit sample, according to Popescu and Caudullo [1]. The voucher specimens (no. KFG/HB/18006-PSP-FRUIT) were deposited in the Herbarium of the Department of Pharmacognosy, Medical University of Lodz (Poland). After harvesting, the raw material was divided into two parts. One of them (fresh fruits) was processed as described earlier [13], and the second was dried in conditions typical for the production of herbal medicinal products (convective drying at a temperature not higher than 60°C) [27]. The dried material was powdered with an electric grinder and sieved through a 0.750-mm sieve. A portion (500.1 g) was sequentially refluxed with methanol-water (75:25, *v*/*v*; 3 × 1.5 L, 30 min, and 2 × 20 min) to give the hydroalcoholic extract (MED, 250.9 g dw). Next, the sample of MED (220.0 g dw) was suspended in warm (40 °C) water (1.5 L) and partitioned with organic solvents (10 × 200 mL each) to yield diethyl ether fraction (DEFD, 7.8 g dw), ethyl acetate fraction (EAFD, 2.7 g dw), *n*-butanol fraction (BFD, 23.7 g dw) and water residue (WRD, 26.3 g dw).

3.2. Qualitative and Quantitative Analysis of Phenolic Compounds

The profile of individual phenolic compounds in the extracts/fractions was evaluated by UHPLC-PDA-ESI-MS^3 and HPLC-PDA using the same analytical procedures and equipment applied previously to fresh fruits [13]. Calibration for HPLC-PDA quantitative analysis was performed using 21 authentic standards, according to Marchelak et al. [56] and Magiera et al. [13]. The validation parameters for 5-hydroxymethylfurfural (HMF) – dried fruit-specific standard (not involved in the previous studies) were shown in Table 3. The identified peaks were quantified as equivalents of external standards per dw of the extracts, depending on their structures and UV-Vis spectra. Briefly, hydroxybenzoic acid derivatives were quantified as protocatechuic acid; monocaffeoylquinic acid isomers as chlorogenic acid; dicaffeoylquinic acid isomers as cynarin; other hydroxycinnamic acid derivatives as caffeic acid or *p*-coumaric acid; flavonoid mono- and diglycosides as isoquercitrin and rutin, respectively; anthocyanins as cyanidin 3-*O*-glucopyranoside; and MRPs as HMF. Results were calculated per dry weight (dw) of the extracts.

The total phenolic content (TPC) and total content of tannin-type proanthocyanidins (TTC) were quantified by the Folin-Ciocalteu method and vanillin assay, respectively, as described previously [13]. The results were expressed in mg gallic acid (GAE)/g of extract dw and mg procyanidin B2 (PB2)/g of extract dw, respectively.

Table 3. Validation parameters for HPLC-PDA quantitative method.

Analyte	λ (nm)	Regression (Linear Model)		*r*	Linear Range (μg/mL)	*F*-Test	LOD (μg/mL)
		Equation	*n*				
HMF	285	y = 33981.70x − 15618.30	8	0.9999	1.08−108.0	167282.90	0.485

λ, detection wavelength; y, peak area; x, concentration of standard in (μg/mL); *n*, number of concentration levels (data points) used for construction of the regression equation; *F*-test, value of the statistical Fisher variance ratio for the experimental data, LOD, limits of detection.

The quantitative results were recalculated for the fresh weight (fw) of fruits using the extraction yield of MED. All standards used for phytochemical profiling were of HPLC grade (purity at least 95%) and were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) or previously isolated in our laboratory from *P. spinosa* flowers and leaves [13 and references therein].

3.3. Isolation and Structure Elucidation of MRPs

For isolation purposes, the preparative sample of dried blackthorn fruits (600.5 g) was extracted as described in Section 3.1 to give the methanol-water (75:25, *v*/*v*) extract (295.7 g dw). The crude extract was suspended in warm (40 °C) water (1.8 L) and re-extracted with ethyl acetate (10 × 250 mL each) to yield the ethyl acetate fraction (5.6 g dw). Two MRPs (compounds **2** and **3**; Figure 2) were isolated by preparative HPLC-PDA using a CombiFlash EZ Prep chromatograph (Teledyne ISCO, Lincoln, NE, USA) equipped with a PDA detector, a self-priming pump, and an internal fraction collector. Separations were performed on a C18 RediSep Prep column (5.0 μm, 150 mm × 20 mm; Teledyne ISCO, Lincoln, NE, USA). The ethyl acetate fraction (5.0 g dw) was dissolved in 40 mL DMSO, filtered through a polytetrafluoroethylene (PTFE) syringe filter (25 mm, 0.2 μm, Ahlstrom, Helsinki, Finland), and the filtrate was injected directly in 2 mL portions into the HPLC system using the manual injection.

The elution system consisted of solvent A (water) and solvent B (acetonitrile) with the elution profile as follows: 0–1 min, 5% B (*v*/*v*); 1–5 min, 5–10% B; 5–10 min, 10% B; 15–15 min, 10−100% B; 15–20 min, 100% B; 20 min, 5% B; 20–28 min, 5% B (equilibration). The flow rate was 19.0 mL/min, and the column was maintained at 25 °C. The effluent was monitored at 290 nm (MRPs) and 350 nm (flavonoids) and automatically collected into 20 mL test tubes. The subfractions enriched in MRPs were combined and lyophilised to yield a mixture of compounds **2** and **3** (450.0 mg) in a brown, amorphous, semi-solid substance.

The structures of the isolates were elucidated by 1D and 2D NMR experiments. The NMR spectra (^{1}H NMR, ^{13}C NMR, COSY, HMBC, and HMQC) were acquired on a Bruker Avance III 600 MHz NMR spectrometer (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) in methanol-d4 (600 MHz for ^{1}H and 150.9 MHz for ^{13}C) using TMS as the internal standard. All reagents were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

3.4. Biological Activity Studies in Cellular Models

3.4.1. Isolation of Neutrophils and PBMCs from Human Buffy Coats

Neutrophils and PBMCs were isolated from human buffy coats by dextran sedimentation, erythrocyte lysis, and centrifugation in a Ficoll-Hypaque gradient (PAA Laboratories, Pasching, Austria), as previously described [13]. After isolation, the cells were suspended in RPMI 1640 culture medium (BioWest, Nuaillé, France), (Ca^{2+})-free phosphate-buffered saline (PBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), or (Ca^{2+})-free Hanks' balanced salt solution (HBSS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), depending on the test, and were stored at 4 °C until use. The buffy coats for the study were purchased from the Warsaw Regional Blood Centre. Peripheral venous blood for fractionation and preparation of buffy coats was collected in the centre from healthy male volunteers (ages 18–35 years). The donors were non-smokers, clinically recognised as healthy, and did not take any medications. The study complied with the principles of the Declaration of Helsinki. As it

used a by-product material available on the market, it did not require the approval of the bioethics committee.

3.4.2. Viability Assessment of Neutrophils and PBMCs

The potential cytotoxicity of the analytes was assessed by flow cytometry (BD FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) with propidium iodide (PI) staining and Triton X-100 solution as a positive control, according to Magiera et al. [13]. The final test concentrations were 1–100 μg/mL for the extracts/fractions and 5–50 μM for pure compounds. The analyses were performed after 24 h and 48 h of incubation for neutrophils and PBMCs, respectively.

3.4.3. Evaluation of ROS, ELA-2, IL-8, IL-6, TNF-α and IL-10 Secretion by Human Immune Cells

All assays were performed according to the procedures described previously [13]. Briefly, the ROS production by neutrophils stimulated by *N*-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (f-MLP) was determined using the luminol-amplified chemiluminescence assay. The ELA-2 secretion by *f*-MLP-cytochalasin B-stimulated neutrophils was determined spectrophotometric using *N*-succinyl-alanine- alanine-valine-p-nitroanilide (SAAVNA) as a substrate. The release of pro- and anti-inflammatory cytokines (IL-8, IL-6, TNF-α and IL-10) by the LPS-stimulated neutrophils and PBMCs was determined with enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) using the commercial kits. The secretion ranges of individual cytokines in ng/mL in stimulated and unstimulated controls for all donors are presented in Table 4. For each assay, appropriate sample dilutions were made to obtain the measuring ranges specified by the manufacturer. Finally, the secretion degree of a particular factor was calculated as a percentage compared to the control cell samples untreated by the tested analytes (100% activity). As positive controls, dexamethasone (5−50 μM) and quercetin (2.5−50 μM) were used. Before the experiments all extracts/compounds were dissolved in water–DMSO mixtures and diluted with the culture medium to obtain the desired concentrations. The final DMSO levels in the reaction environment were at most 2.5% and were checked not to influence the results. LPS (from Escherichia coli O111:B4) was purchased from Merck Millipore (Billerica, MA, USA), ELISA tests from BD Biosciences (San Jose, CA, USA), and all other reagents from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All measurements were performed in 96-well plates using a microplate reader (SYNERGY 4, BioTek, Winooski, VT, USA).

Table 4. Ranges of cytokine secretion levels (ng/mL) in stimulated and unstimulated controls.

	Neutrophils		PBMCs		
	TNF-α	IL-8	TNF-α	IL-10	IL-6
stimulated control	0.5−1.8	43.9−88.8	1.5−5.8	1.4−2.8	2.3−2.7
unstimulated control	0.03−0.20	10.4−20.2	0.06−0.23	0.08−0.13	0.13−0.26

3.5. Statistics and Data Analysis

The results were expressed as means ± standard deviation (SD) for replicate determinations. The one-way analysis of variance (ANOVA), HSD Tukey test, and Dunnett's test were applied to evaluate the statistical significance of the mean values, with $p < 0.05$ regarded as significant. The data were analysed using the Statistica13.1Pl software for Windows (StatSoft, Krakow, Poland).

4. Conclusions

The present study is the first comprehensive analysis addressing the phytochemical profile and biological capacity of dried *P. spinosa* fruits and their main components. Forty-five polyphenolic compounds and three MRPs, including ten new for the plant, were detected and structurally characterised using the LC-MS technique and NMR spectroscopy. Fractionated extraction enabled enrichment of the extracts in active constituents

and activity enhancement. The obtained extracts/fractions significantly downregulated the pro-oxidant and pro-inflammatory functions of human neutrophils and PBMCs by modulating, in particular, the secretion of ROS, TNF-α, ELA-2, and IL-10. Polyphenols significantly contribute to the observed effects through the synergistic action of phenolic acids, condensed procyanidins, and flavonoids. The main constituent of the MRPs fraction, HMF, was nontoxic for the cells at a wide concentration range and able to significantly downregulate the TNF-α release from PBMCs acting thus additively with polyphenols. Compared to fresh sloes [13], dried fruits contain significantly lower levels of most polyphenolic compounds and are distinguished by the formation of MRPs. Nevertheless, dried sloes exhibit considerable pharmacological potential despite the decreased polyphenolic content. The present results might partly explain their traditional use as an inflammatory agent and indicate the extracts most suitable for functional application. However, further studies, including in vivo experiments, are required to confirm their effects eventually.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules27103302/s1. Table S1. UHPLC-PDA-ESI-MS^3 identification data of compounds detected in the dried fruit extracts of *P. spinosa*; Figure S1. Representative UHPLC chromatograms; Table S2. Quantitative profile of the *P. spinosa* fruit; Table S3. Correlation (r) coefficients and probability (p) values of linear relationships between antioxidant and anti-inflammatory activity parameters and phenolic contents of *P. spinosa* dried fruit extracts; Figure S2. Effect of the dried fruit extracts and pure compounds on viability (membrane integrity) of human immune cells. References [13,28,57–68] are cited in the supplementary materials.

Author Contributions: Conceptualization, A.M. (Anna Magiera) and M.A.O.; Investigation, A.M. (Anna Magiera), A.O. and A.M. (Anna Marchelak); Methodology, A.M. (Anna Magiera), M.E.C., A.O., S.G. and M.A.O.; Data curation, A.M. (Anna Magiera); Formal analysis, A.M. (Anna Magiera); Project administration, A.M. (Anna Magiera); Validation, A.M. (Anna Magiera) and M.A.O.; Resources, M.E.C., S.G. and M.A.O.; Supervision, M.E.C. and M.A.O.; Funding Acquisition, M.A.O.; Writing—Original draft, A.M. (Anna Magiera) and M.A.O.; Writing—Review and editing, A.M. (Anna Magiera), M.E.C., A.O., S.G. and M.A.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Medical University of Lodz (grant number 503/3-022-01/503-31-001).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: This project was carried out using CePT infrastructure financed by the European Regional Development Fund within the Operational Programme "Innovative economy" for 2007–2013. The authors would like to thank Ewelina Ziemba for helping with preparation of the extracts.

Conflicts of Interest: No potential conflict of interest were reported by the authors.

Sample Availability: Samples of the fruits and extracts are available from the authors.

Abbreviations

BFD	*n*-butanol fraction of MED
BFF	*n*-butanol fraction of MEF
CHA	chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid)
CYG	cyanidin 3-*O*-*β*-D-glucopyranoside
DEFD	diethyl ether fraction of MED
DEFF	diethyl ether fraction of MEF
DEX	dexamethasone
dw	dry weight
EAFD	ethyl acetate fraction of MED
EAFF	ethyl acetate fraction of MEF
ELA-2	elastase 2 (neutrophils elastase)
*f*MLP	*N*-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine
fw	fresh weight
GAE	gallic acid equivalents
IL	interleukin
LOD	limits of detection
LOQ	limits of quantitation
LPS	bacterial lipopolysaccharide
MED	methanol-water (75:25, *v*/*v*) extract of dried fruits
MEF	methanol-water (75:25, *v*/*v*) extract of fresh fruits
MRPs	Maillard reaction products
MS^3	three-stage mass spectrometry
PB2	procyanidin B2
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
QU	quercetin
ROS	reactive oxygen species
TAC	total content of anthocyanins
TFL	total content of flavonoids
TNF-α	tumour necrosis factor α
TPA	total content of phenolic acids
TPC	total phenolic content (Folin–Ciocalteu assay)
TPH	total phenolic content (sum of individual phenolics by HPLC)
TTC	total content of tannin-type proanthocyanidins
WRD	water residue of MED after fractionated extraction
WRF	water residue of MEF after fractionated extraction

References

1. Popescu, I.; Caudullo, G. Prunus spinosa in Europe: Distribution, habitat, usage and threats. In *European Atlas of Forest Tree Species*; San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A., Eds.; Publications Office of the European Union: Luxembourg, 2016; p. e01aa69+. Available online: https://w3id.org/mtv/FISE-Comm/v01/e01aa69 (accessed on 10 December 2021).
2. Facciola, S. *Cornucopia II: A Source Book of Edible Plants*, 2nd ed.; Facciola, S., Ed.; Kampong Publications: Vista, CA, USA, 1998; p. 204.
3. Alarcón, R.; Pardo-de-Santayana, M.; Priestley, C.; Morales, R.; Heinrich, M. Medicinal and local food plants in the south of Alava (Basque Country, Spain). *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *176*, 207–224. [CrossRef] [PubMed]
4. Jarić, S.; Mačukanović-Jocić, M.; Djurdjević, L.; Mitrović, M.; Kostić, O.; Karadžić, B.; Pavlović, P. An ethnobotanical survey of traditionally used plants on Suva planina mountain (south-eastern Serbia). *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *175*, 93–108. [CrossRef] [PubMed]
5. Kültür, S. Medicinal plants used in Kirklareli Province (Turkey). *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *111*, 341–364. [CrossRef]
6. Zlatković, B.K.; Bogosavljević, S.S.; Radivojević, A.R.; Pavlović, M.A. Traditional use of the native medicinal plant resource of Mt. Rtanj (Eastern Serbia): Ethnobotanical evaluation and comparison. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *151*, 704–713. [CrossRef] [PubMed]
7. Fraternale, D.; Giamperi, L.; Bucchini, A.; Sestili, P.; Paolillo, M.; Ricci, D. *Prunus spinosa* fresh fruit juice: Antioxidant activity in cell-free and cellular systems. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*, 1665–1670. [CrossRef] [PubMed]
8. Barros, L.; Carvalho, A.M.; Morais, J.S.; Ferreira, I.C.F.R. Strawberry tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chem.* **2010**, *120*, 247–254. [CrossRef]

9. Guimarães, R.; Barros, L.; Dueñas, M.; Carvalho, A.M.; Queiroz, M.J.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I.C. Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. *Food Chem.* **2013**, *141*, 3721–3730. [CrossRef] [PubMed]
10. Morales, P.; Ferreira, I.C.F.R.; Carvalho, A.M.; Fernández-Ruiz, V.; Cortes Sánchez-Mata, M.; Cámara, M.; Morales, R.; Tardío, J. Wild edible fruits as a potential source of phytochemicals with capacity to inhibit lipid peroxidation. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2013**, *115*, 176–185. [CrossRef]
11. Ruiz-Rodríguez, B.M.; De Ancos, B.; Sánchez-Moreno, B.; Fernández-Ruiz, V.; De Cortes Sánchez-Mata, M.; Cámara, M.; Tardío, J. Wild blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) fruits as valuable sources of antioxidants. *Fruits* **2014**, *69*, 61–73. [CrossRef]
12. Mikulic-Petkovsek, M.; Stampar, F.; Veberic, R.; Sircelj, H. Wild Prunus fruit species as a rich source of bioactive compounds. *J. Food Sci.* **2016**, *81*, C1928–C1937. [CrossRef]
13. Magiera, A.; Czerwińska, M.E.; Owczarek, A.; Marchelak, A.; Granica, S.; Olszewska, M.A. Polyphenol-enriched extracts of *Prunus spinosa* fruits: Anti-Inflammatory and antioxidant effects in human immune cells ex vivo in relation to phytochemical profile. *Molecules* **2022**, *27*, 1691. [CrossRef] [PubMed]
14. Sabatini, L.; Fraternale, D.; Di Giacomo, B.; Mari, M.; Albertini, M.C.; Gordillo, B.; Rocchi, M.B.L.; Sisti, D.; Coppari, S.; Semprucci, F.; et al. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activity of *Prunus spinosa* L. fruit ethanol extract. *J. Funct. Foods* **2020**, *67*, 103885. [CrossRef]
15. Arsic, B.; Kostic, D.; Randjelovic, S.; Radovanović, B.; Sunaric, S.; Ilic, S. Chemometric analysis of selected medicinal plants from Serbia. *Rom. Biotechnol. Lett.* **2016**, *21*, 11115–11125.
16. Gegiu, G.; Branza, A.D.; Bucur, L.; Grigorian, M.; Tache, T.; Badea, V. Contributions to the antimicrobial and antifungal study of the aqueous extract of *Prunus spinosa* L. *Farmacia* **2015**, *63*, 275–279.
17. Pinacho, R.; Cavero, R.Y.; Astiasaran, I.; Ansorena, D.; Calvo, M.I. Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of in vitro digestion on their antioxidant capacity. *J. Funct. Foods* **2015**, *19*, 49–62. [CrossRef]
18. Rutkowska, M.; Kolodziejczyk-Czepas, J.; Owczarek, A.; Zakrzewska, A.; Magiera, A.; Olszewska, M.A. Novel insight into biological activity and phytochemical composition of *Sorbus aucuparia* L. fruits: Fractionated extracts as inhibitors of protein glycation and oxidative/nitrative damage of human plasma components. *Food Res. Int.* **2021**, *147*, 110526. [CrossRef] [PubMed]
19. Yue, X.; Xu, Z. Changes of anthocyanins, anthocyanidins, and antioxidant activity in bilberry extract during dry heating. *J. Food Sci.* **2008**, *73*, C494–C499. [CrossRef]
20. Heras-Ramirez, M.E.; Quintero-Ramos, A.; Camacho-Davila, A.A.; Barnard, J.; Talamas-Abbud, R.; Torres-Munoz, J.V.; Salas-Munoz, E. Effect of blanching and drying temperature on polyphenolic compound stability and antioxidant capacity of apple pomace. *Food Bioproc. Tech.* **2012**, *5*, 2201–2210. [CrossRef]
21. Kessy, H.N.; Hu, Z.; Zhao, L.; Zhou, M. Effect of steam blanching and drying on phenolic compounds of Litchi Pericarp. *Molecules* **2016**, *21*, 729. [CrossRef]
22. Méndez-Lagunas, L.; Rodríguez-Ramírez, J.; Cruz-Gracida, M.; Sandoval-Torres, S.; Barriada-Bernal, G. Convective drying kinetics of strawberry (*Fragaria ananassa*): Effects on antioxidant activity, anthocyanins and total phenolic content. *Food Chem.* **2017**, *230*, 174–181. [CrossRef]
23. ALjahdali, N.; Carbonero, F. Impact of Maillard reaction products on nutrition and health: Current knowledge and need to understand their fate in the human digestive system. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2019**, *59*, 474–487. [CrossRef] [PubMed]
24. Parisi, S.; Luo, W. Maillard reaction and processed foods—Main chemical products. In *Chemistry of Maillard Reactions in Processed Foods*; Parisi, S., Ed.; Springer Briefs in Molecular Science; Springer: Cham, Switzerland, 2018; p. 53.
25. Shapla, U.M.; Solayman, M.; Alam, N.; Khalil, M.I.; Gan, S.H. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: Effects on bees and human health. *Chem. Cent. J.* **2018**, *12*, 35. [CrossRef] [PubMed]
26. Adefegha, S.A. Functional foods and nutraceuticals as dietary intervention in chronic diseases; Novel perspectives for health promotion and disease prevention. *J. Diet. Suppl.* **2018**, *15*, 977–1009. [CrossRef] [PubMed]
27. Karwowska, K.; Przybył, J. *Suszarnictwo i Przetwórstwo Ziół (Drying and Processing of Herbs)*, 1st ed.; SGGW: Warsaw, Poland, 2005; pp. 35–48.
28. Castillo-Fraireac, C.M.; Poupard, P.; Guilois-Dubois, S.; Salas, E.; Guyota, S. Preparative fractionation of 5′-O-caffeoylquinic acid oxidation products using centrifugal partition chromatography and their investigation by mass spectrometry. *J. Chrom. A.* **2019**, *1592*, 19–30. [CrossRef]
29. Aneklaphakij, C.; Saigo, T.; Watanabe, M.; Naake, T.; Fernie, A.R.; Bunsupa, S.; Satitpatipan, V.; Tohge, T. Diversity of chemical structures and biosynthesis of polyphenols in Nut-bearing species. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 642581. [CrossRef]
30. Calín-Sánchez, Á.; Lipan, L.; Cano-Lamadrid, M.; Kharaghani, A.; Masztalerz, K.; Carbonell-Barrachina, Á.A.; Figiel, A. Comparison of traditional and novel drying techniques and its effect on quality of fruits, vegetables and aromatic herbs. *Foods* **2020**, *9*, 1261. [CrossRef]
31. Piga, A.; Del Caro, A.; Corda, G. From plums to prunes: Influence of drying parameters on polyphenols and antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3675–3681. [CrossRef]
32. Khanal, R.C.; Howard, L.R.; Prior, R.L. Effect of heating on the stability of grape and blueberry pomace procyanidins and total anthocyanins. *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 1464–1469. [CrossRef]
33. Madrau, M.A.; Sanguinetti, A.M.; Caro, A.D.; Fadda, C.; Piga, A. Contribution of melanoidins to the antioxidant activity of prunes. *J. Food Qual.* **2010**, *33*, 155–170. [CrossRef]

34. Richards, S.A.; Hollerton, J.C. *Essential Practical NMR for Organic Chemistry*; John Wiley & Sons: Chichester, UK, 2011; pp. 57, 138. [CrossRef]
35. Cottier, L.; Descotes, G.; Soro, Y. Synthesis of acetylated ranunculin diastereoisomers and δ–glucosyloxy–γ–oxo esters from α or β glucosylmethylfurfural. *J. Carbohydr. Chem.* **2005**, *24*, 55–71. [CrossRef]
36. Boffo, E.F.; Tavares, L.A.; Tobias, A.C.T.; Ferreira, M.M.C.; Ferreira, A.G. Identification of components of Brazilian honey by 1H NMR and classification of its botanical origin by chemometric methods. *LWT* **2012**, *49*, 55–63. [CrossRef]
37. Choudhary, A.; Kumar, V.; Kumar, S.; Majid, I.; Aggarwal, P.; Suri, S. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) formation, occurrence and potential health concerns: Recent developments. *Toxin Rev.* **2021**, *40*, 545–561. [CrossRef]
38. Abraham, K.; Gürtler, R.; Berg, K.; Heinemeyer, G.; Lampen, A.; Appel, K.E. Toxicology and risk assessment of 5-hydroxymethylfurfural in food. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55*, 667–678. [CrossRef] [PubMed]
39. Pastoriza de la Cueva, S.; Álvarez, J.; Végvári, Á.; Montilla-Gómez, J.; Cruz-López, O.; Delgado-Andrade, C.; Rufián-Henares, J.A. Relationship between HMF intake and SMF formation *in vivo*: An animal and human study. *Mol. Nutr. Food Res.* **2017**, *61*, 1600773. [CrossRef]
40. Murkovic, M.; Pichler, N. Analysis of 5-hydroxymethylfurfual in coffee, dried fruits and urine. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 842–846. [CrossRef]
41. Chung, H.Y.; Cesari, M.; Anton, S.; Marzetti, E.; Giovannini, S.; Seo, A.Y.; Carter, C.; Yu, B.P.; Leeuwenburgh, C. Molecular inflammation: Underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* **2009**, *8*, 18–30. [CrossRef]
42. Jones, H.R.; Robb, C.T.; Perretti, M.; Rossi, A.G. The role of neutrophils in inflammation resolution. *Semin. Immunol.* **2016**, *28*, 137–145. [CrossRef]
43. Iyer, S.S.; Cheng, G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit. Rev. Immunol.* **2012**, *32*, 23–63. [CrossRef]
44. Marchelak, A.; Owczarek, A.; Matczak, M.; Pawlak, A.; Kolodziejczyk-Czepas, J.; Nowak, P.; Olszewska, M.A. Bioactivity potential of *Prunus spinosa* L. flower extracts: Phytochemical profiling, cellular safety, pro-inflammatory enzymes inhibition and protective effects against oxidative stress in vitro. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 680. [CrossRef]
45. Bourgonje, A.R.; Feelisch, M.; Faber, K.N.; Pasch, A.; Dijkstra, G.; van Goor, H. Oxidative stress and redox-modulating therapeutics in inflammatory bowel disease. *Trends Mol. Med.* **2020**, *26*, 1034–1046. [CrossRef]
46. Tiwari, B.K.; Pandey, K.B.; Abidi, A.B.; Rizvi, S.I. Markers of oxidative stress during diabetes mellitus. *J. Biomark.* **2013**, *2013*, 378790. [CrossRef] [PubMed]
47. Kuno, Y.; Ina, K.; Nishiwaki, T.; Tsuzuki, T.; Shimada, M.; Imada, A.; Nishio, Y.; Nobata, K.; Suzuki, T.; Ando, T.; et al. Possible involvement of neutrophil elastase in impaired mucosal repair in patients with ulcerative colitis. *J. Gastroenterol.* **2002**, *37*, 22–32. [CrossRef] [PubMed]
48. Liu, H.; Lessieur, E.M.; Saadane, A.; Lindstrom, S.I.; Taylor, P.R.; Kern, T.S. Neutrophil elastase contributes to the pathological vascular permeability characteristic of diabetic retinopathy. *Diabetologia* **2019**, *62*, 2365–2374. [CrossRef] [PubMed]
49. Zhang, J.M.; An, J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int. Anesthesiol. Clin.* **2007**, *45*, 27–37. [CrossRef] [PubMed]
50. Kalliolias, G.D.; Ivashkiv, L.B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2016**, *12*, 49–62. [CrossRef]
51. Saraiva, M.; Vieira, P.; O'Garra, A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J. Exp. Med.* **2020**, *217*, e20190418. [CrossRef]
52. Husøy, T.; Haugen, M.; Murkovic, M.; Jöbstl, D.; Stølen, L.H.; Bjellaas, T.; Rønningborg, C.; Glatt, H.; Alexander, J. Dietary exposure to 5-hydroxymethylfurfural from Norwegian food and correlations with urine metabolites of short-term exposure. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 3697–3702. [CrossRef]
53. Qiu, Y.; Lin, X.; Chen, Z.; Li, B.; Zhang, Y. 5-Hydroxymethylfurfural exerts negative effects on gastric mucosal epithelial cells by inducing oxidative stress, apoptosis, and tight junction disruption. *J. Agric. Food Chem.* **2022**, *70*, 3852–3861. [CrossRef]
54. Kong, F.; Lee, B.H.; Wei, K. 5-Hydroxymethylfurfural mitigates lipopolysaccharide-stimulated inflammation via suppression of MAPK, NF-κB and mTOR activation in RAW 264.7 Cells. *Molecules* **2019**, *24*, 275. [CrossRef]
55. Uchida, R.; Kato, M.; Hattori, Y.; Kikuchi, H.; Watanabe, E.; Kobayashi, K.; Nishida, K. Identification of 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) as an active component Citrus Jabara that suppresses FcεRI-mediated mast Cell Activation. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2472. [CrossRef]
56. Marchelak, A.; Olszewska, M.A.; Owczarek, A. Simultaneous quantification of thirty polyphenols in blackthorn flowers and dry extracts prepared thereof: HPLC-PDA method development and validation for quality control. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *184*, 113121. [CrossRef] [PubMed]
57. Li, H.; Wu, C.-J.; Tang, X.-Y.; Yu, S.-J. Determination of four bitter compounds in caramel colors and beverages using modified QuEChERS coupled with liquid chromatography-diode array detector-mass spectrometry. *Food Anal. Methods* **2019**, *12*, 1674–1683. [CrossRef]
58. Gökmen, V.; Senyuva, H.Z. Improved method for the determination of hydroxymethylfurfural in baby foods using liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2845–2849. [CrossRef] [PubMed]
59. Teixidó, E.; Moyano, E.; Santos, F.J.; Galceran, M.T. Liquid chromatography multi-stage mass spectrometry for the analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods. *J. Chromatogr. A.* **2008**, *1185*, 102–108. [CrossRef]

60. Catarino, M.D.; Silva, A.M.S.; Saraiva, S.C.; Sobral, A.B.J.F.N.; Cardoso, S.M. Characterization of phenolic constituents and evaluation of antioxidant properties of leaves and stems of *Eriocephalus africanus*. *Arab. J. Chem.* **2018**, *11*, 62–69. [CrossRef]
61. Jaiswal, R.; Sovdat, T.; Vivan, F.; Kuhnert, N. Profiling and characterization by LC-MSn of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in maté (*Ilex paraguariensis*). *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 5471–5481. [CrossRef] [PubMed]
62. Jaiswal, R.; Müller, H.; Müller, A.; Karar, M.G.; Kuhnert, N. Identification and characterization of chlorogenic acids, chlorogenic acid glycosides and flavonoids from *Lonicera henryi* L. (Caprifoliaceae) leaves by LC-MSn. *Phytochemistry* **2014**, *108*, 252–263. [CrossRef]
63. Clifford, M.N.; Johnston, K.L.; Knight, S.; Kuhnert, N. Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2900–2911. [CrossRef]
64. Bystrom, L.M.; Lewis, B.A.; Brown, D.L.; Rodriguez, E.; Obendorf, R.L. Characterization of phenolics by LC-UV/vis, LC-MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. 'Montgomery' fruits. *Food Chem.* **2008**, *111*, 1017–1024. [CrossRef]
65. Xu, S.; Xu, X.; Yuan, S.; Liu, H.; Liu, M.; Zhang, Y.; Zhang, H.; Gao, Y.; Lin, R.; Li, X. Identification and analysis of amygdalin, neoamygdalin and amygdalin amide in different processed bitter almonds by HPLC-ESI-MS/MS and HPLC-DAD. *Molecules* **2017**, *22*, 1425. [CrossRef]
66. Ben Said, R.; Hamed, A.I.; Mahalel, U.A.; Al-Ayed, A.S.; Kowalczyk, M.; Moldoch, J.; Oleszek, W.; Stochmal, A. Tentative characterization of polyphenolic compounds in the male flowers of *Phoenix dactylifera* by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and DFT. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 512. [CrossRef] [PubMed]
67. Chen, G.; Li, X.; Saleri, F.; Guo, M. Analysis of flavonoids in *Rhamnus davurica* and its antiproliferative activities. *Molecules* **2016**, *21*, 1275. [CrossRef] [PubMed]
68. Clifford, M.N.; Knight, S.; Kuhnert, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSn. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3821–3832. [CrossRef] [PubMed]

molecules MDPI

Supplementary Material for:

Polyphenols and Maillard Reaction Products in Dried *Prunus spinosa* Fruits: Quality Aspects and Contribution to Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity in Human Immune Cells *Ex Vivo*

Anna Magiera [1,*], Monika Ewa Czerwińska[2,3], Aleksandra Owczarek[1], Anna Marchelak[1], Sebastian Granica[4] and Monika Anna Olszewska[1]

[1] Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, 1 Muszynskiego St., 90-151 Lodz, Poland
[2] Department of Biochemistry and Pharmacogenomics, Medical University of Warsaw, 1 Banacha St., 02-097 Warsaw, Poland
[3] Centre for Preclinical Research, Medical University of Warsaw, 1B Banacha St., 02-097 Warsaw, Poland
[4] Microbiota Lab, Centre for Preclinical Studies, Department of Pharmacognosy and Molecular Basis of Phytotherapy, Medical University of Warsaw, 1 Banacha St., 02-097 Warsaw, Poland
* Correspondence: anna.magiera@umed.lodz.pl (A. Magiera); Tel.: +48 503316997

Supplementary Material

Table of Contents

S.1. Results

Table S1. UHPLC-PDA-ESI-MS^3 identification data of compounds detected in the dried fruit extracts of *P. spinosa*.

Figure S1. Representative UHPLC chromatograms.

Table S2. Quantitative profile of the *P. spinosa* fruit.

Figure S2. Effect of the fruit extracts and pure compounds on viability (membrane integrity) of human immune cells.

Table S3. Correlation (r) coefficients and probability (p) values of linear relationships between antioxidant and anti-inflammatory activity parameters and phenolic contents of *P. spinosa* fruits extracts.

References

S.1. Results

Table S1. UHPLC-PDA-ESI-MS^3 identification data of compounds detected in the dried fruit extracts of *Prunus spinosa*.

Peak	Analyte	*Rt* (min)	UV λ_{max} (nm)	$[M-H]^-$ (m/z)	Fragmentary ions	$[M+H]^+$ (m/z)	Fragmentary ions	Extracts	References
1	3-Hydroxy-2,3-dihydromaltol (2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(H)-pyran-4-one)	2.5	295	-	-	145	-	BFD, DEFD, EAFD, MED	[1]
2	5-Hydroxymethylfurfural (HMF)[a,b]	3.2	285	-	-	127	109	BFD, DEFD, EAFD, MED, WRD	[2, 3]
3	5-Hydroxymethoxymethyl-2-furanmethanol[b]	3.2	285	-	-	-	-	BFD, DEFD, EAFD, MED, WRD	-
4	Vanillic acid *O*-hexoside	3.9	250, 290	329	167	-	-	BFD, EAFD, MED, WRD	-
5	Protocatechuic acid 4-*O*-hexoside	4.3	280	315	153	-	-	EAFD	[4]
6	Protocatechuic acid[a]	4.6	260 295	153	153	155	155	DEFD, EAFD	-
7	Unidentified	5.2	325	517	335	-	-	BFD, MED, WRD	-
8	cis-3-*O*-Caffeoylquinic acid	5.7	322	353	191, 179	-	-	BFD, MED	[5]
9	3-*O*-Caffeoylquinic acid hexoside	6.2	325 295	515	353 (191, 179), 335, 341, 179			BFD, MED	[6]
10	3-*O*-Caffeoylquinic acid (neochlorogenic acid)[a]	6.7	325 265,211	353	191, 179, 135	-	-	BFD, DEFD, EAFD, MED, WRD	[7]
11	*p*-Hydroxybenzoic acid[a]	7.1	267 290	137	-	-	-	DEFD, EAFD	-
12	Unidentified	7.4	280	505	379	-	-	EAFD	-
13	(Epi)catechin derivative	7.5	280	415	289, 245	-	-	DEFD	-
14	Caffeoylshikimic acid derivative	8.0	-	505	335, 179	-	-	EAFD	[5]
15	Vanilloyl malate hexoside	8.9	260	445	329, 167	-	-	EAFD	-
16	3-*O*-*p*-Coumaroylquinic acid	9.2	310	337	163, 191	-	-	BFD, DEFD, EAFD, MED	[5]
17	*p*-Coumaric acid *O*-hexoside	9.7	280	325	163	-	-	EAFD	[8]
18	Amygdalin	10.1	210	456	323, 221	-	-	BFD	[9]
19	Vanillic acid[a]	10.1	216, 260, 290	167	167	169	169	DEFD	-
20	5-*O*-Caffeoylquinic acid (chlorogenic acid, CHA)[a]	10.6	325	353	191, 179	-	-	BFD, DEFD, EAFD, MED	[7]
21	*cis*-3-*O*-Feruloylquinic acid	11.0	215, 325, 293	367	193	-	-	DEFD, EAFD, MED	[5]
22	Unidentified	11.2	300, 225	415	293	-	-	BFD	-
23	4-*O*-Caffeoylquinic acid (cryptochlorogenic acid)[a]	11.5	325, 215	353	173, 191, 179	-	-	BFD, DEFD, EAFD, MED	[7]
24	Cyanidin 3-*O*-glucoside (CYG)[a]	11.6	515, 280	447	285, 401	449	287	BFD	-
25	Caffeic acid 3/4-*O*-hexoside	12.1	320	341	179, 135	-	-	DEFD, EAFD	-
26	3-*O*-Feruloylquinic acid	12.5	322	367	193	-	-	EAFD	[5]
27	Vanillin[a]	13.3	285	-	-	153	153	DEFD, EAFD	-
28	*cis*-3-*O*-*p*-Coumaroylquinic acid	14.6	305	337	163	-	-	DEFD, EAFD	[5]
29	Caffeoylquinic acid dehydrodimer	14.9	330, 287	705	513, 339	-	-	MED, WRD	[10]
30	4-*O*-Caffeoylshikimic acid	15.2	325	335	179, 135	-	-	DEFD, EAFD	[5]

31	*p*-Coumaric acid[a]	15.8	310	163	-	-	-	DEFD	-
32	4-*O*-Feruloylquinic acid	16.5	320, 217	367	176	-	-	EAFD	[5]
33	Caffeoylshikimic acid	17.4	280	335	161, 135, 179	-	-	BFD, DEFD, EAFD, MED	[5]
34	Caffeoylshikimic acid	18.9	215	335	161, 179	-	-	DEFD, EAFD	[5]
35	Unidentified	20.9	280	317	287	-	-	DEFD	-
36	*p*-Coumaroylshikimic acid	23.8	300, 205	319	119, 145, 275, 163, 257	-	-	DEFD, EAFD	[11]
37	Aromadendrin hexoside (dihydrokaempferol hexoside)	24.3	280, 328	449	287, 151, 269, 201	-	-	EAFD	[12]
38	Quercetin hexoside-pentoside	24.7	354	595	301, 433	-	303	BFD	-
39	*p*-Coumaroylshikimic acid	25.3	313, 290	319	145, 275, 257	-	-	DEFD, EAFD	[11]
40	Quercetin 3-*O*-*β*-D-galactoside (hyperoside)[a]	26.2	264, 355	463	301	-	303	EAFD	-
41	Quercetin 3-*O*-(6″-*O*-*α*-L-rhamnopyranosyl)-*β*-D-glucopyranoside (rutin)[a]	26.6	265, 350	609	301	-	303	BFD, EAFD, MED	-
42	Quercetin 3-*O*-*β*-D-glucopyranoside (isoquercitrin)[a]	27.7	260, 355	463	301	-	303	DEFD, EAFD	-
43	Quercetin 3-*O*-(2″-*O*-*β*-D-glucopyranosyl)-*α*-L-arabinofuranoside[a]	28.7	255, 355	595	433, 301	-	303	BFD, MED	-
44	Quercetin 3-*O*-*α*-D-xylopyranoside (reinutrin)[a]	30.1	256, 356	433	301	435	303	DEFD, EAFD	-
45	Quercetin 3-*O*-*α*-L-arabinopyranoside (guaiaverin)[a]	30.4	255, 355	433	301	435	303	DEFD, EAFD	-
46	Quercetin 3-*O*-*α*-L-arabinofuranoside (avicularin)[a]	35.1	255, 355	433	301	435	303	DEFD, EAFD, MED	-
47	Quercetin 3-*O*-(4″-*O*-*β*-D-glucopyranosyl)-*α*-L-rhamnopyranoside (multinoside A)[a]	35.8	254, 355	609	447, 301	611	449, 303	BFD, EAFD, MED	-
48	Quercetin 3-*O*-*α*-L-rhamnopyranoside (quercitrin)[a]	36.5	255, 355	447	301	449	303	DEFD, EAFD, MED	-
49	Quercetin malyl-pentoside	38.0	254, 350	549	433, 301	-	435, 303	EAFD	-
50	Quercetin malyl-pentoside	39.3	255, 355	549	433, 301	-	435, 303	DEFD	-
51	Kaempferol hexoside	42.0	255, 355	447	285	-	287	DEFD	-
52	Quercetin acetyl-hexoside-rhamoside	46.5	254, 350	651	609, 301	-	303	EAFD, MED	-
53	Quercetin (QU)[a]	49.2	255, 356	301	-	-	303	DEFD, EAFD, MED	-
54	Unidentified	50.9	350	337	322	-	-	DEFD	-

[a] Identified with authentic standards. [b] Identified by NMR. *Rt*, retention times. UV λ_{max}, absorbance maxima in UV-Vis spectra. $[M-H]^-$, deprotonated molecular ions in MS spectra recorded in a negative ion mode. $[M+H]^+$, protonated molecular ions in MS spectra recorded in a positive ion mode. Nomenclature of quinic acid esters including chlorogenic acid isomers is according to IUPAC rules adopted by Clifford et al. [7,13].

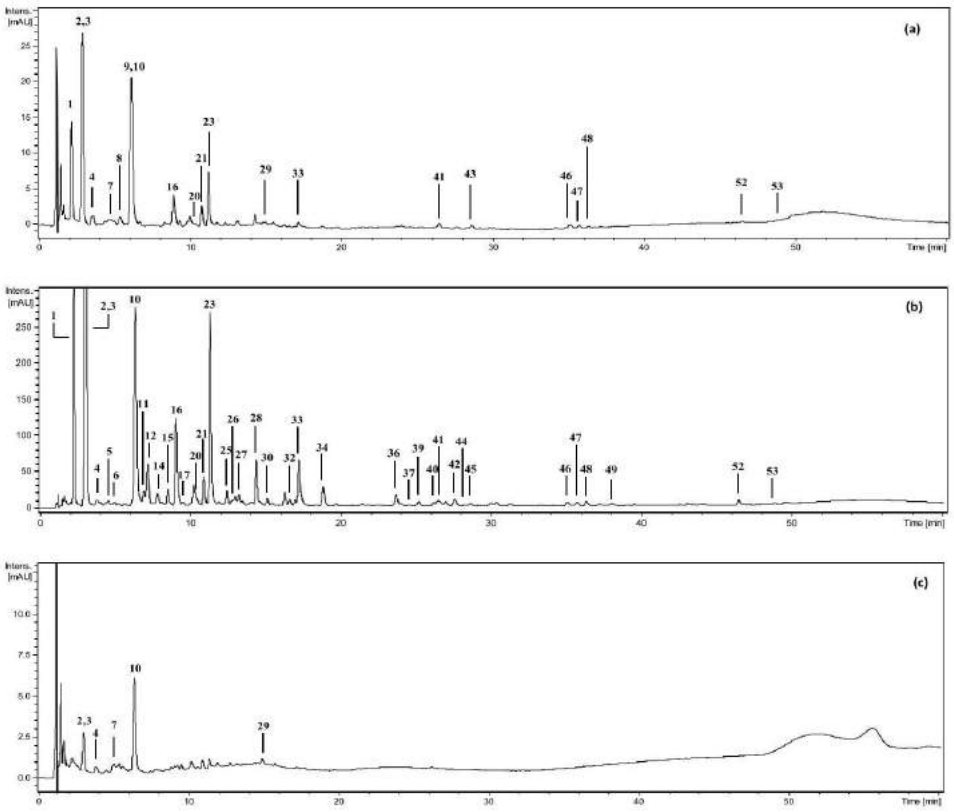


Figure S1. Representative UHPLC chromatograms at 280 nm of (a) methanol extract from dried fruits of *Prunus spinosa*, MED; ethyl acetate fraction from dried fruits, EAFD (b); and water residue from dried fruits, WRD. Peak numbers refer to those implemented in the Supplementary Table S1.

Table S2. Quantitative profile of the *Prunus spinosa* fruit.

	Dried fruit		Fresh fruit	
Total contents:	mg/g fw	mg/g dw	mg/g fw*	mg/g dw
TPC (GAE)	5.47 ± 0.09	13.43 ± 0.24	13.69 ± 0.55	33.63 ± 1.36
TPH	1.96 ± 0.12	9.61 ± 0.30	4.46 ± 0.09	10.97 ± 0.22
TPA	1.67 ± 0.10	4.11 ± 0.26	3.07 ± 0.05	7.55 ± 0.13
TAC	n.d.	n.d.	0.72 ± 0.02	1.78 ± 0.04
TFL	0.29 ± 0.02	0.72 ± 0.04	0.66 ± 0.03	1.63 ± 0.08
TTC (PB2)	1.67 ± 0.05	4.10 ± 0.12	6.96 ± 0.30	17.10 ± 0.74
MRPs	0.19 ± 0.01	0.46 ± 0.03	n.d.	n.d,
Individual compounds:				
Avicularin	0.13 ± 0.02	0.32 ± 0.04	0.21 ± 0.02	0.51 ± 0.05
Hyperoside	n.d.	n.d.	0.02 ± 0.0007	0.04 ± 0.001
Isoquercitrin	n.d.	n.d.	0.01 ± 0.0006	0.03 ± 0.001
Rutin	0.08 ± 0.006	0.20 ± 0.01	0.25 ± 0.003	0.61 ± 0.007
Quercitrin	0.02 ± 0.002	0.05 ± 0.005	0.02 ± 0.001	0.06 ± 0.004
Quercetin	0.01 ± 0.002	0.03 ± 0.005	n.d.	n.d.
Cyanidin 3-*O*-glucoside	n.d.	n.d.	0.31 ± 0.02	0.75 ± 0.05
Cyanidin 3-*O*-rutinoside	n.d.	n.d.	0.22 ± 0.01	0.53 ± 0.03
Peonidin-3-*O*-glucoside	n.d.	n.d.	0.15 ± 0.01	0.38 ± 0.01
Neochlorogenic acid	0.92 ± 0.07	2.27 ± 0.17	2.43 ± 0.05	5.96 ± 0.11
Chlorogenic acid	0.03 ± 0.002	0.07 ± 0.005	0.15 ± 0.003	0.36 ± 0.007
Cryptochlorogenic acid	0.43 ± 0.006	1.06 ± 0.01	0.24 ± 0. 01	0.60 ± 0.03
5-Hydroxymethylfurfural	0.16 ± 0.01	0.39 ± 0.03	n.d.	n.d.

Results are presented as means ± SD ($n = 3$). * Values according to Magiera et al. [14]. TPC, total phenolic contents in gallic acid equivalents (GAE); TPH, total contents of low-molecular-weight phenols determined by HPLC-PDA; TPA, total phenolic acids; TAC, total anthocyanins; TFL, total flavonoids; TTC, total tannins in procyanidin B2 (PB2) equivalents; fw, fresh weight; dw, dry weight. N.d.: below the limits of quantitation (LOQ) or detection (LOD).

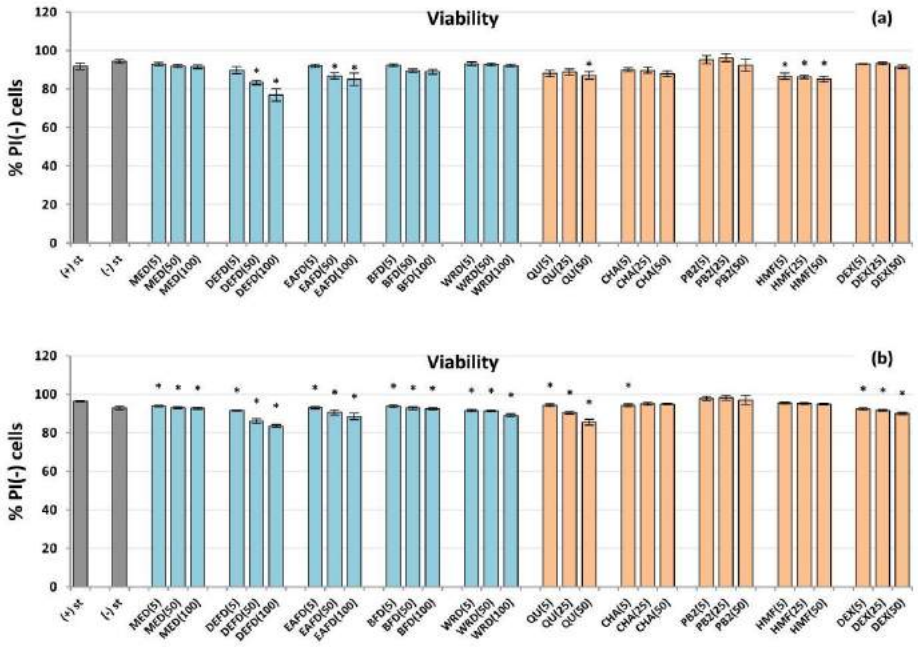


Figure S2. Effect of fruit extracts/fractions (5-100 μg/mL) and standards (5-50 μM) on viability (membrane integrity) of human immune cells expressed as a percentage of PI(-) cells (propidium iodide-negative): **(a)** effect on viability of neutrophils after 24 h incubation; **(b)** effect on viability of PBMCs after 48 h incubation. Extracts/fractions: MED, methanol-water (75:25, *v/v*) extract of dried fruits; DEFD, diethyl ether fraction of MED; EAFD, ethyl acetate fraction of MED; BFD, *n*-butanol fraction of MED; WRD, water residue of MED. Standards: DEX, dexamethasone; QU, quercetin; CHA, chlorogenic acid; PB2, procyanidin B2; HMF, 5-Hydroxymethylfurfural; Positive control: Triton X-100 solution (98.6% of PI(+) cells). Data expressed as means ± SD of five independent experiments performed with cells isolated from five independent donors. Statistical significance in Dunnett's test: $^{*}p < 0.05$ compared with the stimulated control (+)st.

Table S3. Correlation (r) coefficients and probability (p) values of linear relationships between biological activity parameters and phenolic contents of *Prunus spinosa* fruits extracts.

		Neutrophils		
r (p) for	**ROS level**	**TNF-α secretion**	**ELA-2 secretion**	**IL-8 secretion**
TPC	-0.7099 (0.000)*	-0.5936 (0.020)*	-0.6390 (0.002)*	-0.1314 (0.641)
TPH+TTC	-0.6479 (0.001)*	-0.5292 (0.042)*	-0.6510 (0.001)*	-0.1317 (0.625)
		PBMCs		
r (p) for		**TNF-α secretion**	**IL-10 secretion**	**IL-6 secretion**
TPC		-0.9116 (0.000)*	0.5549 (0.032)*	-0.9378 (0.000)*
TPH+TTC		-0.9134 (0.000)*	0.6685 (0.006)*	-0.9774 (0.000)*

Values calculated using activity and concentration parameters reported in Table 1 and Figures 4-6. TPC, total phenolic contents in gallic acid equivalents (GAE); TPH, total contents of low-molecular-weight phenols determined by HPLC-PDA; TTC, total tannins in procyanidin (PB2) B2 equivalents. Asterisks mean statistical significance of the linear relationships ($p < 0\ 05$).

References

1. Li, H.; Wu, C.-J.; Tang, X.-Y.; Yu, S.-J. Determination of four bitter compounds in caramel colors and beverages using modified QuEChERS coupled with liquid chromatography-diode array detector-mass spectrometry. *Food Anal. Methods* **2019**, *12*, 1674-1683.
2. Gökmen, V.; Senyuva, H.Z. Improved method for the determination of hydroxymethylfurfural in baby foods using liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2845-2849.
3. Teixidó, E.; Moyano, E.; Santos, F.J.; Galceran, M.T. Liquid chromatography multi-stage mass spectrometry for the analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods. *J. Chromatogr. A.* **2008**, *1185*, 102-108.
4. Catarino, M.D.; Silva, A.M.S.; Saraiva, S.C.; Sobral, A.B.J.F.N.; Cardoso, S.M. Characterization of phenolic constituents and evaluation of antioxidant properties of leaves and stems of *Eriocephalus africanus*. *Arab. J. Chem.* **2018**, *11*, 62-69.
5. Jaiswal, R.; Sovdat, T.; Vivan, F.; Kuhnert, N. Profiling and characterization by LC-MSn of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in maté (*Ilex paraguariensis*). *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 5471-5481.
6. Jaiswal, R.; Müller, H.; Müller, A.; Karar, M. G.; Kuhnert, N. Identification and characterization of chlorogenic acids, chlorogenic acid glycosides and flavonoids from *Lonicera henryi* L. (Caprifoliaceae) leaves by LC-MS^n. *Phytochemistry* **2014**, *108*, 252–263.
7. Clifford, M.N.; Johnston, K.L.; Knight, S.; Kuhnert, N. Hierarchical scheme for LC-MS^n identification of chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2900-2911.
8. Bystrom, L. M.; Lewis, B.A.; Brown, D.L.; Rodriguez, E.; Obendorf, R.L. Characterization of phenolics by LC-UV/vis, LC-MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. 'Montgomery' fruits. *Food Chem.* **2008**, *111*, 1017–1024.
9. Xu, S.; Xu, X.; Yuan, S.; Liu, H.; Liu, M.; Zhang, Y.; Zhang, H.; Gao, Y.; Lin, R.; Li, X. Identification and analysis of amygdalin, neoamygdalin and amygdalin amide in different processed bitter almonds by HPLC-ESI-MS/MS and HPLC-DAD. *Molecules* **2017**, *22*, 1425.
10. Castillo-Fraireac, C.M.; Poupard, P.; Guilois-Dubois, S.; Salas, E.; Guyota, S. Preparative fractionation of 5'-O-caffeoylquinic acid oxidation products using centrifugal partition chromatography and their investigation by mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2019**, *1592*, 19-30.
11. Ben Said, R.; Hamed, A.I.; Mahalel, U.A.; Al-Ayed, A.S.; Kowalczyk, M.; Moldoch, J.; Oleszek, W.; Stochmal, A. Tentative characterization of polyphenolic compounds in the male flowers of *Phoenix dactylifera* by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and DFT. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, E512.
12. Chen, G.; Li, X.; Saleri, F.; Guo, M. Analysis of flavonoids in *Rhamnus davurica* and its antiproliferative activities. *Molecules* **2016**, *21*, E1275.
13. Clifford, M.N.; Knight, S.; Kuhnert, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS^n. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3821–3832.
14. Magiera, A.; Czerwińska, M.E.; Owczarek, A.; Marchelak, A.; Granica, S.; Olszewska, M.A. Polyphenol-enriched extracts of *Prunus spinosa* fruits: Anti-inflammatory and antioxidant effects in human immune cells ex vivo in relation to phytochemical profile. *Molecules* **2022**, *27*, 1691.

➢ Publikacja III

Magiera A., Kołodziejczyk-Czepas J., Skrobacz K., Czerwińska M.E., Rutkowska M., Prokop A., Michel P., Olszewska M.A. (2022). Valorisation of the inhibitory potential of fresh and dried fruit extracts of *Prunus spinosa* L. towards carbohydrate hydrolysing enzymes, protein glycation, multiple oxidants and oxidative stress-induced changes in human plasma constituents. *Pharmaceuticals*, 15(10), 1300, doi: 10.3390/ph15101300, **IF_{2021} = 5.215, $MEiN_{2021}$ = 100**

pharmaceuticals MDPI

Article

Valorisation of the Inhibitory Potential of Fresh and Dried Fruit Extracts of *Prunus spinosa* L. towards Carbohydrate Hydrolysing Enzymes, Protein Glycation, Multiple Oxidants and Oxidative Stress-Induced Changes in Human Plasma Constituents

Anna Magiera [1,*], Joanna Kołodziejczyk-Czepas [2], Karolina Skrobacz [2], Monika Ewa Czerwińska [3,4], Magdalena Rutkowska [1], Aleksandra Prokop [5], Piotr Michel [1] and Monika Anna Olszewska [1]

1 Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, 1 Muszynskiego St., 90-151 Lodz, Poland
2 Department of General Biochemistry, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 141/143 Pomorska, 90-236 Lodz, Poland
3 Department of Biochemistry and Pharmacogenomics, Medical University of Warsaw, 1 Banacha St., 02-097 Warsaw, Poland
4 Centre for Preclinical Research, Medical University of Warsaw, 1B Banacha St., 02-097 Warsaw, Poland
5 Student Scientific Association, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, 1 Muszynskiego St., 90-151 Lodz, Poland
* Correspondence: anna.magiera@umed.lodz.pl; Tel.: +48-503316997

check for updates

Citation: Magiera, A.; Kołodziejczyk-Czepas, J.; Skrobacz, K.; Czerwińska, M.E.; Rutkowska, M.; Prokop, A.; Michel, P.; Olszewska, M.A. Valorisation of the Inhibitory Potential of Fresh and Dried Fruit Extracts of *Prunus spinosa* L. towards Carbohydrate Hydrolysing Enzymes, Protein Glycation, Multiple Oxidants and Oxidative Stress-Induced Changes in Human Plasma Constituents. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 1300. https://doi.org/10.3390/ph15101300

Academic Editor: Ana Angelica Feregrino-Perez

Received: 5 September 2022
Accepted: 17 October 2022
Published: 21 October 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/).

Abstract: *Prunus spinosa* fruits (sloes), both fresh and dried, are underexplored dietary components and ethno-phytotherapeutic remedies applied to treat chronic oxidative-stress-related diseases, including diabetes. The present study aimed to evaluate drying-related changes in the antidiabetic potential of sloe extracts and some bioactivity mechanisms, which might be connected with their traditional application. The polyphenol-enriched extracts, prepared by fractionated extraction and phytochemically standardised, i.a., by LC-MS/MS, were tested in vitro using a set of biological and chemical models. The experiments revealed the significant extracts' ability to counteract the generation of advanced glycation end products (AGEs) and inhibit the activity of key glycolytic enzymes, i.e., α-glucosidase and α-amylase. Moreover, they were proved to effectively scavenge multiple oxidants of physiological importance ($O_2^{\bullet -}$, $HO^{\bullet}$, H_2O_2, $NO^{\bullet}$, HOCl), increase the non-enzymatic antioxidant capacity of human plasma (NEAC) under oxidative stress conditions induced by peroxynitrite, and protect plasma proteins and lipids against peroxidation and nitration at in vivo-relevant levels (1–50 μg/mL, equivalent to 0.03–6.32 μg polyphenols/mL). In most cases, the activity of fresh fruit extracts surpassed that of dried-based products. The correlation studies and tests on model compounds proved polyphenols as dominant contributors to the observed effects. Furthermore, the co-occurring representatives of various polyphenolic classes were found to contribute to the biological activity of sloes through additive and synergistic effects. Considering the extraction yield and activity parameters, especially the superior outcomes compared to anti-diabetic drugs aminoguanidine and acarbose in the anti-glycation and α-glucosidase inhibition tests, the methanol–water (75:25, *v*/*v*) extract of fresh fruits and its phenolic-enriched fractions revealed the most advantageous potential for functional application.

Keywords: *Prunus spinosa* Linne; polyphenols; antidiabetic activity; antioxidant activity; human plasma; digestive enzymes; glycation

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a chronic ailment distinguished by high blood-glucose levels and various vascular pathologies associated with hyperglycaemia, such as cardiomyopathy,

peripheral arterial diseases, diabetic nephropathy or retinopathy [1]. Nowadays, the frequency of DM is increasing worldwide drastically because of the changing lifestyles and diets of industrial societies. The International Diabetes Federation expects that the diabetic population throughout the world will become almost 800 million by 2045, posing severe health and economic challenge [2].

Significant evidence from epidemiological studies has revealed that long-term consumption of plant-derived foods is inversely correlated with DM and its cardiovascular complications [3]. The beneficial health effects of plant products are primarily connected with their polyphenolic constituents, such as flavonoids, anthocyanins, phenolic acid derivatives, and proanthocyanidins. As therapeutic agents, polyphenols may act through various molecular mechanisms, including influence on the DM-related metabolic pathways, inhibition of protein glycation and generation of toxic end products of advanced glycation (AGEs), enhancement of the total antioxidant status, and modification of inflammatory response [3,4]. In addition, polyphenols can ameliorate hyperglycaemia by inhibiting the activity of critical enzymes digesting complex carbohydrates in the intestinal lumen, such as α-glucosidase and α-amylase [3,5]. Therefore, the development and biological effects of polyphenol-rich plant-based products that can prevent or treat DM and its complications has recently gained close attention [4].

Prunus spinosa L. (blackthorn, sloe), which belongs to the Rosaceae family, is a perennial deciduous plant growing native as a shrub in wild areas of northern Europe, Mediterranean countries, temperate regions of Asia and in northwest Africa. Moreover, as a naturalized species, the plant also occurs in the temperate zone of North America [6]. Blackthorn is a source of edible fruits—fresh plums are used to make syrups, juice, wine, liqueurs, and tinctures, while dried sloes are added to herbal teas [7]. The polyphenol-rich blackthorn fruits, both fresh and dried, are pleiotropic ethomedicines indicated to treat gastrointestinal and urinary inflammations, diarrhoea, and metabolic diseases, including diabetes and obesity [8,9]. Moreover, herbal formulations of fresh sloes are used as heart-strengthening and anti-hypertensive agents [10].

Although the ethnopharmacological sources suggested the potential of blackthorn fruits in the prophylaxis and therapy of DM and its cardiovascular pathologies [8–10], the relevant activity mechanisms and vectors are still insufficiently recognised. Most of the earlier works focused on the anti-inflammatory properties of the fruit preparations: the extracts were proved to downregulate the pro-inflammatory response of human immune cells, including neutrophils and peripheral blood mononuclear cells [11,12], and inhibit the expression of adhesion molecules in human endothelial cells [13], which might be essential for alleviating the DM-associated vascular inflammation. The potential direct antidiabetic properties of sloe fruits have been analysed to date only by Popović et al. [14]. They showed that alcoholic extracts of fresh sloes could inhibit α-glucosidase and α-amylase and investigated the impact of selected polyphenolic compounds on the observed activity. Unfortunately, the potential of dried fruits to inhibit glycolytic enzymes remained unexplored to date. On the other hand, plant extracts usually have a complex composition, and their biological capacities are driven by the joint activity of multiple constituents rather than by individual phytochemicals, with the benefit of additive and synergistic effects [15]. Our previous study revealed the vast complexity of the phenolic matrix of sloes; over 60 compounds representing various chemical classes were identified by LC-MS/MS, including flavonoids, anthocyanins, phenolic acids, tannin-type proanthocyanidins, and non-polyphenolic Maillard reaction products (MRPs), present only in the dried fruits [11,12]. Apart from the presence of MRPs, the extracts of fresh and dried *P. spinosa* fruits differed significantly in terms of the structure and concentration of numerous polyphenols [11,12]. Therefore, the contribution of various compounds/groups of compounds and differences in phenolic profiles of fresh and dried blackthorn fruits to their antidiabetic potential should be explained.

DM and DM-related vascular pathologies are linked to oxidative stress arising from the hyperglycaemia-induced excessive production of reactive oxygen and nitrogen species

(ROS/RNS), which can trigger a maladaptive response by affecting numerous signalling and metabolic pathways in diabetic complications [1]. First, the oxidative steps are involved in glycation (glycoxidation), i.e., the non-enzymatic reaction between reducing sugars and protein amino groups, which leads to the generation of AGEs. They are metabolic pro-oxidants that can directly impair the functions of various proteins and further boost ROS/RNS secretion. The overproduced ROS/RNS can induce inflammatory reactions and attack various biomolecules in blood plasma, vascular endothelium, and myocardium, increasing tissue degradation [16]. Thus, the potential antiglycation effects of blackthorn fruits, their influence on functional biomolecules under oxidative stress conditions, or multiple ROS/RNS generated in vivo might represent important activity mechanisms of sloes in treating diabetes. Unfortunately, there are no previous studies on the subject to date.

Therefore, the purpose of the present study was: (a) to compare for the first time the inhibitory ability of the phenolic-enriched extracts from fresh and dried *P. spinosa* fruits (thoroughly standardised by various phytochemical methods, including LC-MS/MS) towards glycolytic enzymes (α-glucosidase and α-amylase); (b) to investigate the scavenging capacity of the extracts towards various ROS/RNS of physiological significance ($O_2^{\bullet -}$, $HO^{\bullet}$, H_2O_2, $NO^{\bullet}$, HOCl); (c) to evaluate the anti-glycation properties of the extracts (the impact on the formation of AGEs); and (d) to verify the preventive features of the extracts against peroxidation and nitration of human plasma components, and their impact on the non-enzymatic antioxidant capacity of plasma under oxidative stress conditions. Moreover, correlation studies and comparative tests of native blackthorn polyphenols and MPRs were applied to specify compounds responsible for the effects observed in vitro. Finally, the extracts most favourable for their potential use as functional products were selected.

2. Results and Discussion

2.1. Inhibition of Digestive Enzymes Related to Diabetes Mellitus (DM)

The carbohydrate-metabolising enzymes α-glucosidase and α-amylase are among the leading pharmacological targets for managing DM [17]. The primary function of the two enzymes is to hydrolyse polysaccharides from food, specifically starch, to enable the absorption of free monosaccharides in the gastrointestinal tract. The breakdown of starch to maltose and other oligosaccharides is mainly catalysed in the duodenum by α-amylase synthesized by pancreatic acinar cells [18]. Subsequently, at the mucosal brush border of the small intestine cells, α-glucosidase hydrolyse the free oligosaccharides into single glucose units, which are then transported into the blood [19]. Therefore, inhibiting these enzymes slows down the digestion of complex sugars, reduces the absorption of the hydrolysis products, and consequently lowers the postprandial plasma sugar in DM patients.

Antioxidant-rich plant food has significant antidiabetic potential and is used to prevent and support the treatment of DM [20]. Fruits are among the best sources of bioavailable polyphenolic antioxidants in the human diet, with excellent potential for producing antidiabetic functional foods or even phytotherapeutics. The accumulated research revealed that the fruits of various *Prunus* species might be especially effective inhibitors of glycolytic enzymes related to DM [21–23]. Therefore, the present study aimed to compare the inhibitory ability of *P. spinosa* fresh and dried fruits towards both key carbohydrate-digesting enzymes α-glucosidase and α-amylase. The material for the study were the hydroalcoholic extracts of fresh (MEF) and dried (MED) sloes and their concentrated polyphenol-rich fractions obtained by fractionated extraction of the source extracts with diethyl ether (DEFs), ethyl acetate (EAFs), and *n*-butanol (BFs). Moreover, the post-extraction water residues (WRs) were also analysed to obtain a deeper insight into the activity vectors of the studied extracts. In our previous works, we showed that fractionation is a convenient way to establish active components of a studied plant because it enables selective isolation of various groups of phytochemicals and prevents the coincidental correlations that might be observed for extracts of similar composition [11,12,24].

The extracts/fractions for the present study were obtained previously, verified as non-cytotoxic for human blood cells in vitro, and thoroughly standardised using a panel of phytochemical techniques, including LC-MS/MS [11,12]. The standardisation allowed the identification and quantitation of 69 individual compounds as well as the calculation of total contents of flavonoids (TFL), phenolic acids (TPA), tannin-type proanthocyanidins (TTC), anthocyanins (TAC), and MRPs [11,12]. The representative chromatograms for fresh fruit extracts/fractions were provided in Figure 1. The overall phytochemical composition of the extracts/fractions was shown in Supplementary Table S1; as indicated, their total phenolic contents (TPC) fall in the range of 26.8–126.5 mg gallic acid equivalents (GAE)/g dw. The details on the structural identification and quantitative determination of polyphenolic individuals were reported in earlier works [11,12]. Among the identified compounds, cyanidin 3-*O*-glucoside, quercetin 3-*O*-glucoside (isoquercitrin), quercetin, chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid), and 5-hydroxymethylfurfural (HMF) were chosen as model representatives of various chemical classes to test the impact of individual phytochemicals on the analysed activity.

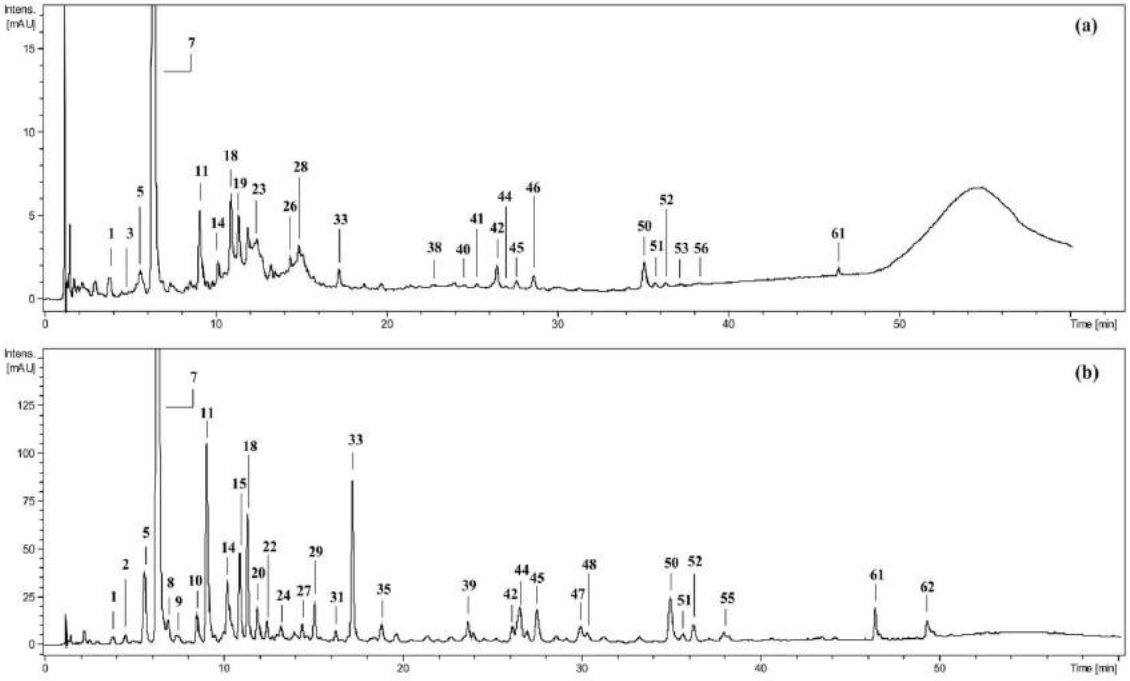


Figure 1. Example UHPLC chromatograms at 280 nm of (**a**) methanol–water (75:25, *v*/*v*) extract from fresh *P. spinosa* fruits, MEF; and (**b**) its ethyl acetate fraction, EAFF. Peak identification: 1—vanillic acid *O*-hexoside; 2—protocatechuic acid; 3—unidentified; 5—*cis*-3-*O*-caffeoylquinic acid; 7—neochlorogenic acid; 8—*p*-hydroxybenzoic acid; 9—neochlorogenic acid hexoside; 10—vanilloyl malate hexoside; 11—3-*O*-*p*-coumaroylquinic acid; 14—chlorogenic acid; 15—cis-3-*O*-feruloylquinic acid; 18—cryptochlorogenic acid; 19—cyanidin 3-*O*-glucoside; 20—caffeic acid 3/4-*O*-hexoside; 22—3-*O*-feruloylquinic acid; 23—cyanidin 3-*O*-rutinoside; 24—vanillin; 26—peonidin 3-*O*-glucoside; 27—*cis*-3-*O*-*p*-coumaroylquinic acid; 28—peonidin 3-*O*-rutinoside; 29—4-*O*-caffeoylshikimic acid; 31—4-*O*-feruloylquinic acid; 33, 35—caffeoylshikimic acid; 38—kaempferol dihexoside; 39—*p*-coumaroylshikimic acid; 40—quercetin hexoside-pentoside; 41—quercetin rhamnoside-hexoside;

42—hyperoside; 44—rutin; 45—isoquercitrin; 46—quercetin 3-*O*-(2″-*O*-β-D-glucopyranosyl)-α-L-arabinofuranoside; 47—reinutrin; 48—guaiaverin; 50—avicularin; 51—multinoside A; 52—quercitrin; 53—isorhamnetin rhamnoside-hexoside; 55—quercetin malyl-pentoside; 56—quercetin acetyl-hexoside; 61—quercetin acetyl-hexoside-rhamoside; 62—quercetin. Nomenclature of pseudodepsides according to IUPAC. For details of compounds' identification and quantification see Magiera et al. [11].

As presented in Table 1 and Supplementary Figure S1, most of the tested extracts/fractions acted as dose-dependent inhibitors of α-glucosidase and α-amylase but with different effectiveness towards a particular enzyme. The exceptions were WRF and WRD, which, up to a concentration of 1500 μg/mL, showed no activity against α-amylase. The estimated IC_{50} values indicated the extracts as more potent inhibitors of α-glucosidase than α-amylase, which follows the recent report of Popović et al. [14] on the ethanol–water extracts from fresh *P. spinosa* fruits from north Serbia. Moreover, the fresh fruit extracts were significantly more effective than those from dried sloes (Table 1 and Supplementary Figure S1).

Table 1. Inhibitory features of *P. spinosa* fruit extracts against glycolytic enzymes and protein glycation.

	α-Glucosidase IC_{50} (μg/mL)	α-Amylase IC_{50} (μg/mL)	AGEs Formation IC_{50} (μg/mL)
Analytes:			
MEF	**15.43 ± 0.84** ^{A}	68.32 ± 2.62 ^{C}	**42.94 ± 3.18** ^{B}
MED	136.31 ± 4.24 ^{D}	214.13 ± 12.20 ^{F}	96.83 ± 3.41 ^{D}
DEFF	**18.11 ± 0.42** ^{A}	**40.89 ± 2.04** ^{B}	73.61 ± 3.09 ^{C}
DEFD	**26.82 ± 2.75** ^{A}	86.45 ± 3.71 ^{C}	**51.51 ± 3.57** ^{B}
EAFF	52.39 ± 2.30 ^{B}	**33.47 ± 1.57** ^{B}	75.34 ± 4.42 ^{C}
EAFD	128.81 ± 6.29 ^{D}	136.17 ± 10.18 ^{E}	79.79 ± 5.39 ^{C}
BFF	90.95 ± 13.00 ^{C}	110.12 ± 15.46 ^{D}	**45.50 ± 3.03** ^{B}
BFD	181.64 ± 9.23 ^{F}	272.83 ± 4.18 ^{G}	95.53 ± 2.67 ^{D}
WRF	50.05 ± 2.10 ^{B}	***	82.93 ± 2.07 ^{C}
WRD	161.06 ± 3.52 ^{E}	***	97.97 ± 5.62 ^{D}
Quercetin	*	37.52 ± 2.32 ^{B}	-
Quercetin 3-*O*-glucoside (isoquercitrin)	209.64 ± 5.64 ^{G}	-	3.09 ± 0.17 ^{A}
Cyanidin 3-*O*-glucoside	635.13 ± 34.43 ^{H}	31.28 ± 1.66 ^{B}	10.90 ± 0.85 ^{A}
Chlorogenic acid	**	81.06 ± 3.94 ^{C}	7.07 ± 0.74 ^{A}
5-Hydroxymethylfurfural (HMF)	**	**	**
Reference standards:			
Acarbose	177.07 ± 9.10 ^{E,F}	4.90 ± 0.30 ^{A}	-
Aminoguanidine	-	-	78.89 ± 4.95 ^{C}

IC_{50}, Half inhibitory concentration (amount needed for 50% inhibition of a given process) expressed in μg/mg of the dry extract or standard/mL of the reaction mixture; * inactive up to a concentration of 50 μg/mL, above 50 μg/mL insoluble; ** inactive up to 1000 μg/mL; *** inactive up to 1500 μg/mL. For extracts codes, see Abbreviations. Data represent the mean values ± SD ($n = 3$). Values in each column labeled with different capital letters (A–H) are significantly different at $p < 0.05$.

The inhibitory activity of all analysed extracts/fractions towards α-glucosidase was superior compared to acarbose, a reference antidiabetic drug. The most active were hydroalcoholic fresh fruit extract (MEF) and DEFs from both fresh and dried sloes (Table 1 and Supplementary Figure S1). Their IC_{50} values amounted to 15.4–26.8 μg/mL and were up to 11.5 times lower than observed for acarbose (177.1 μg/mL), which means much stronger activity. However, the effect of all other extracts/fractions was also relevant and at least not worse than that of the drug ($p < 0.05$), regardless of whether they came from fresh or dried fruits. Although synthetic drugs, including acarbose, are widely recommended to treat DM and prediabetes, their medicinal application has numerous side effects, such as nausea, diarrhoea or flatulence [17]. Therefore, the proven effectiveness of sloe extracts suggests that both fresh and dried *P. spinosa* fruits are promising raw materials for producing antidiabetic functional foods with a preference for fresh ones.

It is worth noting that only a few fruit extracts have been demonstrated to inhibit α-glucosidase with similar effectiveness to the tested *P. spinosa* extracts/fractions. According to the latest literature, the comparable or more advantageous activity in relation to acarbose was achieved for alcoholic extracts from mulberry (*Morus alba* L.) [25], sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) [26], pomegranate (*Punica granatum* L.) [27], and dogwoods (*Cornus* sp.) [28], while in the genus *Prunus* they were obtained for peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) [21] and sweet cherry (*Prunus avium* L.) [23]. The reported IC_{50} values for these extracts amounted to 0.6–72.0 μg/mL, while the corresponding parameters of *P. spinosa* fruit extracts (the most active samples) tested in the present paper reached the values of 15.4–26.8 μg/mL. Therefore, it further supports the use of sloes and extracts thereof in the phytotherapy of DM, according to traditional recommendations [8,9].

As shown in Table 1 and Supplementary Figure S1, fresh fruit extract (MEF) demonstrated approximately nine times stronger inhibitory activity towards α-glucosidase than the dried fruit extract (MED): their IC_{50} values were 15.4 μg/mL and 136.3 μg/mL, respectively. At the same time, MEF was characterised by much higher total contents of polyphenols (TPC and TPH) and polyphenolic subgroups ($p < 0.05$), especially tannin-type proanthocyanidins (TTC); additionally, MEF was distinguished by the presence of anthocyanins (TAC), not detected in MED (for details on the drying-related changes in the *P. spinosa* phytochemistry see Magiera et al. [12]). This might suggest that proanthocyanidins and anthocyanins might be primarily responsible for α-glucosidase inhibition. This assumption was supported by the results obtained for the BFs and WRs fractions—those from fresh fruits accumulated significantly higher TAC and TTC levels than those from dried sloes ($p < 0.05$). However, the DEFs and EAFs clearly broke out of the pattern as they did not contain either tannins or anthocyanins; instead, they accumulated elevated levels of phenolic acids (TPA) and flavonoids (TFL). It strongly suggested that none of the phenolic groups or individual compounds alone but all polyphenols of the fruits contribute to the observed effects by synergistic or additive mechanisms. The relatively low effectiveness of pure model polyphenols, especially cyanidin 3-*O*-glucoside and chlorogenic acid (Table 1 and Supplementary Figure S1), and the statistically significant correlation between the TPC levels and activity parameters for α-glucosidase inhibition ($r = -0.7273$, $p < 0.05$; Figure 2a, Supplementary Table S2), confirmed this hypothesis. Our results thus partially contrast those of Popović et al. [14], who observed only a relevant correlation of the α-glucosidase inhibitory activity with the levels of quercetin 3-*O*-glucoside (isoquercitrin) in the sloe extract without, however, testing the actual potential of the pure compound. As shown in Table 1 and Supplementary Figure S1, the reactivity of isoquercitrin cannot solely explain the activity of *P. spinosa* extracts. On the other hand, the relatively high IC_{50} values of polyphenolic standards might suggest that some non-phenolic compounds may also influence the inhibitory capacity of the extracts. Previously, Cui et al. [22] reported on the potent inhibitory capacity of a polysaccharide fraction from the apricot pulp (*Prunus armeniaca* L.) towards α-glucosidase. Therefore, further research on blackthorn fruits should address the possible influence of non-phenolic phytochemicals on their anti-glycolytic activity.

The synergic contribution of polyphenols was also proved for the α-amylase inhibition through a close correlation with the TPC values ($r = -0.8328$, $p < 0.01$; Figure 2b, Supplementary Table S2). This time, polyphenols appeared to be the essential vectors of the observed effects as the model polyphenolic compounds revealed the relevant activity with the most decisive impact of flavonoids and anthocyanins (quercetin, cyanidin 3-*O*-glucoside). It confirmed the report of Popović et al. [14] on a similarly strong relationship between $1/IC_{50}$ values for α-amylase inhibition and TPC levels ($r = -0.8085$, $p < 0.01$), as well as some individual quercetin glycosides and anthocyanins in the fresh *P. spinosa* fruit extracts. Likewise, the activity parameters of sloe extracts were worse than that found for acarbose in the present (Table 1 and Supplementary Figure S1) and earlier study [14]. We observed that the most potent extracts/fraction from fresh fruits (MEF, DEFF, EAFF) inhibited the enzyme 7–14 times weaker than the reference drug, while the capacity of dried fruit extracts/fraction was even lower. Therefore, only the fresh fruits might be

considered potential α-amylase inhibitors, and the concentrated fruit fractions seem to be the most valuable for the production of functional food. The enrichment in polyphenols is more recently becoming an increasingly popular procedure when preparing functional products [29].

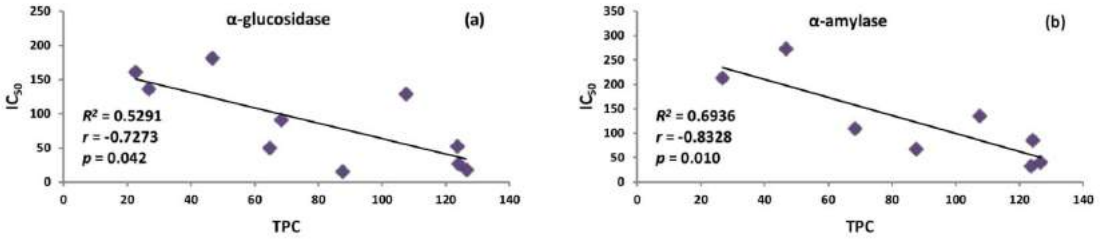


Figure 2. Correlation graphs between the total polyphenolic content (TPC) and: (**a**) α-glucosidase inhibition, (**b**) α-amylase inhibition of the extracts. Graphs plotted with the mean value of IC_{50} (μg/mL) vs. the mean value of TPC (mg GAE/g dw); R_2, coefficient of determination; *r*, correlation coefficients; *p*, probability values.

The results obtained in the inhibition tests towards glycolytic enzymes may also provide a preliminary explanation of the antidiabetic activity mechanisms of sloe fruits. Our results show the selectivity of the extracts in terms of activity mechanisms—they are more potent inhibitors of α-glucosidase than α-amylase. It should be noted that such selectivity is beneficial for a functional product candidate and is preferred by modern medicine and pharmacy. Furthermore, such selectivity is often observed for polyphenol-rich plant extracts and is probably related to the differences in specific steric affinity of polyphenols to both these enzymes. For instance, such variations in the inhibitory potential for a given enzyme might be related to the number of hydroxyl groups and the formation of hydrogen bonds between the hydroxyl groups of polyphenolic compounds and the catalytic residues of the enzyme binding sites [23].

2.2. Scavenging of Multiple ROS

ROS/RNS are generated as by-products of the normal oxygen metabolism and have an essential regulatory role for anti-microbial defense and various cellular functions. However, the hyperglycemic conditions in DM can lead to the overproduction of ROS/RNS and the development of systemic oxidative stress. Among different ROS, the superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) is critical in vivo because it is the primary species generated by immune cells upon different pro-oxidant and pro-inflammatory stimuli. When produced, $O_2^{\bullet-}$ is transformed into other toxic ROS/RNS, including hydroxyl radical ($HO^{\bullet}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), nitrogen oxide ($NO^{\bullet}$), hypochlorous acid (HOCl), and peroxynitrite ($ONOO^-$) [30]. The increased ROS/RNS production modifies numerous DM-related pathways implicated in the pathogenesis of diabetic complications, such as the polyol and hexosamine pathways, nuclear factor kappa B (NF-κB) signalling pathway, as well as the generation of AGEs and protein kinase C activation [16,31]. Therefore, the supportive role of dietary polyphenols in the treatment of DM is often explained by their antioxidant effects and powerful ability to neutralise a ROS/RNS family in the mitochondrial electron transport chain. The polyphenolic antioxidants disturb the oxidative sequence in different ways; they may intercept singlet oxygen, prevent the first-chain initiation by scavenging $O_2^{\bullet-}$, decompose primary oxidation products to non-radical species, bind metal ion catalysts, and interact with various essential signalling proteins [32].

This study explored the scavenging ability of blackthorn fruits towards in vivo-relevant ROS/RNS for the first time. Previously, only their impact on synthetic free-radicals, such as DPPH or $ABTS^{\bullet+}$, was mainly investigated [33,34]. As indicated in Table 2 and Supplementary Figure S2, all of the analysed extracts/fractions of *P. spinosa* fruits showed a

significant and concentration-dependent capacity to scavenge five of the most common ROS/RNS generated in vivo: $O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$, H_2O_2, $NO^{\bullet}$, and HOCl. The especially low SC_{50} values, compared to the positive controls of ascorbic acid and Trolox, were found in the $NO^{\bullet}$, HOCl, and $O_2^{\bullet-}$-scavenging tests. In all tests, MEF revealed more potent effects than MED, indicating stronger antioxidant activity of fresh fruits in relation to dried sloes. Nevertheless, the SC_{50} values expressed in μg GAE/mL for all fractions (re-calculated from the original data with the TPC levels; Supplementary Table S3) showed that blackthorn polyphenols of both fresh and dried fruits are effective even at very low concentrations. For example, in the $O_2^{\bullet-}$-scavenging test, the re-calculated values were 2.7–7.0 μg GAE/mL, while the respective parameters for model polyphenols and positive controls amounted 5.3–135.3 μg/mL. Among all extracts/fractions, the most potent effects were found for DEFs and EAFs. It corresponded to our previous reports on the powerful antioxidant effects of these fractions in human neutrophils ex vivo: at physiological concentrations (2.5–5 μg/mL; 0.3–0.6 μg GAE/mL), they significantly limited the ROS secretion in the *f*-MLP-stimulated cells by approximately 36–69% [11,12]. The present results might thus suggest that the cellular antioxidant effects of sloes are partly due to their direct ROS-neutralising potential. Likewise, Fraternale et al. [35] observed that sloe juice increases the viability of H_2O_2-stressed premonocytes, probably due to H_2O_2-scavenging. On the other hand, Sabatini et al. [13] have documented that the target activity is also connected with the blockage of the NF-κB signalling.

Table 2. Scavenging activity (SC_{50}) of *P. spinosa* fruit extracts towards multiple oxidants.

	$NO^{\bullet}$ (μg/mL)	HOCl (μg/mL)	$O_2^{\bullet-}$ (μg/mL)	H_2O_2 (mg/mL)	$HO^{\bullet}$ (mg/mL)
Analytes:					
MEF	18.28 ± 0.42 ^{H}	40.04 ± 0.51 ^{F}	73.89 ± 3.58 ^{D}	0.17 ± 0.004 ^{E}	0.44 ± 0.02 ^{E,F}
MED	43.05 ± 3.08 ^{I}	100.90 ± 0.69 ^{G}	101.81 ± 3.05 ^{E}	0.57 ± 0.007 ^{J}	0.81 ± 0.02 ^{H}
DEFF	5.61 ± 0.13 ^{F}	**17.34 ± 0.50** ^{B,C}	**29.40 ± 0.88** ^{B}	**0.13 ± 0.002** ^{C}	**0.33 ± 0.01** ^{D}
DEFD	3.85 ± 0.22 ^{D}	**18.35 ± 0.52** ^{B,C}	**32.70 ± 2.74** ^{B}	0.15 ± 0.002 ^{D}	**0.32 ± 0.01** ^{D}
EAFF	**2.15 ± 0.16** ^{C}	31.48 ± 0.64 ^{D}	45.08 ± 2.96 ^{C}	**0.14 ± 0.001** ^{C}	**0.38 ± 0.01** ^{D,E}
EAFD	4.79 ± 0.39 ^{E}	34.44 ± 0.46 ^{D,E}	52.76 ± 2.82 ^{C}	0.21 ± 0.005 ^{F}	**0.33 ± 0.01** ^{D}
BFF	6.35 ± 0.41 ^{G}	39.78 ± 0.85 ^{F}	73.52 ± 2.68 ^{D}	0.22 ± 0.002 ^{G}	0.47 ± 0.01 ^{F,G}
BFD	43.70 ± 2.49 ^{I}	96.48 ± 5.41 ^{G}	106.88 ± 4.39 ^{E}	0.44 ± 0.008 ^{I}	0.96 ± 0.06 ^{I}
WRF	51.76 ± 3.89 ^{J}	38.02 ± 0.88 ^{E,F}	103.47 ± 4.06 ^{E}	0.27 ± 0.002 ^{H}	0.52 ± 0.03 ^{G}
WRD	40.21 ± 1.99 ^{I}	153.46 ± 0.83 ^{H}	311.63 ± 7.08 ^{G}	0.72 ± 0.003 ^{K}	1.17 ± 0.06 ^{J}
Quercetin	0.48 ± 0.03 ^{A}	2.08 ± 0.14 ^{A}	7.89 ± 0.24 ^{A}	0.008 ± 0.001 ^{A}	0.05 ± 0.002 ^{A}
Cyanidin 3-*O*-glucoside	1.40 ± 0.09 ^{B}	5.62 ± 0.11 ^{A}	10.11 ± 0.33 ^{A}	0.012 ± 0.001 ^{A,B}	0.17 ± 0.002 ^{C}
Chlorogenic acid	0.69 ± 0.02 ^{A}	13.82 ± 0.53 ^{B}	4.58 ± 0.29 ^{A}	0.018 ± 0.001 ^{A,B}	0.07 ± 0.001 ^{A,B}
5-Hydroxymethylfurfural (HMF)	**	**	**	***	***
Reference standards:					
Ascorbic acid	0.59 ± 0.04 ^{A}	6.32 ± 0.07 ^{A}	5.28 ± 0.25 ^{A}	0.014 ± 0.001 ^{A,B}	0.14 ± 0.005 ^{B,C}
Trolox	0.59 ± 0.02 ^{A}	21.49 ± 1.21 ^{C}	135.33 ± 5.59 ^{F}	0.020 ± 0.001 ^{B}	0.13 ± 0.003 ^{B,C}

SC_{50}, Half scavenging concentration (amount required to reduce the initial oxidant concentration by 50%) calculated in μg/mg of the dry extract or standard/mL of the reaction mixture; ** inactive up to a concentration of 500 μg/mL; *** inactive up to 1500 μg/mL. For extracts codes, see Abbreviations. Data are given as mean of three replicates ± SD. Values in each column labeled with different capital letters (A–K) are significantly different at $p < 0.05$.

The correlation studies (Supplementary Table S2) and tests on model compounds (Table 2) proved that polyphenols significantly contribute to the observed scavenging effects. For all scavenging assays, the essential impact ($p < 0.05$) of total phenolic contents (TPC, $r > -0.88$; TPH, $r > -0.71$) was evidenced, and $O_2^{\bullet-}$-scavenging also significantly depended ($p < 0.05$) on the total flavonoid content (TFL, $r > -0.79$). Similarly, as in the digestive enzyme inhibition tests, it suggested a strong synergy between individual blackthorn polyphenols. Many scientific reports point to the antioxidant synergy of polyphenols.

For example, the synergism of chlorogenic acid with quercetin, rutin, isoquercitrin, and a quercetin pentoside-hexoside has previously been documented [15,36,37].

2.3. Inhibition of the AGEs Generation

The overproduction of ROS in hyperglycemic conditions also accelerates the protein glycation and formation of AGEs. By binding with each other and with proteins, AGEs form a network of cross-links and disturb the functions of most cells and tissues in the human body [38]. For example, the glycation of collagen in the vascular wall makes its fibres stiff and inelastic, which results in the loss of elasticity of blood vessels, a typical complication of DM. The breakdown of endothelial cells from the extracellular matrix is also attributed to protein glycation. This may favour the development of atherosclerotic plaque and diabetic microangiopathies. In addition, the glycation of lipoproteins of cell membranes increases their permeability, facilitates lipid peroxidation, and causes oxidative damage to intracellular structures. Furthermore, the binding of AGEs to the AGEs-specific receptor (RAGE) activates immune cells, such as monocytes/macrophages, granulocytes, and T lymphocytes, leading to the development of chronic inflammation [38]. Recently, it has been suggested that AGEs may also damage pancreatic β-cells and contribute to insulin resistance [39]. Dietary polyphenols are among the most promising natural anti-glycation agents [40,41]. According to the available data, the anti-glycation activity of polyphenols is connected with various direct and indirect mechanisms, such as ROS-scavenging, trapping reactive dicarbonyl compounds, deactivating carbonyl groups of reducing monosaccharides, binding with proteins, cleaving the AGEs structures, and downregulating the RAGE expression [41,42].

In this study, the polyphenol-rich *P. spinosa* fruits were, for the first time, demonstrated to counteract non-enzymatic protein glycation (Table 1 and Supplementary Figure S1). All of the tested extracts/fractions prevented the formation of AGEs with effectiveness comparable to or higher than the reference aminoguanidine. Although it is a prototype anti-AGEs agent approved for treating some diabetic complications, it has severe side effects; thus, other glycation inhibitors are in demand [40]. In this context, the most promising blackthorn extracts are MEF, BFF, and DEFD, revealing significantly stronger anti-glycation effects than aminoguanidine ($p < 0.05$). As shown in Table S1, MEF and BFF were rich in anthocyanins and proanthocyanidins. However, the correlation tests (Supplementary Table S2) displayed only a moderate relationship between the anti-AGEs capacity of the extracts and the levels of these groups of polyphenols ($r = -0.6820$ for TAC and $r = -0.5288$ for TTC; $p > 0.05$). Moreover, the experiments on model compounds (Table 1 and Supplementary Figure S1) suggested the relevant impact of flavonoids and phenolic acids, which might be essential for the elevated effects of DEFD. Therefore, again, the additive or synergistic effects of various polyphenols might better explain the activity of *P. spinosa* extracts. Previously, similar conclusions were drawn for anthocyanin-rich and anthocyanin-free extracts of blackberries, raspberries, blueberries, cranberries, and strawberries [43]. Moreover, our results also show that the sloe fruit extracts are more effective inhibitors of AGEs formation than those of many other fruits, commonly consumed or used in phytotherapy. The IC_{50} values of the basic hydroalcoholic extracts of sloes are in the range of 42.9–96.8 μg/mL, while the methanol extracts of blackberries, black/red raspberries, and strawberries inhibited protein glycation by only 40% at 100 μg/mL. Lower antiglycation effectiveness was also observed for extracts of various *Cotoneaster* fruits (IC_{50} = 106.4–166.6 μg/mL) [44]. On the other hand, effects comparable to blackthorn extracts were obtained for the extracts of blueberries and cranberries [43].

2.4. Antioxidant Protection of Human Plasma Components against Oxidative Stress

Oxidative stress is a key factor in the pathogenesis of diabetes complications, especially within the cardiovascular system [31]. Apart from influencing numerous metabolic pathways and cell signalling and promoting the formation of AGEs, the overproduced ROS/RNS have a direct destructive effect on various biomolecules. One of the most toxic

ROS/RNS generated under hyperglycemic conditions is peroxynitrite ($ONOO^-$), produced in vivo by the reaction between $O_2^{\bullet -}$ and $NO^\bullet$ radicals [45,46]. Once generated, $ONOO^-$ induces structural modifications of functional proteins and lipids in the vascular endothelium and blood plasma, including nitration and dimerisation of tyrosine units, oxidation of active thiol groups in sulphur-containing amino acids, especially cysteine, and lipid peroxidation, which eventually leads to chronic cardiovascular dysfunction [47].

Therefore, to check the potential preventive effects of *P. spinosa* fruit extracts against oxidative and nitrative injury of biomolecules, an experimental model of human blood plasma exposed to oxidative stress induced by $ONOO^-$ (100–150 μM; achievable locally in vivo, e.g., in inflamed blood vessels) was applied [46]. The process was monitored by measuring the oxidative stress biomarkers, including the products of protein nitration (3-nitrotyrosine, 3-NT), lipid peroxidation (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS), as well as the total antioxidant capacity of plasma (NEAC). The extracts and fractions from fresh sloes were selected for the study due to their high ability to inhibit glycolytic enzymes, potent anti-glycation activity, and significant ROS/RNS-scavenging properties. In addition, the basic hydroalcoholic extract of dried fruits (MED) was tested for the overall comparison. The extracts/fractions were assayed at 1–50 μg/mL concentrations, equal to 0.03–6.32 μg GAE/mL, depending on the TPC value. As discussed earlier with the accumulated bioavailability data, dietary polyphenols may reach such levels in plasma after oral supplementation [24,47].

As shown in Figure 3, the $ONOO^-$-stimulated plasma exhibited considerably enhanced ($p < 0.001$) amounts of 3-NT and TBARS (an approximately 17-fold and 2-fold increase was observed, respectively) compared to the untreated samples. Moreover, a pronounced decrease in the NEAC value was revealed. In plasma samples co-incubated with $ONOO^-$ and the extracts/fractions, the nitration and oxidation of both proteins and lipids were significantly limited (Figure 3a,b), regardless of the type and concentration of the tested extracts. Even at low levels of 1–5 μg/mL (0.02–0.63 μg GAE/mL), the fresh fruit extracts/fractions lowered tyrosine nitration by about 23–43% (DEFF and MEF were the most potent) (Figure 3b). At 50 μg/mL (3.23–6.32 μg GAE/mL), the 3-NT level was reduced by up to 51% for EAFF. The dried fruit extract MED was slightly less active; it reduced the nitration effect by about 22% at 1–5 μg/mL (0.01–0.13 μg GAE/mL) and 44% at 50 μg/mL (1.34 μg GAE/mL).

All tested fresh fruit extracts (except WRF at 1 μg/mL) also protected plasma against $ONOO^-$-induced lipid peroxidation (Figure 3b), regardless of the concentration level. The most pronounced effect was observed at 5–50 μg/mL; in those conditions, the TBARS level for the samples incubated with EAFF, DEFF, and MEF was not significantly different ($p > 0.001$) or only 1.2-fold higher than that of untreated, control plasma. At 5–50 μg/mL, all analysed extracts/fractions also restored the NEAC plasma values to the physiological control levels (Figure 3c). Moreover, the highest enhancement of the NEAC values (to about 130–140% vs. the $ONOO^-$-stimulated plasma) was found at 50 μg/mL of DEFF, EAFF and MED.

Generally, the fresh fruit extracts/fractions, featured by the highest phenolic contents (DEFF, EAFF, MEF), especially those enriched with flavonoids and phenolic acids (DEFF, EAFF), were the most valuable plasma protecting agents. The significant impact of polyphenols on the revealed effects was verified by the strong correlation ($r = -0.83$, $p < 0.001$) between the TPC and TBARS levels. For other tests, where the concentration-dependency was visible for selected extracts/fractions, the correlations were insignificant ($p > 0.001$), and the contribution of polyphenols was confirmed by the studies of model compounds. It was revealed that the preventive effects of quercetin, cyanidin 3-*O*-glucoside, and chlorogenic acid at 5 μg/mL did not differ substantially ($p > 0.001$) from that of positive standards ascorbic acid and Trolox (Figure 3), tested at the same concentration. Moreover, the standard polyphenols did not differ ($p > 0.001$) in antioxidant effectiveness from each other, except that cyanidin 3-*O*-glucoside was especially active in the TBARS test. All these observations suggest the synergistic/additive effects of various groups of polyphenols in the examined

extracts. Similar effects were previously observed for some other fruits recommended by ethnomedicine for the adjunctive treatment of diabetes, such as rowanberries [24], and for blackthorn flowers [48]. On the other hand, the more potent capacity of the flower extracts observed previously and related to the higher phenolic contents in flowers [48] compared to the currently analysed fruits confirmed the significant contribution of polyphenols to the protective activity of blackthorn extracts in plasma.

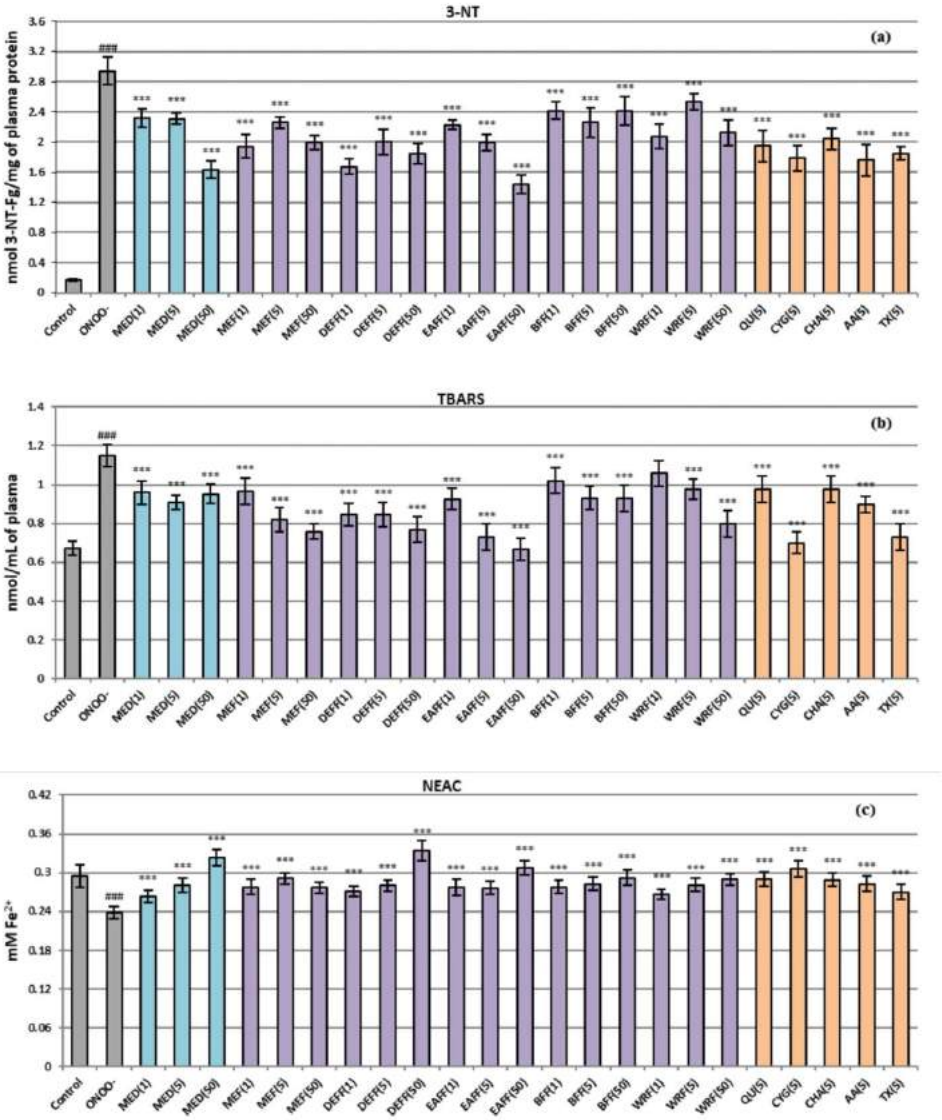


Figure 3. Protective effects of *P. spinosa* fruits extracts on human plasma under oxidative stress conditions: (**a**) influence on the nitration of tyrosine residues in plasma proteins and formation of 3-NT; (**b**) impact on the lipid peroxidation and TBARS generation; (**c**) effects on the NEAC value of

plasma (assessed by FRAP). Data expressed as mean values ± SE (n = 7–9). Statistical significance: ### $p < 0.001$ for control plasma versus $ONOO^-$-treated plasma in the absence of the investigated analytes; *** $p < 0.001$ for $ONOO^-$-treated plasma in the presence of the extracts (1–50 μg/mL) or model compounds/positive controls (5 μg/mL) versus $ONOO^-$-treated plasma without the analytes. QU, quercetin; CYG, cyanidin 3-*O*-glucoside; CHA, chlorogenic acid; AA, ascorbic acid; TX, Trolox®.

All tested fresh fruit extracts (except WRF at 1 μg/mL) also protected plasma against $ONOO^-$-induced lipid peroxidation (Figure 3b), regardless of the concentration level. The most pronounced effect was observed at 5–50 μg/mL; in those conditions, the TBARS level for the samples incubated with EAFF, DEFF, and MEF was not significantly different ($p > 0.001$) or only 1.2-fold higher than that of untreated, control plasma. At 5–50 μg/mL, all analysed extracts/fractions also restored the NEAC plasma values to the physiological control levels (Figure 3c). Moreover, the highest enhancement of the NEAC values (to about 130–140% vs. the $ONOO^-$-stimulated plasma) was found at 50 μg/mL of DEFF, EAFF and MED.

Generally, the fresh fruit extracts/fractions, featured by the highest phenolic contents (DEFF, EAFF, MEF), especially those enriched with flavonoids and phenolic acids (DEFF, EAFF), were the most valuable plasma protecting agents. The significant impact of polyphenols on the revealed effects was verified by the strong correlation ($r = -0.83$, $p < 0.001$) between the TPC and TBARS levels. For other tests, where the concentration-dependency was visible for selected extracts/fractions, the correlations were insignificant ($p > 0.001$), and the contribution of polyphenols was confirmed by the studies of model compounds. It was revealed that the preventive effects of quercetin, cyanidin 3-*O*-glucoside, and chlorogenic acid at 5 μg/mL did not differ substantially ($p > 0.001$) from that of positive standards ascorbic acid and Trolox (Figure 3), tested at the same concentration. Moreover, the standard polyphenols did not differ ($p > 0.001$) in antioxidant effectiveness from each other, except that cyanidin 3-*O*-glucoside was especially active in the TBARS test. All these observations suggest the synergistic/additive effects of various groups of polyphenols in the examined extracts. Similar effects were previously observed for some other fruits recommended by ethnomedicine for the adjunctive treatment of diabetes, such as rowanberries [24], and for blackthorn flowers [48]. On the other hand, the more potent capacity of the flower extracts observed previously and related to the higher phenolic contents in flowers [48] compared to the currently analysed fruits confirmed the significant contribution of polyphenols to the protective activity of blackthorn extracts in plasma.

According to the available research, the elevated levels of the investigated oxidative stress biomarkers and reduced plasma antioxidant capacity are valuable factors for predicting cardiovascular events [49]. Therefore, as the impact of exogenous non-enzymatic antioxidants on the plasma redox status in vitro corresponds with their in vivo effects [50], the reported activity of *P. spinosa* fruit extracts at low concentration levels might be an argument for their use as a functional food adjuvant in DM. However, further studies are required to verify their value in vivo experimentally.

2.5. Biological Potential of Maillard Reaction Products (MRPs) in Dried Fruits

Our previous study pointed to the presence of several MRPs in dried *P. spinosa* fruits [12]. These are drying-related constituents formed at elevated temperatures in a multistep reaction of amino acids and reducing carbohydrates [51]. The primary MPR in sloes is 5-hydroxymethylfurfural (HMF), present at the levels of 0.26–37.8 mg/g dw in the extracts/fractions of dried fruits (Table S1). HMF is also one of the most commonly occurring MPRs in food [51,52]. According to the available literature, HMF may have various biological effects, either beneficial or harmful. The molecular structure of HMF and the presence of some reactive functional groups, such as an aldehyde group, heterocyclic furan ring, and conjugated double bonds, have been suggested as the basis for the expected antioxidant activity of HMF [51,52]. However, in our previous research on the ROS-release in human neutrophils, the compound revealed relatively low activity; it downregulated the ROS level by only 15% at 50 μM, compared to a 96% reduction observed for quercetin at

the same concentration [12]. The present study proved that HMF up to 500–1500 μg/mL (equivalent to 4–40 μM) has no direct ROS-scavenging capacity (Table 2 and Supplementary Figure S2). Moreover, it is inactive in the inhibition tests towards glycolytic enzymes (Table 1 and Supplementary Figure S1) and unable to inhibit the generation of AGEs (Table 1 and Supplementary Figure S1).

3. Materials and Methods

3.1. Study Material, Extraction and Phytochemical Standardisation

The research material was the extracts and fractions of fresh and dried *P. spinosa* L. fruits obtained by fractionated extraction as described previously [11,12]. The ripe fruits for the study were harvested in October 2018 from the natural habitats in Krasnobród (Poland) and divided into two stock samples: one immediately frozen to preserve fresh fruits and second dried as described earlier [11,12]. Eventually, five various extracts/fractions were prepared from each material. Briefly, methanol–water (75:25, *v*/*v*) extract (MEF) and its fractions of diethyl ether (DEFF), ethyl acetate (EAFF), *n*-butanol (BFF), and water residue (WRF) were produced from fresh fruits. Likewise, dried fruits yielded the source extract MED and its DEFD, EAFD, BFD, and WRD fractions. Details on the plant material origin, its authentication, storage conditions, voucher specimen number, the preparation of extracts/fractions, and the evaluation of their cellular safety in vitro, as well as on their comprehensive phytochemical standardisation using a set of chromatographic and spectrophotometric methods, including LC-MS/MS, were reported in the previous papers [11,12].

3.2. α-Glucosidase and α-Amylase Inhibition Assays

The inhibition of α-glucosidase was evaluated according to the spectrophotometric method reported by Ma et al. [53] with slight modifications. The enzyme activity measurement was based on the *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside (*p*-NPG) hydrolysis. In brief, 150 μL of a phosphate buffer (0.1 M, pH 6.9) solution of an extract or standard was mixed with the enzyme (0.43 U/mL, 50 μL) and pre-incubated for 15 min at 37 °C. Next, a 0.7 mM *p*-NPG solution in the buffer (50 μL) was added, and after 15 min of incubation, the reaction was stopped by adding Na_2CO_3 (0.2 M, 50 μL). Finally, the absorbance was read at 405 nm in a microplate reader. The positive control was acarbose. The values obtained for the blind samples without the analytes or acarbose meant 100% enzyme activity. The inhibitory potential of the analytes towards α-glucosidase was expressed as a half inhibitory concentration (IC_{50}), calculated from concentration-inhibition curves.

The inhibitory activity of the analytes towards α-amylase was determined fluorometrically according to Truba et al. [28] using an EnzChek™ Ultra Amylase Assay Kit. The test was based on measuring products formed after the enzymatically catalysed hydrolysis of the corn starch substrate DQTM (labeled with the fluorescent dye BODIPY® FL). The fluorescence of the hydrolysate was read at 37 °C in a microplate reader at 485 nm and 535 nm for excitation and emission, respectively. The positive control was acarbose. The values obtained for the blind samples without the analytes or acarbose meant 100% enzyme activity. The inhibitory potential of the analytes towards α-amylase was expressed as a half inhibitory concentration (IC_{50}), calculated from concentration-inhibition curves.

3.3. Multiple Oxidants Scavenging Activity

The scavenging efficiency of *P. spinosa* fruit extracts/fractions towards various ROS ($O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$, H_2O_2, HOCl, and $NO^{\bullet}$) was tested using appropriate fluorimetric and spectrophotometric methods as described previously [54]. Ascorbic acid and Trolox® served as positive controls. The results were expressed as half scavenging concentration (SC_{50}) values, estimated using concentration-scavenging curves.

3.4. Inhibition of the Formation of Advanced Glycation Endproducts (AGEs)

The impact of the extracts/fractions on protein glycation was evaluated in the fructose-bovine serum albumin (BSA) test system with aminoguanidine as a positive control according to the fluorimetric method of Starowicz and Zieliński [42], modified by Rutkowska et al. [24]. The fluorescence was measured at 37 °C in a microplate reader at 355 nm and 420 nm for excitation and emission, respectively. The results were reported as half inhibitory concentration (IC_{50}) values, estimated using concentration-inhibition curves.

3.5. Protective Effects on Human Plasma Exposed to Oxidative Stress

Blood plasma was isolated by differential centrifugation [48,55] of buffy coats (from healthy volunteers) obtained from the Regional Centre of Blood Donation and Blood Treatment in Lodz (Poland). The Committee on the Ethics of Research at the University of Lodz approved all experiments (decision number: 8/KBBN-UŁ/II/2015). For the study, plasma samples were pre-incubated for 15 min at 37 °C with the extracts/fractions (1–50 μg/mL) or model polyphenols/positive controls (Trolox®, ascorbic acid) and then treated by 100–150 μM $ONOO^-$. Two kinds of control plasma were also prepared; the first was exposed to $ONOO^-$ in the absence of the analytes, and the second was the blind control containing neither analytes nor $ONOO^-$. Several experiments conducted with blood plasma and the analytes only (without $ONOO^-$) confirmed the lack of their direct interactions with plasma components. The influence on the levels of oxidative stress biomarkers in plasma was evaluated using the appropriate immunoenzymatic and spectrophotometric methods [48,55]. In brief, a competitive ELISA test was applied to immunodetect 3-NT in proteins. The results were calculated using the standard curve of nitro-fibrinogen (3-NT-Fg) and expressed as 3-NT-Fg equivalents (nmol/mg of plasma proteins). The TBARS levels of plasma lipids were determined spectrophotometrically and calculated in nmol/mL of plasma. The impact on the NEAC value was measured using the FRAP assay, with the results calculated from the standard curve of ferrous sulphate and expressed in mM of Fe^{2+} equivalents [48,55].

3.6. Statistical Analysis

Statistical tests were done using the Satistica13Pl software for Windows (StatSoft Inc., Krakow, Poland). All results were presented as means ± SD (standard deviation) or ±SE (standard error) for the indicated number of independent replicates. Statistical comparisons were made using the parametric method of one-way ANOVA (for chemical tests) or one-way ANOVA for repeated measures (for human plasma model), followed by the post hoc Tukey's test or Dunnett's test. Pearson correlations were used to evaluate the relationships between the various parameters. Differences between the mean values and correlation coefficients were considered significant at p-values less than 0.05.

4. Conclusions

The present paper is the first investigation of the potential of polyphenol-rich extracts from fresh and dried *P. spinosa* fruits in the context of diabetes and its complications. Both fresh and dried fruit extracts revealed high antioxidant capacity, manifested in the potent direct scavenging of multiple oxidants generated in vivo, effective prevention against the generation of AGEs, enhancement of the non-enzymatic capacity of plasma under oxidative stress conditions, and noticeable protection against the nitrative and oxidative structural changes in plasma proteins and lipids. Moreover, the extracts were confirmed as powerful inhibitors of glycolytic enzymes, especially α-glucosidase. Polyphenolic compounds seem to contribute mainly to the observed effects through additive and synergic action. In most tests, the fresh fruit extracts exhibited more potent effects than those obtained from dried sloes. It confirmed that the changes in fruit polyphenols during drying have substantial deteriorative consequences on the biological capacity of the final products. The obtained results might partly explain the therapeutic application of fresh and dried *P. spinosa* fruits in diabetes, recommended by traditional medicine, but suggest that the fresh fruit should

be favoured. Considering its high extraction yield and promising activity parameters compared to antidiabetic drugs and reference antioxidants, the hydroalcoholic extract of fresh sloes (MEF) appears to be most advantageous for biological application. However, additional research is demanded to confirm its effects in vivo and obtain a deeper insight into other possible mechanisms related to the treatment of diabetes and its complications. Moreover, the impact of non-phenolic constituents, including polysaccharides, on fruit activity should be addressed in future studies.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/ph15101300/s1, S1.: General; Table S1. Overall quantitative profile of the *P. spinosa* fruit extracts (mg/g dw); Table S2. Correlation (*r*) coefficients and probability (*p*) values of linear relationships between antioxidant and antidiabetic activity parameters and phenolic contents of *P. spinosa* fruits extracts. Table S3. Scavenging activity (SC_{50}, µg GAE/mL) of *P. spinosa* fruit extracts towards multiple oxidants; Figure S1. Inhibitory capacity of *P. spinosa* fruit extracts, their activity markers and standards against glycolytic enzymes and protein glycation; Figure S2. Antioxidant activity of *P. spinosa* fruit extracts, their activity markers and standards towards in vivo-relevant oxidants.

Author Contributions: Conceptualization, A.M. and M.A.O.; methodology, A.M., J.K.-C., M.E.C.; validation, A.M., M.A.O.; formal analysis, A.M.; investigation, A.M., J.K.-C., K.S., M.R., A.P., P.M.; resources, M.A.O., J.K.-C.; M.E.C.; data curation, A.M.; writing—original draft preparation, A.M., M.A.O.; writing—review and editing, A.M., J.K.-C., M.E.C., M.A.O.; supervision, M.A.O.; project administration, A.M.; funding acquisition, M.A.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Medical University of Lodz (grant number 503/3-022-01/503-31-001).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of The Committee on the Ethics of Research at the University of Lodz (protocol code: 8/KBBN-UŁ/II/2015; date of approval: 19/11/2015).

Informed Consent Statement: Informed Consent waived due to, that the buffy coat fractions, being a by-product of blood fractionation for transfusion, were commercially available. We did not recruit the study group. Donors' data was anonymised. The donors' personal data is kept only by the Regional Centre of Blood Donation and Blood Treatment in Lodz and is not shared with other institutions.

Data Availability Statement: Data is contained within the article and supplementary materials.

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

Abbreviations

3-NT-Fg	nitro-fibrinogen
ABTS	2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
AGEs	advanced glycation end products
BFD	*n*-butanol fraction of MED
BFF	*n*-butanol fraction of MEF
DEFD	diethyl ether fraction of MED
DEFF	diethyl ether fraction of MEF
DM	diabetes mellitus
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
dw	dry weight
EAFD	ethyl acetate fraction of MED
EAFF	ethyl acetate fraction of MEF
FRAP	ferric-reducing ability of plasma
GAE	gallic acid equivalents
H_2O_2	hydrogen peroxide
HMF	5-hydroxymetylfurfural

$HO^{\bullet}$	hydroxyl radical
HOCl	hypochlorous acid
MED	methanol–water (75:25, *v*/*v*) extract of dried fruits
MEF	methanol–water (75:25, *v*/*v*) extract of fresh fruits
MRPs	Maillard reaction products
NEAC	non-enzymatic antioxidant capacity of human plasma
NF-κB	nuclear factor kappa B
$NO^{\bullet}$	nitrogen oxide
$O_2^{\bullet -}$	superoxide anion radical
$ONOO^-$	peroxynitrite
PB2	procyanidin B2
RAGE	AGEs-specific receptor
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
TAC	total content of anthocyanins
TBARS	thiobarbituric acid-reactive substances
TFL	total content of flavonoids
TPA	total content of phenolic acids
TPC	total phenolic content (Folin–Ciocalteu assay)
TPH	total phenolic content (sum of individual phenolics by HPLC)
TTC	total content of tannin-type proanthocyanidins
WRD	water residue of MED after fractionation
WRF	water residue of MEF after fractionation

References

1. Ullah, A.; Khan, A.; Khan, I. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi Pharm. J.* **2016**, *24*, 547–553.
2. The International Diabetes Federation (IDF). IDF Diabetes Atlas 2021—10th Edition. Available online: https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/ (accessed on 22 June 2022).
3. Sun, L.; Miao, M. Dietary polyphenols modulate starch digestion and glycaemic level: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60*, 541–555. [CrossRef] [PubMed]
4. Guasch-Ferré, M.; Merino, J.; Sun, Q.; Fitó, M.; Salas-Salvadó, J. Dietary polyphenols, mediterranean diet, prediabetes, and type 2 diabetes: A narrative review of the evidence. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 6723931. [CrossRef] [PubMed]
5. Hanhineva, K.; Törrönen, R.; Bondia-Pons, I.; Pekkinen, J.; Kolehmainen, M.; Mykkänen, H.; Poutanen, K. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 1365–1402. [CrossRef] [PubMed]
6. Popescu, I.; Caudullo, G. Prunus spinosa in Europe: Distribution, habitat, usage and threats. In *European Atlas of Forest Tree Species*; San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A., Eds.; Publications Office of the European Union: Luxembourg, 2016; p. e01aa69+. Available online: https://w3id.org/mtv/FISE-Comm/v01/e01aa69 (accessed on 22 June 2022).
7. Facciola, S. *Cornucopia II: A Source Book of Edible Plants*, 2nd ed.; Kampong Publications: Vista, CA, USA, 1998; p. 204.
8. Alarcón, R.; Pardo-de-Santayana, M.; Priestley, C.; Morales, R.; Heinrich, M. Medicinal and local food plants in the south of Alava (Basque Country, Spain). *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *176*, 207–224. [CrossRef]
9. Kültür, S. Medicinal plants used in Kirklareli Province (Turkey). *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *111*, 341–364. [CrossRef]
10. Jarić, S.; Mačukanović-Jocić, M.; Djurdjević, L.; Mitrović, M.; Kostić, O.; Karadžić, B.; Pavlović, P. An ethnobotanical survey of traditionally used plants on Suva planina mountain (south-eastern Serbia). *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *175*, 93–108. [CrossRef]
11. Magiera, A.; Czerwińska, M.E.; Owczarek, A.; Marchelak, A.; Granica, S.; Olszewska, M.A. Polyphenol-enriched extracts of *Prunus spinosa* fruits: Anti-inflammatory and antioxidant effects in human immune cells ex vivo in relation to phytochemical profile. *Molecules* **2022**, *27*, 1691. [CrossRef]
12. Magiera, A.; Czerwińska, M.E.; Owczarek, A.; Marchelak, A.; Granica, S.; Olszewska, M.A. Polyphenols and Maillard reaction products in dried *Prunus spinosa* fruits: Quality aspects and contribution to anti-inflammatory and antioxidant activity in human immune cells ex vivo. *Molecules* **2022**, *27*, 3302. [CrossRef]
13. Sabatini, L.; Fraternale, D.; Di Giacomo, B.; Mari, M.; Albertini, M.C.; Gordillo, B.; Rocchi, M.B.L.; Sisti, D.; Coppari, S.; Semprucci, F.; et al. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activity of *Prunus spinosa* L. fruit ethanol extract. *J. Funct. Foods* **2020**, *67*, 103885. [CrossRef]
14. Popović, B.M.; Blagojević, B.; Ždero Pavlović, R.; Mićić, N.; Bijelić, S.; Bogdanović, B.; Mišan, A.; Duarte, C.M.M.; Serra, A.T. Comparison between polyphenol profile and bioactive response in blackthorn (*Prunus spinosa* L.) genotypes from north Serbia-from raw data to PCA analysis. *Food Chem.* **2020**, *302*, 125373. [CrossRef] [PubMed]
15. Rutkowska, M.; Olszewska, M.A.; Kolodziejczyk-Czepas, J.; Nowak, P.; Owczarek, A. *Sorbus domestica* leaf extracts and their activity markers: Antioxidant potential and synergy effects in scavenging assays of multiple oxidants. *Molecules* **2019**, *24*, 2289. [CrossRef] [PubMed]

16. Vlassara, H.; Striker, G.E. Advanced glycation endproducts in diabetes and diabetic complications. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* **2013**, *42*, 697–719. [CrossRef] [PubMed]
17. Marín-Peñalver, J.J.; Martín-Timón, I.; Sevillano-Collantes, C.; Del Cañizo-Gómez, F.J. Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. *World J. Diabetes* **2016**, *7*, 354–395. [CrossRef] [PubMed]
18. Butterworth, P.J.; Warren, F.J.; Ellis, P.R. Human α-amylase and starch digestion: An interesting marriage. *Starch-Stärke* **2011**, *63*, 395–405. [CrossRef]
19. Lovegrove, A.; Edwards, C.H.; De Noni, I.; Patel, H.; El, S.N.; Grassby, T.; Zielke, C.; Ulmius, M.; Nilsson, L.; Butterworth, P.J.; et al. Role of polysaccharides in food, digestion, and health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, *57*, 237–253. [CrossRef]
20. Bahadoran, Z.; Mirmiran, P.; Azizi, F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: A review. *J. Diabetes Metab. Disord.* **2013**, *12*, 43. [CrossRef]
21. Bento, C.; Gonçalves, A.C.; Silva, B.; Silva, L.R. Assessing the phenolic profile, antioxidant, antidiabetic and protective effects against oxidative damage in human erythrocytes of peaches from Fundão. *J. Funct. Foods* **2018**, *43*, 224–233. [CrossRef]
22. Cui, J.; Gu, X.; Wang, F.; Ouyang, J.; Wang, J. Purification and structural characterization of an α-glucosidase inhibitory polysaccharide from apricot (*Armeniaca sibirica* L. Lam.) pulp. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *121*, 309–314. [CrossRef]
23. Papoutsis, K.; Zhang, J.; Bowyer, M.C.; Brunton, N.; Gibney, E.R.; Lyng, J. Fruit, vegetables, and mushrooms for the preparation of extracts with α-amylase and α-glucosidase inhibition properties: A review. *Food Chem.* **2021**, *338*, 128119. [CrossRef]
24. Rutkowska, M.; Kołodziejczyk-Czepas, J.; Owczarek, A.; Zakrzewska, A.; Magiera, A.; Olszewska, M.A. Novel insight into biological activity and phytochemical composition of *Sorbus aucuparia* L. fruits: Fractionated extracts as inhibitors of protein glycation and oxidative/nitrative damage of human plasma components. *Food Res. Int.* **2021**, *147*, 110526. [CrossRef] [PubMed]
25. Wang, Y.; Xiang, L.; Wang, C.; Tang, C.; He, X. Antidiabetic and antioxidant effects and phytochemicals of mulberry fruit (*Morus alba* L.) polyphenol enhanced extract. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e71144. [CrossRef] [PubMed]
26. Li, R.; Wang, Q.; Zhao, M.; Yang, P.; Hu, X.; Ouyang, D. Flavonoid glycosides from seeds of *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* with α-glucosidase inhibition activity. *Fitoterapia* **2019**, *137*, 104248. [CrossRef] [PubMed]
27. Di Sotto, A.; Locatelli, M.; Macone, A.; Toniolo, C.; Cesa, S.; Carradori, S.; Eufemi, M.; Mazzanti, G.; Di Giacomo, S. Hypoglycemic, antiglycation, and cytoprotective properties of a phenol-rich extract from waste peel of *Punica granatum* L. var. Dente di Cavallo DC2. *Molecules* **2019**, *24*, 3103. [CrossRef]
28. Truba, J.; Stanisławska, I.; Walasek, M.; Wieczorkowska, W.; Woliński, K.; Buchholz, T.; Melzig, M.F.; Czerwińska, M.E. Inhibition of digestive enzymes and antioxidant activity of extracts from fruits of *Cornus alba*, *Cornus sanguinea* subsp. *hungarica* and *Cornus florida*-A comparative study. *Plants* **2020**, *9*, 122. [CrossRef]
29. Amorim, F.L.; de Cerqueira Silva, M.B.; Cirqueira, M.G.; Oliveira, R.S.; Machado, B.A.S.; Gomes, R.G.; de Souza, C.O.; Druzian, J.I.; de Souza Ferreira, E.; Umsza-Guez, M.A. Grape peel (Syrah var.) jam as a polyphenol-enriched functional food ingredient. *Food Sci. Nutr.* **2019**, *7*, 1584–1594. [CrossRef] [PubMed]
30. Liguori, I.; Russo, G.; Curcio, F.; Bulli, G.; Aran, L.; Della-Morte, D.; Gargiulo, G.; Testa, G.; Cacciatore, F.; Bonaduce, D.; et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin. Interv. Aging* **2018**, *13*, 757–772. [CrossRef]
31. Giacco, F.; Brownlee, M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* **2010**, *107*, 1058–1070. [CrossRef]
32. Zhang, H.; Tsao, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr. Opin. Food Sci.* **2016**, *8*, 33–42. [CrossRef]
33. Barros, L.; Carvalho, A.M.; Sá Morais, J.; Ferreira, I.C.F.R. Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chem.* **2010**, *120*, 247–254. [CrossRef]
34. Ruiz-Rodríguez, B.M.; De Ancos, B.; Sánchez-Moreno, C.; Fernández-Ruiz, V.; De Cortes Sánchez-Mata, M.; Cámara, M.; Tardío, J. Wild blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) fruits as valuable sources of antioxidants. *Fruits* **2014**, *69*, 61–73. [CrossRef]
35. Fraternale, D.; Giamperi, L.; Bucchini, A.; Sestili, P.; Paolillo, M.; Riccia, D. *Prunus spinosa* fresh fruit juice: Antioxidant activity in cell-free and cellular systems. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*, 1665–1670. [PubMed]
36. Hajimehdipoor, H.; Shahrestani, R.; Shekarchi, M. Investigating the synergistic antioxidant effects of some flavonoid and phenolic compounds. *Res. J. Pharmacogn.* **2014**, *1*, 35–40.
37. Kicel, A.; Owczarek, A.; Kapusta, P.; Kolodziejczyk-Czepas, J.; Olszewska, M.A. Contribution of individual polyphenols to antioxidant activity of *Cotoneaster bullatus* and *Cotoneaster zabelii* leaves-structural relationships, synergy effects and application for quality control. *Antioxidants* **2020**, *9*, 69. [CrossRef] [PubMed]
38. Singh, V.P.; Bali, A.; Singh, N.; Jaggi, A.S. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **2014**, *18*, 1–14. [CrossRef]
39. Tan, K.C.; Shiu, S.W.; Wong, Y.; Tam, X. Serum advanced glycation end products (AGEs) are associated with insulin resistance. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2011**, *27*, 488–492. [CrossRef]
40. Ramkisoon, J.S.; Mahomoodally, F.M.; Ahmed, N.; Subratty, H.A. Natural inhibitors of advanced glycation end-products. *Nutr. Food Sci.* **2012**, *42*, 397–404. [CrossRef]
41. Yeh, W.J.; Hsia, S.M.; Lee, W.H.; Wu, C.H. Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings. *J. Food Drug. Anal.* **2017**, *25*, 84–92. [CrossRef]
42. Starowicz, M.; Zieliński, H. Inhibition of advanced glycation end-product formation by high antioxidant-leveled spices commonly used in European cuisine. *Antioxidants* **2019**, *8*, 100. [CrossRef]

43. Ma, H.; Johnson, S.L.; Liu, W.; DaSilva, N.A.; Meschwitz, S.; Dain, J.A.; Seeram, N.P. Evaluation of polyphenol anthocyanin-enriched extracts of blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry for free radical scavenging, reactive carbonyl species trapping, anti-glycation, anti-β-amyloid aggregation, and microglial neuroprotective effects. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 461.
44. Kicel, A.; Magiera, A.; Skrzywanek, M.; Malczuk, M.; Olszewska, M.A. Inhibition of α-glucosidase, α-amylase and protein glycation by phenolic extracts of *Cotoneaster bullatus*, *Cotoneaster zabelii* and *Cotoneaster integerrimus* leaves and fruits: Focus on anti-hyperglycemic activity and kinetic parameters. *Molecules* **2022**, *27*, 7081. [CrossRef]
45. Pacher, P.; Beckman, J.S.; Liaudet, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 315–424. [CrossRef] [PubMed]
46. Szabó, C.; Ischiropoulos, H.; Radi, R. Peroxynitrite: Biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 662–680. [CrossRef] [PubMed]
47. Pacher, P.; Szabo, C. Role of peroxynitrite in the pathogenesis of cardiovascular complications of diabetes. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, *6*, 136–141. [CrossRef] [PubMed]
48. Marchelak, A.; Owczarek, A.; Matczak, M.; Pawlak, A.; Kołodziejczyk-Czepas, J.; Nowak, P.; Olszewska, M.A. Bioactivity potential of *Prunus spinosa* L. flower extracts: Phytochemical profiling, cellular safety, pro-inflammatory enzymes inhibition and protective effects against oxidative stress in vitro. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 680. [CrossRef]
49. Ahsan, H. 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. *Hum. Immunol.* **2013**, *74*, 1392–1399. [CrossRef]
50. Atkin, M.A.; Gasper, A.; Ullegaddi, R.; Powers, H.J. Oxidative susceptibility of unfractionated serum or plasma: Response to antioxidants in vitro and to antioxidant supplementation. *Clin. Chem.* **2005**, *51*, 2138–2144. [CrossRef]
51. Shapla, U.M.; Solayman, M.; Alam, N.; Khalil, M.I.; Gan, S.H. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: Effects on bees and human health. *Chem. Cent. J.* **2018**, *12*, 35. [CrossRef]
52. Kowalski, S.; Lukasiewicz, M.; Duda-Chodak, A.; Zięć, G. 5-Hydroxymethyl-2-Furfural (HMF)—Heat-induced formation, occurrence in food and biotransformation—A review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2013**, *63*, 207–225. [CrossRef]
53. Ma, L.F.; Yan, J.J.; Lane, H.Y.; Jin, L.C.; Qiu, F.J.; Wang, Y.J.; Xi, Z.F.; Shan, W.G.; Zhan, Z.J.; Ying, Y.M. Bioassay-guided isolation of lanostane-type triterpenoids as alpha-glucosidase inhibitors from *Ganoderma hainanense*. *Phytochem. Lett.* **2019**, *29*, 154–159. [CrossRef]
54. Marchelak, A.; Owczarek, A.; Rutkowska, M.; Michel, P.; Kołodziejczyk-Czepas, J.; Nowak, P.; Olszewska, M.A. New insights into antioxidant activity of *Prunus spinosa* flowers: Extracts, model polyphenols and their phenolic metabolites in plasma towards multiple *in vivo*-relevant oxidants. *Phytochem. Lett.* **2019**, *30*, 288–295. [CrossRef]
55. Kołodziejczyk-Czepas, J.; Nowak, P.; Wachowicz, B.; Piechocka, J.; Głowacki, R.; Moniuszko-Szajwaj, B.; Stochmal, A. Antioxidant efficacy of *Kalanchoe daigremontiana* bufadienolide-rich fraction in blood plasma in vitro. *Pharm. Biol.* **2016**, *54*, 3182–3188. [CrossRef] [PubMed]

pharmaceuticals MDPI

Supplementary Material for:

Valorisation of the Inhibitory Potential of Fresh and Dried Fruit Extracts of *Prunus spinosa* L. towards Carbohydrate Hydrolysing Enzymes, Protein Glycation, Multiple Oxidants and Oxidative Stress-Induced Changes in Human Plasma Constituents

Anna Magiera [1,*], Joanna Kołodziejczyk-Czepas [2], Karolina Skrobacz [2], Monika Ewa Czerwińska [3,4], Magdalena Rutkowska [1], Aleksandra Prokop [5], Piotr Michel [1] and Monika Anna Olszewska [1]

[1] Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, 1 Muszynskiego St., 90-151 Lodz, Poland
[2] Department of General Biochemistry, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 141/143 Pomorska, 90-236 Lodz, Poland
[3] Department of Biochemistry and Pharmacogenomics, Medical University of Warsaw, 1 Banacha St., 02-097 Warsaw, Poland
[4] Centre for Preclinical Research, Medical University of Warsaw, 1B Banacha St., 02-097 Warsaw, Poland
[5] Student Scientific Association, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, 1 Muszynskiego St., 90-151 Lodz, Poland
* Correspondence: anna.magiera@umed.lodz.pl; Tel.: +48 503316997

Table of Contents

S.1. General

Table S1. Overall quantitative profile of the *P. spinosa* fruit extracts (mg/g dw).

Table S2. Correlation (r) coefficients and probability (*p*) values of linear relationships between antioxidant and antidiabetic activity parameters and phenolic contents of *P. spinosa* fruits extracts.

Table S3. Scavenging activity (SC_{50}, μg GAE/mL) of *P. spinosa* fruit extracts towards multiple oxidants.

Figure S1. Inhibitory capacity of *P. spinosa* fruit extracts, their activity markers and standards against glycolytic enzymes and protein glycation.

Figure S2. Antioxidant activity of *P. spinosa* fruit extracts, their activity markers and standards towards *in vivo*-relevant oxidants.

pharmaceuticals MDPI

S.1. General

High-purity reagents and standards for spectrophotometric and fluorometric assays: α-glucosidase; acarbose; aminoguanidine; fructose; sodium aside; *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside (*p*-NPG); bovine serum albumin (BSA); pancreatin from porcine pancreas; xanthine oxidase from bovine milk; xanthine; nitrotetrazolium blue chloride (NBT); hydrogen peroxide (H_2O_2); horseradish peroxidase; phenol; 4-aminoantipyrine; salicylic acid; iron (II) sulphate heptahydrate; 4,5-diaminofluorescein (DAF-2); 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB); sodium borohydride; ethylenediaminetetraacetic acid; Evans blue; diethylenetriaminepentaacetic acid; Trolox; quercetin; isoquercitrin (quercetin 3-*O*-β-D-glucopyranoside); 5-hydroxymethylfurfural (HMF); chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid); and ascorbic acid; were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), while sodium nitroprusside and sodium hypochlorite were obtained from Avantor Performance Materials (Gliwice, Poland); cyanidin 3-*O*-β-D-glucopyranoside (CYG) from Phytolab (Vestenbergsgreuth, Germany); and phosphate-buffered saline (PBS) from Biomed (Lublin, Poland). The EnzChek™ Ultra Amylase Assay Kit was purchased from Thermo Fisher Scientific (Walltham, USA). All immunoreagents for 3-nitrotyrosine detection were purchased from Abcam (Cambridge, UK). All other chemicals and solvents were of analytical grade and obtained from Avantor (Poland). In all analyses redistilled water was used. Samples were incubated in a constant temperature using a BD 23 incubator (Binder, Tuttlingen, Germany). All activity studies were performed using 96-well plates and monitored by microplate readers: SPECTROstar Nano (BMG LabTech, Ortenberg, Germany) or Synergy HTX (BioTek, Winooski, VT, USA).

Table S1. Overall quantitative profile of the *P. spinosa* fruit extracts (mg/g dw).

	TPC (GAE)	TPH	TPA	TAC	TFL	TTC (PB2)	MRPs
Extracts/fractions::							
MEF	87.57 ± 3.54^{C}	28.56 ± 0.58^{E}	19.67 ± 0.33^{G}	4.64 ± 0.11^{B}	4.25 ± 0.21^{E}	**44.53 ± 1.93**^{A}	n.d.
MED	26.77 ± 0.47^{F}	9.61 ± 0.60^{F}	8.19 ± 0.51^{H}	n.d.	1.43 ± 0.09^{F}	8.17 ± 0.24^{C}	0.92 ± 0.07^{C}
DEFF	**126.49 ± 1.41**^{A}	81.83 ± 0.80^{C}	35.15 ± 1.12^{D}	n.d.	**41.11 ± 0.41**^{A}	n.d.	n.d.
DEFD	**124.01 ± 0.70**^{A}	80.24 ± 1.16^{C}	47.51 ± 1.50^{C}	n.d.	25.99 ± 0.77^{B}	n.d.	**37.75 ± 2.39**^{A}
EAFF	**123.63 ± 3.68**^{A}	104.02 ± 1.92^{B}	91.26 ± 2.16^{B}	n.d.	12.21 ± 0.32^{C}	n.d.	n.d.
EAFD	107.43 ± 4.08^{B}	**109.91 ± 1.26**^{A}	**102.53 ± 0.85**^{A}	n.d.	6.69 ± 0.46^{D}	n.d.	13.53 ± 0.78^{B}
BFF	68.23 ± 0.12^{D}	43.17 ± 1.14^{D}	29.62 ± 1.10^{E}	**9.17 ± 0.33**^{A}	4.38 ± 0.17^{E}	8.02 ± 0.23^{C}	n.d.
BFD	46.58 ± 2.28^{E}	28.49 ± 0.96^{E}	25.16 ± 0.80^{F}	0.22 ± 0.01^{D}	3.12 ± 0.24^{E}	n.d.	1.37 ± 0.03^{C}
WRF	64.59 ± 0.61^{D}	6.07 ± 0.14^{G}	4.79 ± 0.08^{I}	0.96 ± 0.06^{C}	0.32 ± 0.02^{F}	28.36 ± 0.41^{B}	n.d.
WRD	22.59 ± 0.05^{F}	0.78 ± 0.01^{H}	0.78 ± 0.01^{J}	n.d.	n.d.	5.37 ± 0.11^{D}	0.26 ± 0.003^{C}

Results are presented as means ± SD (n = 3). For each parameter, different superscript letters indicate significant differences (p < 0.05). The highest levels for each parameter are printed in bold. Extracts/fractions: MEF/MED, methanol-water (75:25, v/v) extracts of fresh/dried fruits; DEFF/DEFD, diethyl ether fraction of MEF/MED; EAFF/EAFD, ethyl acetate fraction of MEF/MED; BFF/BFD, n-butanol fraction of MEF/MED; WRF/WRD, water residue of MEF/MED. Analytical parameters: TPC, total phenolic contents in gallic acid equivalents (GAE); TPH, total contents of low molecular weight phenols determined by HPLC-PDA; TPA, total phenolic acids; TAC, total anthocyanins; TFL, total flavonoids; MRPs, total Maillard reaction products; TTC, total tannins in procyanidin B2 equivalents (PB2). N.d.: below the limits of quantitation (LOQ) or detection (LOD). For detailed quantitative levels and LC-MS/MS data for identification of individual compounds see the previous papers by Magiera et al. [1,2].

Table S2. Correlation (r) coefficients and probability (*p*) values of linear relationships between antioxidant and antidiabetic activity parameters and phenolic contents of *P. spinosa* fruits extracts.

r (*p*) for	α-glucosidase	α-amylase	AGEs fomation	NO	HOCl	$O_2^{\cdot-}$	H_2O_2	$HO^{\cdot}$
TPC	**-0.7273 (0.042)***	**-0.8328 (0.010)***	-0.4112 (0.312)	**-0.8814 (0.004)***	**-0.9282 (0.001)***	**-0.9636 (0.000)***	**-0.9153 (0.001)***	**-0.8873 (0.003)***
TPH	-0.3238 (0.434)	-0.5853 (0.127)	-0.0821 (0.847)	**-0.8082 (0.015)***	**-0.7408 (0.036)***	**-0.8281 (0.011)***	**-0.7096 (0.049)***	**-0.7529 (0.031)***
TFL	-0.6317 (0.093)	-0.5718 (0.139)	-0.1522 (0.719)	-0.5155 (0.191)	-0.6514 (0.080)	**-0.7991 (0.017)***	-0.5613 (0.148)	-0.5538 (0.154)
TAC	-0.1305 (0.758)	-0.1493 (0.724)	-0.6820 (0.062)	-0.1703 (0.687)	-0.1183 (0.780)	0.1925 (0.648)	-0.1702 (0.687)	-0.0899 (0.832)
TPA	-0.0425 (0.920)	-0.3624 (0.378)	0.0722 (0.865)	-0.6227 (0.099)	-0.4901 (0.218)	-0.5517 (0.156)	-0.4977 (0.209)	-0.5543 (0.154)
TTC	-0.3679 (0.370)	-0.1921 (0.649)	-0.5288 (0.178)	0.1141(0.788)	-0.0044 (0.992)	0.2332 (0.578)	-0.1042 (0.806)	-0.0407 (0.924)

Activity and concentration parameters according to Tables 1, 2, S1. Asterisk means statistical significance of the estimated linear relationships (*$p < 0.05$). All statistically significant relationships are printed in bold.

Table S3. Scavenging activity (SC_{50}, μg GAE/mL) of *P. spinosa* fruit extracts towards multiple oxidants.

	$NO^{\bullet}$	HOCl	$O_2^{\bullet-}$	H_2O_2	$HO^{\bullet}$
Extracts/fractions:					
MEF	1.60	3.51	6.47	14.89	38.53
MED	1.15	2.70	2.73	15.25	21.68
DEFF	0.71	2.19	3.72	16.44	41.74
DEFD	0.48	2.28	4.06	18.60	39.68
EAFF	0.27	3.89	5.57	17.31	25.66
EAFD	0.51	3.70	5.67	22.56	35.45
BFF	0.43	2.71	5.02	15.01	32.07
BFD	2.04	4.49	4.98	20.49	44.72
WRF	3.34	2.46	6.68	17.44	34.05
WRD	0.91	3.47	7.04	16.26	26.43

SC_{50}, Scavenging efficiency (amount of antioxidant needed to decrease the initial concentration of the oxidant by 50%) expressed in μg of phenolics/mL of the enzyme reaction solution (values obtained by converting the original SC_{50} values using the TPC levels); expressed in μg of the dry extract or standard/mL of the reaction solution; GAE, gallic acid equivalents. For extracts/fractions codes, see Table S1 and Section Abbreviations. Results presented as mean values ± SD ($n = 3$).

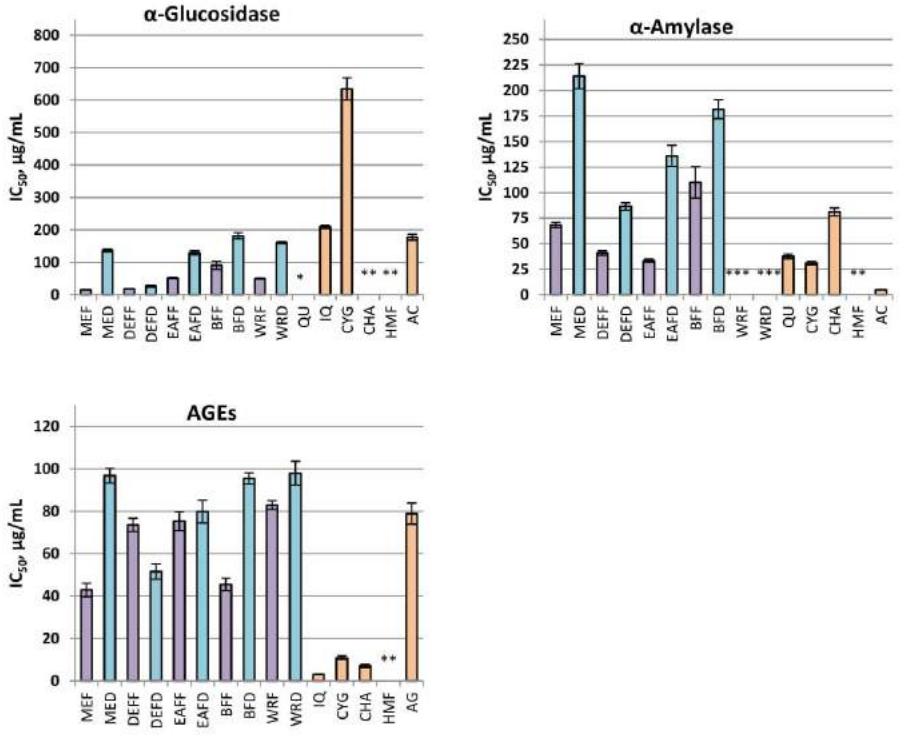


Figure S1. Inhibitory capacity of *P. spinosa* fruit extracts, their activity markers and standards against glycolytic enzymes and protein glycation. Results are presented as mean values of $SC_{50} \pm SD$ ($n = 3$), expressed in µg of the dry extract or standard/mL. Extracts/fractions: MEF/MED, methanol-water (75:25, *v*/*v*) extracts of fresh/dried fruits; DEFF/DEFD, diethyl ether fraction of MEF/MED; EAFF/EAFD, ethyl acetate fraction of MEF/MED; BFF/BFD, *n*-butanol fraction of MEF/MED; WRF/WRD, water residue of MEF/MED. QU, quercetin; IQ, isoquercitrin; CYG, cyanidin 3-*O*-glucoside; CHA, chlorogenic acid; HMF, 5-hydroxymethylfurfural; AC, acarbose; AG, aminoguanidine; * inactive up to a concentration of 50 µg/mL, above 50 µg/mL insoluble; ** inactive up to a concentration of 500 µg/mL; *** inactive up to 1500 µg/mL.

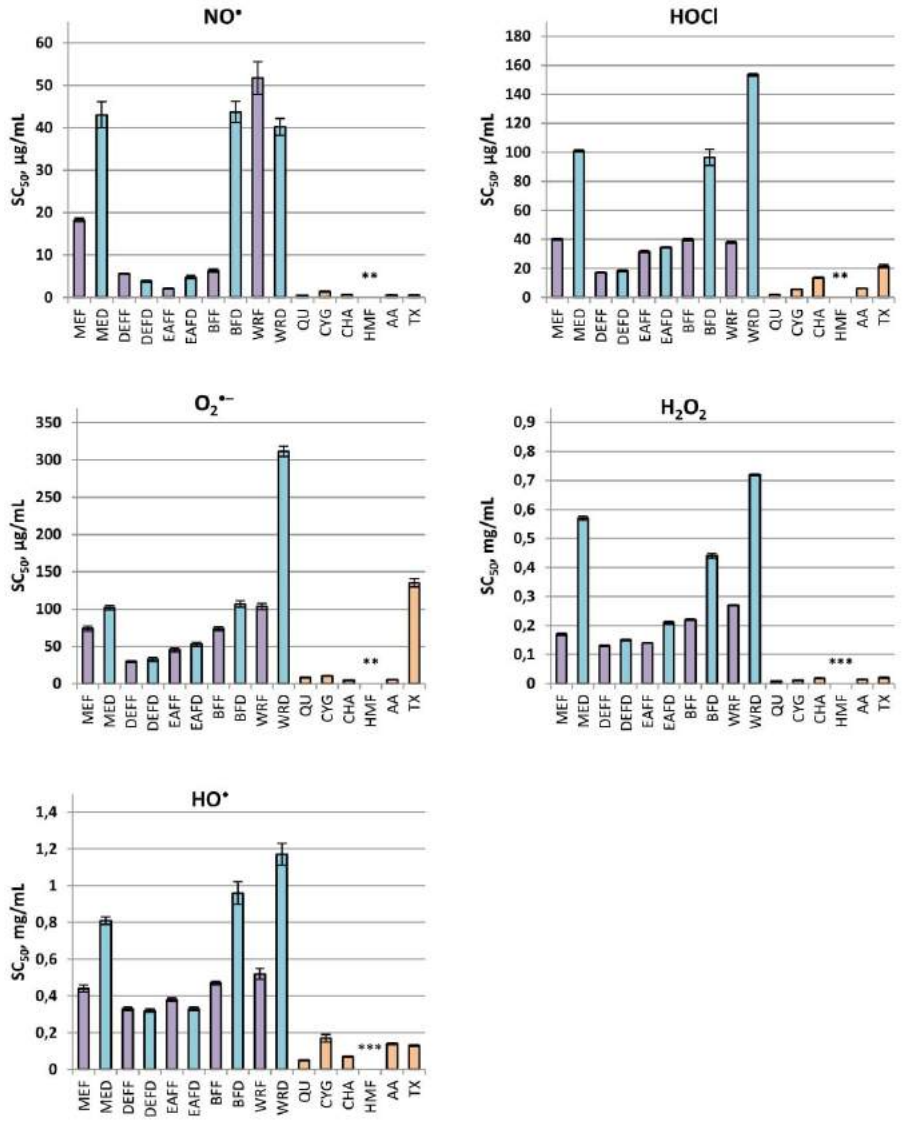


Figure S2. Antioxidant activity of *P. spinosa* fruit extracts, their activity markers and standards towards *in vivo*-relevant oxidants. Results are presented as mean values of $SC_{50} \pm SD$ ($n = 3$), expressed in µg/mg of the dry extract or standard/mL. Extracts/fractions: MEF/MED, methanol-water (75:25, *v/v*) extracts of fresh/dried fruits; DEFF/DEFD, diethyl ether fraction of MEF/MED; EAFF/EAFD, ethyl acetate fraction of MEF/MED; BFF/BFD, *n*-butanol fraction of MEF/MED; WRF/WRD, water residue of MEF/MED. QU, quercetin; CYG, cyanidin 3-*O*-glucoside; CHA, chlorogenic acid; HMF, 5-hydroxymethylfurfural; AA, ascorbic acid; TX, Trolox®; ** inactive up to a concentration of 500 µg/mL; *** inactive up to 1500 µg/mL.

References

1. Magiera, A.; Czerwińska, M.E.; Owczarek, A.; Marchelak, A.; Granica, S.; Olszewska, M.A. Polyphenol-enriched extracts of *Prunus spinosa* fruits: Anti-inflammatory and antioxidant effects in human immune cells ex vivo in relation to phytochemical profile. *Molecules* **2022a**, *27*, 1691.
2. Magiera, A.; Czerwińska, M.E.; Owczarek, A.; Marchelak, A.; Granica, S.; Olszewska, M.A. Polyphenols and Maillard reaction products in dried *Prunus spinosa* fruits: Quality aspects and contribution to anti-inflammatory and antioxidant activity in human immune cells ex vivo. *Molecules* **2022b**, *27*, 3302.

Łódź, dnia 07.11.2022

mgr farm. Anna Magiera
Katedra Farmakognozji
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Ja, niżej podpisana **Anna Magiera** informuję Przewodniczącego Rady Naukowej ds. Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, że ani badania stanowiące podstawę tez mojej pracy doktorskiej, ani sama praca pt. **„Profil polifenolowy i aktywność biologiczna ekstraktów ze świeżych i suszonych owoców *Prunus spinosa* L. – analiza porównawcza"** nie były przedmiotem postępowania o wszczęcie przewodu doktorskiego w innej jednostce uprawnionej do nadawania takiego stopnia. Jestem współwykonawcą badań stanowiących podstawę mojego doktoratu i posiadam protokoły badań dostępne do wglądu na życzenie władz Uczelni.

Anna Magiera
.....
(podpis kandydata)

Łódź, dnia 07.11.2022

mgr farm. Anna Magiera
Katedra Farmakognozji
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że:

w publikacji „**Magiera A.**, Czerwińska M.E., Owczarek A., Marchelak A., Granica S., Olszewska M.A. (2022). Polyphenol-enriched extracts of *Prunus spinosa* fruits: Anti-inflammatory and antioxidant effects in human immune cells ex vivo in relation to phytochemical profile. *Molecules*, 27(5), 1691, doi: 10.3390/ molecules27051691",

mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji i planu pracy, współautorstwie manuskryptu, nadzorze nad procesem przygotowania ekstraktów i frakcji, analizie profilu fitochemicznego ekstraktów i frakcji uzyskanego metodą LC-MS, wykonaniu oznaczeń zawartości związków polifenolowych metodami spektrofotometrycznymi i HPLC-PDA dla ekstraktów/frakcji, wykonaniu oznaczeń wpływu ekstraktów, frakcji, związków modelowych na prooksydacyjne i prozapalne funkcje neutrofilii (inhibicja wytwarzania ROS, hamowanie sekrecji ELA-2, TNF-α, IL-8), wykonaniu oznaczeń wpływu ekstraktów/frakcji, związków modelowych na pro- i przeciwzapalne funkcje PBMCs (hamowanie sekrecji IL-6, TNF-α, nasilenie wydzielania IL-10), ocenie wpływu ekstraktów/frakcji, związków modelowych na żywotność ludzkich neutrofilii i PBMCs, analizie statystycznej i interpretacji otrzymanych wyników oraz pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego, w tym współprzygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów. Mój udział w przygotowaniu tej pracy szacuję na **50%**.

w publikacji „**Magiera A.**, Czerwińska M.E., Owczarek A., Marchelak A., Granica S., Olszewska M.A. (2022). Polyphenols and Maillard reaction products in dried *Prunus spinosa* fruits: Quality aspects and contribution to anti-Inflammatory and antioxidant activity in human immune cells ex vivo. *Molecules*, 27(10), 3302, doi: 10.3390/molecules27103302",

mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji i planu pracy, współautorstwie manuskryptu, nadzorze nad procesem przygotowania ekstraktów i frakcji niezbędnych do oznaczeń profilu chemicznego oraz aktywności biologicznej, przygotowaniu ekstraktów niezbędnych do izolacji MRPs oraz przeprowadzeniu ich izolacji, analizie profilu fitochemicznego ekstraktów i frakcji uzyskanego metodą LC-MS, wykonaniu oznaczeń zawartości związków polifenolowych i MRPs metodami spektrofotometrycznymi i HPLC-PDA dla ekstraktów i frakcji, wykonaniu oznaczeń wpływu ekstraktów/frakcji, związków modelowych na prooksydacyjne i prozapalne funkcje neutrofilii (inhibicja wytwarzania ROS, hamowanie sekrecji ELA-2, TNF-α, IL-8), wykonaniu oznaczeń wpływu ekstraktów/frakcji, związków modelowych na pro- i przeciwzapalne funkcje PBMCs (hamowanie sekrecji IL-6, TNF-α, nasilenie wydzielania IL-10), ocenie wpływu ekstraktów, frakcji, związków modelowych na żywotność ludzkich neutrofilii i PBMCs, analizie statystycznej i interpretacji

otrzymanych wyników oraz pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego, w tym współprzygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów. Mój udział w przygotowaniu tej pracy szacuję na **65%**.

w publikacji „**Magiera A.**, Kołodziejczyk-Czepas J., Skrobacz K., Czerwińska M.E., Rutkowska M., Prokop A., Michel P., Olszewska M.A. (2022). Valorisation of the inhibitory potential of fresh and dried fruit extracts of *Prunus spinosa* L. towards carbohydrate hydrolysing enzymes, protein glycation, multiple oxidants and oxidative stress-induced changes in human plasma constituents. *Pharmaceuticals*, 15(10), 1300, doi: 10.3390/ph15101300",

mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji i planu pracy, współautorstwie manuskryptu, wykonaniu oznaczeń aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów, frakcji, związków modelowych wobec $O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$, H_2O_2, $NO^{\bullet}$, HClO, przeprowadzeniu oznaczeń hamowania enzymu α-amylazy przez ekstrakty, frakcje i związki modelowe, nadzorze nad wykonaniem oznaczeń hamowania α-glukozydazy dla wszystkich analitów, współudziale w procesie optymalizacji metody zahamowania tworzenia AGEs oraz wykonanie w tej metodzie oznaczeń dla związków modelowych i nadzorowanie oznaczeń dla ekstraktów i frakcji, analizie statystycznej i interpretacji otrzymanych wyników oraz pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego, w tym współprzygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów. Mój udział w przygotowaniu tej pracy szacuję na **65%**.

Anna Magiera
(podpis)

)

Łódź, dnia 02.11.2022

dr hab. n. farm. Monika A. Olszewska, prof. UM
Katedra Farmakognozji
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż w pracach:

„Magiera A., Czerwińska M.E., Owczarek A., Marchelak A., Granica S., **Olszewska M.A.** (2022). Polyphenol-enriched extracts of *Prunus spinosa* fruits: Anti-inflammatory and antioxidant effects in human immune cells ex vivo in relation to phytochemical profile. *Molecules*, 27(5), 1691, doi: 10.3390/ molecules27051691",

„Magiera A., Czerwińska M.E., Owczarek A., Marchelak A., Granica S., **Olszewska M.A.** (2022). Polyphenols and Maillard reaction products in dried *Prunus spinosa* fruits: Quality aspects and contribution to anti-Inflammatory and antioxidant activity in human immune cells ex vivo. *Molecules*, 27(10), 3302, doi: 10.3390/molecules27103302",

„Magiera A., Kołodziejczyk-Czepas J., Skrobacz K., Czerwińska M.E., Rutkowska M., Prokop A., Michel P., **Olszewska M.A.** (2022). Valorisation of the inhibitory potential of fresh and dried fruit extracts of *Prunus spinosa* L. towards carbohydrate hydrolysing enzymes, protein glycation, multiple oxidants and oxidative stress-induced changes in human plasma constituents. *Pharmaceuticals*, 15(10), 1300, doi: 10.3390/ph15101300",

mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji i planu prac, nadzorze nad poprawnością prowadzonych eksperymentów i interpretacji wyników, konsultacji metodyki analiz fitochemicznych i aktywności antyoksydacyjnej w modelach bezkomórkowych, udostępnieniu palety substancji wzorcowych uzyskanych w ramach wcześniejszych prac izolacyjnych, współautorstwie i finalnej korekcie manuskryptu oraz wsparciu w rozwiązywaniu problemów naukowo-badawczych podniesionych przez recenzentów.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr farm. Annę Magierę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, że samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część prac wskazuje na indywidualny wkład mgr Anny Magiery w opracowanie koncepcji, wykonanie części eksperymentalnej, opracowanie i interpretację wyników w ww. pracy.

Olszewska
.....
(podpis)

Warszawa, dnia 22.10.2022

dr hab. n. farm. Monika Ewa Czerwińska
Zakład Biochemii i Farmakogenomiki
Wydział Farmaceutyczny
Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii (CePT)
Warszawski Uniwersytet Medyczny

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż:

w pracy „Magiera A., **Czerwińska M.E.**, Owczarek A., Marchelak A., Granica S., Olszewska M.A. (2022). Polyphenol-enriched extracts of *Prunus spinosa* fruits: Anti-inflammatory and antioxidant effects in human immune cells ex vivo in relation to phytochemical profile. *Molecules*, 27(5), 1691, doi: 10.3390/ molecules27051691",

mój udział polegał na konsultacji metodyki oraz nadzorze nad poprawnością eksperymentów przeprowadzonych w modelu ludzkich neutrofilii i PBMCs, a także korekcie finalnej wersji manuskryptu.

w pracy „Magiera A., **Czerwińska M.E.**, Owczarek A., Marchelak A., Granica S., Olszewska M.A. (2022). Polyphenols and Maillard reaction products in dried *Prunus spinosa* fruits: Quality aspects and contribution to anti-Inflammatory and antioxidant activity in human immune cells ex vivo. *Molecules*, 27(10), 3302, doi: 10.3390/molecules27103302",

mój udział polegał na konsultacji metodyki oraz nadzorze nad poprawnością eksperymentów przeprowadzonych w modelu ludzkich neutrofilii i PBMCs, a także korekcie finalnej wersji manuskryptu.

w pracy „Magiera A., Kołodziejczyk-Czepas J., Skrobacz K., **Czerwińska M.E.**, Rutkowska M., Prokop A., Michel P., Olszewska M.A. (2022). Valorisation of the inhibitory potential of fresh and dried fruit extracts of *Prunus spinosa* L. towards carbohydrate hydrolysing enzymes, protein glycation, multiple oxidants and oxidative stress-induced changes in human plasma constituents. *Pharmaceuticals*, 15(10), 1300, doi: 10.3390/ph15101300",,

mój udział polegał na konsultacji metodyki oraz nadzorze nad poprawnością oznaczeń hamowania enzymu α-amylazy, a także korekcie finalnej wersji manuskryptu przygotowanego przez głównych autorów.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr farm. Annę Magierę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, że samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część prac wskazuje na indywidualny wkład mgr Anny Magiery w opracowanie koncepcji, wykonanie części eksperymentalnej, opracowanie i interpretację wyników w ww. pracy.

Monika Czerwińska
(podpis)

Warszawa, dnia 28.10.2022

prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Sebastian Granica
Microbiota Lab
Zakład Biologii i Farmakognozji
Wydział Farmaceutyczny
Warszawski Uniwersytet Medyczny

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż:

w pracy „Magiera A., Czerwińska M.E., Owczarek A., Marchelak A., **Granica S.**, Olszewska M.A. (2022). Polyphenol-enriched extracts of *Prunus spinosa* fruits: Anti-inflammatory and antioxidant effects in human immune cells ex vivo in relation to phytochemical profile. *Molecules*, 27(5), 1691, doi: 10.3390/ molecules27051691",

mój udział polegał na wykonaniu oznaczeń profilu fitochemicznego ekstraktów i frakcji metodą LC-MS, konsultacji metodyki analiz przeprowadzonych w modelu ludzkich neutrofilii oraz korekcie finalnej wersji manuskryptu przygotowanego przez głównych autorów.

w pracy „Magiera A., Czerwińska M.E., Owczarek A., Marchelak A., **Granica S.**, Olszewska M.A. (2022). Polyphenols and Maillard reaction products in dried *Prunus spinosa* fruits: Quality aspects and contribution to anti-Inflammatory and antioxidant activity in human immune cells ex vivo. *Molecules*, 27(10), 3302, doi: 10.3390/molecules27103302",

mój udział polegał na wykonaniu oznaczeń profilu fitochemicznego ekstraktów i frakcji metodą LC-MS, konsultacji metodyki analiz przeprowadzonych w modelu ludzkich neutrofilii oraz korekcie finalnej wersji manuskryptu przygotowanego przez głównych autorów.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr farm. Annę Magierę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, że samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część prac wskazuje na indywidualny wkład mgr Anny Magiery w opracowanie koncepcji, wykonanie części eksperymentalnej, opracowanie i interpretację wyników w ww. pracy.

Sebastian Granica
.....
(podpis)
28/10/2022

Łódź, dnia 22.10.2022

dr hab. Joanna Kołodziejczyk-Czepas, prof. UŁ
Katedra Biochemii Ogólnej Wydział
Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż:

w pracy „Magiera A., **Kołodziejczyk-Czepas J.**, Skrobacz K., Czerwińska M.E., Rutkowska M., Prokop A., Michel P., Olszewska M.A. (2022). Valorisation of the inhibitory potential of fresh and dried fruit extracts of *Prunus spinosa* L. towards carbohydrate hydrolysing enzymes, protein glycation, multiple oxidants and oxidative stress-induced changes in human plasma constituents. *Pharmaceuticals*, 15(10), 1300, doi: 10.3390/ph15101300",

mój udział polegał na optymalizacji i wykonaniu analiz aktywności antyoksydacyjnej w modelu ludzkiego osocza dla ekstraktów, frakcji i związków modelowych, a także korekcie finalnej wersji manuskryptu przygotowanego przez głównych autorów.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr farm. Annę Magierę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, że samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część prac wskazuje na indywidualny wkład mgr Anny Magiery w opracowanie koncepcji, wykonanie części eksperymentalnej, opracowanie i interpretację wyników w ww. pracy.

Joanna Kołodziejczyk-Czepas
.....
(podpis)

Łódź, dnia 02.11.2022

dr n. farm. Anna Marchelak
Katedra Farmakognozji
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż:

w pracy „Magiera A., Czerwińska M.E., Owczarek A., **Marchelak A.**, Granica S., Olszewska M.A. (2022). Polyphenol-enriched extracts of *Prunus spinosa* fruits: Anti-inflammatory and antioxidant effects in human immune cells ex vivo in relation to phytochemical profile. *Molecules*, 27(5), 1691, doi: 10.3390/ molecules27051691",

mój udział polegał na przygotowaniu ekstraktów i frakcji oraz konsultacji w zakresie interpretacji wyników otrzymanych w analizie profilu fitochemicznego ekstraktów i frakcji uzyskanego metodą LC-MS.

w pracy „Magiera A., Czerwińska M.E., Owczarek A., **Marchelak A.**, Granica S., Olszewska M.A. (2022). Polyphenols and Maillard reaction products in dried *Prunus spinosa* fruits: Quality aspects and contribution to anti-Inflammatory and antioxidant activity in human immune cells ex vivo. *Molecules*, 27(10), 3302, doi: 10.3390/molecules27103302",

mój udział polegał na przygotowaniu ekstraktów i frakcji oraz konsultacji w zakresie interpretacji wyników otrzymanych w analizie profilu fitochemicznego ekstraktów i frakcji uzyskanego metodą LC-MS.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr farm. Annę Magierę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, że samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część prac wskazuje na indywidualny wkład mgr Anny Magiery w opracowanie koncepcji, wykonanie części eksperymentalnej, opracowanie i interpretację wyników w ww. pracy.

Anna Marchelak
.....
(podpis)

Łódź, dnia 02.11.2022

dr n. farm. Piotr Michel
Katedra Farmakognozji
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż:

w pracy „Magiera A., Kołodziejczyk-Czepas J., Skrobacz K., Czerwińska M.E., Rutkowska M., Prokop A., **Michel P.**, Olszewska M.A. (2022). Valorisation of the inhibitory potential of fresh and dried fruit extracts of *Prunus spinosa* L. towards carbohydrate hydrolysing enzymes, protein glycation, multiple oxidants and oxidative stress-induced changes in human plasma constituents. *Pharmaceuticals*, 15(10), 1300, doi: 10.3390/ph15101300",

mój udział polegał na przeprowadzeniu oznaczeń hamowania enzymu α-glukozydazy dla ekstraktów i frakcji otrzymanych z owoców suszonych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr farm. Annę Magierę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, że samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część prac wskazuje na indywidualny wkład mgr Anny Magiery w opracowanie koncepcji, wykonanie części eksperymentalnej, opracowanie i interpretację wyników w ww. pracy.

Michel Piotr
.....
(podpis)

Łódź, dnia 02.11.2022

dr n. farm. Aleksandra Owczarek-Januszkiewicz
Katedra Farmakognozji
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż:

w pracy „Magiera A., Czerwińska M.E., **Owczarek A.**, Marchelak A., Granica S., Olszewska M.A. (2022). Polyphenol-enriched extracts of *Prunus spinosa* fruits: Anti-inflammatory and antioxidant effects in human immune cells ex vivo in relation to phytochemical profile. *Molecules*, 27(5), 1691, doi: 10.3390/ molecules27051691",

mój udział polegał na konsultacji w zakresie interpretacji wyników otrzymanych w analizie profilu fitochemicznego ekstraktów i frakcji uzyskanego metodą LC-MS, a także korekcie merytorycznej i językowej finalnej wersji manuskryptu przygotowanego przez głównych autorów.

w pracy „Magiera A., Czerwińska M.E., **Owczarek A.**, Marchelak A., Granica S., Olszewska M.A. (2022). Polyphenols and Maillard reaction products in dried *Prunus spinosa* fruits: Quality aspects and contribution to anti-Inflammatory and antioxidant activity in human immune cells ex vivo. *Molecules*, 27(10), 3302, doi: 10.3390/molecules27103302",

mój udział polegał na konsultacji w zakresie interpretacji wyników otrzymanych w analizie profilu fitochemicznego ekstraktów i frakcji uzyskanego metodą LC-MS, optymalizacji metody preparatywnej HPLC-PDA izolacji MRPs, analizie strukturalnej wyizolowanych MRPs, a także korekcie merytorycznej i językowej finalnej wersji manuskryptu przygotowanego przez głównych autorów.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr farm. Annę Magierę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, że samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część prac wskazuje na indywidualny wkład mgr Anny Magiery w opracowanie koncepcji, wykonanie części eksperymentalnej, opracowanie i interpretację wyników w ww. pracy.

Aleksandra Owczarek-Januszkiewicz
(podpis)

Łódź, dnia 02.11.2022

dr n. farm. Magdalena Rutkowska
Katedra Farmakognozji
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż:

w pracy „Magiera A., Kołodziejczyk-Czepas J., Skrobacz K., Czerwińska M.E., **Rutkowska M.**, Prokop A., Michel P., Olszewska M.A. (2022). Valorisation of the inhibitory potential of fresh and dried fruit extracts of *Prunus spinosa* L. towards carbohydrate hydrolysing enzymes, protein glycation, multiple oxidants and oxidative stress-induced changes in human plasma constituents. *Pharmaceuticals*, 15(10), 1300, doi: 10.3390/ph15101300",

mój udział polegał na optymalizacji metody zahamowania tworzenia AGEs oraz wykonanie w tej metodzie oznaczeń dla ekstraktów i frakcji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr farm. Annę Magierę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, że samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część prac wskazuje na indywidualny wkład mgr Anny Magiery w opracowanie koncepcji, wykonanie części eksperymentalnej, opracowanie i interpretację wyników w ww. pracy.

Magdalena Rutkowska
(podpis)

Kraków, dnia 22.10.2022

mgr farm. Aleksandra Prokop
Koło Naukowe
Katedra Farmakognozji
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż:

w pracy „Magiera A., Kołodziejczyk-Czepas J., Skrobacz K., Czerwińska M.E., Rutkowska M., **Prokop A.**, Michel P., Olszewska M.A. (2022). Valorisation of the inhibitory potential of fresh and dried fruit extracts of *Prunus spinosa* L. towards carbohydrate hydrolysing enzymes, protein glycation, multiple oxidants and oxidative stress-induced changes in human plasma constituents. *Pharmaceuticals*, 15(10), 1300, doi: 10.3390/ph15101300",

mój udział polegał na przeprowadzeniu oznaczeń hamowania enzymu α-glukozydazy dla związków modelowych oraz ekstraktów i frakcji otrzymanych z owoców świeżych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr farm. Annę Magierę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, że samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część prac wskazuje na indywidualny wkład mgr Anny Magiery w opracowanie koncepcji, wykonanie części eksperymentalnej, opracowanie i interpretację wyników w ww. pracy.

Aleksandra Prokop
(podpis)

Łódź, dnia 22.10.2022

mgr Karolina Skrobacz
Katedra Biochemii Ogólnej Wydział
Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż:

w pracy „Magiera A., Kołodziejczyk-Czepas J., **Skrobacz K.**, Czerwińska M.E., Rutkowska M., Prokop A., Michel P., Olszewska M.A. (2022). Valorisation of the inhibitory potential of fresh and dried fruit extracts of *Prunus spinosa* L. towards carbohydrate hydrolysing enzymes, protein glycation, multiple oxidants and oxidative stress-induced changes in human plasma constituents. *Pharmaceuticals*, 15(10), 1300, doi: 10.3390/ph15101300",

mój udział polegał na wykonaniu analiz aktywności antyoksydacyjnej w modelu ludzkiego osocza dla ekstraktów, frakcji i związków modelowych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr farm. Annę Magierę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, że samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część prac wskazuje na indywidualny wkład mgr Anny Magiery w opracowanie koncepcji, wykonanie części eksperymentalnej, opracowanie i interpretację wyników w ww. pracy.

Karolina Skrobacz
(podpis)

Wykształcenie i całkowity dorobek naukowy

Wykształcenie

- **2021-2022 –** studia podyplomowe „Zarządzanie projektami: metodyki, praktyka, techniki, narzędzia", Politechnika Warszawska, Wydział Elektroniki i Technik Informacyjnych Instytut Automatyki i Informatyki Stosowanej.
- **2017-2022 –** studia doktoranckie, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Wydział Farmaceutyczny, Katedra Farmakognozji, opiekun naukowy: dr hab. n. farm. Monika A. Olszewska, prof. UM; otwarcie przewodu doktorskiego: 30.01.2019.
- **2011-2017 –** studia magisterskie, kierunek: Farmacja, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Wydział Farmaceutyczny.

  Praca magisterska przygotowana w Zakładzie Farmakognozji pod kierunkiem naukowym dr hab. n. farm. Moniki A. Olszewskiej, prof. UM (promotor) i dr n. farm. Aleksandry Owczarek (opiekun): „Optymalizacja izolacji wybranych związków flawonoidowych z materiału roślinnego z wykorzystaniem metod chromatografii cieczowej – wysokosprawnej i typu flash", praca magisterska wyróżniona II miejscem w Wydziałowym Konkursie Prac Magisterskich.

Kursy, szkolenie, certyfikaty

- **2021 –** Certyfikat „AgilePM® Agile Project Management Foundation Examination"; APMG International.
- **2021 –** Certyfikat „PRINCE2® Foundation Certificate in Project Management"; Axelos.
- **2021 –** Certyfikat „Process Iceberg® Facilitation Methodology"; Centrum Facylitacji.
- **2021 –** Certyfikowany kurs dla Monitorów i kandydatów na Monitorów Badań Klinicznych; Brillance.
- **2021 –** Certyfikowane szkolenie „Dobór właściwej surowicy w procesie hodowli komórek"; Merck.
- **2021 –** Certyfikowane szkolenie „Autentykacja linii komórkowych. Kolekcja komórek ECACC jako wiarygodne źródło materiału badawczego"; Merck.
- **2021 –** Certyfikowane szkolenie „„Smart up your lab" - rozwiązania ułatwiające pracę i poprawiające bezpieczeństwo w laboratoriach chemicznych"; Merck.
- **2021 –** Certyfikowane szkolenie „Wyroby Medyczne-Tworzenie, badania, rejestracja"; TUV Nord Polska i Centrum Innowacji i Transferu Technologii.
- **2020 –** Certyfikowane szkolenie dla osób planujących, wykonujących, uczestniczących i uśmiercających zwierzęta w doświadczeniach; Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Zwierzętarnia Wydziału Farmaceutycznego.
- **2019 –** Certyfikowane szkolenie „Innowacyjne rozwiązania do hodowli komórek ssaczych"; Merck.
- **2019 –** Certyfikat „Goethe-Zertifikat C1"; Goethe Institut.

Staże naukowe

- **09.2022-11.2022** – Staż badawczy w zakresie oceny aktywności przeciwzapalnej różnych substancji roślinnych w modelach komórek układu immunologicznego (Warszawski Uniwersytet Medyczny, Zakład Biologii i Farmakognozji, opiekun naukowy stażu: prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Sebastian Granica).
- **09.2020-12.2020 –** Staż badawczy w zakresie hodowli linii komórkowej ludzkiego gruczolakoraka jelita grubego Caco2 (Warszawski Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny, Katedra Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii, opiekun naukowy stażu: dr hab. n. farm. Monika E. Czerwińska).
- **10.2019-11.2019 –** Staż badawczy w zakresie izolacji PBMCs z krwi obwodowej oraz oceny ich funkcji prozapalnych (Warszawski Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny, Katedra Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii; opiekun naukowy stażu: dr hab. n. farm. Monika E. Czerwińska).
- **05.2019-06.2019 –**Staż badawczy w zakresie izolacji neutrofili z krwi obwodowej oraz oceny ich funkcji pro-oksydacyjnych i prozapalnych (Warszawski Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny, Katedra Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii; opiekun naukowy stażu: dr. hab. n. farm. Monika E. Czerwińska, prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Sebastian Granica).
- **09.2018-10.2018 –** Staż badawczy w zakresie analizy aktywności enzymów zaangażowanych w procesy trawienne (α-amylazy oraz lipazy) (Warszawski Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny, Katedra Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii; opiekun naukowy stażu: dr hab. n. farm. Monika E. Czerwińska).

Prace oryginalne

1. **Magiera A.**, Kołodziejczyk-Czepas J., Skrobacz K., Czerwińska M.E., Rutkowska M., Prokop A., Michel P., Olszewska M.A. (2022). Valorisation of the inhibitory potential of fresh and dried fruit extracts of *Prunus spinosa* L. towards carbohydrate hydrolysing enzymes, protein glycation, multiple oxidants and oxidative stress-induced changes in human plasma constituents. *Pharmaceuticals*, 15, 1300, **IF_{2021}=5.215, $MEiN_{2021}$=100.**
2. Kicel A., **Magiera A.**, Skrzywanek M., Malczuk M., Olszewska M.A. (2022). The inhibition of α-glucosidase, α-amylase and protein glycation by phenolic extracts of *Cotoneaster bullatus*, *Cotoneaster zabelii*, and *Cotoneaster integerrim*us leaves and fruits: Focus on anti-hyperglycemic activity and kinetic parameters. *Molecules*, 27, 7081, **IF_{2021}=4.927, $MEiN_{2021}$=140.**
3. **Magiera A.**, Czerwińska M.E., Owczarek A., Marchelak A., Granica S., Olszewska M.A. (2022). Polyphenols and Maillard Reaction Products in dried *Prunus spinosa* fruits: Quality aspects and contribution to anti-Inflammatory and antioxidant activity in human immune cells *ex vivo*. *Molecules*, 27, 1691, **IF_{2021} = 4.927, $MEiN_{2021}$ = 140.**
4. **Magiera A.**, Czerwińska M.E., Owczarek A., Marchelak A., Granica S., Olszewska M.A. (2022). Polyphenol-enriched extracts of *Prunus spinosa* fruits: Anti-Inflammatory and antioxidant effects in human immune cells ex vivo in relation to phytochemical profile. *Molecules*, 27, 3302, **IF_{2021}=4.927, $MEiN_{2021}$=140.**

5. **Magiera A.**, Rychlińska I., Olszewska M.A. (2022). Comparative HPLC-DAD analysis of arbutin content in selected commercial spices from *Lamiaceae* available on the European market. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 79(1), 33-40, **IF_{2021}=0.555, $MEiN_{2021}$=100.**
6. Olszewska M.A., Owczarek A., **Magiera A.**, Granica S., Michel P. (2021). Screening for the active anti-inflammatory and antioxidant polyphenols of *Gaultheria procumbens* and their application for standardisation: From identification through cellular studies to quantitative determination. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11532, **IF_{2021}=6.208, $MEiN_{2021}$=140.**
7. Owczarek A., Kołodziejczyk-Czepas J., Woźniak-Serwata J., **Magiera A.**, Kobiela N., Wasowicz K., Olszewska M.A. (2021). Potential activity mechanisms of *Aesculus hippocastanum* bark: Antioxidant effects in chemical and biological *in vitro* models. *Antioxidants*, 10(7), 995, **IF_{2021}=7.675, $MEiN_{2021}$=100.**
8. Rutkowska M., Kołodziejczyk-Czepas J., Owczarek A., Zakrzewska A., **Magiera A.**, Olszewska M.A. (2021). Novel insight into biological activity and phytochemical composition of *Sorbus aucuparia* L. fruits: Fractionated extracts as inhibitors of protein glycation and oxidative/nitrative damage of human plasma components. *Food Research International*, 147, 110526, **IF_{2021}=7.425, $MEiN_{2021}$=140.**
9. **Magiera A.**, Marchelak A., Michel P., Owczarek A., Olszewska M.A. (2021). Lipophilic extracts from leaves, inflorescences and fruits of *Prunus padus* L. as potential sources of corosolic, ursolic and oleanolic acids with anti-inflammatory activity. *Natural Product Research*, 35(13), 2263-2268, **IF_{2021}=2.488, $MEiN_{2021}$=70.**
10. Olszewska M.A., Granica S., Kołodziejczyk-Czepas J., **Magiera A.**, Czerwińska M., Nowak P., Rutkowska M., Owczarek A. (2020). Variability of sinapic acid derivatives during germination and their contribution to antioxidant and anti-inflammatory effects of broccoli sprouts in human plasma and human peripheral blood mononuclear cells. *Food and Function*, 11(8), 7231-7244, **IF_{2020}= 5.396, $MNiSW_{2019}$=100.**
11. Michel P., Granica S., **Magiera A.**, Rosińska K., Jurek M., Poraj Ł., Olszewska M.A. (2019). Salicylate and procyanidin-rich stem extracts of *Gaultheria procumbens* L. inhibit pro-inflammatory enzymes and suppress pro-Inflammatory and pro-oxidant functions of human neutrophils ex vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1753, **IF_{2019}=4.556, $MNiSW_{2019}$=140.**
12. Olszewska M.A., Kołodziejczyk-Czepas J., Rutkowska M., **Magiera A.**, Michel P., Rejman M.W., Nowak P., Owczarek A. (2019). The effect of standardised flower extracts of *Sorbus aucuparia* L. on pro-inflammatory enzymes, multiple oxidants and oxidative/nitrative damage of human plasma components *in vitro. Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 9746358, **IF_{2019}=5.076, $MNiSW_{2019}$=100.**
13. **Magiera A.**, Sienkiewicz M., Olszewska M.A., Kicel A., Michel P. (2019). Chemical profile and antibacterial activity of essential oils from leaves and fruits of *Gaultheria procumbens* L. cultivated in Poland. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 76(1), 93-102, **IF_{2019}=0.456, $MNiSW_{2019}$=100.**

14. Owczarek A., **Magiera A.**, Matczak M., Piotrowska D.G., Olszewska M.A., Marchelak A. (2017). Optimisation of preparative HPLC separation of four isomeric kaempferol diglycosides from *Prunus spinosa* L. by application of the response surface methodology. *Phytochemistry Letters*, 20, 415-424, **IF_{2017}=1.575, $MNiSW_{2017}$=20**.

Prace przeglądowe

1. **Magiera A.** (2022). Das therapeutische Potenzial von *Picrorhiza kurroa* bei der Behandlung von Lebererkrankungen. Überblick über den aktuellen Wissensstand. *Zeitschrift für Phytotherapie*, 43(2), 67-72, **$MEiN_{2021}$=20.**
2. **Magiera A.**, Prokop A., Gieleta M., Olszewska M.A. (2021). Potencjał terapeutyczny owoców niepokalanka pospolitego (*Vitex agnus-castus*) w schorzeniach ginekologicznych – przegląd aktualnego stanu wiedzy. *Farmacja Polska*, 77(8), 491-502, **$MEiN_{2021}$=70.**
3. Nowak S., **Magiera A.**, Kopka K., Kicel A., Olszewska M.A. (2018). Rodzaj *Grindelia* Willd. źródłem cennych roślin leczniczych. *Farmacja Polska*, 74(9), 521-530, **$MNiSW_{2017}$=8.**
4. **Magiera A.**, Marchelak A., Owczarek A., Olszewska M.A. (2018). Profil fitochemiczny i potencjał terapeutyczny szanty zwyczajnej (*Marrubium vulgare*) – przegląd aktualnego stanu wiedzy. *Farmacja Polska*, 74(4), 210-222, **$MNiSW_{2017}$=8.**
5. Marchelak A., **Magiera A.**, Owczarek A., Olszewska M.A. (2017). Kora *Terminalia arjuna* – wskazania tradycyjnej medycyny ajurwedyjskiej w świetle współczesnych badań klinicznych. *Farmacja Polska*, 73(8), 465-473, **$MNiSW_{2017}$=8.**
6. **Magiera A.**, Marchelak A., Owczarek A. (2017). *Terminalia chebula* – wskazania tradycyjnej medycyny w świetle badań fitochemicznych i farmakologicznych. *Farmacja Polska*, 73(5), 275-284, **$MNiSW_{2017}$=8.**

Sumarczyczny współczynnik **Impact Factor** według listy JCR zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **61.406**, natomiast łączna punktacja **MEiN/MNiSW** jest równa **1652**.

Komunikaty zjazdowe

1. Gieleta M., Olszewska M.A., Marchelak A., Wiśniewska J., **Magiera A.** Zmienność sezonowa zawartości polifenoli oraz aktywności przeciwcukrzycowej liści *Prunus spinosa* L. XXIV *Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego*, Lublin (Polska), 2021, poster.
2. **Magiera A.**, Prokop A., Czerwińska M.E., Rutkowska M., Olszewska M.A. Evaluation of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) fruits activities targeting management of diabetes and related complications using *in vitro* models. *International Conference on Plant Systems Biology and Biotechnology (ICPSBB)*, Złote Piaski (Bułgaria), 2021, poster.
3. **Magiera A.**, Czerwińska M.E., Olszewska M.A. *In vitro* anti-inflammatory activity of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) fruits extracts in human immune cells. *International Conference on Plant Systems Biology and Biotechnology (ICPSBB)*, Złote Piaski (Bułgaria), 2021, poster.

4. Prokop A., Olszewska M.A., **Magiera A.** Ziele szanty zwyczajnej (*Marrubium vulgare* L.) - wskazania medycyny tradycyjnej w świetle aktualnych badań nad składem i aktywnością biologiczną. *III Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Perspektywy wykorzystania roślin w nauce i przemyśle"*, Lublin (Polska), 2020, referat ustny.
5. **Magiera A.**, Czerwińska M.E., Olszewska M.A. Analiza profilu polifenolowego ekstraktów ze świeżych i suszonych owoców *Prunus spinosa* L. oraz ocena ich wpływu na sekrecję wybranych czynników pro- i przeciwzapalnych. *Kopernikańskie E-Seminarium Doktoranckie*, Toruń (Polska), 2020, poster.
6. **Magiera A.**, Czerwińska M.E., Kołodziejczyk-Czepas J., Olszewska M.A. Wielokierunkowa aktywność świeżych i suszonych owoców *Prunus spinosa* L. – uwarunkowania fitochemiczne. *V Krajowa Konferencja Naturalne Substancje Roślinne – Aspekty Strukturalne i Aplikacyjne*, Puławy (Polska), 2019, referat ustny.
7. Olszewska M.A., Kołodziejczyk-Czepas J., Owczarek A., Rutkowska M., Michel P., **Magiera A.** Effects of *Sorbus aucuparia* flower extracts on *in vivo*-relevant oxidants and oxidative/nitrative damage of human plasma components. *11th International Symposium On Chromatography Of Natural Products*, Lublin (Poland), 2018, poster.
8. Kicel A., Owczarek A., Gralak P., **Magiera A.**, Olszewska M.A. Polyphenolic profile, antioxidant effectiveness and pro-inflamatory enzymes inhibition of flower, leaves, fruits and bark of *Cotoneaster integerrimus*. *11th International Symposium On Chromatography Of Natural Products*, Lublin (Poland), 2018, poster.
9. Michel P., Granica S., Rosińska K., **Magiera A.**, Olszewska M.A. Phytochemical profile of *Gaultheria procumbens* stem extracts and their effects on the pro-inflamatory and pro-oxidant functions of human neutrophils. *11th International Symposium On Chromatography Of Natural Products*, Lublin (Poland), 2018, poster.
10. Owczarek A., Kobiela N., **Magiera A.**, Olszewska M.A. Development of a UHPLC-PDA method for standardization of *Hippocastani cortex* by statistical and numerical optimization. *11th International Symposium On Chromatography Of Natural Products*, Lublin (Poland), 2018, poster.
11. Rutkowska M., Dubicka M., **Magiera A.**, Olszewska M.A. Variation in the phenolic profile and antioxidant activity of *Sorbus domestica* (L.) leaves during foliar development. *11th International Symposium On Chromatography Of Natural Products*, Lublin (Poland), 2018, poster.
12. **Magiera A.**, Owczarek A., Michel P., Rutkowska M., Olszewska M.A. Profil fitochemiczny i aktywność przeciwzapalna ekstraktów z kwiatów jarzębu pospolitego (*Sorbus aucuparia* L.). *II Konferencja Naukowo – Szkoleniowa Studentów Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi*, Łódź (Polska), 2018, poster.
13. **Magiera A.**, Sienkiewicz M., Olszewska M.A., Kicel A., Michel P. Analiza składu chemicznego oraz aktywności przeciwbakteryjnej olejków eterycznych z owoców i liści gaulterii rozesłanej (*Gaultheria procumbens* L.) uprawianej w Polsce, *II Konferencja Naukowo – Szkoleniowa Studentów Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi*, Łódź (Polska), 2018, poster.

14. **Magiera A.**, Marchelak A., Owczarek A. *Terminalia chebula* - tybetański "król medycyny" w świetle współczesnych badań fitochemicznych i farmakologicznych. *Konferencja Naukowa Studentów Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Kosmetologii i Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersyetu Medycznego w Łodzi „150 rocznica urodzin Marii Skłodowskiej-Curie*, Łódź (Polska), 2017, poster.

15. Owczarek A., **Magiera A.**, Marchelak A., Olszewska M.A.: Application of response surface methodology in optimization of separation of four isomeric flavonoid diglycosides from Prunus spinosa leaf. *10th International Symposium On Chromatography Of Natural Products*, Lublin (Poland), 2016, poster.

Nagrody i stypendia za działalność naukową

1. Zespołowa Nagroda Naukowa II stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za publikację „Variability of sinapic acid derivatives during germination and their contribution to antioxidant and anti-inflammatory effects of broccoli sprouts on human plasma and human peripheral blood mononuclear cells" – IF = 5.396. (2021).
2. Zespołowa Nagroda Naukowa I stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za cykl publikacji „Profil fitochemiczny oraz aktywność przeciwzapalna i antyoksydacyjna ekstraktów z wybranych substancji roślinnych z rodzaju *Sorbus* w modelach *in vitro*" – IF = 8.135. (2020).
3. Zespołowa Nagroda Naukowa II stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za cykl publikacji „Profil fitochemiczny oraz aktywność przeciwzapalna i antyoksydacyjna ekstraktów z pędów *Gaultheria procumbens* w modelach *in vitro*" – IF = 4.556. (2020).
4. Zespołowa Nagroda Naukowa III stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za cykl publikacji „Gatunki *Grindelia integrifolia* oraz *Gaultheria procumbens* źródłem olejków eterycznych o aktywności przeciwbakteryjnej" – IF=2.614. (2020).
5. Nagroda dla autora najlepszej prezentacji ustnej podczas V Krajowej Konferencji „Naturalne Substancje Roślinne – Aspekty Strukturalne i Aplikacyjne" w Puławach, (2019).
6. Zespołowa Nagroda Naukowa III stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za cykl publikacji „Zastosowanie metod statystycznych do optymalizacji rozdziałów HPLC produktów roślinnych" – IF = 3.097, (2018).
7. Stypendium Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi dla najlepszych doktorantów za osiągnięcia naukowe (2018/2019, 2019/2020, 2020/2021).

Działalność popularyzatorska

1. Wsparcie merytoryczne dla studentów Polskiego Towarzystwa Studentów Farmacji przy organizacji ogólnopolskiej akcji "Skonsultuj z Farmaceutą – Choroby Tarczycy" (Łódź, 09.04.2022).
2. Wsparcie merytoryczne dla studentów Polskiego Towarzystwa Studentów Farmacji przy organizacji ogólnopolskiej akcji "Skonsultuj z Farmaceutą – Cukrzyca" (Łódź, 20.11.2021).
3. Wykładowca w projekcie "UMED edukuje" w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 (14-23.09.2021).

4. Wsparcie merytoryczne dla studentów Polskiego Towarzystwa Studentów Farmacji przy organizacji (wraz z Okręgową Izbą Aptekarską w Łodzi) biegu "Recepta na Zdrowie - Łódź" (w ramach ogólnopolskiej akcji promującej aktywność fizyczną) (Łódź, 12.06.2021).
5. Wsparcie merytoryczne dla Studentów Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego przy organizacji ogólnopolskiej akcji profilaktycznej „Skonsultuj z Farmaceutą – Cukrzyca" (Łódź, 30.11.2019).
6. Wsparcie merytoryczne dla Studentów Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego przy organizacji ogólnopolskiej akcji profilaktycznej „Skonsultuj z Farmaceutą –Nadciśnienie tętnicze" (Łódź, 23.03.2019).

Działalność dydaktyczna

- Prowadzenie zajęć dydaktycznych z przedmiotu Farmakognozja.
- Pełnienie roli opiekuna 8 prac magisterskich.
- Opieka nad członkami Koła Naukowa przy Zakładzie Farmakognozji. W efekcie pracy w ramach Koła Naukowego powstały dwie publikacje naukowe oraz 3 komunikaty zjazdowe (w tym jeden w formie ustnej) zaprezentowane na konferencjach krajowych oraz zagranicznych.