

Streszczenie

Ostatnio przeprowadzone badania kliniczne dowodzą, że regularne spożywanie truskawek może mieć korzystny wpływ na utrzymanie dobrej kondycji zdrowotnej. Dieta wzbogacona w owoce truskawek zmniejsza ryzyko występowania chorób układu krążenia, bo: poprawia kondycję śródbłonna naczyń, hamuje agregację płytek, poprawia profil lipidowy, podnosi odporność LDL na oksydacyjną modyfikację. Udowodniono skuteczność truskawek w hamowaniu transformacji i proliferacji w różnych typach nowotworów, a także w hamowaniu rozrostu guzów nowotworowych wywołanych doświadczalnie. Nieliczne dotąd badania z udziałem ludzi potwierdzają to działanie. Ponadto dieta ta powoduje wzrost aktywności antyoksydacyjnej osocza i sprzyja inaktywacji wolnych rodników, moduluje metabolizm eicozanoidów, oraz osłabia prozapalny wpływ diety bogatej w tłuszcze i węglowodany u osób otyłych. Dlatego też dieta wzbogacona w owoce truskawek nie tylko jest atrakcyjna pod względem kulinarnym ale może sprzyjać obniżeniu ryzyka zachorowania na choroby układu sercowo-naczyniowego.

Truskawki są bogatym źródłem antyoksydantów potencjalnie bardzo silnych *in vitro* takich jak witamina C i polifenole, w szczególności antocyjany i kwas elagowy [2]. W dotychczas przeprowadzonych badaniach wykazano, że 2 - 3 h po jednorazowym spożyciu porcji truskawek wzrasta we krwi poziom metabolitów polifenoli zawartych w tych owocach – kwasów 3,4 dihydroksybenzoesowego i 4-hydroksybenzoesowego, aglikonu i glukuronidu pelargonidyny, jako metabolitów antocyjanów oraz glukuronidu urolityny będącego metabolitem elagotanin.

Kwas moczowy ma znaczący udział (sięgający 60-70%) w zdolności antyoksydacyjnej osocza. Może to maskować antyoksydacyjne działanie wchłanianych fitozwiązków w wyniku wzbogacenia diety w bogate w polifenole owoce.

Dlatego też celem pracy było przeprowadzenie badań klinicznych mających odpowiedzieć na sformułowane poniżej pytania :

- Czy wzbogacenie diety w truskawki 500 g dziennie przez 9 dni zwiększy zdolność antyoksydacyjną osocza mierzoną testem FRAP i DPPH u zdrowych ochotników?

- Czy efekt ten zależy od czasu trwania interwencji dietetycznej i godziny pobrania krwi (krew pobrana 3 godziny po zjedzeniu truskawek i na czczo)?
- Czy kwas moczowy „maskuje” wpływ konsumpcji truskawek na zdolność antyoksydacyjną osocza (porównanie potencjału antyoksydacyjnego próbek osocza natywnych i pozbawionych kwasu moczowego)?
- Czy jednorazowa dawka witaminy C odpowiadająca ilości tej witaminy zawartej w 500 g truskawek ma wpływ na zdolność antyoksydacyjną osocza?
- Czy konsumpcja truskawek spowoduje wzrost stężenia wybranych polifenoli, w szczególności metabolitów antocyjanów i elagotanin, w próbkach osocza i ich wydalania w moczu u zdrowych ochotników?

W tym celu wykonano dwa badania kliniczne - interwencja dietetyczna polegająca na wprowadzeniu do diety truskawek (dawka 500 g dziennie) o dokładnie scharakteryzowanej zawartości fitozwiązków w szczególności polifenoli.

W obu doświadczeniach oznaczano:

- zdolność antyoksydacyjną metodami FRAP i DPPH, w osoczu natywnym oraz po enzymatycznym usunięciu z osocza kwasu moczowego, na czczo i - w drugim doświadczeniu - 3 h po spożyciu truskawek.
- stężenie kwasu moczowego w osoczu
- stężenie polifenoli w osoczu i w moczu

Celem pierwszego badania było sprawdzenie, czy spożycie truskawek podnosi zdolność antyoksydacyjną osocza na czczo u osób pozostających na diecie zubożonej w polifenole. W badaniu wzięło udział 10 ochotników (wiek 41 ± 6 lat, masa ciała 74.4 ± 12.7 kg) spożywających porcję truskawek 500 g dziennie (miedzy godziną 11.00 a 11.30) przez 9 dni oraz 7 osób z grupy kontrolnej. W dniach wizyt kontrolnych (0, 3, 6, 9, 12, 15 i 21 dzień) pobierano krew na czczo i poranny mocz. W obu grupach stężenie kwasu moczowego oraz test DPPH nie uległy zmianie w ciągu 21 dni obserwacji. Jednak enzymatyczne usunięcie kwasu moczowego z osocza ujawniło pozytywny wpływ włączenia truskawek do diety - test DPPH wykazał wzrost z $5.7 \pm 0.6\%$ do $6.6 \pm 0.6\%$, $6.5 \pm 1.0\%$ and $6.3 \pm 1.4\%$ po 3, 6 i 9 dniach suplementacji owocami i spadek po okresie wypłukiwania do $5.7 \pm 0.8\%$ ($p < 0.01$). Zaznaczył się znaczący wzrost wydalania z moczem urolityny A i kwasu 4-hydroksohipurowego (odpowiednio 5.7 i 8.9 razy po 6 dniach spożycia truskawek).

Protokół drugiego doświadczenia nie narzucał ochotnikom żadnych restrykcji dietetycznych. Jedenastu osobom spożywającym truskawki (500 g dziennie przez 9 dni) oraz 15 osobom z grupy kontrolnej w dniach wizyt (0, 3, 7, 11, 14) pobierano krew na czczo oraz o godz. 14.30 (3 h po spożyciu owoców) oraz zbierano 24 godzinny moczu. Po pierwszej, piątej i dziewiątej dawce truskawek, 3 h po spożyciu owoców testy mierzące zdolność antyoksydacyjną w osoczu z którego usunięto kwas moczowy wykazały podwyższone wartości DPPH (odp. o 17.4, 17.6 i 12.6%) i FRAP (o 15.5, 25.6 i 21.4%), ($p < 0.05$). W osoczach natywnych trend wzrostowy wartości testów po posiłku nie był potwierdzony statystycznie. Spożycie truskawek podwyższało wydalanie urolityny A i kwasu 4-hydroksohipurowego, choć nie stwierdzono wzrostu stężenia polifenoli w osoczu. Trzy godziny po przyjęciu doustnej dawki witaminy C (równoważnej jej zawartości w 500 g truskawek) nie zaobserwowano wzrostu testów FRAP i DPPH tak w osoczu natywnym jak i pozbawionym kwasu moczowego.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń udowodniły, że:

- U zdrowych dorosłych osób będących na swojej „normalnej” codziennej diecie wzrost zdolności antyoksydacyjnej osocza 3 godziny po spożyciu 500 g truskawek jest przemijający i wyraźnie widoczny tylko w osoczu pozbawionym kwasu moczowego.
- Regularna konsumpcja truskawek nie zwiększa zdolności antyoksydacyjnej osocza krwi pobranej na czczo od osób będących na „normalnej diecie.”
- Wprowadzenie do diety truskawek zwiększa zdolność antyoksydacyjną osocza krwi pobranej na czczo ale tylko w przypadku próbek pozbawionych kwasu moczowego i u osób na diecie ubogo-polifenolowej.
- Osocze pozbawione kwasu moczowego jest optymalnym materiałem do monitorowania wpływu interwencji dietetycznej na całkowitą aktywność krążących antyoksydantów.

Summary

Most clinical studies were conducted that regular consumption of strawberries can have potential health promoting effects. This may include cardiovascular protection: improve in endothelium condition, decrease in platelet aggregation, improve in lipid profile, decrease in low-density lipoprotein peroxidative damage. It has been proven effective in inhibiting the transformation and proliferation in different types of cancer, as well as inhibiting the growth of tumours induced experimentally

Strawberries are a rich source of antioxidants, potentially very strong in vitro such as vitamin C and polyphenols, in particular anthocyanins and ellagic acid [2]. The studies carried out so far show that 2 – 3 hours after a single consumption of a portion of strawberries increases in the blood the level of polyphenol metabolites contained in these fruits – 3,4 dihydroxybenzoic acid and 4-hydroxybenzoic acid, aglycone and pelargonidin glucuronide, as anthocyanin metabolites and urolithin glucuronide being a metabolite of ellagitannins.

The uric acid has a significant share (up to 60-70%) in the plasma antioxidant activity. It can mask the antioxidant activity of the absorbed fitocompounds as a result of enriching the diet in the rich in polyphenols fruits.

Therefore, the objective of this doctoral thesis was to conduct the clinical studies supposed to give answers to the following questions:

- Does the including of strawberries in the diet (500 g daily for 9 days) increase the plasma antioxidant activity measured by FRAP and DPPH-tests among the healthy volunteers?
- Does the result depend on the duration of the dietary intervention and the time of blood collection (fasting blood and blood collected 3 hours after consumption of strawberries)?
- Does the uric acid mask the influence of the strawberries consumption on the plasma antioxidant activity (comparison of the antioxidant potential of the native plasma and non-urate samples)?
- Does the single dosis of vitamin C equivalent to the amount of this vitamin that is in 500 g of strawberries have the impact on the plasma antioxidant activity?

- Does the strawberries consumption cause the increase of the concentration of the selected polyphenols, in particular anthocyanins and ellagotannins in plasma samples and their elimination with urine among healthy people?

There were conducted two clinical studies – the dietary intervention that added to the diet the strawberries (daily dosis – 500 g) of a precisely determined content of fitocompounds, especially polyphenols.

In both studies determined:

- The antioxidant activity in native and non-urate, fasting and, in the second study, 3 hours after strawberries consumption plasma, by FRAP and DPPH methods.
- Uric acid concentration in plasma
- Polyphenols concentration in plasma and urine

The objective of the first study was to examine whether the consumption of the strawberries increases the fasting plasma antioxidant activity among people who stay on a diet enriched in polyphenols. The study involved 10 volunteers (age 41 ± 6 years, body weight 74.4 ± 12.7 kg) that consumed 500 g of strawberries daily for 9 days and 7 matched controls. Fasting plasma and spot morning urine samples were collected at baseline, during fruit consumption and after a 6 day wash-out period. In both groups the uric acid concentration and DPPH test did not change during 21 days of observation. However, the enzymatic removing of uric acid from plasma revealed the positive influence of including the strawberries in the diet. Non-urate plasma DPPH decomposition increased from $5.7 \pm 0.6\%$ to $6.6 \pm 0.6\%$, $6.5 \pm 1.0\%$ and $6.3 \pm 1.4\%$ after 3, 6 and 9 days of supplementation, respectively. The wash-out period reversed this activity back to $5.7 \pm 0.8\%$ ($p < 0.01$). Significant increase in urinary urolithin A and 4-hydroxyhippuric (by 8.7- and 5.9-times after 6 days of supplementation with fruits) was noted.

The second study with healthy volunteers did not impose any dietary restrictions.

Eleven subjects and fifteen subjects from a control group consumed strawberries (500 g daily for 9 days). During control visits (days: 0, 3, 7, 11, 14) fasting and 3-h postprandial (3 hours after consumption of fruits) blood and 24-h urine were collected.

First, 5th and 9th strawberry dose increased 3-h postprandial DPPH-test by 17.4, 17.6 and 12.6%, and FRAP by 15.5, 25.6 and 21.4% in comparison to fasting values in non-urate plasma ($p < 0.05$). In native plasma only a trend was observed to higher postprandial values for both tests. Strawberries increased urinary urolithin A and 4-hydroxyhippuric acid whereas

plasma polyphenols were stable. No changes of FRAP and DPPH-test were noted after 3 hours from ascorbate intake (equivalent of 500 g of strawberries) in the native and non-urate plasma.

The results of the conducted studies proved that:

- Among healthy adult people staying on their usual diet, the increase of the plasma antioxidant activity 3 hours after the consumption of 500 g of the strawberries is transient and clearly apparent only in the non-urate plasma.
- Regular strawberry consumption does not increase the fasting plasma antioxidant activity among people staying on their usual diet.
- Including the strawberries into the diet increases the fasting plasma antioxidant activity, but only in non-urate samples and in people remaining on a diet impoverished in polyphenols.
- The non-urate plasma is an optimal material for the monitoring the impact of dietary intervention on the total activity of circulating antioxidants.