PAŃSTWO I SPOŁECZEŃSTWO
STATE AND SOCIETY
E-ISSN 2451-0858 ISSN 1643-8299 ROK XXIII: 2023, NR 1

DOI: 10.48269/2451-0858-pis-2023-1-006
Data wpłynięcia: 30.11.2022
Data akceptacji: 8.06.2023

LIOFILIZOWANE OWOCE RÓŻY OBNIŻAJĄ POZIOM KORTYZOLU U STUDENTÓW PO STRESIE EGZAMINACYJNYM

Małgorzata Kalemba-Drożdż A–F
ORCID: 0000-0002-7017-3279

Agnieszka Cierniak A–C,E–F
ORCID: 0000-0001-6537-2954

Agata Grzywacz-Kisielewska A–B,E–F
ORCID: 0000-0001-6950-4475

Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Zakład Biochemii

A – Koncepcja i projekt badania, B – Gromadzenie i/lub zestawianie danych, C – Analiza i interpretacja danych, D – Napisanie artykułu, E – Krytyczne zrecenzowanie artykułu, F – Zatwierdzenie ostatecznej wersji artykułu

Autor do korespondencji

Małgorzata Kalemba-Drożdż
Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Zakład Biochemii,
ul. Gustawa Herlinga Grudzińskiego 1, 30-705 Kraków
email: mkalemba-drozdz@afm.edu.pl

Streszczenie

Wprowadzenie: Ekstrakty roślinne bogate w polifenole mogą modyfikować poziom stresu. Celem projektu było zbadanie, czy liofilizowane owoce róży (*Rosa rugosa*) przyjmowane doustnie przez studentów wpływają na poziom kortyzolu przed i po silnie stresującym egzaminie.
Materiał i metody: Badanie o charakterze podwójnie ślepej próby objęło zdrowych ochotników rekrutowanych pośród studentów kierunków medycznych. Uczestnicy w grupie badanej przyjmowali kapsułki

zawierające po 400 mg liofilizowanych mielonych owoców róży przez pięć kolejnych dni poprzedzających egzamin (stresor). W tym czasie grupa kontrolna przyjmowała placebo. Uczestnicy wypełnili ankietę dotyczącą ich płci, stylu życia, historii chorób, aktywności fizycznej, stosowanej diety, używek, leków i suplementów diety. Próbki śliny do oznaczenia poziomu kortyzolu zostały pobrane trzykrotnie: rano przed rozpoczęciem fazy eksperymentalnej, rano przed stresorem oraz godzinę po ustąpieniu stresora. Poziom kortyzolu w ślinie oznaczono metodą immunoenzymatyczną.
Wyniki: Stwierdzono, że przyjmowanie liofilizowanych owoców róży przez pięć dni istotnie zmniejsza poziom kortyzolu u studentów po egzaminie w porównaniu z grupą przyjmującą placebo. Nie wykazano różnic w poziomie kortyzolu przed egzaminem niezależnie od przyjmowanego preparatu. Żaden inny analizowany czynnik nie wpływał na stężenie hormonu stresu u studentów.
Wnioski: Liofilizowane owoce róży mogą pomagać w osłabieniu skutków stresu.
Słowa kluczowe: kortyzol, kortyzol w ślinie, stres, owoce róży, *Rosa rugosa*, stres egzaminacyjny, stresor, polifenole, flawonoidy, antocyjany

Wprowadzenie

Organizm ludzki nieustannie reaguje na wewnętrzne i zewnętrzne czynniki stresogenne, co powoduje uwalnianie kortyzolu. Główną funkcją fizjologiczną kortyzolu jest: podniesienie ciśnienia krwi, podniesienie stężenia glukozy i aminokwasów we krwi, hamowanie odpowiedzi układu odpornościowego, regulacja absorpcji wapnia oraz wydzielania kwasu żołądkowego. Kortyzol pozwala organizmowi pozostać w stanie wysokiej gotowości [1]. Ten hormon steroidowy jest używany jako marker pobudzenia osi podwzgórze–przysadka–kora nadnerczy w odpowiedzi na stres [2].

Kortyzol jest syntetyzowany w warstwie pasmowatej kory nadnerczy z cholesterolu. Uwalnianie kortyzolu jest kontrolowane przez oś podwzgórze–przysadka–nadnercza (HPA). Hormon uwalniający kortykotropinę (CRH) jest uwalniany przez jądro przykomorowe (PVN) podwzgórza. CRH działa na przedni płat przysadki, uwalniając hormon adrenokortykotropowy (ACTH), który zwiększa liczbę receptorów LDL na błonie komórkowej i podnosi aktywność limitującego enzymu szlaku syntezy kortyzolu: desmolazy cholesterolowej. Wydzielanie kortyzolu jest regulowane w pętli ujemnego sprzężenia z ACTH oraz CRH. Oś HPA podlega rytmowi okołodobowemu. Większość kortyzolu krąży w krwiobiegu w postaci nieaktywnej, związanej z globuliną wiążącą kortykosteroidy (CBG) lub albuminą. Kortyzol jest odwracalnie konwertowany z kortyzonu przez dehydrogenazę 11-beta-hydroksysteroidową 1 (HSD11B1) i z powrotem przez HSD11B2 [3]. Stężenie kortyzolu we krwi i ślinie jest skorelowane, dzięki czemu możliwa jest nieinwazyjna ocena poziomu stresu poprzez oznaczanie kortyzolu w próbkach śliny [4–6]. Związek pomiędzy stresem a indukcją stanów zapalnych, które z kolei mogą prowadzić do rozwoju chorób cywilizacyjnych, został dobrze opisany [7–9]. Tymczasem liczne badania wskazują, że ekstrakty roślinne zasobne w przeciwutleniacze,

np. zielona herbata [10] czy ekstrakt z granatu [11], pomagają obniżać poziom kortyzolu w ślinie w reakcji na stresor.

Owoce róży pomarszczonej (*Rosa rugosa*), uprawianej w Polsce na dużą skalę, są łatwo dostępnym suplementem roślinnym i wraz z innymi gatunkami róż stanowią składnik tradycyjnej diety. Preparaty z owoców róży, takie jak intrakt czy sok, wykazują silne działanie antyoksydacyjne [12–14]. Badania wskazują, że ekstrakty z owoców róży zmniejszają poziom uszkodzeń DNA w limfocytach ludzkich poddanych działaniu stresu oksydacyjnego [15].

Interesujące jest zatem zbadanie, czy suplementy diety o działaniu antyoksydacyjnym mogłyby znaleźć zastosowanie w obniżaniu poziomu kortyzolu oraz łagodzeniu skutków stresu. Celem niniejszego projektu była próba odpowiedzi na pytanie, czy liofilizowane owoce róży (*Rosa rugosa*) przyjmowane doustnie przez studentów wpływają na poziom kortyzolu przed i po silnie stresującym egzaminie.

Materiał i metody

Przygotowanie badania

Projekt uzyskał zgodę uczelnianej komisji bioetycznej nr KBKA/50/O/2019. Każda rekrutowana osoba zapoznała się z jego celem i wyraziła pisemną zgodę na udział w badaniu, w tym zgodę na przetwarzanie danych osobowych na podstawie wymogów ogólnego rozporządzenia o ochronie danych osobowych z dnia 27.04.2016 r. (RODO). Wszystkie dane uczestników były traktowane jako dane poufne i posłużyły wyłącznie celom realizacji projektu. Dane publikowane w projekcie mają wyłącznie charakter opisu statystycznego badanej grupy i w żaden sposób nie umożliwią identyfikacji poszczególnych osób.

Rekrutacja uczestników odbywała się przed rozpoczęciem sesji egzaminacyjnej pośród studentów kierunku lekarskiego, pielęgniarstwa, dietetyki, i kosmetologii Krakowskiej Akademii im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego. Uczestnicy badania wypełnili ankietę dotyczącą płci, parametrów antropometrycznych, stylu życia, historii chorób, aktywności fizycznej, historii rozrodczej, stosowanej diety, używek, leków i suplementów diety. Do badania nie rekrutowano osób, u których występowały schorzenia przewlekłe. Zrekrutowano 120 osób spełniających zakładane parametry zdrowotne.

Badanie zostało przeprowadzone z podwójną ślepą próbą. Jako placebo służyły nieprzezroczyste kapsułki z 120 mg glukozy, wyglądające identycznie jak kapsułki z 400 mg liofilizowanych, mielonych owoców róży. Każdy uczestnik badania otrzymał zakodowany zestaw doświadczalny zapakowany w nieprzeźroczystą kopertę, zawierający 6 kapsułek z owocami róży lub placebo (pięć wymaganych przeprowadzeniem badania i jedną zapasową) oraz 3 sterylne opisane probówki o pojemności 5 ml wraz z dokładną instrukcją postępowania

odnośnie do przyjmowania suplementu, a także pobierania, przechowywania i dostarczenia próbek. Studenci do grupy badanej (owoce róży) i grupy referencyjnej (placebo) byli przydzielani losowo przez osobę rekrutującą, która nie znała sposobu kodowania próbek. Studenci deklarowali, który egzamin w sesji jest w ich przekonaniu najbardziej stresogenny, i na podstawie tej informacji ustalano dla nich indywidualny harmonogram pobierania i deponowania próbek.

Przygotowanie preparatów

Komercyjnie dostępne liofilizowane owoce róży pomarszczonej (*Rosa rugosa*; Premium Rosa, Polska), potocznie – ale nieprawidłowo – nazywanej dziką różą, zostały zbadane pod kątem zawartości witaminy C metodą Tillmansa oraz zawartości polifenoli, flawonoidów, antocyjanów i karotenoidów metodami spektrofotometrycznymi zgodnie z wcześniej opisanymi protokołami [12,16]. Przed oznaczeniem 10 g sproszkowanego preparatu zawieszono w 100 ml buforu odpowiedniego do stosowanej metody i wytrząsano intensywnie przez dziesięć minut.

W sterylnych warunkach przygotowano nieprzezroczyste kapsułki żelatynowe zawierające minimum 400 mg liofilizowanych, mielonych owoców róży. Każda kapsułka była ważona, dopuszczalna maksymalna zawartość liofilizatu wynosiła do 450 mg. Uwzględniając skład preparatu owoców róży (tabela 1), jako placebo przygotowano nieprzezroczyste kapsułki zawierające 120 mg ± 20 mg glukozy (Merck, Germany), wyglądające dokładnie tak samo jak kapsułki ze sproszkowanymi owocami róży.

Zestawy doświadczalne z kapsułkami zostały zakodowane przez inną osobę niż osoba rozdająca zestawy uczestnikom, aby ani uczestnicy badania, ani osoby rekrutujące oraz wykonujące analizę poziomu kortyzolu nie wiedzieli, które zestawy zawierają aktywny składnik, a które placebo.

Pobieranie próbek

Uczestnicy badania zostali poproszeni o pobranie pierwszej próbki śliny rano pierwszego dnia eksperymentu, tj. na pięć dni przed stresorem (egzamin). Wieczorem od pierwszego do piątego dnia przyjmowali kapsułkę z owocami róży lub placebo. W dniu egzaminu po przebudzeniu uczestnicy pobrali próbkę śliny nr 2. Po zakończeniu egzaminu badani odczekali godzinę bez spożywania posiłku i pobrali próbkę śliny nr 3. Próbki były pobierane na czczo (w przypadku próbki nr 3 występowały przynajmniej trzy godziny wstrzemięźliwości od pokarmu) po wstępnym przepłukaniu ust czystą wodą i niezwłocznie zamrożone w -20°C, a następnie przekazane autorom badania. Próbki do czasu oznaczenia były przechowywane w temperaturze -80°C.

Oznaczenie stężenia kortyzolu w ślinie

Do oznaczenia stężenia kortyzolu w ślinie zastosowano komercyjny kompetycyjny test immunoenzymatyczny DRG Salivary Cortisol ELISA Kit SLV-2930 (DRG Diagnostics GmbH, Niemcy), w którym kortyzol z próbki pacjenta konkuruje z koniugatem kortyzol-peroksydaza chrzanowa o wiązanie do przeciwciał powlekających płytkę. Po inkubacji niezwiązany koniugat jest wypłukiwany, a ilość związanego do płytki koniugatu kortyzol-peroksydaza jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia kortyzolu w próbce, a zatem po dodaniu substratu dla peroksydazy intensywność barwy powstającego produktu reakcji enzymatycznej jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia kortyzolu w badanej próbce.

W celu wykonania oznaczenia odmierzono po 100 µl każdego roztworu standardowego, próbek kontrolnych oraz badanych do studzienek płytki 96-dołkowej powleczonej przeciwciałami rozpoznającymi kortyzol. Następnie dodano po 200 µl roztworu przeciwciał skoniugowanych z peroksydazą chrzanową. Mieszano przez 10 sekund, po czym inkubowano przez 60 minut w temperaturze pokojowej na wytrząsarce obrotowej. Po inkubacji pięciokrotnie przepłukano studzienki roztworem płuczącym (400 µl na studzienkę). Następnie dodano po 200 µl roztworu substratu do każdego dołka i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Reakcję enzymatyczną zatrzymano przez dodanie do każdego dołka po 100 µl roztworu blokującego. Niezwłocznie zmierzono absorbancję próbek przy długości fali 450 nm za pomocą spektrofotometru LEDetect (Labexim, Austria). Ponieważ zastosowany test ma charakter kompetycji, intensywność zabarwienia dołków jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia kortyzolu w badanych próbkach.

Każdą próbkę analizowano w dwóch powtórzeniach. Średnie wyniki pomiarów odniesiono do uzyskanej logarytmicznej krzywej standardowej. W celu utrzymania wysokiej jakości oznaczenia został wykonany intra-assay. Jako wartość potwierdzającą wysoką jakość oznaczenia przyjęto wynik mniejszy niż 10.

Analizy prowadzono w pomieszczeniach przystosowanych do pracy z materiałem zakaźnym, wyposażonych w śluzy oraz komory laminarne klasy II.

Analiza statystyczna

W celu ustalenia, czy istnieją zależności pomiędzy stężeniem kortyzolu w ślinie a przyjmowaniem suplementu oraz czynnikami zaburzającymi, przeprowadzono analizę statystyczną za pomocą oprogramowania Statistica 10 (StatSoft, USA). Istotność statystyczną różnic określono przy pomocy testu *U* Manna-Whitney'a oraz testem Fishera. Analizę wariancji pomiędzy kolejnymi punktami doświadczalnymi oceniano jednoczynnikowym testem ANOVA Kruskala-Wallisa, jak również w podziale na grupy. Jako granicę istotności przyjęto wartość $p < 0,05$. Korelacje między zmiennymi analizowano za pomocą regresji liniowej, a do określenia siły korelacji wykorzystano współczynnik korelacji liniowej Pearsona.

Wyniki

Zawartość podstawowych składników odżywczych została oznaczona przez producenta liofilizatu. Stwierdzono, że preparat zawiera znaczne ilości związków polifenolowych. Zanalizowany skład fitochemiczny liofilizowanych owoców róży zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Skład preparatu liofilizowanych owoców róży

Składnik	Zawartość w 100 g s.m.	Odch. st.	Zawartość w 1 kapsułce 400 mg	Odch. st.
Karotenoidy	12,1 µg	1,90	0,05 µg	0,01
Polifenole	1889 mg	48,20	7,56 mg	0,74
Flawonoidy	493 mg	36,20	1,97 mg	0,20
Antocyjany	1286 mg	54,70	5,07 mg	0,49
Kwas askorbinowy	1390 mg	34,10	5,56 mg	0,70
Sacharydy	28 g	DP	112 mg	14
Cukry	15 g	DP	60 mg	7,50
Błonnik	52 g	DP	208 mg	26
Białko	4 g	DP	16 mg	2
Lipidy	2,9 g	DP	11,60 mg	1,45

DP – deklaracja producenta; odch. st. – odchylenie standardowe; s.m. – sucha masa

Docelowo projekt miał obejmować 120 osób, jednak po wykluczeniu uczestników, którzy w trakcie trwania eksperymentu zachorowali na infekcje dróg oddechowych, uczestników, którzy nie dostarczyli wszystkich próbek lub przechowywali je w niewłaściwy sposób, oraz usunięciu niepełnych danych, ostatecznie zebrano 50 kompletnych rekordów i w analizie statystycznej uwzględniono wyniki stężenia kortyzolu zmierzonego w 150 próbkach śliny.

Statystyki podstawowe dotyczące badanych grup studentów przyjmujących owoce róży i placebo zebrano w tabelach 2a i 2b.

Tabela 2a. Charakterystyka antropometryczna uczestników badania: studentów przyjmujących liofilizowane owoce róży oraz grupy referencyjnej przyjmującej placebo

	Całość (N = 50)	Placebo (N = 24)	Owoce róży (N = 26)	Test *U*
	mediana (I–III *Q*)	mediana (I–III *Q*)	mediana (I–III *Q*)	p
Wiek [lata]	24 (20–35)	22,5 (20–27)	26 (21–35)	>0,05
Masa ciała [kg]	60 (57–74)	57 (54–76,8)	63 (58–69)	>0,05
Wzrost [m]	1,69 (1,63–1,75)	1,68 (1,60–1,75)	1,69 (1,65–1,75)	>0,05
BMI [kg/m^2]	22,4 (20,3–24,0)	21,6 (20,7–24,4)	22,6 (20,8–23,1)	>0,05
Obwód talii [cm]	75 (70–87)	74 (71,5–81)	75 (72,3–87,3	>0,05
Obwód bioder [cm]	99 (92–100)	92 (87–102,5)	99 (95,8–100)	>0,05
WHR	0,81 (0,72–0,88)	0,81 (0,76–0,86)	0,81 (0,71–0,89)	>0,05

Q – kwartyl

Tabela 2b. Charakterystyka stylu życia uczestników badania: studentów przyjmujących liofilizowane owoce róży oraz grupy referencyjnej przyjmującej placebo

	Całość (N = 50)	Placebo (N = 24)	Owoce róży (N = 26)	Test Fishera
	n (%)	n (%)	n (%)	p
Płeć: kobieta/mężczyzna	37(74) / 13(26)	18(75) / 6(25)	19(73) / 7(27)	>0,05
Dieta: tradycyjna/bezmięsna	40(80) / 10(20)	20(83) / 4(17)	20(77) / 6(23)	>0,05
Aktywność: sport/brak	39(78) / 11(22)	19(79) / 5(21)	20(77) / 6(23)	>0,05
Palenie: tak/nie	9(18) / 41(82)	3(13) / 21(88)	6(23) / 20(77)	>0,05
Miejsce zamieszkania: <100 tys. / >100 tys.	28(56) / 22(44)	12(50) / 12(50)	16(62) / 10(38)	>0,05

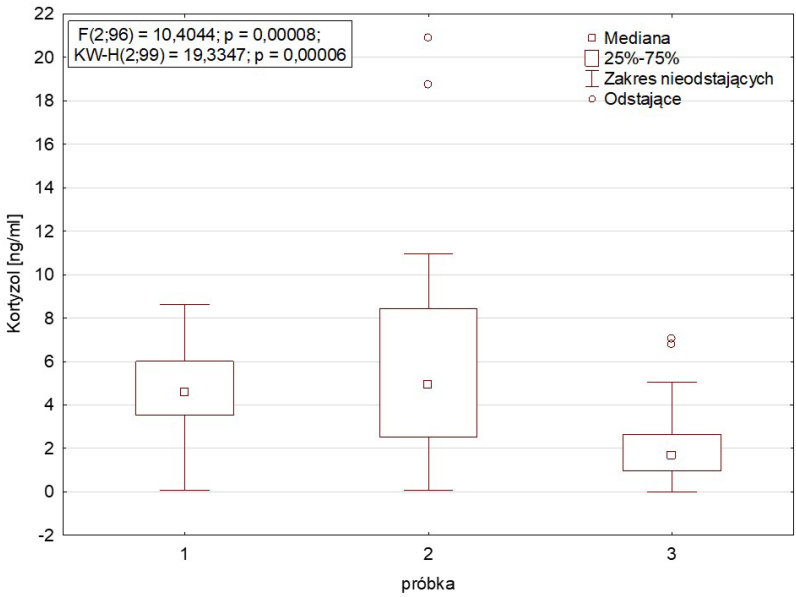
Kobiety uczestniczące w badaniu nie zadeklarowały żadnej historii rozrodczej. Wśród uczestników nie było osób skrajnie niedożywionych ani otyłych. Średnie BMI mieściło się w normie. Grupa przyjmująca owoce róży nie różniła się znacząco od grupy przyjmującej placebo pod względem budowy ciała, zachowań zdrowotnych czy wielkości miejscowości zamieszkania.

Nie stwierdzono występowania żadnych korelacji pomiędzy stężeniem kortyzolu a parametrami antropometrycznymi uczestników projektu. Analizy wykonywano zarówno na całości zebranych danych, jak i w podziale na grupy.

Uzyskany wynik intra-assay dla oznaczenia stężenia kortyzolu w ślinie wynosił 6,2, co potwierdza jakość i powtarzalność uzyskanych wyników.

Stwierdzono występowanie istotnie statystycznych różnic w poziomie stężenia kortyzolu w próbkach śliny pobranych po godzinie od ustąpienia stresora

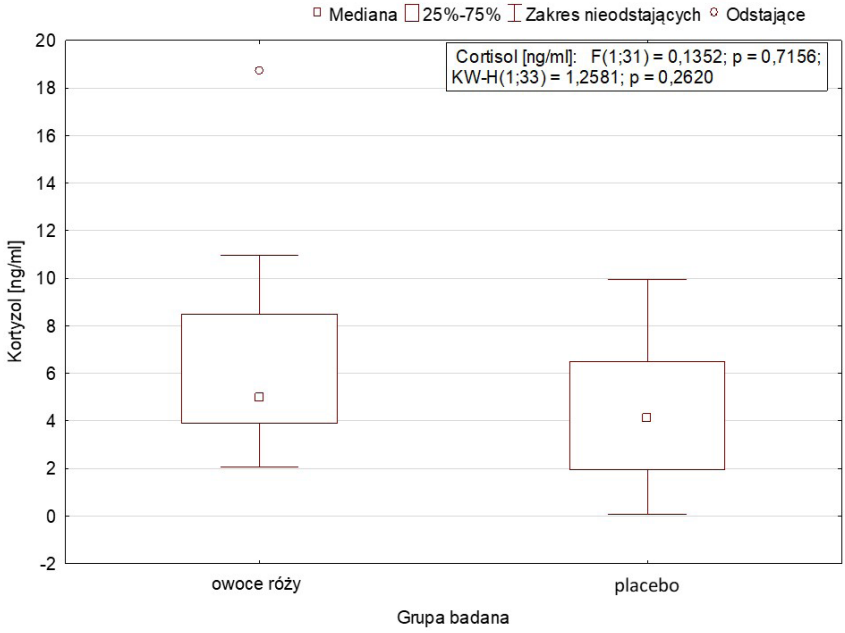
(próbka nr 3) w porównaniu ze stężeniem kortyzolu w próbkach pobranych rano przed wystąpieniem stresora (próbka nr 2) oraz w próbkach kontrolnych (próbka nr 1) (p = 0,001). Wyniki testu ANOVA przedstawiono na rycinie 1. Jednak ze względu na bardzo dużą rozpiętość wyników nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu kortyzolu między próbkami kontrolnymi (próbka nr 1) a próbkami pobranymi rano w dniu egzaminu (próbka nr 2) (p = 0,569) (rycina 1).



Rycina 1. Wyniki analizy wariancji stężenia kortyzolu w ślinie wszystkich studentów uczestniczących w projekcie. 1 – próbka kontrolna pobrana przed rozpoczęciem eksperymentu; 2 – próbka pobrana rano w dniu egzaminu; 3 – próbka pobrana godzinę po ustąpieniu stresora.

Zaobserwowano, że początkowy poziom kortyzolu u studentów był bardzo zróżnicowany zarówno w grupie przyjmującej owoce róży, jak i grupie referencyjnej.

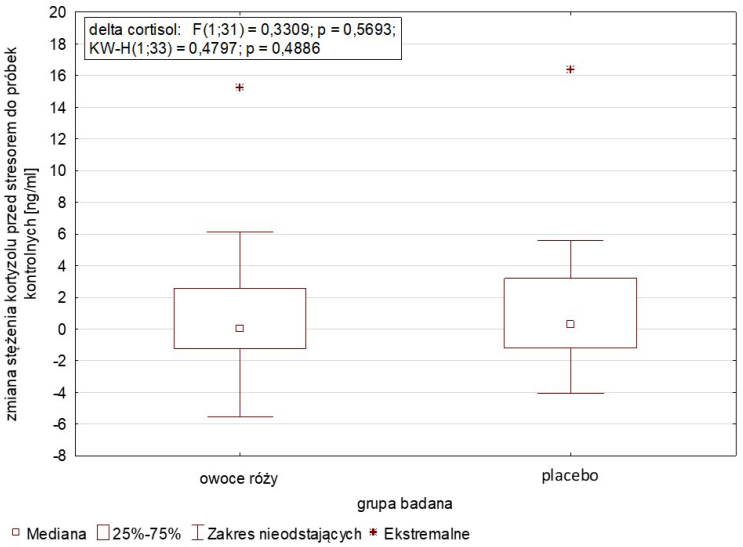
Nie stwierdzono występowania różnicy istotnej statystycznie między grupą przyjmującą różę a grupą referencyjną (p = 0,2620) dla stężenia kortyzolu w ślinie w próbkach pobranych przed stresorem (rycina 2) ani w próbkach kontrolnych pobranych przed rozpoczęciem eksperymentu (p = 0,1238).



Rycina 2. Wyniki analizy wariancji dla stężenia kortyzolu w ślinie studentów przed wystąpieniem stresora między grupą przyjmującą liofilizowane owoce róży a grupą referencyjną.

Podobnie nie zaobserwowano istotnie statystycznych różnic między stężeniem kortyzolu w próbkach śliny pobranych od dwóch grup studentów w godzinę po ustąpieniu stresora ($p = 0,132$).

Jednak ze względu na dużą rozpiętość wyników w poszczególnych punktach pomiarowych wykonano analizę wariancji dla zmian stężenia kortyzolu pomiędzy punktami pomiarowymi. Nie stwierdzono różnic w zmianach stężenia kortyzolu między próbkami pobranymi przed stresorem do próbki kontrolnej pobranej przed rozpoczęciem eksperymentu między grupą studentów przyjmującą placebo a grupą przyjmującą owoce róży ($p = 0,4886$) (rycina 3).



Rycina 3. Wynik testu ANOVA dla zmian stężenia kortyzolu w próbkach śliny pobranych rano przed stresorem a stężeniem oznaczonym w próbkach kontrolnych, czyli pobranych przed rozpoczęciem przyjmowania preparatów: owoców róży lub placebo.

Jednak porównanie zmian stężeń kortyzolu w próbkach pobranych godzinę po ustąpieniu stresora do próbek kontrolnych wykazało występowanie znaczących statystycznie różnic. Wyniki analizy wariancji przedstawiono na rycinie 4.

Rycina 4. Wyniki testu ANOVA dla zmian stężenia kortyzolu w próbkach śliny pobranych godzinę po ustąpieniu stresora a stężeniem oznaczonym w próbkach kontrolnych dla grup przyjmujących różne preparaty: owoce róży lub placebo.

Dyskusja

Skład preparatu z liofilizowanych owoców róży był zgodny z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy [13,14,17–22] i zostało potwierdzone, że jest on dobrym źródłem związków polifenolowych. Wiele badań wskazuje, że surowce zawierające duże ilości polifenoli, jak zielona herbata, granaty, kakao czy cytrusy, mogą obniżać stężenie wskaźników stresu, m.in. stężenie kortyzolu [10,11,23–27]. Jednak efekt ten nie jest obserwowany zawsze, a czasami otrzymane wyniki są kompletnie przeciwstawne. W badaniach prowadzonych przez Szelényi i wsp. nad resweratrolem wykazano, że może on obniżać produkcję kortyzolu [27], jednak wyniki uzyskane przez Li i wsp. wskazują, że ten sam związek może stymulować syntezę hormonu stresu [28]. Katechiny z kakaowca wykazały działanie antystresowe [24] w projekcie realizowanym przez Ruijtersa i wsp., natomiast w publikacji Tsanga i wsp. nie wykazano efektu ochronnego ciemnej czekolady przeciwko stresowi [29]. Bogate w związki polifenolowe i inne przeciwutleniacze ekstrakty z żeńszenia również nie wykazały żadnego wpływu na poziom stresu [30].

Świeże owoce róży pomarszczonej i innych gatunków róż znane są z wysokiej zawartości witaminy C [12–14,17–22], jednak nawet jeśli w trakcie przetwarzania surowca większa część tej witaminy jest tracona, ekstrakty z owoców róży nadal są zasobnym źródłem przeciwutleniaczy z grupy polifenoli, szczególnie: flawonoidów – katechiny, kwercytryny, kwercetyny; kwasów fenolowych – galusowego, chlorogenowego i elagowego; oraz karotenoidów – karotenów, luteiny i likopenu [12–14,18,20]. Bogaty skład fitochemiczny i korzystne właściwości biologiczne ekstraktów z owoców róży [12–22] były przesłaniem do realizacji niniejszego projektu.

Wyniki uzyskane w przeprowadzonym eksperymencie wykazały występowanie istotnie niższego stężenia kortyzolu w próbkach śliny pobranych po godzinie od ustąpienia stresora. Można by próbować wyciągnąć wniosek, że niższe stężenie kortyzolu jest bezpośrednim skutkiem ustąpienia czynnika stresogennego, jednak należy uwzględnić, że próbki nr 3 zostały pobrane po południu w odróżnieniu od próbek nr 1 i nr 2, które były pobierane rano. Wydzielanie kortyzolu charakteryzuje się cykliczną dobową zmiennością [1–5], z najwyższymi stężeniami obserwowanymi rano. W związku z tym niższe stężenie hormonu stresu w próbce nr 3 mogłoby wynikać z późniejszej godziny pobrania próbki, wyłączając w ten sposób wpływ ustąpienia stresora, dlatego należy wstrzymać się od jednoznacznych wniosków w tej kwestii.

Ponadto nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu kortyzolu między próbkami kontrolnymi (próbka nr 1) a próbkami pobranymi rano w dniu egzaminu (próbka nr 2) ($p = 0{,}238$). Uzyskane wyniki wskazują, że niektórzy studenci odczuwali stres zarówno na początku, jak i na końcu trwania eksperymentu, prawdopodobnie ze względu na fakt, że o ile sam egzamin jest silnym

stresorem, to również czas przygotowania i oczekiwania do przystąpienia do egzaminu są czynnikami stresującymi. W przypadku próbek śliny pobranych rano w dniu wystąpienia stresora zaobserwowano bardzo dużą rozpiętość wyników pomiaru stężenia kortyzolu, co świadczy o różnorodnym poziomie stresu wywoływanego przez egzamin. Jednak celem projektu nie było zbadanie poziomu stresu egzaminacyjnego u studentów, bowiem zadano pytanie: czy poziom stresu egzaminacyjnego może być zmodyfikowany przez przyjmowanie dodatkowej porcji przeciwutleniaczy w postaci suplementu liofilizowanych owoców róży? Stwierdzono zatem, że w grupie studentów przyjmujących liofilizowane owoce róży przez pięć dni wystąpiło istotne statystycznie obniżenie stężenia kortyzolu w ślinie w godzinę po ustąpieniu stresora w porównaniu ze studentami, którzy przyjmowali placebo. Jednak ze względu na stosunkowo małą liczbę uczestników badania i brak bezpośredniej różnicy stężenia kortyzolu między badanymi grupami warto rozważyć przeprowadzenie eksperymentu z zastosowaniem wyższych dawek liofilizowanych owoców róży na większej grupie badanej. Wyniki uzyskane przez Preuß i wsp. wskazują [31], że silniejszym stresorem niż egzaminy pisemne są wypowiedzi ustne, wobec tego zastosowanie w przyszłych badaniach tego rodzaju egzaminów jako stresorów pomoże wskazać występowanie wyraźniejszych zależności.

Wnioski

Przyjmowanie liofilizowanych owoców róży nie wpływa ani negatywnie, ani pozytywnie na poziom stresu przed egzaminem, który to poziom mierzony jest jako stężenie kortyzolu w ślinie studentów. Jednak liofilizowane owoce róży, jako surowiec polifenolowy, mogą pomagać w osłabieniu skutków stresu po ustąpieniu stresora. Uzyskane wyniki dają podstawę do zaprojektowania szerszych badań nad wpływem owoców róży na poziom stresu.

Podziękowania

Autorki serdecznie dziękują pani mgr Annie Szuster oraz pani Marii Filipowicz za pomoc w przygotowaniu badania i wsparcie w każdej sytuacji w czasie sześcioletniej współpracy w Zakładzie Biochemii Wydziału Lekarskiego i Nauk o Zdrowiu KAAFM.

Bibliografia

1. Lee DY, Kim E, Choi MH. *Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress*. BMB Rep. 2015; 48(4): 209–216. http://dx.doi.org/10.5483/bmbrep.2015.48.4.275.

2. Kirschbaum C, Hellhammer DH. *Salivary Cortisol* [w:] Fink G (ed.). *Encyclopedia of Stress*. Second Edition. Academic Press, Cambridge 2007: 405–409. https://doi.org/10.1016/B978-012373947-6.00334-2.
3. Thau L, Gandhi J, Sharma S. *Physiology, Cortisol.* National Library of Medicine; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538239/ [dostęp: 27.06.2023].
4. Vining RF, McGinley RA, Maksvytis JJ, Ho KY. *Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol*. Ann Clin Biochem. 1983; 20(Pt 6): 329–335. https://doi.org/10.1177/000456328302000601.
5. Hellhammer DH, Wüst S, Kudielka BM. *Salivary cortisol as a biomarker in stress research*. Psychoneuroendocrinology. 2009; 34(2): 163–171. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.10.026.
6. Strahler J, Skoluda N, Kappert MB, Nater UM. *Simultaneous measurement of salivary cortisol and alpha-amylase: Application and recommendations*. Neurosci Biobehav Rev. 2017; 83: 657–677. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.08.015.
7. Yegorov YE, Poznyak AV, Nikiforov NG, Sobenin IA, Orekhov AN. *The Link between Chronic Stress and Accelerated Aging*. Biomedicines. 2020; 8(7), 198. https://doi.org/10.3390/biomedicines8070198.
8. Sinha R, Jastreboff AM. *Stress as a common risk factor for obesity and addiction*. Biol Psychiatry. 2013; 73(9): 827–835. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.01.032.
9. Aschbacher K, O'Donovan A, Wolkowitz OM, Dhabhar FS, Su Y, Epel E. *Good stress, bad stress and oxidative stress: insights from anticipatory cortisol reactivity*. Psychoneuroendocrinology. 2013; 38(9): 1698–1708. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.02.004.
10. White DJ, de Klerk S, Woods W, Gondalia S, Noonan C, Scholey AB. *Anti-Stress, Behavioural and Magnetoencephalography Effects of an l-Theanine-Based Nutrient Drink: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Trial*. Nutrients. 2016; 8(1), 53. https://doi.org/10.3390/nu8010053.
11. Al-Dujaili E, Stockton A. *Pomegranate extract intake reduces CVD and diabetes risk factors, stress hormone levels and improves overall quality of life scores in a double-blind, placebo-controlled study (249.2)*. The FASEB Journal. 2014; 28, 249.2. https://doi.org/10.1096/fasebj.28.1_supplement.249.2.
12. Kalemba-Drożdż M, Kwiecień I, Szewczyk A, Cierniak A, Grzywacz-Kisielewska A. *Fermented Vinegars from Apple Peels, Raspberries, Rosehips, Lavender, Mint, and Rose Petals: The Composition, Antioxidant Power, and Genoprotective Abilities in Comparison to Acetic Macerates, Decoctions, and Tinctures*. Antioxidants. 2020; 9(11), 1121. https://doi.org/10.3390/antiox9111121.
13. Cunja V, Mikulic-Petkovsek M, Weber N, Jakopic J, Zupan A, Veberic R, Stampar F, Schmitzer V. *Fresh from the ornamental garden: Hips of selected rose cultivars rich in phytonutrients*. J Food Sci. 2016; 81(2): C369–C379. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13220.
14. Olech M, Nowak R, Pecio Ł, Łoś R, Malm A, Rzymowska J, Oleszek W. *Multidirectional characterisation of chemical composition and health-promoting potential of Rosa rugosa hips*. Nat Prod Res. 2017; 31(6): 667–671. https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1180601.
15. Kalemba-Drożdż M, Cierniak A. *Wpływ róż na zdrowie – farmakologiczne i biochemiczne działanie ekstraktów z płatków Rosa rugosa i Rosa damascena* [w:]

Goździalska A, Jaśkiwicz J (red.). *Współczesne kierunki w medycynie prewencyjnej*. Oficyna Wydawnicza AFM, Kraków 2013: 127–138.
16. Kalemba-Drożdż M, Cierniak A, Kwiecień I. *Owoce, jadalne kwiaty i liście dzikich roślin – surowce polifenolowe działają jako skuteczne czynniki przeciwutleniające i genoprotekcyjne* [w:] Kalemba-Drożdż M, Grzywacz-Kisielewska A, Cierniak A (red.). *Surowce polifenolowe – zastosowania i perspektywy*. Oficyna Wydawnicza AFM, Kraków 2022: 51–98. https://doi.org/10.48269/978-83-66007-99-4-003.
17. Butkevičiūtė A, Urbštaitė R, Liaudanskas M, Obelevičius K, Janulis V. *Phenolic Content and Antioxidant Activity in Fruit of the Genus Rosa L. Antioxidants.* 2022; 11(5), 912. https://doi.org/10.3390/antiox11050912.
18. Bhave A, Schulzova V, Chmelarova H, Mrnka L, Hajslova J. *Assessment of rosehips based on the content of their biologically active compounds*. J Food Drug Anal. 2017; 25(3): 681–690. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.12.019.
19. Koczka N, Stefanovits-Bányai É, Ombódi A. *Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Rosehips of Some Rosa Species*. Medicines (Basel). 2018; 5(3), 84. https://doi.org/10.3390/medicines5030084.
20. Medveckienė B, Kulaitienė J, Jarienė E, Vaitkevičienė N, Hallman E. *Carotenoids, Polyphenols, and Ascorbic Acid in Organic Rosehips (Rosa spp.) Cultivated in Lithuania*. *Applied Sciences.* 2020; 10(15), 5337. https://doi.org/10.3390/app10155337.
21. Ermolaev VA, Fedorov DE. *Development of sublimation drying modes of rose hip fruits Freezing drying of rose hip*. BIO Web Conf. 2022; 42, 02001. https://doi.org/10.1051/bioconf/20224202001.
22. Tabaszewska M, Najgebauer-Lejko D. *The content of selected phytochemicals and in vitro antioxidant properties of rose hip (Rosa canina L.) tinctures*. NFS Journal. 2020; 21: 50–56. https://doi.org/10.1016/j.nfs.2020.09.003.
23. Kiki GAÀ, Pop RM, Sabin O, Bocsan IC, Chedea VS, Socaci SA, Pârvu AE, Finsia E, Francis T, Mathieu Z, Buzoianu AD. *Polyphenols from Dichrostachys cinerea Fruits Anti-Inflammatory, Analgesic, and Antioxidant Capacity in Freund's Adjuvant-Induced Arthritic Rat Model*. Molecules. 2022; 27(17), 5445. https://doi.org/10.3390/molecules27175445.
24. Ruijters EJ, Haenen GRMM, Weseler AR, Bast A. *The cocoa flavanol (-)-epicatechin protects the cortisol response.* Pharmacol Res. 2014; 79: 28–33. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.11.004.
25. Liu M, Mo SW, Zhou ZQ, Gao BH. [*Effects of Tangeretin on cortisol stress response induced by high-intensity resistance exercise*]. Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi. 2021; 37(5): 523–528. Chinese. https://doi.org/10.12047/j.cjap.6166.2021.055.
26. Du J, Zhu M, Bao H, Li B, Dong Y, Xiao C, Zhang GY, Henter I, Rudorfer M, Vitiello B. *The Role of Nutrients in Protecting Mitochondrial Function and Neurotransmitter Signaling: Implications for the Treatment of Depression, PTSD, and Suicidal Behaviors*. Crit Rev Food Sci Nutr. 2016; 56(15): 2560–2578. https://doi.org/10.1080/10408398.2013.876960.
27. Szelényi P, Somogyi A, Sarnyai F, Zámbó V, Simon-Szabó L, Kereszturi É, Csala M. *Microsomal pre-receptor cortisol production is inhibited by resveratrol and epigallocatechin gallate through different mechanisms*. Biofactors. 2019; 45(2): 236–243. https://doi.org/10.1002/biof.1477.

28. Li D, Dammer EB, Sewer MB. *Resveratrol stimulates cortisol biosynthesis by activating SIRT-dependent deacetylation of P450scc*. Endocrinology. 2012; 153(7): 3258–3268. https://doi.org/10.1210/en.2011-2088.
29. Tsang C, Hodgson L, Bussu A, Farhat G, Al-Dujaili E. *Effect of Polyphenol-Rich Dark Chocolate on Salivary Cortisol and Mood in Adults.* Antioxidants (Basel). 2019; 8(6), 149. https://doi.org/10.3390/antiox8060149.
30. Sung WS, Kang HR, Jung CY, Park SS, Lee SH, Kim EJ. *Efficacy of Korean red ginseng (Panax ginseng) for middle-aged and moderate level of chronic fatigue patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Complement Ther Med. 2020; 48, 102246. https://doi.org/10.1016/j.ctim.2019.102246.
31. Preuß D, Schoofs D, Schlotz W, Wolf OT. *The stressed student: Influence of written examinations and oral presentations on salivary cortisol concentrations in university students*. Stress. 2010; 13(3): 221–229. https://doi.org/10.3109/10253890903277579.

Freeze-dried rose hips decrease cortisol levels in students after the stress of exams

Abstract

Introduction: Plant extracts rich in phenolic compounds may modify the stress level. The aim of this project is to investigate whether freeze-dried rosehips (*Rosa rugosa*), taken orally by students, affect cortisol concentration before and after a highly stressful exam.
Materials and methods: The double-blind study included healthy volunteers recruited from medical and health sciences students. Participants in the study group took capsules containing 400 mg of freeze-dried ground rosehips for five consecutive days preceding the exam (stressor). At that time, the control group was taking a placebo (120 mg of glucose). Participants completed a questionnaire on their gender, lifestyle, medical history, physical activity, diet, stimulants, medications and dietary supplements. Saliva samples for determining the level of cortisol in saliva were taken three times: in the morning before the beginning of the experimental phase, in the morning before the stressor, and one hour after the stressor subsided. The level of cortisol in saliva was determined using ELISA.
Results: It was found that taking freeze-dried rosehips for five days significantly reduced the level of cortisol in students after the exam compared to the placebo group. There were no differences in the level of cortisol before the exam, regardless of the preparation taken. No other analyzed factor influenced the concentration of the stress hormone in students.
Conclusions: Freeze-dried rosehips can help reduce the effects of stress.
Key words: cortisol, salivary cortisol, stress, rosehips, *Rosa rugosa*, examination stress, stressor, polyphenols, flavonoids, anthocyanins