

**BIOLOŠKI ZNAČAJ ANTIOKSIDANATA - VAŽAN FAKTOR VISOKO
KVALITETNE HRANE****THE BIOLOGICAL IMPORTANCE OF ANTIOXIDANS, AN ESSENTIAL
FACTOR OF HIGH-QUALITY FOOD**

B.I. Ognjanović, S.Z. Pavlović, R.V. Žikić, A.Š. Štajn, Z.S. Saičić, V.M. Petrović
Institut za biologiju, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Beograd

IZVOD

Globalni problem savremenog sveta je proizvodnja dovoljnih količina visoko kvalitetne i zdrave hrane. Savremene studije pokazuju da je jedan od najvažnijih faktora koji utiču na kvalitet hrane održavanje njene oksidacione stabilnosti. Istraživanja oksidacione stabilnosti hrane nameću potrebu uvođenja novih kriterijuma i standarda koji bi obuhvatili i određivanje antioksidacionih komponenata u hrani. Rezultati naših istraživanja pokazuju da tretman koenzimom Q₁₀, vitaminom E i maslinovim uljem, povećava antioksidacioni status (enzimske i neenzimske komponente) u tkivima pacova.

ABSTRACT

The production of sufficient quantity of economically profitable high-quality food is the main problem of modern world. Recent scientific knowledge shows that one of the most important factors that influence to the quality of food is the improvement of its oxidative stability. Investigations of the oxidative stability of food showed that we must introduce new criteria and standards, which would include the determination of antioxidative components in food. The obtained results show that treatment by coenzyme Q₁₀, vitamin E and olive oil improved antioxidative status (enzymatic and nonenzymatic components) in the tissues of the rat.

UVOD

Problem rešavanja prehrane svetskog stanovništva ne može da se reši samo većim obimom proizvodnje hrane, već proizvedena hrana ujedno mora da bude visoko kvalitetna, koja zadovoljava hemijske, fizičke i mikrobiološke kriterijume i koja obezbeđuje pravilan odnos biološki važnih organskih materija (proteini, masti, ugljeni hidrati, vitamini), aditiva, minerala i mikrokonstituenata. Jedan od najvažnijih faktora koji utiču na kvalitet hrane je održavanje njene oksidacione stabilnosti (Show i Jeng, 1986; Mancini i sar., 1995). Ovakav pristup održavanja kvaliteta hrane podrazumeva proizvodnju hrane u odgovarajućim ekološkim uslovima, prvenstveno kroz edukaciju proizvođača, prerađivača, distributera i potrošača, kao i kroz uvođenje novih standarda za određivanje kvaliteta hrane. Novija naučna saznanja u istraživanju oksidativne stabilnosti, koja su posebno intezivirana poslednjih decenija, pokazuju da je jedan od najvažnijih faktora održavanja kvaliteta hrane poboljšanje njene oksidacione stabilnosti - odnosno visok sadržaj antioksidanata. Da bi se proizvela zdrava hrana, bogata antioksidantima, nameće se potreba primene novih saznanja i uvođenje novih kriterijuma i standarda koji bi obuhvatili i određivanje antioksidacionih komponenata u hrani. Istraživanja su pokazala da se nivo prirodnih antioksidanata značajno razlikuje u uzorcima hrane različitog porekla (na pr. mleko). Takođe je pokazano, da naknadnim dodavanjem antioksidanata, kao što su koenzim Q₁₀, selen, vitamin E, maslinovo ulje, može značajno da se poveća ukupni nivo svih antioksidanata u tkivima eksperimentalnih životinja (Mancini i sar., 1995; Žikić i sar., 1999; Ognjanović i sar., 2000; Žikić i sar., 2000).

ANTIOKSIDANTI KAO ZNAČAJAN ELEMENT KVALITETA HRANE

Hrana sadrži sopstvene antioksidante ukoliko je sveža i kvalitetno tehnološki obrađena. Ukoliko iz nekih razloga (siromašno zemljište, neadekvatna klima, neadekvatna tehnološka priprema ili skladištenje). (Loue, 1987), hrana ne sadrži fiziološke nivoe antioksidanata, potrebno je njeno naknadno obogaćivanje. Tek antioksidantima obogaćena hrana može da se isporuči potrošačima (Show i Jeng, 1986; Rannem i sar., 1995).

Zašto je to važno? Antioksidacioni zaštitni sistem (AOS) se sastoji od niza enzimskih (SOD - superoksid-dismutaza, CAT - katalaza, GSH-Px - glutation-peroksidaza, GST - glutation-S-transferaza, GR - glutation-reduktaza) i neenzimskih komponenata (GSH - glutation, vitamini A, C, E, ubihinon, selen) čija je uloga uklanjanje reaktivnih vrsta kiseonika (RVK, engleski - reactive oxygene species - ROS) ili njihovo transformisanje u manje reaktivne (štete) molekule (Kappus, 1985; Davies i sar., 1990), i na taj način štite organizam od toksičnog delovanja ovih radikala.

Produkcija reaktivnih vrsta kiseonika u organizmu može da bude povećana ukoliko se preko hrane ili na druge načine u organizam unose određene štetne materije (prooksidanti). Štetne efekte koje u organizmu izazivaju reaktivne vrste kiseonika mogu da eliminišu (ili da značajno smanje) antioksidanti zbog čega je veoma važno da njihovo prisustvo u hrani (voda, napitci) bude na fiziološki potrebnom nivou. Zbog toga se smatra da zdrava hrana, pored zadovoljavanja postojećih standarda o kvalitetu, mora da sadrži i dovoljno antioksidanata.

Za normalno funkcionisanje organizma neophodna je ravnoteža između produkcije reaktivnih vrsta kiseonika i komponenti antioksidacionog zaštitnog sistema (AOS). Zdrava i kvalitetna hrana ne sme da sadrži elemente koji bi mogli da izazovu produkciju slobodnih radikala kiseonika, a u isto vreme mora da sadrži i dovoljan nivo antioksidanata (Kawasaki, 1992; Mancini i sar., 1995; Niki i sar., 1995).

Ukoliko iz nekog razloga (neadekvatni supstrat, kao što su zemlja ili voda, neodgovarajuća tehnologija proizvodnje, prerade, pakovanja, skladištenja ili distribucije) nije obezbeđeno (očuvano) dovoljno prisustvo antioksidanata, onda se to mora obezbediti naknadnim dodavanjem, odnosno obogaćivanjem (Pelissier i sar., 1989; Niki i sar., 1995).

Određivanje oksidacione stabilnosti podrazumeva kontrolu nivoa enzimskih (SOD, CAT, GSH-Px, GST, GR) i neenzimskih (GSH, AsA, Vit E, Se) komponenti antioksidacionog zaštitnog sistema u hrani tokom procesa proizvodnje, pripreme i distribucije do potrošača, kao i mogućnost dodatnog obogaćivanja nekim od antioksidanata. Samo takva hrana može da obezbedi potrebnu oksidacionu stabilnost u organizmu. Bilo koji poremećaj u organizmu koji dovodi do narušavanja ravnoteže između prooksidanata i antioksidanata, dovodi do ozbiljnih fizioloških posledica (Jacob i Burri, 1996).

U cilju proizvodnje zdrave i kvalitetne hrane obogaćene sa antioksidantima, cilj našeg rada bio je da odredimo sve važnije komponente antioksidacionog sistema u tkivima eksperimentalnih organizama posle njihovog naknadnog izlaganja pojedinim antioksidantima kao što su koenzim Q₁₀, vitamin E i maslinovo ulje. Slična istraživanja sa obogaćivanjem mesa sa antioksidantima mogu kasnije da se sprovedu na domaćim životinjama, čije meso se konzumira u ljudskoj ishrani, kao i u proizvodnji i preradi drugih namirnica i napitaka (mleko, jaja, žitarice, voće, povrće, voda i napitci).

MATERIJAL I METODE RADA

U našim eksperimentima su korišćeni mužjaci Wistar albino pacova stari 3 meseca. Sve životinje su u akutnom tretmanu injicirane intramuskularno 48^h pre žrtvovanja, i to: (1) CoQ₁₀ (20mg CoQ₁₀/kg t.m.), (2) kombinacijom CoQ₁₀ i vitamina E (20mg CoQ₁₀/kg t.m. + 20 iu vit E/kg t.m.) i (3) maslinovim uljem (0.4ml maslinovog ulja/kg t.m.).

U eksperimentima su analizirana tkiva jetre i skeletnog mišića. Izolovana tkiva iz organizma su isprana u fiziološkom rastvoru, a zatim su usitnjena i homogenizovana u odnosu 1:10 uz dodatak saharoznog pufera, pH 7.4. Iz homogenata je određena koncentracija vitamina E (Desai, 1980). Preostali homogenat je centrifugiran 90 minuta na 37500 rpm. U supernatantu su određene aktivnosti enzima: superoksid-dismutaze (SOD) (Misra i Fridovich, 1972), katalaze (CAT) (Beutler, 1982), glutation-peroksidaze (GSH-Px) (Tamura i sar., 1982), glutation-S-transferaze (GST) (Habig i sar., 1974) i glutation-reduktaze (GR) (Glatzle i sar., 1974). Za određivanje koncentracije vitamina C korišćena je dinitrofenilhidrazinska metoda (Roe, 1957, a određivanje koncentracije koenzima Q (CoQ) metoda Beyer-a (1991).

Dobijene vrednosti obrađene su statistički. Značajnost odstupanja određena je Studentovim - t testom (Hoel, 1966), pri čemu je za najniži stepen značajnosti uzeta vrednost $p < 0.05$.

REZULTATI

Na grafiku 1. prikazana je aktivnost enzima antioksidacionog zaštitnog sistema (SOD, CAT, GSH-Px, GST i GR), a na grafiku 2 promene koncentracije vitamina C i E, kao i koncentracije koenzima Q u jetri kontrolne grupe pacova i pacova kojima je u akutnom tretmanu intramuskularno davan CoQ, kombinacija koenzima Q i vitamina E, i maslinovo ulje. Dobijeni rezultati pokazuju da je posle egzogenog davanja

antioksidanata (CoQ, kombinacije CoQ i vitamina E i maslinovog ulja) značajno poboljšani ukupan antioksidacioni status (enzimske i neenzimske komponente AOS-a) u odnosu na kontrolne vrednosti.

Rezultati pokazuju da je povećana aktivnost svih enzima antioksidacionog sistema (SOD, CAT, GSH-Px i GR) (grafik 3), kao i aktivnost enzima GST i koncentracije vitamina C i E (grafik 4) u skeletnim mišićima pacova koji su u akutnom tretmanu intramuskularno dobijali CoQ, kombinaciju CoQ i vitamina E i maslinovo ulje.

DISKUSIJA

U našim eksperimentima sa akutnim dodavanjem koenzima Q (CoQ), vitamina E i maslinovog ulja pokazano je značajno povećanje aktivnosti enzima antioksidacionog sistema (SOD, CAT, GSH-Px, GST i GR) i koncentracije vitamina C i E (Vit C, Vit E), kao i koncentracije koenzima Q (CoQ) u jetri (grafik 1 i 2) i skeletnim mišićima (grafik 3 i 4).

Mediterranska hrana je bogata povrćem, žitom, voćem i uljem, (uglavnom maslinovim), tako da je kod stanovništva mediteranskih zemalja smanjen problem koronarnih bolesti. Prirodni antioksidanti u maslinovom ulju (nezasićene masne kiseline, vitamin A i E) imaju zaštitnu ulogu od kardiovaskularnih bolesti jer inhibiraju oksidaciju lipoproteina i nastanak lipidnih peroksida (Mancini i sar., 1995; Gerber, 1997).

U uslovima izloženosti stresu, toksičnim i ostalim štetnim agensima (delovanje teških metala, ultra ljubičasto i jonizujuće zračenje, smog, pušenje, prekomerno konzumiranje alkohola) smanjeno je prisustvo AOS (enzimskih i neenzimskih komponenti) i povećava se prisustvo ROS koji svojim agresivnim svojstvima oštećuju ćelije i tkiva, izazivaju bolesti i u krajnjem slučaju smrt organizma (Kappus, 1985; Simović i sar., 1988; Jacob i Burri, 1996).

Antioksidanti koji su prisutni u svakom organizmu, tkivu i ćeliji omogućuju uklanjanje ROS ili njihovo transformisanje u neškodljive produkte. Međutim, naš odbrambeni sistem može se dopuniti i pojačati pravilnom, zdravom ishranom (Shaw i Jeng, 1986; Mancini i sar., 1995; Favier, 1988; Niki i sar., 1995; Pelissier i sar., 1989), koja podrazumeva unošenje onih hranljivih komponenti, koje sadrže prirodne antioksidante, odnosno unošenjem hrane koja u sebi ima što manje prooksidanata. Na taj način organizam, pored energetskog izvora, osigurava i sistem zaštite koji održava prirodnu ravnotežu u organizmu, omogućuje pravilan razvoj, rast i funkcionisanje, usporava starenje i smanjuje rizik od kancera, hroničnih srčanih oboljenja (Sinatra i DeMarco, 1995; Simović i sar., 1988; Langsjoen i sar., 1994), nervnih oboljenja i drugih poremećaja (Rannem, 1995; Reuter i sar., 1995). Time se stvaraju uslovi zdravog i kvalitetnog života.

ZAKLJUČAK

Prikazani rezultati predstavljaju inicijalna istraživanja sprovedena na laboratorijskim pacovima. Predtretmanom životinja sa koenzimom Q (CoQ), kombinacijom CoQ i vitamina E i maslinovim uljem, značajno se poboljšava oksidaciona stabilnost u jetri i skeletnim mišićima eksperimentalnih životinja. Značajno je naglasiti da primenjeni model predtretmana sa nekim antioksidantom, kao i sa njihovom kombinacijom, može da se sprovede i na farmama stoke, koja se koristi u ljudskoj ishtani. Na taj način je moguće da se posle klanja životinja dobije meso obogaćeno antioksidantima, čija je oksidaciona stabilnost značajno poboljšana, a to je samo jedan od načina poboljšanja kvaliteta ljudske ishrane.

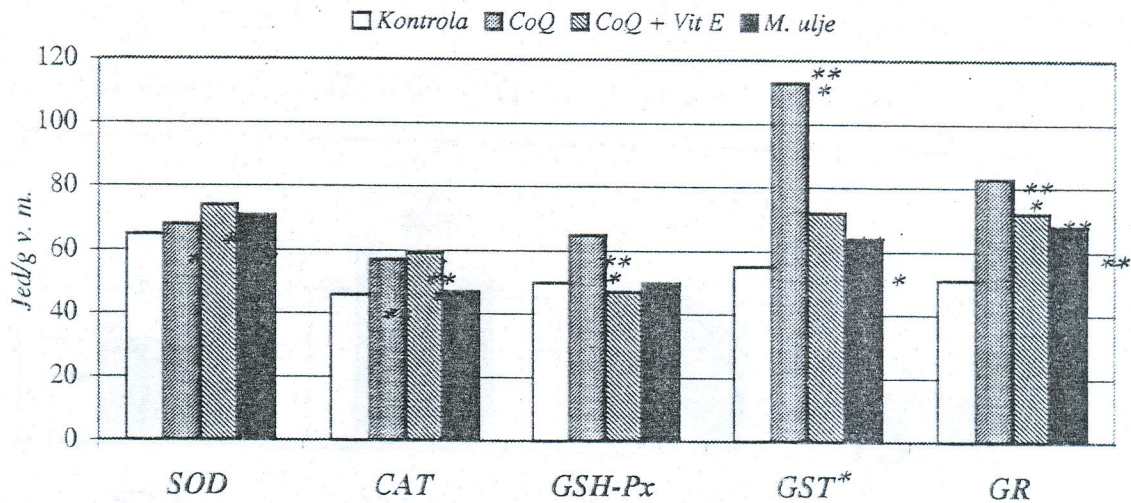
Kvalitetna hrana mora da sadrži potrebnu količinu biološki važnih komponenti kako bi se organizmu obezbedile neophodne organske supstance, vitamini i mikroelementi.

Prisustvo antioksidacionih komponentata u hrani je važan faktor njenog kvaliteta, koji treba da postane sastavni deo kriterijuma i novih standarda o kvalitetu. Ovakav prilaz definisanja kvaliteta hrane nameće potrebu kontrole nivoa enzimskih (SOD, CAT, GSH-Px, GST i GR) i neenzimskih komponenti (GSH, vitamini A, C, E, CoQ, Se), u namirnicama tokom procesa proizvodnje, pripreme i distribucije do potročača. U slučaju nedovoljnog prisustva antioksidanata u hrani, njena oksidaciona stabilnost se može postići naknadnim obogaćivanjem, odnosno dodavanjem deficitarnih komponenti AOS-a.

LITERATURA

1. Beutler E. (1982): Catalase, In: Beutler E. eds. "Red cell metabolism, a manual of biochemical methods". Grune and Stratton.: Inc. 105-106.
2. Beyer RE. (1991): An analysis of the role of Coenzyme Q in free radical generation and as antioxidant. *Biochem. Cell. Biol.* 70: 390-403.
3. Constantinescu A, Maguire JJ, Packer L. (1994): Interactions Between Ubiquinones and Vitamins in membranes and Cells. *Mol. Aspects. Med.* Vol 15, Iss S, pp. 57-65.
4. Davies KJA, Wiese AG, Sevanian A, Kim EH. (1990): Repair systems in oxidative stress. *Molecular Biology of Aging* . pp. 123-141.
5. Desai ID. (1984): Vitamin E Analysis Methods for Animal Tissues. *Methods in Enzymology.* 105: 138-147.
6. Favier A. (1988): Selenium Metabolism, Selenium in Medicine and Biology, Avoriaz, France.
7. Freeman BA, Crapo JD. (1982): Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 47: 412-426.
8. Gerber M. (1997): Olive oil, monounsaturated fatty acids and cancer. *Cancer Lett.* 114 (1-2): 91-92.
9. Glatzle D, Vulliamuier JP, Weber F, Cecker K. (1974): Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the Assessment of the Riboflavin status in Humans. *Specialia.* 665-667.
10. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. (1974): Glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139.
11. Hoel. (1966): Rapid specific method for determination of aldoses in body fluids. *Nature.* 183: 108-109.
12. Jacob RA, Burri BJ. (1996): Oxidative damage and defense. *Am. J. Clin. Nutr.* 63 (6): 985S-990S.
13. Kappus H. (1985): Oxidative Stress. Ed. H. Sies. Academic. Press, London, p. 273.
14. Kawasaki T. (1992): Antioxidant function of coenzyme Q. *J. Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo).* Spec No: 552-555.
15. Langsjoen H, Langsjoen P, Willis R, Folkers K. (1994): Usefulness of Coenzyme Q₁₀ in Clinical Cardiology: A Long-Term Study. *Mol. Aspects. Med.* 15, pp. s165-s175.
16. Lannek N, Lindberg P. (1976): Vitamin E and selenium deficiencies (VESD) of domestic animals. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 19: 127-164.
17. Loue A. (1987): Les Oligo-elements en Agriculture. Ed. Agri. Nothan. Paris.
18. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJJ. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 235-241.
19. Mancini M, Parfitt VJ, Rubba P. (1995): Antioxidants in the Mediterranean diet. *Can J Cardiol.* 11 Suppl G: 105G-109G.
20. Misra HP, Fridovich I. (1972): The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247: 3170-3175.
21. Niki E, Noguchi N, Tsuchinashi H, Gotoh N. (1995): Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *Am J Clin Nutr.* 62 (6 Suppl): 1322S-1326S.
22. Ognjanović BI, Žikić RV, Štajn AŠ, Maletić SD. (2000): Fiziološki aspekti proizvodnje visoko kvalitetne hrane. *Eko-konferencija 2000, 27-30. septembar, Novi Sad, Zdravstveno bezbedna hrana, knjiga II,* pp. 247-253.
23. Pelissier MA, Boisset M, Albrecht R. (1998): The effects of vitamin A nutritional status on microsomal lipid peroxidation and α -tocopherol level in rat liver. *Experientia.* 45: 342-343.
24. Rannem T. (1995): The effect of selenium supplementation on skeletal and cardiac muscle in selenium-depleted patients. *J. Parenter. Enteral. Nutr.* 19 (5): 3351-3355.
25. Roe HJ. (1983): Chemical determination of ascorbic, dehydroascorbic and diketogulonic acids. In: Glick D. eds. "Methods of Biochemical Analysis", Intersc. Publ. New York - London, pp. 115-139.
26. Reuter W, Vorberg B, Krumpolt K, Sauer I. (1995): Effect of olive oil and fish oil on parameters of lipids and antioxidants in hyperlipoproteinemia. *Z Ernährungswiss.* 34 (2): 151-159.
27. Shamberger RJ. (1983): Selenium deficiency diseases in animals. In "Biochemistry of Selenium". New York: Plenum Press, pp 31-58.
28. Show CK, Jeng J. (1986): The role of selenium in nutrition. In: Spallholz MD, Ganther HE eds. "Selenium in Medicine and Biology", Academic Press, Orlando.
29. Simović M, Dinić P, Savić J, Jović P, Milovanović S, Spasić M. (1988): Slobodni radikali kiseonika u zdravlju i bolesti. *Vojnosanit. Pregl.* 45 (4): 279-287.
30. Sinatra ST, DeMarco J. (1995): Free radicals, oxidative stress, oxidized low density lipoprotein (LDL), and the heart: antioxidants and other strategies to limit cardiovascular damage. *Conn. Med.* 59 (10): 579-588.
31. Tamura M, Oschino N, Chance B. (1982): Some characteristics of hydrogen and alkylhydroperoxides metabolizing systems in cardiac tissue. *J. Biochem.* 92: 1019-1031.
32. Žikić RV, Pajović S, Štajn AŠ, Pejić S, Ognjanović BI, Pavlović SZ, Kasapović J. (1999): Hrana i ishrana. 40 (1-2): 51-56.
33. Žikić RV, Štajn AŠ, Pavlović SZ, Ognjanović BI. (2000): Biotehnologija u stočarstvu. 16 (3-4): 41-48.

Grafik 1. Aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation-peroksidaze (GSH-Px), glutation-S-transferaze (GST) i glutation reduktaze (GR) u jetri kontrolne grupe pacova i pacova akutno tretiranih koenzimom Q (CoQ), kombinacijom CoQ i vitamina E (CoQ+Vit E) i maslinovim uljem



* $p < 0.05$, ** $p < 0.02$, *** $p < 0.01$.

($X10^2$)

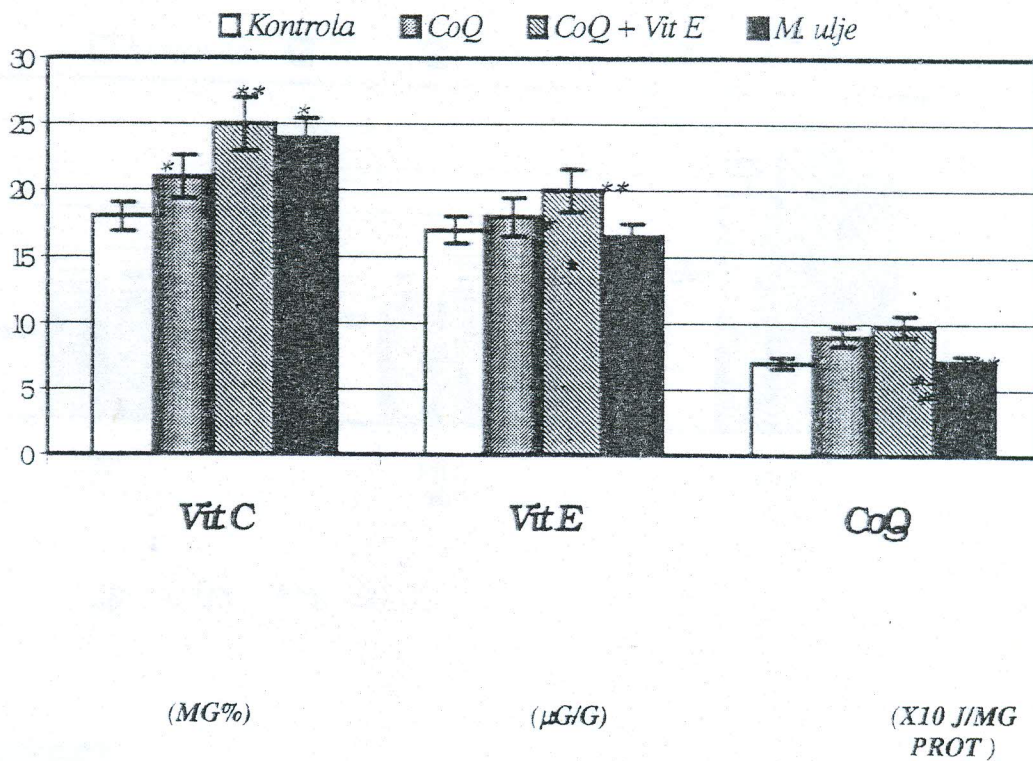
($X10^3$)

($X10^3$)

($X10^3$)

($X10^2$)

Grafik 2. Koncentracije vitamina C (Vit C), vitamina E (Vit E) i CoQ u jetri kontrolne grupe pacova i pacova akutno tretiranih koenzimom Q (CoQ), kombinacijom CoQ i vitamina E (CoQ+Vit E) i maslinovim uljem

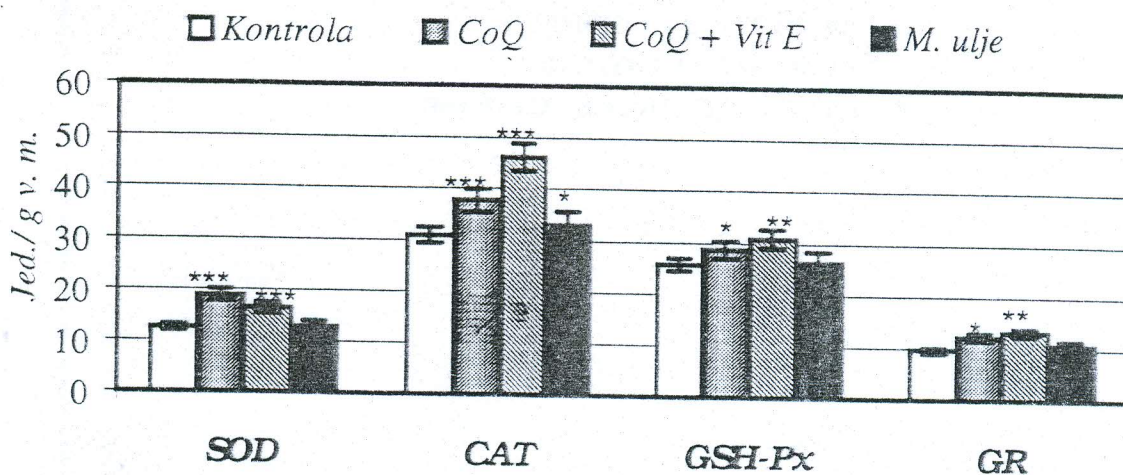


(MG%)

(μ G/G)

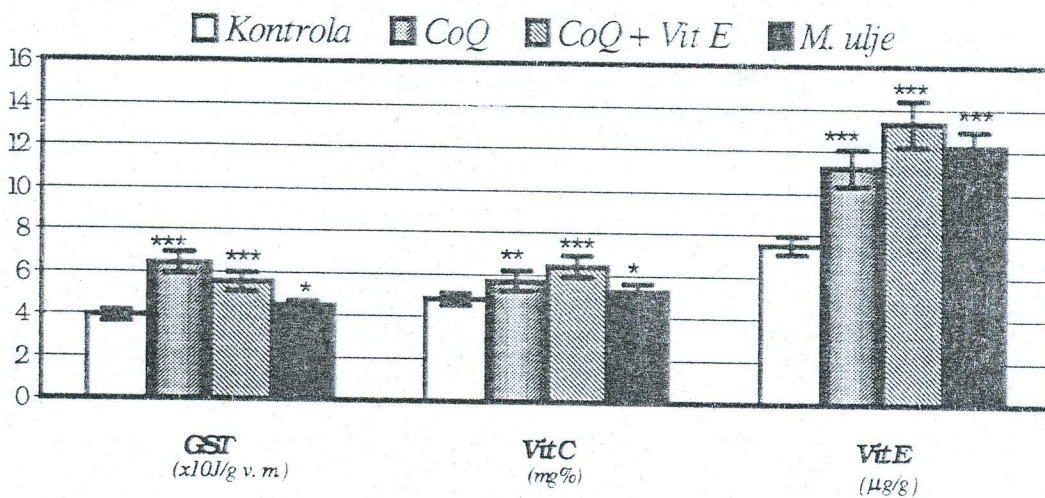
($X10$ J/MG
PROT)

Grafik 3. Aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GSH-Px) i glutation reduktaze (GR) u mišiću kontrolne grupe pacova i pacova akutno tretiranih koenzimom Q (CoQ), kombinacijom CoQ i vitamina E (CoQ+Vit E) i maslinovim uljem



* $p < 0.05$, ** $p < 0.02$, *** $p < 0.01$.

Grafik 4. Aktivnost glutation-S-transferaze (GST) i koncentracije vitamina C (Vit C) i vitamina E (vit E) u mišiću kontrolne grupe pacova i pacova akutno tretiranih koenzimom Q (CoQ), kombinacijom CoQ i vitamina E (CoQ+Vit E) i maslinovim uljem



* $p < 0.05$, ** $p < 0.02$, *** $p < 0.01$.