

## STANOVENIE VYBRANÝCH ANTIOXIDAČNÝCH PARAMETROV V PLAZME U VEGETARIÁNOV A NEVEGETARIÁNOV DETERMINATION OF DIFFERENT PLASMA ANTIOXIDANTS IN VEGETARIANS AND NON-VEGETARIANS

Mišľanová Csilla, Kudláčková Marica, Máleková Jana, Valachovičová Martina,  
Kadrabová Jana, Mad'arič Alexander

Slovenská zdravotnícka univerzita v Bratislave

### Summary

Oxidants are free radicals, which are forms of oxygen and can cause damage to body cells. Free radicals can damage cells, and may play a role in heart disease, cancer and other diseases. If free radicals are not neutralised they can work against the immune system and develop degenerative diseases. Antioxidants are substances that may protect your cells against the effects of free radicals. The main antioxidants are beta-carotene, vitamins C and E, coenzyme Q10, flavonoids, etc. Plant food is a rich source of antioxidants. These include fruits, vegetables, nuts, grains, some meats, poultry, fish etc. Regular and frequent consumption of protective food commodities has been found to be associated with some degree of protection against hypertension, diabetes, coronary artery disease, degenerative diseases prevention. The aim of this study was to determine different antioxidants in plasma by HPLC method and to compare and evaluate achieved results in groups of vegetarians and non-vegetarians.

**Key words:** antioxidants, homocysteine, vegetarians, HPLC, plasma

### ÚVOD

Oxidanty sú vedľajšie produkty ľudského metabolizmu, ktoré poškadzujú bielkoviny buniek. Sú to voľné kyslíkové radikály, ktoré v bunke nepriaznivým spôsobom ovplyvňujú cukry a tuky. Voľné radikály napádajú tuky (lipidy) v bunkových membránach, dochádza k ich peroxidácii, ktorá je súčasťou mechanizmov chorôb ako ateroskleróza, rakovina, oslabenie imunity, kardiovaskulárne, cerebrovaskulárne ochorenia a pod. Antioxidanty sú látky schopné dezaktivovať nabitú časticu voľného radikálu, bránia oxidačnému procesu alebo ho spomaľujú. Ideálne by bolo, keby boli antioxidanty a oxidanty v rovnováhe (Dey et al., 2008). Narušenie tejto rovnováhy sa nazýva *oxidačný stres*. Proti deštruktívnej aktivite voľných radikálov používa organizmus „vlastné zdroje“, ale tiež látky, ktoré sa do tela dostanú spolu so stravou. *Endogénne* antioxidanty naše telo produkuje (enzýmy, koenzýmy, zlúčeniny s obsahom síry, napr. glutatión) a počet týchto enzýmov a ich koncentrácia v organizme je konštantná, ale prívod ďalších, *tzv. exogénnych* antioxidantov môžeme regulovať a ovplyvniť stravou. Tieto antioxidanty majú vo svojom ochrannom pôsobení širší záber. Patria sem napr. vitamín E, C, beta-karotén, luteín, lykopén, flavonoidy, koenzým Q10 a pod. (Asplund et al., 2002) Napríklad vitamín E sa ukladá v častiach buniek obsahujúcich tuk, ako sú bunkové membrány a lipoproteíny a chráni ich proti rôznym druhom oxidantov (Pazdro a Burgess, 2010). Vitamín C je najdôležitejší antioxidant v krvi (Carr a Frei, 1999). Zatiaľ čo vitamín E je v tukoch rozpustný, vitamín C je rozpustný vo vode. Koenzým Q10 ma rozhodujúcu úlohu pri premene tukov, cukrov a bielkovín v bunkách, ovplyvňuje obranné reakcie organizmu a zlepšuje fyzickú a psychickú pohodu. Koenzým Q10 v ľudskom organizme pôsobí ako antioxidant v systéme chinón-hydrochinón a chráni ho pred účinkami voľných radikálov. Všetky antioxidanty sú prospešné zdraviu, ale väčší prínos majú, ak sú

užívané spolu. Antioxidanty navzájom spolupracujú, rôzne antioxidanty nás chránia proti rôznym typom voľných radikálov v rôznych častiach tela.

Pravidelná a dostatočná konzumácia zeleniny, ovocia, celozrnných potravín, strukovín, orieškov a ďalších olejnatých semien spolu so zdravým životným štýlom môže znamenať redukciu degeneratívnych ochorení (Houston, 2010). Komplexná, pestrá strava zabezpečuje nutričnú kvalitu (príjem všetkých nutrientov) a cez koncentrácie nutrientov v konzumovanej potravinovej zmesi odpovedajúce odporúčaným výživovým dávkam tiež nutričnú kvantitu (Gusak a Dellapenna, 1999). Dlhodobé nutričné štúdie ukázali inverzný vzťah medzi stravovaním s prevažnou konzumáciou rastlinnej potravy a výskytom ischemickej choroby srdca, diabetu, mnohých typov rakoviny a celkovej mortality (Leitzmann et al., 2005; Key et al., 2009). Zdravotné benefity rastlinnej stravy pochádzajú z nižšieho príjmu nasaturovaných tukov, cholesterolu a živočíšnych bielkovín a vyššieho príjmu komplexných sacharidov, vlákniny, nenasýtených mastných kyselín, neesenciálnych aminokyselín, horčička, kyseliny listovej, vitamínu C, vitamínu E, karotenoidov a ďalších fytochemikálií. Subjekty s nízkou alebo žiadnou konzumáciou živočíšnych tukov a konzumáciou prevažne rastlinnej potravy majú v porovnaní s bežnou populáciou nízke hodnoty celkového cholesterolu, LDL-cholesterolu, triacylglycerolov a nasaturovaných mastných kyselín a významne vyššie hodnoty parametrov s aterosklerotickými vlastnosťami (HDL-cholesterol, polynenasýtené mastné kyseliny, vitamín E, C) (Krajčovičová-Kudláčková et al., 2000; Szeto et al., 2004).

Vegetariánstvo je najrozšírenejšou a najznámejšou formou alternatívnej výživy. Najprísnejšou formou je vegánstvo, ktoré dôsledne odmieta akúkoľvek živočíšnu potravu vrátane mlieka, mliečnych výrobkov a vajec. Lakto-vegetariáni k rastlinnej potrave pridávajú mlieko a mliečne výrobky. Lakto-ovo-vegetariáni si k rastlinnej potrave doprajú navyše mlieko, mliečne výrobky a vajcia. Ovo-vegetariáni akceptujú vajcia, nie však mlieko. Semi-vegetariáni odmietajú iba niektoré druhy mäsa - zväčša nekonzumujú červené mäso, kým biele mäso z hydiny a rýb jedia.

V danom príspevku budú prezentované niektoré vybrané antioxidačné parametre (vitamín C, E,  $\beta$ -karotén, koenzým Q10) v ľudskej plazme stanovené metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) u skupiny nevegetariánov a vegetariánov.

## MATERIÁL A METÓDY

Všetky experimenty boli uskutočnené použitím kvapalinového chromatografu HP 1200.

Analytická separácia vitamínu E a  $\beta$ -karoténu bola uskutočnená na kolóne LiChrospher C18 (250x4,6 mm, I.D., 5  $\mu$ m, Merck) s pripojenou predkolónou LiChrospher C18 (4x4 mm, I.D., 5  $\mu$ m). Mobilná fáza pozostávala zo zmesi: acetonitril: tetrahydrofurán: metanol obsahujúci BHT: octan amónny (67,4:22:6,8:3,8,v/v/v/v); prietok 1,2 ml.min<sup>-1</sup>. Teplota kolóny bola 29 °C a dávkovaný objem bol 20  $\mu$ l. Na detekciu bol použitý fluorescenčný detektor zapojený v sérii s DAD detektorom (Hess et al., 1991).

Pre HPLC analýzu vitamínu C bola aplikovaná kolóna Lichrospher RP 100 RP 18 (250x4,6 mm, 5  $\mu$ m, Merck). Mobilná fáza pozostávala z 3,7 mmól.l<sup>-1</sup> fosforečnanového tlmivého roztoku, pH 4; prietok 0,8 ml.min<sup>-1</sup>. Na analýzu bola použitá UV detekcia pri 245 nm. Teplota kolóny bola 20 °C a dávkovaný objem bol 25  $\mu$ l (Čerhata et al., 1994)

Na stanovenie koenzýmu Q10 sa použila certifikovaná metóda pomocou kitov of firmy Chromsystems. Teplota analytickej kolóny bola 25 °C; prietok mobilnej fázy 2,5 ml.min<sup>-1</sup> a dávkovaný objem bol 50  $\mu$ l.

Štúdie sa zúčastnilo 240 dobrovoľníkov, z toho 105 nevegetariánov a 135 vegetariánov (79 semi-vegetariánov a 56 lakto-ovo-vegetariánov) vo veku od 20-60 rokov.

Na testovanie štatistickej významnosti bola použitá Pearsonova korelačná analýza. Ako signifikantné sme hodnotili rozdiely na hladine významnosti  $P < 0,05$  a  $P < 0,001$ .

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V uvedenom príspevku sú diskutované len vybrané parametre: vitamíny E, C, beta-karotén a koenzým Q10. Prezentované výsledky sú len čiastkovými výsledkami celej komplexnej štúdie, ktorá zahŕňala aj klinické somatometrické postupy (stanovenie telesnej výšky a hmotnosti, výpočet výškovo-hmotnostného indexu BMI, meranie hrúbky rias podkožného tuku, stanovenie percenta telesného tuku), stanovenie biochemických a imunologických parametrov.

Probandi s prevažnou konzumáciou rastlinnej potravy mali významne zvýšené antioxidantné vitamíny C,  $\beta$ -karotén a na lipidy štandardizovaný vitamín E. V Tabuľke 1 sú uvedené namerané hodnoty týchto parametrov stanovených HPLC metódou u oboch skupín, nevegetariánov a vegetariánov (rozdelení na semi- a lakto-ovo-vegetariánov). Vegetariáni mali signifikantne vyššie hodnoty v porovnaní s nevegetariánmi. Nadprahové hodnoty ( $>30$ ) vitamínu E (Gey, 1995) boli zaznamenané u 25 % vegetariánov, kým u nevegetariánov to bolo iba u 11 %. Nadprahové hodnoty sú optimálne z pohľadu antioxidantnej ochrany a redukovaného rizika ochorení.

**Tab. 1 Hodnoty antioxidantných vitamínov v ľudskej plazme**

| Analyt    | Nevegetariáni<br>mmol.l <sup>-1</sup> | Semi-vegetariáni<br>mmol.l <sup>-1</sup> | Lakto-ovo-vegetariáni<br>mmol.l <sup>-1</sup> |
|-----------|---------------------------------------|--|---|
| Vitamín C | 34,53 ± 12,94                         | 46,01 ± 11,11***                         | 46,66 ± 13,35***                              |
| Vitamín E | 22,98 ± 8,09                          | 27,41 ± 7,35*                            | 25,66 ± 5,44*                                 |
| b-karotén | 0,74 ± 0,61                           | 0,94 ± 0,74***                           | 0,77 ± 0,59*                                  |

Hodnoty vyjadrujú priemerné koncentrácie ± STDEV. \* $P < 0,05$  \*\*\* $P < 0,001$

Ďalej bol sledovaný pomer vitamínov C/E, ktorý musí byť  $> 1$ , kedy je najefektívnejšia aktivita vitamínov proti voľným radikálom (Esterbauer et al., 1993; Kudláčková et al., 2004). U semi-vegetariánov tento pomer dosahoval hodnotu  $1,75 \pm 0,51$ , u lakto-ovo vegetariánov  $1,88 \pm 0,62$ , čo je v priemere o 7 % vyššie ako u nevegetariánov ( $1,70 \pm 0,97$ ).

Ďalším dôležitým antioxidantom je koenzým Q10. Vegetariáni ho prirodzenou cestou prijímajú menej, pretože sa nachádza predovšetkým v produktoch živočíšneho pôvodu, na čo poukazujú aj hodnoty uvedené v Tabuľke 2. U nevegetariánov boli hodnoty štatisticky vysoko významne zvýšené ( $P < 0,001$ ) oproti vegetariánom.

**Tab. 2 Koncentrácie koenzýmu Q10 v ľudskej plazme**

| Analyt      | Nevegetariáni<br>mmol.l <sup>-1</sup> | Semi-vegetariáni<br>mmol.l <sup>-1</sup> | Lakto-ovo-vegetariáni<br>mmol.l <sup>-1</sup> |
|-------------|---------------------------------------|--|---|
| Koenzým Q10 | 608,24 ± 180,36                       | 466,60 ± 119,00                          | 490,64 ± 138,22                               |

Hodnoty vyjadrujú priemerné koncentrácie ± STDEV.

## ZÁVER

Aj napriek tomu, že boli prezentované len čiastkové výsledky, záverom je možno povedať, že správne naplánovaná vegetariánska strava je nutrične adekvátna, plne zdravotne vyhovujúca a schopná zabezpečiť zdravotné benefity v prevencii mnohých ochorení. Mierne formy vegetariánskeho stravovania (semi, lakto-ovo-ako boli aj probandi v našej štúdií) dokážu človeku pri starostlivom a pestrom výbere potravín zabezpečiť dostatok všetkých živín bez reálnej hrozby nutričných deficitov a benefity tejto stravy prevyšujú potenciálne riziká.

Táto štúdia bola vytvorená realizáciou projektu „Výskum zdravotných efektov rastlinnej potravy a možnosti redukcie zdravotných rizík“, ITMS:26240220022, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

## LITERATÚRA

1. ASPLUND, K. 2002. Antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular disease, a systematic review. In *J Internal Medicine*, vol. 251, 2002, p. 372-392.
2. CARR, A.C., FREI, B. 1999. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. In *Am J Clin Nutr*, vol. 69 (6), 1999, p. 1086-1107.
3. CERHATA, D., BAUEROVÁ, A., GINTER, E. 1994. Stanovenie kyseliny askorbovej v sére HPLC metódou a jeho korelácia ku spektrofotometrickému stanoveniu. In *Česká a Slovenská Farmácia*, vol. 43, 1994, p. 166-168.
4. DEY, P., GUPTA, P., ACHARYA, N.K., RAY, S. 2008. Antioxidants and lipid peroxidation in gestational diabetes - a preliminary study. In *Indian J Physiol Pharmacol*, vol. 52 (2), 2008, p. 149-156.
5. ESTERBAUER, H., WAG, G., PUHL, H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. In *British Medical Bulletin*, vol. 49, 1993, p. 566-576.
6. GEY, K.F. 1995. Ten year retrospective on the antioxidant hypothesis of arteriosclerosis. Threshold plasma levels of antioxidant micronutrients related to minimum cardiovascular risk. In *Nutrition and Biochemistry*, vol. 6, 1995, p. 206-236
7. GUSAK, M.A., DELLAPENNA, D. 1999. Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. In *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, vol. 50, 1999, p. 133-161.
8. HESS, D., KELLER, H.E., OBERLIN, B., BONFANTI, R., SCHUEP, W. 1991. HPLC determination of carotenoids, tocopherols and retinol in plasma. In *Int J Vitam Nutr Res*, vol. 61, 1991, p. 232-238.
9. HOUSTON, M.C. 2010. The role of cellular micronutrient analysis, nutraceuticals, vitamins, antioxidants and minerals in the prevention and treatment of hypertension and cardiovascular disease. In *Ther Adv Cardiovasc Dis.*, vol. 4(3), 2010, p. 165-183.
10. KEY, T.J., APPLEBY, P.N., SPENCER, E.A. 2009. Cancer incidence in British vegetarians. In *Brit.J.Cancer*, vol. 101, 2009, p. 192-197.
11. KRAJČOVIČOVÁ-KUDLÁČKOVÁ, M., BLAŽÍČEK, P., BABINSKÁ, K. 2000. Traditional and alternative nutrition-levels of homocysteine and lipid parameters in adults. In *Scand J Clin lab Inves*, vol. 60, 2000, p. 657-664.

12. KRAJČOVIČOVÁ-KUDLÁČKOVÁ, M., PAUKOVÁ, V., BAČEKOVÁ, M., DUŠINSKÁ, M. Lipid peroxidation in relation to vitamin C and vitamin E levels. In *Cent Eur J Public Health*, vol. 12 (1), 2004 p. 46-48.
13. SZETO, Y.T., KWOK, T.C., BENZIE, I.F. 2004. Effect of a long-term vegetarian diet on biomarkers of antioxidant status and cardiovascular disease risk. In *Nutr*, vol. 20, 2004, p. 863-866.
14. LEITZMANN, C. 2005. Vegetarians diets-what are the advantages? In *Forum Nutr.*, vol. 57, 2005, p. 147-156.
15. PAZDRO, R., BURGESS, J.R. 2010. The role of vitamin E and oxidative stress in diabetes complications. In *Mech Ageing Dev.*, vol. 131(4), 2010, p. 276-286.

**Kontaktná adresa:** RNDr. Csilla Mišľanová, PhD., Slovenská zdravotnícka univerzita, Limbová 12, 833 03 Bratislava, e-mail: [csilla.mislanova@szu.sk](mailto:csilla.mislanova@szu.sk)