

ЗНАЧАЈ ПРИРОДНЕ ИСХРАНЕ НОВОРОЂЕНЧАДИ У АНТИОКСИДАЦИОНОЈ ОДБРАНИ

Драгана САВИЋ¹, Јелена ВОЈИНОВИЋ¹, Лилика ЗВЕЗДАНОВИЋ²,
Владан ЂОСИЋ², Војин САВИЋ³

¹Дечја интерна клиника, Клинички центар Ниш, Ниш; ²Институт за клиничку биохемију,
Клинички центар Ниш, Ниш; ³Институт за медицинска истраживања, Медицински факултет, Ниш

КРАТАК САДРЖАЈ

Испитиван је значај ензима супероксид-дизмутазе (*SOD*) и глутатион-пероксидазе (*GSH-Px*) у антиоксидационој заштити новорођенчади анализом активности ова два ензима у хуманом колоструму и млеку (добијеном од 63 породиље, после нормалног порођаја, без компликација и знакова инфекције), желудачном садржају 10 новорођенчади на природној исхрани и 15 новорођенчади на вештачкој исхрани (без знакова инфекције), као и у плазми 10 новорођенчади без знакова инфекције и 10 новорођенчади која су била у стању неонатусне сепсе. Резултати истраживања су показали да у колоструму постоји статистички значајно већа активност *SOD* ($p < 0,001$) у односу на зрело млеко, али без значајне статистичке разлике у активности *GSH-Px* у овим узорцима. У желудачном садржају деце на вештачкој исхрани активност *SOD* је статистички значајно нижа него код деце на природној исхрани, као и од активности у зрелом мајчином млеку ($p < 0,001$). Код новорођенчади са сепсом утврђено је статистички значајно повећање активности *SOD* у плазми, као и значајно снижење *GSH-Px*, у односу на новорођенчад без знакова инфекције и на природној исхрани. Негативна корелација између вредности *SOD* и *GSH-Px* у узорцима желудачног садржаја новорођенчади на природној и вештачкој исхрани, као и у стању сепсе указује на то да је активност оба ензима у неонатусном периоду значајна за адекватну антиоксидациону заштиту. Природна исхрана зрелим мајчиним млеком је вероватно важна у успостављању адекватне антиоксидационе заштите новорођенчади.

Кључне речи: колострум; хумано млеко; антиоксидациони ензими; *SOD*; *GSH-Px*

УВОД

Антиоксидациона заштита организма у физиолошким условима обухвата три нивоа деловања: спречавање стварања слободних радикала, ангажовање антиоксидационог система у условима нормалног и појачаног стварања слободних радикала и деловање ензимских антиоксиданата који учествују у репарацији насталог оксидационог оштећења различитих липида, протеина, угљених хидрата и нуклеинских киселина. Ензими одговорни за репарацију и делимично или потпуно ремодулирање оксидираних супстрата су класична и глутатион-пероксидаза зависна од фосфолипида, фосфолипаза А₂, протеолитички ензими, метионин-сулфокид редуктаза, гликозидазе, егзонуклеазе, ДНК лигазе и ДНК полимеразе [1].

Према природи и начину деловања, антиоксиданти могу бити ензимски и неензимски. Ензимски антиоксиданти су супероксид-дизмутаза, каталаза, глутатион-пероксидаза, глутатион-редуктаза и глутатион-С трансферазе. Они чине примарну линију антиоксидационе заштите, док неензимски антиоксиданти представљају секундарну линију одбране (природни ендогени производи ћелије, нутритивне егзогене материје, фармаколошки активне супстанции). Неензимски антиоксиданти су: витамин Е, витамин С, бета каротен, глутатион, метионин, цистеин, албумин, таурин и прекурсорни, билирубин, мокраћна киселина, креатинин, коензим Q, флавоноиди итд.

У стању запаљењске реакције стимулише се производња и активност примарних антиоксиданата. Тада долази до повећања потрошње ових ензима, па је због тога стимулисана њихова даља производња.

Тако у стању сепсе долази до енормне активације оксидационог, али и антиоксидационог система [2]. Истовремено је нарушена равнотежа између прооксидационог и антиоксидационог дејства, интензивира се дејство слободних радикала и ствара њихова ланчана реакција, што доводи до оштећења мембрана ћелија, ћелијских органела и базалних мембрана (липидна пероксидација). Ови процеси воде ка поремећеној функцији различитих органа и система.

Квалитет примарног антиоксидационог система може се проценити, између осталог, и утврђивањем активности ензима глутатион-пероксидазе (*GSH-Px*) и супероксид-дизмутазе (*SOD*), као и каталазе. Активност ових ензима може бити један од показатеља оксидационог стреса. Мало је радова и поузданих података о значају ових ензима за квалитет антиоксидационог одговора код новорођенчета. Квалитетна заштита новорођенчета укључује и уравнотежен оксидационо-антиоксидациони систем, што у стањима запаљенских реакција обезбеђује ефикасну одбрану организма без већих оштећења ткива [3]. Испитивање активности антиоксидационих ензима код здраве новорођенчади или код инфекција и сепсе од великог је клиничког значаја за процену квалитета заштите новорођенчета.

Исхрана новорођенчета колострумом и мајчиним млеком јесте наставак његове идеалне парентералне исхране у фетусном периоду. Оваква исхрана је усклађена са степеном зрелости гастроинтестиналног система новорођенчета и низом услова у којима је дете заштићено од инфекције и прекомерне реактивности. Ово се, пре свега, односи на неконтролисани оксидациони прасак, у којем због дејства слободних радикала, пре свега кисеоника, страдају ћелије и ткива. Велики број радова показује да је пра-

вилан развој оралне толеранције условљен адекватном антиоксидационом заштитом у првим месецима по рођењу, уз примарну дигестивну колонизацију еубактеријама [4].

ЦИЉ РАДА

Циљ овог истраживања је био да се утврди значај ензима *GSH-Px* и *SOD* у антиоксидационој заштити код новорођенчади анализом активности ових ензима у мајчином колоструму и млеку у односу на њихову активност у желудачном садржају новорођенчета. Извршена је и анализа активности ових ензима у плазми новорођенчади у стањима сепсе. Овим истраживањем се наглашава предност природне исхране над вештачком, будући да се природном исхраном обезбеђује, између осталог, и унос антиоксидационих ензима и њихово присуство у организму новорођенчади.

МЕТОД РАДА

Узорци колострума незрелог и зрелог млека добијени су од 63 породице после нормалног порођаја, без компликација, укључујући и инфекцију. Узорци су добијени мануелном експресијом од првог до трећег дана лактације (колострум), а затим 15. дана лактације (зрело мајчино млеко), сакупљани су у стерилне пластичне епрувете и замрзавани на -20°C . Желудачни садржај је добијен од 10 новорођенчади без знакова инфекције и на природној исхрани зрелим мајчиним млеком и 15 новорођенчади на вештачкој исхрани, такође без инфекције. Садржај желуца је добијен гастричном сондом један сат после храњења, после претходне провере аспирацијом да нема заосталог млечног садржаја у желуцу. Након центрифугирања желудачног садржаја у супернатану је одређивана *pH* вредност, при чему је дисоцирана *HCl* упоређивана на Муровој (*Moor*) табели. Добијени узорци су замрзавани на -20°C . Узорци плазме добијени су из периферне крви венепункцијом од 10 здравих новорођенчади без знакова инфекције (пет на природној и пет на вештачкој исхрани) и од 10 новорођенчади са сепсом и на природној исхрани. Након издвајања узорци су замрзавани до тренутка одређивања активности ензима.

Количина протеина у колоструму, желудачном садржају и плазми одређивана је методом по Лорију (*Lowry*). Активност *SOD* и *GSH-Px* је одређивана применом комерцијалних тестова *Ransod* и *Ransel* фирме *Randox*. Тест *Ransod* се заснива на конкуритивној инхибицији стварања супероксид-анион радикала у систем ксантин – ксантин-оксидаза. Тест за одређивање *GSH-Px* заснива се на методи Поглија (*Pogli*) и Валентина (*Valentin*), у којој *GSH-Px* катализује оксидацију глутатиона у кумен-хидропероксид [5]. Добијене вредности су изражаване бројем јединица по граму протеина (*U/g* прот.). Анализе су рађене на апарату *Synchron CX-50* (*Beckman*).

О свим поступцима за узимање узорака и разлика због којих се то ради мајке су биле детаљно ин-

формисане и дале свој писани пристанак. С обзиром на то да је узимање узорака саставни део редовних медицинских поступака на које су мајке дале пристанак, није било етичких конфликта због којих би било потребно тражити одобрење Етичког комитета.

Сви добијени резултати су статистички анализирани коришћењем програма *SSPS 10.0* и приказани табеларно или графички. Анализа статистичких значајности вршена је применом Ман-Витнијевог (*Mann-Whitney*) теста, а анализа корелација коришћењем Пирсоновог (*Pearson*) теста корелације.

РЕЗУЛТАТИ

Резултати нашег испитивања показују да је активност *SOD* $15,01-11,72$ *U/g* у колоструму првог дана лактације. Другог дана долази до статистички значајног повећања вредности овог ензима ($61,85\pm 33,05$). Трећег дана су вредности *SOD* у колоструму двоструко ниже него другог дана ($35,23\pm 22,05$). Петнаестог дана вредности *SOD* у зрелом млеку су статистички значајно ниже ($p<0,001$) од вредности измерених прва три дана лактације ($0,754\pm 0,32$ *U/g*). За разлику од *SOD*, активност *GSH-Px* има приближно исте вредности у узорцима колострума у прва три дана, као и у узорцима зрелог млека (Табела 1).

Анализа активности *SOD* у желудачном садржају показала је да су вредности код новорођенчади на природној исхрани ($0,65\pm 0,53$ *U/g*) статистички значајно веће од вредности код новорођенчета на вештачкој исхрани ($0,49\pm 0,38$ *U/g*) ($p<0,001$). Активност *SOD* у обе ове групе била је нижа од вредности измерених у зрелом млеку ($0,73\pm 0,32$) (Графикон 1).

Активност *GSH-Px* је статистички значајно виша у желудачном садржају у односу на измерену активност у зрелом млеку (Графикон 2). Вредности *GSH-Px* су статистички значајно веће у желудачном садржају новорођенчади на природној исхрани ($7,36\pm 1,9$ *U/g*) у односу на групу новорођенчади на вештачкој исхрани ($4,39\pm 1,8$ *U/g*) ($p<0,001$) (Графикон 2). Корелациона анализа је показала негативну корелацију између вредности *SOD* и *GSH-Px* у узорцима желудачног садржаја. Код новорођенчади на природној

ТАБЕЛА 1. Активност *SOD* и *GSH-Px* у узорцима колострума и зрелог млека.

TABLE 1. *SOD* and *GSH-Px* activity in samples of colostrum and mature milk.

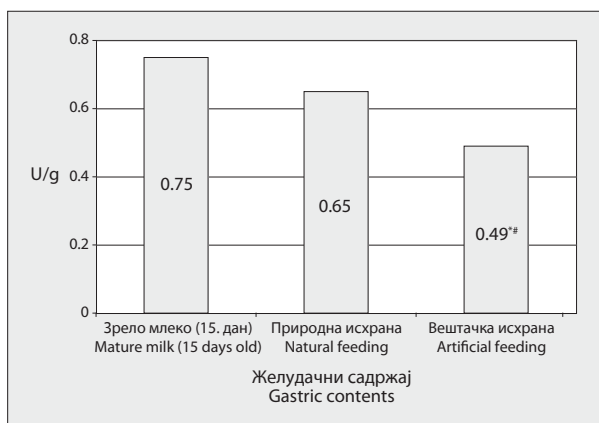
Храна Feeding	SOD	GSH-Px
Колострум (1. дан) Colostrum (day 1)	$15.01\pm 11.72^{*}\#$	2.40 ± 1.26
Колострум (2. дан) Colostrum (day 2)	$61.85\pm 33.05^{*}$	3.27 ± 1.02
Колострум (3. дан) Colostrum (day 3)	$35.23\pm 22.05^{*}$	2.89 ± 1.68
Зрело млеко (15. дан) Mature milk (day 15)	0.754 ± 0.32	2.95 ± 1.26

* $p<0,001$ (у поређењу са вредностима у зрелом млеку)

$p<0,001$ (у поређењу са вредностима у колоструму 2. и 3. дана)

* $p<0,001$ (in comparison to values for mature milk)

$p<0,001$ (in comparison to values for 1-day-old and 2-day-old colostrum)



ГРАФИКОН 1. Активност SOD у зрелом млеку и желудачном садржају код здраве новорођенчади.

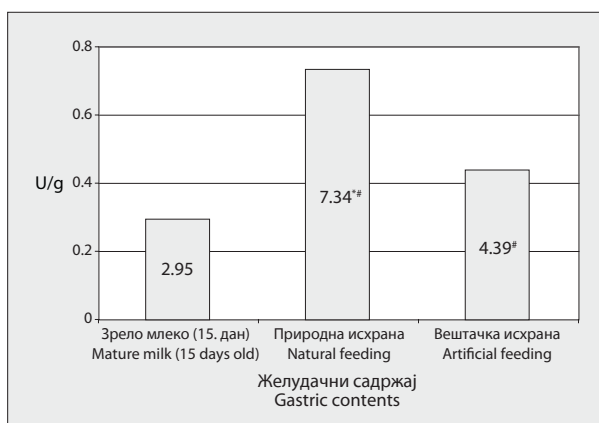
GRAPH 1. SOD activity in mature milk and gastric contents of healthy newborns.

* $p < 0,001$ (статистички значајно у поређењу природне и вештачке исхране)

$p < 0,001$ (статистички значајно у поређењу са зрелим млеку)

* $p < 0,001$ (statistically significant in comparison to natural and artificial feeding)

$p < 0,001$ (statistically significant in comparison to mature milk)



ГРАФИКОН 2. Активност GSH-Px у зрелом млеку и желудачном садржају код здраве новорођенчади.

GRAPH 2. GSH-Px activity in mature milk and gastric contents of healthy newborns.

* $p < 0,001$ (статистички значајно у поређењу природне и вештачке исхране)

$p < 0,001$ (статистички значајно у поређењу са зрелим млеку)

* $p < 0,001$ (statistically significant in comparison to natural and artificial feeding)

$p < 0,001$ (statistically significant in comparison to mature milk)

исхране r је $-0,543$ ($p < 0,001$), а на вештачкој исхране r је $-0,613$ ($p < 0,001$).

Мерење активности антиоксидантних ензима у плазми новорођенчади (Табела 2) показује да су вредности SOD сличне вредностима измереним у желудачном садржају. Насупрот томе, постоји статистички значајно ($p < 0,001$) већа активност GSH у плазми у односу на вредности добијене у узорцима желудачног садржаја. Код новорођенчади са сепсом постоји статистички значајно повећање активности SOD, као и значајно снижење активности GSH-Px ($p < 0,001$). Корелационом анализом групе новорођенчади без знакова инфекције и новорођенчади са сепсом добијена је вредност $r = 0,752$ ($p < 0,001$).

ТАБЕЛА 2. Активност SOD и GSH-Px у плазми код новорођенчади са сепсом и здраве новорођенчади на природној исхрани.

TABLE 2. SOD and GSH-Px activity in plasma of newborns with sepsis and of newborns being naturally fed.

Испитаници Subjects	SOD	GSH-Px
Здрава новорођенчад Healthy newborns	1.06 ± 0.41	92.016 ± 3.09
Новорођенчад са сепсом Newborns with sepsis	$1.4 \pm 0.587^*$	$53.54 \pm 14.32^*$

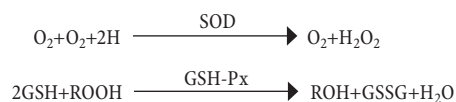
* $p < 0,001$ (у односу на здраву новорођенчад)

* $p < 0,001$ (in comparison to healthy newborns)

ДИСКУСИЈА

Оксидациони стрес се може дефинисати као последица повећане производње слободних радикала кисеоника, односно смањене одбрамбене активности антиоксидационог система. Одбрамбени антиоксидантни механизми могу бити ензимски и неензимски системи. Важне компоненте антиоксидационог система су SOD и GSH-Px. Познато је да повећана активност ензима SOD представља адаптациони одговор на повећане концентрације супероксидних јона, а дисеквибријум између SOD и GSH-Px настаје као последица оксидационог стреса у ћелији. Многи раније објављени радови указују на то да је од великог протективног значаја очуван однос у активностима ових ензима [6].

Ова два ензимска система функционишу независно, али је познато да прво делује SOD, и то на супероксид-анјон и катализује стварање водоник-пероксида, који је супстрат за деловање глутатион-пероксидазе која је селен-независна. ROOH је органски хидропероксид, а на приказаној поједностављеној схеми види се да GSH-Px, као други ензим, делује на производ реакције првог, што би значило да не делују истовремено, што се мора имати у виду приликом мерења њихове активности.



У неонатусном периоду јавља се специфичан облик физиолошки смањене заштићености новорођенчади. Могућност адаптације у правцу повећане активности антиоксидационих ензима у условима инфекције један је од фактора обезбеђивања минимума одбране новорођенчета [7]. Измерена активност SOD у колоструму у прва три дана по рођењу новорођенчета могла би указати на његов значај у антиоксидационој заштити у току евентуалних инфекција новорођенчета, када се ниво оксидационих метаболитских продуката значајно повећава [2]. Ово је вероватно и разлог постојања физиолошког адаптационог механизма којим колострум мајке обезбеђује значајно бољи ниво антиоксидационе заштите у првим данима лактације у периоду када новорођенче није у стању да се самостално заштити сопственом синтезом ових ензима [8].

Са сазревањем мајчиног млека долази до значајног смањења активности SOD, тако да она достиже

вредности измерене у плазми новорођенчета без знакова инфекције [9, 10]. Ово се вероватно догађа у периоду када је новорођенче способније да преузме функције антиоксидационе заштите. Даља исхрана мајчиним млеком обезбеђује одређен степен заштите, с обзиром на то да су резултати нашег истраживања показали да новорођенчад на вештачкој исхрани имају статистички значајно ниже вредности *SOD*. Познато је да код деце на вештачкој исхрани постоји колонизација дигестивног система различитим микроорганизмима у односу на одојчад на природној исхрани [11]. Све је већи број аутора који сматра да ово може бити пресудно за каснији развој различитих патолошких стања [12].

Активност глутатион-пероксидазе у нашем испитивању није показала значајне разлике у вредностима измереним у колоструму и зрелом млеку. Међутим, посебну пажњу заслужују резултати наше студије који показују да постоје статистички значајно веће вредности овог ензима у желудачном садржају новорођенчади на природној исхрани у односу на активности измерене у зрелом млеку. Овакав налаз указује на то да новорођенче има донекле сопствену продукцију антиоксидантних ензима [13]. Статистички значајна разлика између активности *SOD* и *GSH-Px*, у зависности од природне или вештачке исхране, може бити последица или значајно мање активности ових ензима када се новорођенчад налази на вештачкој исхрани, или смањене потребе за њиховом већом активношћу у условима вештачке исхране [14].

У нашем испитивању је показано да код новорођенчади са сепсом повећање активности *SOD* прати статистички значајно смањење активности *GSH-Px* у плазми у односу на вредности код новорођенчади без инфекције. То указује на то да неадекватна антиоксидациона заштита може имати значајну улогу у развоју сепсе [15]. Резултати наше студије, као и налаза других аутора показују да би колострум у првим данима по рођењу могао имати важну улогу у обезбеђењу антиинфективне заштите новорођенчета [16]. Такође, природна исхрана зрелим мајчиним млеком током дужег периода лактације игра улогу у успостављању адекватне антиоксидационе одбране новорођенчета [14, 17].

ЗАКЉУЧАК

Анализе активности два антиоксидантна ензима (*SOD* и *GSH-Px*) у узорцима колострума, зрелог млека, желудачног садржаја новорођенчади после подоја и после оброка замене за мајчино млеко показују значајно мање вредности у односу на активност у плазми код новорођенчади без знакова инфекције и са знацима сепсе. Активност ових ензима је у плазми новорођенчади знатно нижа у односу на одрасле особе, али је у стању сепсе измерена велика активност. Активност *SOD* и *GSH-Px* је статистички значајно нижа у колоструму и зрелом млеку, али се може мерити, што представља идеалан еквилибријум у првим данима по рођењу, у адаптационом периоду, када је присуство инфективних агенаса спречено на више начина, а посебно природном исхраном.

Активност ових ензима се повећава у првим данима у току исхране колострумом, да би се наредних дана смањила и остала константно ниска у зрелом млеку.

Активност у желудачном садржају такође је већа код деце на природној исхрани, али је измерена значајно већа активност у желудачном садржају код деце на вештачкој исхрани у односу на децу која се хране зрелим млеком, што можда може индиректно да укаже на рану стимулацију у дигестивном систему новорођенчета на вештачкој исхрани и потребу за већом активношћу антиоксидационог система. Мале вредности антиоксидационе заштите за период новорођенчета значе добру адаптацију у дигестивном систему, који уз респирациони систем представља место сталне стимулације агенсима из спољашње средине. Природна исхрана дојењем која је правилно спроведена у првим данима по рођењу и надаље јесте идеалан начин заштите и у функцији оксидационо-антиоксидационих реакција.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kinsky N. Mechanism of activation of biological antioxidants. *Proc Soc Biol Ned* 1992; 200:248-54.
2. Batra S, Kumar R, Seema, Kapor AK, Ray G. Alteration in antioxidant status during neonatal sepsis. *Am Trop Pediatr* 2000; 20(1):27-33.
3. Rosenfeld W, Cocepacion L. Endogenous antioxidant defenses in neonates. *J Free Radic Biol Med* 1986; 2(4):295-8.
4. Friel JK, Martin SM, Langdon M, Hezberg GR, Buettner GR. Milk from mothers of both premature and full-term infants provides better antioxidant protection than does infant formula. *Pediatr Res* 2002; 51:612-8.
5. Đorđević V, Pavlović D, Kocić G. Biohemija slobodnih radikala. Niš; 2000.
6. Gaeta LM, Tozzi G, Pastore A, Bertini E, Piemonte F. Determination of superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in blood of healthy pediatrics subjects. *Clinica Chimica Acta* 2002; 322:117-20.
7. Rock MJ, Kincaid RL, Carstens GE. Effect of prenatal sources and level of dietary selenium on passive immunity and thermometabolism of newborn lambs. *Mall Rumin Res* 2001; 40(2):129-38.
8. Buescher ES, McIlherhan SM. Antioxidant properties of human colostrum. *Pediatr Res* 1988; 24:14-9.
9. Linmark-Manson H, Akeson B. Antioxidative factors in milk. *Br J Nutr* 2000; 84(Suppl 1):103-10.
10. Abbe I, Friel JK. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase content of human milk from mothers of premature and full-term infants during the 3 months of lactation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 31(3):270-4.
11. Buescher ES, Hair PS. Human milk anti-inflammatory component contents during acute mastitis. *Cell Immunol* 2000; 210(2):87-95.
12. Cordain L, Toohley L, Smith MJ, et al. Modulation of immune function by dietary lectins in rheumatoid arthritis. *Br J Nutr* 2000; 83:201-17.
13. Torres A, Farre R, Lagarda MJ, Monleon J. Determination of glutathione peroxidase activity of human milk. *Nahrung* 2003; 47(6):430-3.
14. Alberti-Fidanza A, Burini G, Pariello G. Total antioxidant capacity of colostrum and transitional and mature human milk. *J Matrn Fetal Neonatal Med* 2002; 11(4):275-9.
15. Kumar R, Mandal RN, Tandon A, et al. Indian J serum TNF- α and free radical scavengers in neonatal septicemia. *Pediatr* 1999; 66(4):511-6.
16. Qin YD, Luo X, Huang DL, Xu CZ. Dynamic changes of enzyme activities and growth factor contents in human colostrum. *Zhng-hua Fu Chan Ke Za ZHI* 2004; 39(7):449-52.
17. Dodge ML, Wander RC, Xia Y, Butler JA, Whanger PD. Glutathione peroxidase activity modulates fatty acid profiles of plasma and breast milk in Chinese women. *J Trace Elem Med Biol* 1999; 12(4):221-30.

IMPORTANCE OF BREAST-FEEDING IN ANTIOXIDANT DEFENCE

Dragana SAVIĆ¹, Jelena VOJINOVIĆ¹, Lilika ZVEZDANOVIĆ², Vladan ĆOSIĆ², Vojin SAVIĆ³

¹Children's Hospital, Clinical Centre, Niš; ²Institute for Medical Biochemistry, Clinical Centre, Niš;

³Institute for Biomedical Research, School of Medicine, Niš

ABSTRACT

We investigated the importance of two enzymes (superoxide dismutase – SOD and glutathione peroxidase – GSH-Px) in the antioxidant defence of newborns and analysed their activity in: human colostrum and milk (from 63 mothers, after normal delivery, without complications or signs of infection), gastric fluid (from 10 breast-fed newborns, 7-28 days after birth; and from 15 artificially-fed newborns, with no signs of infection, 7-28 days after birth), and plasma (from 10 newborns, 1-28 days old, with no signs of infection, and 10 newborns, 1-28 days old, with signs of neonatal sepsis). The results of the study showed that there was statistically significant increased activity of SOD ($p < 0.001$) in colostrum compared to mature milk. There was no statistically important difference in the activity of GSH-Px between those two samples. The activity of SOD in the gastric fluid of the artificially-fed newborns was statistically significantly lower than in the breast-fed newborns ($p < 0.001$). The same results were found for mature mother's milk. We discovered a significant increase of SOD plasma activity in the new-

borns with sepsis, compared to the breast-fed newborns, with no signs of infection. The negative correlation between the activities of SOD and GSH-Px in the gastric fluid samples of the breast-fed and the artificially-fed newborns and the newborns with sepsis, showed that the activities of both enzymes were important for adequate antioxidant defence during the neonatal period. Breast-feeding with both colostrum and mature human milk is probably very important for adequate antioxidant defence in newborns.

Key words: colostrum; human milk; antioxidant enzymes; SOD; GSH-Px

Dragana SAVIĆ
Dečja interna klinika
Klinički centar Niš
Bulevar dr Zorana Đinđića 48, 18000 Niš
Tel: 018 234 190
E-mail: vojins@eunet.yu

* Рад је саопштен на Конгресу Удружења алерголога и клиничких имунолога Србије и Црне Горе септембра 2004. у Нишкој Бањи.