ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

POPIS OBJAVU K DIPLOMU ČÍS. 25

Prihlásené 24.01.77 (PO 30-77)

Právo prednosti od 24. 01. 77

Zverejnené Čs. gastroenterologie a výživa, 32 (8) : 501, 1978

Udelené 21.01.82

Vydané 15.01.83

MDT 577.3

Autor objavu: GINTER EMIL, RNDr., CSc., BRATISLAVA

Názov objavu: **Funkcia vitamínu C v 7 alfa-hydroxylácii cholesterolu pri biosyntéze žlčových kyselín**

Predmet objavu: Jav spočívajúci vo funkcii vitamínu C (L-askorbovej kyseliny pri kľúčovej rýchlosť limitujúcej reakcii transformácie cholesterolu na žlčové kyseliny, 7 alfa-hydroxylácii sterolového jadra cholesterolu, prebiehajúcej v pečeňových mikrosomoch za účasti cytochromu P-450.

Od konca 2. svetovej vojny sa v literatúre vyskytujú správy o účinnosti vitamínu C (L-askorbová kyselina, askorbát) pri prevencii experimentálnej hypercholesterolémie a ateroskleróz a o možnosti využitia vitamínu C aj pri terapii humánnych hyperlipémií. Najznámejšie sú v tejto oblasti práce skupiny akademika Mjasnikova (Mjasnikov A. L.: Influence of some factors on development of experimental atherosclerosis, Circvulation 17 : 99—113, 1958). Mechanizmus účinku vitamínu C pri kontrole hladín cholesterolu však zostával úplne neznámy.

Podstata objavu spočíva v tom, že úloha vitamínu C pri kontrole hladín cholesterolu bola lokalizovaná na molekulárnej úrovni. L-askorbová kyselina prostredníctvom cytochromu P-450 ovplyvňuje v endoplazmatickom retikule pečeňovej bunky rýchlosť kľúčovej reakcie premeny cholesterolu na žlčové kyseliny 7 α-hydroxyláciu sterolového jadra cholesterolu. Pretože táto reakcia limituje celkovú rýchlosť transformácie cholesterolu na jeho hlavný degradačný produkt, pri nadostatku vitamínu C dochádza k spomaleniu tohto procesu s následným hromadením cholesterolu v organizme.

Výskum mechanizmu zásahu vitamínu C do metabolizmu cholesterolu umožnilo vypracovanie modelu skrytého chronického nedostatku vitamínu C u morčiat (Ginter E., Bobek P., Ovečka M.: Model of chronic hypovitaminosis C in guinea pigs. Int. Z. Vitam Forsch. 38 : 104—113, 1968). Staršie práce používali totiž modelové situácie, podstatne odlišné od výživovej situácie súčasného človeka. Pracovali alebo na zvieratách, ktoré na rozdiel od človeka endogénne syntetizujú vitamín C (napr. myš, potkan alebo králik), alebo na morčatách v štádiu akútneho skorbutu. Skorbut predstavuje totálny metabolický rozvrat, ktorý pri biochemickom výskume znemožňuje stanoviť primárnu príčinu určitej metabolickej poruchy.

Model skrytého nedostatku vitamínu C je podstatne bližší výživovej situácii moderného človeka a má pre biochemický výskum podstatne väčšiu cenu. Morčatá sú držané na skorbutogénej diéte po dobu dvoch týždňov, následkom čoho hladina vitamínu C v ich orgánoch prudko klesne, ale príznaky akútnej avitaminózy C sa ešte neprejavujú. Potom sa začne podávať udržiavacia dávka askorbovej kyseliny (0,5 mg/zviera alebo 1 mg/kg telesnej hmotnosti/deň), ktorá zabráni prejavom skorbutu, ale hladiny vitamínu C v tkanivách zostávajú trvale na veľmi nízkej úrovni (obr. 1). Takto sa vytvorí rovnovážny stav, pri ktorom sú morčatá zdanlivo normálne (rovnaký konzum potravy, rovnaký rast a chovanie ako u kontrolných zvierat). Kontrolné zvieratá dostávajú rovnakú diétu, ale minimálne 20násobne vyššie dávky askorbovej kyseliny. Pri takomto usporiadaní jednou premennou je rozdielna hladina vitamínu C v tkanivách, takže pri nájdení určitej biochemickej poruchy možno označiť jednoznačne za kauzálny faktor skrytý nedostatok vitamínu C.

U morčiat držaných v stave skrytého nedostatku vitamínu C minimálne desať týždňov dochádzalo pravidelne k akumulácii cholesterolu v pečeni a krvnom séru (Tabulka 1). Výskum mechanizmu tohto javu bol vzhľadom na komplikovanosť metabolizmu cholesterolu zložitý, pretože o výške hladín v živočíšnom i ľudskom organizme rozhoduje prinajmenšom päť procesov: 1) distribúcia cholesterolu medzi krvou a tkanivami, 2) vstrebávanie exogénneho cholesterolu, 3) syntéza endogénneho cholesterolu, 4) vylučovanie cholesterolu vo forme neutrálnych sterolov, 5) transformácia cholesterolu na žlčové kyseliny.

Myšlienkový a metodický prístup k riešeniu tejto problematiky je skrátene zhrnutý v tabulce 2, kde sú uvedené aj citácie pôvodných prác.

Tabulka 1. Vplyv chronického skrytého nedostatku vitamínu C na koncentráciu celkového cholesterolu v krvnej plazme a v pečeni morčiat samcov

Krvná plazma (mmol/l)			Pečeň (mmol/kg)		
Dĺžka hypovitaminózy C (týždne)	KONTROLA	HYPOVITAMINÓZA C	Dĺžka hypovitaminózy C (týždne)	KONTROLA	HYPOVITAMINÓZA C
16 — 20	3,06 ± 0,36	4,43 ± 0,47	15	9,5 ± 0,8	17,1 ± 1,0
22	2,56 ± 0,16	3,42 ± 0,16	16 — 20	11,8 ± 1,5	16,2 ± 1,7
23	2,46 ± 0,18	3,63 ± 0,21	17 — 21	10,2 ± 0,9	16,0 ± 1,8
24	2,44 ± 0,18	3,63 ± 0,18	20 — 22	10,6 ± 0,9	15,6 ± 2,0
26	2,28 ± 0,18	3,60 ± 0,21	28	8,4 ± 0,4	15,2 ± 2,7
28	2,85 ± 0,16	3,50 ± 0,13	31	9,2 ± 0,6	17,1 ± 2,5

Priemery z 9 — 15 zvierat ± stredná chyba priemeru.
Všetky rozdiely medzi kontrolnými a hypovitaminóznymi skupinami sú štatisticky signifikantné ($P < 0,05 — 0,001$).

Tabulka 2. Zhrnutie myšlienkových a metodických prístupov, ktoré viedli k objavu úlohy vitamínu C pri premene cholesterolu na žlčové kyseliny

OTÁZKA	SPÔSOB RIEŠENIA	ODPOVEĎ
1) Ako vplýva hypovitaminóza C na distribúciu cholesterolu medzi plazmou a tkanivami?	Sledovanie kinetiky relatívnej mernej aktivity 26- ^{14}C-choresterolu medzi plazmou a rôznymi orgánmi. Ginter E., Jankela J., Nemec R., Bobek P.: Použitie cholesterolu-26-^{14}C pre sledovanie distribúcie cholesterolu v tkanivách morčiat, Čs. Gastroent. Výž. 26 : 304—310, 1972	Vplyv nedostaku vitamínu C na distribuciu cholesterolu medzi plazmou a všetkými sledovanými tkanivami bol nesignifikantný
2) Ako vplýva hypovitaminóza C na resorpciu exogénneho cholesteru?	Sledovanie metabolizmu intragastrálne podaného 4-^{14}C-cholesterolu. Ginter E., Červeň J., Mikuš L. : The effect of chronic hypovitaminosis C on the absorption of cholesterol-4-^{14}C in guinea pigs, Physiol. Bohemoslov. 18 : 459—461, 1969.	Pri hypovitaminóze C je resorpcia exogénneho cholesteru mierne znížená
3) Vplýva hypovitaminóza C na syntézu endogénneho cholesterolu?	Sledovanie inkorporácie 1-^{14}C-acetátu do cholesterolu v rôznych tkanivách. Ginter E., Nemec R. : Metabolism of (1-^{14}C)acetate in guinea pigs with chronic vitamin C hyposaturation, J. Atheroscler. Res. 10 : 273—276, 1969. Ginter E. : Marginal vitamin C deficiency, lipid metabolism, and atherogenesis. Adv. Lipid Res. 16 : 167 — 220, 1978.	Vplyv hypovitaminózy C na syntézu endogénneho cholesteru je minimálny
4) Ovplyvňuje hypovitaminóza C vylučovanie cholesterolu vo forme neutrálnych sterolov?	Injekčné podanie 4-^{14}C-cholesterolu a sledovanie odpadu rádioaktivity stolicou vo frakcii neutrálnych sterolov. Ginter E., Červeň J., Nemec R., Mikuš L.: Lowered cholesterol catabolism in guinea pigs with chronic ascorbic acid deficiency. Amer. J. Clin. Nutr. 24: 1238—1245, 1971.	Hypovitaminóza C nevplývala na vylučovanie cholesterolu vo forme neutrálnych sterolov

OTÁZKA	SPÔSOB RIEŠENIA	
5) Ovplyvňuje hypovitaminóza C premenu cholesteru na žlčové kyseliny?	a) Injekčné podanie 4-^{14}C-cholesterolu a sledovanie odpadu rádioaktivity stolicou vo frakcii žlčových kyselín b) Injekčné podanie 4-^{14}C-cholesteru a sledovanie presunu rádioaktívneho uhlíku do žlčových kyselín v pečeni c) Injekčné podanie 26-^{14}C-cholesterolu a sledovanie množstva vydýchaného rádioaktívneho kysličníka uhličitého. Ginter E., Červeň J., Nemec R., Mikuš L.: Lowered cholesterol catabolism in guinea pigs with chronic ascorbic acid deficiency. Amer. J. Clin. Nutr. 24: 1238—1245, 1971. Ginter E.: Choresterol : vitamin C controls its transformation to bile acids. Science 179 : 702—704, 1973.	Všetk dokáz **hypov** **transf** **kyseli**
6) Je zistené spomalenie premeny cholesteru na žlčové kyseliny významné z kvantitativneho hľadiska a z hľadiska metabolického obratu cholesterolu?	Matematická interpretácia pokusov, v ktorých sa po aplikácii 26-^{14}C-cholesterolu sleduje kinetika vydýchaného rádioaktívneho kysličníka uhličitého a merná aktivita cholesterolu v plazme a tkanivách. Dvojkompartmentová analýza vyhasínacích kriviek plazmatického ^{14}C-cholesterolu. Ginter E., Nemec R., Červeň J., Mikuš L.: Quantification of lowered cholesterol oxidation in guinea pigs. Lipids 8 : 135—141, 1973. Ginter E.: Ascorbic acid in cholesterol and bile acid metabolism. Ann. N. Y. Acad. Sci. 258 : 410—421, 1975.	Pri hy transf kyseli plazm jeho n
7) Sú zistené poruchy reverzibilné?	Sledovanie oxidácie 26-^{14}C-cholesterolu na rádioaktívny kysličník uhličitý u avitaminóznych zvierat pred a po liečbe vysokými dávkami askorbovej kyseliny. Ginter E., Nemec R., Bobek P.: Stimulation of (26-^{14}C) cholesterol oxidation by ascorbic acid in scorbutic guinea-pigs. Brit. J. Nutr. 28 : 205—211, 1972.	Zisten Liečba má za oxidác

Výsledky viedli k jednoznačnému záveru: pri chronickom nedostatku vitamínu C (t. j. hypovitaminóze C) je v pečeni výrazne spomalená premena cholesteru na žlčové kyseliny. Rýchlosť tohto procesu závisí na koncentrácii vitamínu C v pečenkovej bunke: so zvyšovaním koncentrácie vitamínu C rýchlosť premeny cholesteru na žlčové kyseliny lineárne stúpa (obr. 2). Maximálnu degradáciu cholesterolu možno docieliť maximálnymi rovnovážnymi hladinami askorbovej kyseliny v pečeni (Ginter E., Bobek P., Vargová D.: Tissue lovels and optimum dosage of vitamin C in guinea pigs. Nutr. Metabol. 23 : 217—226, 1979).

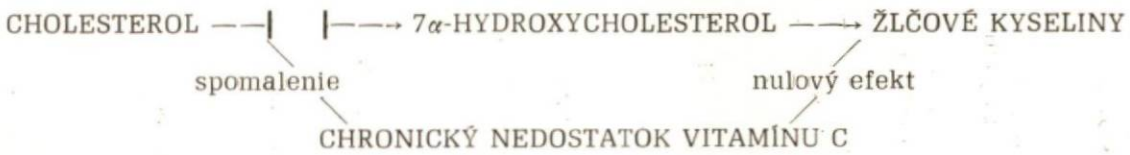
Premena cholesterolu na žlčové kyseliny je mnohostupňový proces, prebiehajúci postupne v endoplazmatickom retikule, cytosole a mitochondriách pečeňovej bunky. Zahrnuje hydroxylačné reakcie, dehydrogenáciu, saturáciu dvojnej väzby v jadre, redukciu 3-ketonu, ω- a β-oxidáciu bočného reťazca cholesterolu.

Prvým stupňom premeny cholesterolu na žlčové kyseliny je vnášanie hydroxyskupiny do polohy 7α v jadre. Predpokladali sme, že askorbová kyselina vplýva práve na túto prvú reakciu, pretože

a) 7α-hydroxylácia cholesterolu je rýchlosť limitujúcou reakciou celkovej premeny cholesterolu na žlčové kyseliny

b) zdá sa, že biologicky obecnou úlohou vitamínu C je jeho účast v hydroxylačných reakciách.

Ak by bol tento predpoklad správny, potom v protiklade k spomalenej degradácii cholesterolu by nemal byť nedostatkom vitamínu C ovplyvnený katabolizmus 7α-hydroxycholesterolu:



S cieľom verifikovať tento predpoklad sme syntetizovali 26-^{14}C-7α-hydroxycholesterol (26-^{14}C-cholest-5-ene-3β,7α-diol; Ginter E., Ozdín L., Nemec R.: Localization of the interference of ascorbic acid deficiency with bile acid biogenesis. Physiol. Bohemoslov. 26 : 353—359, 1977) a sledovali jeho oxidáciu na rádioaktívny kysličník uhličitý in vivo v porovnaní s oxidáciou 26-^{14}C-cholesterolu. Výsledky zhrnuté na obr. 3 ukázali, že na rozdiel od signifikantne spomalenej degradácie 26-^{14}C-cholesterolu nie je degradácia 26-^{14}C-7 α-hydroxycholesterolu nedostatkom vitamínu C ovplyvnená. Je zrejmé, že nedostatok vitaminu C ovplyvňuje premenu cholesterolu na žlčové kyseliny výlučne na stupni 7 α-hydroxylácie; ďalšie stupne degradácie cholesterolu sú na vitamíne C nezávislé. Cholesterol 7 α-hydroxyláza je lokalizovaná v mikrozomálnej frakcii pečenovej bunky a pre svoju aktivitu vyžaduje kyslík, NADPH a cytochrom P-450.

Ak sa vitamín C-deficitným morčatám podá askorbová kyselina, dochádza k paralelnému vzostupu hladiny cytochromu P-450 a oxidácii značkovaného cholesterolu. Tieto výsledky naznačili, že uvažovaný efekt vitamínu C je sprostredkovaný jeho vplyvom na cytochrom P-450 — obr. 4.

V posledných rokoch boli tieto závery potvrdené vo viacerých zahraničných laboratóriách. V mikrozomoch izolovaných z pečene vitamín C-deficitných morčiat bola najdená podstatne znížená aktivita cholesterol 7 α-hydroxylázy a cytochrom P-450 izolovaný z tohto zdroja mal znížen̊ schopnosť katalyzovať 7 α-hydroxyláciu cholesterolu (Björkhem I., Kallner A.: Hepatic 7 α-hydroxylation of cholesterol in ascorbate-deficient and ascorbate-supplemented guinea pigs, J. Lipid Res. 17 : 360—365 1976; Harris W. S., Kottke B. A., Subbiah M. T. R.: Bile acid metabolism in ascrobic acid-deficient guinea pigs, Amer. J. Clin. Nutr. 32: 1837—1841, 1979). Nedávno americkí autori (Holloway D. E., Rivers J. M.: The influence of chronic ascorbic aciddeficiency and excessive ascorbic acid intake on bile acid metabolism and bile composition in the guinea pig. J. Nutr. 1981, v tlači) našli priamu koreláciu medzi aktivitou cholesterol 7α-hydroxylázy a hladinou vitamínu C v pečeni morčiat, ktorá je vo veľmi dobrej zhode s vyššie popísanou priamou koreláciou medzi rýchlosťou oxidácie cholesterolu a koncentráciou kyseliny v pečeni (obr. 2). Všetci títo autori uznávajú prioritu nášho výskumu v tejto oblasti.

Možnosti praktickej aplikácie objavu sú široké, pretože sa začínajú hromadiť údaje o tom, že skrytý nedostatok vitamínu C negatívne vplýva na metabolizmus cholesterolu aju ľudí a že podávaním vitamínu C možno priaznivo ovplyvniť zvýšené hladiny cholesterolu u týchto osôb (Heine H., Norden C.: Vitamin C therapy on hyperlipoproteinemia, Internat. J. Vit. Nutr. Res., Suppl. 19 : 45—54, 1979; Ginter E., Bobek P., Babala J., Jakubovský J., Zaviačič M., Lojda Z.: Vitamin C in atherosclerosis, tamtiež, str. 55—70; Hanck A., Weiser H.: The influence of vitamin C on lipid metabolism in man and animals, tamtiež, str. 83—93). Vo vyspelých zemiach existujú veľké skupiny ľudí ohrozených súčasne skrytým nedostatkom vitamínu C i aterosklerózou. Sú to osoby starších vekových skupín a diabetici. Ak sa u týchto osôb odstráni skrytý nedo-

statok vitamínu C, u väčšiny z nich sa súčasne zníží aj hypercholesterolémia. Nedávno sa podarilo dokázať, že takýto priaznivý efekt vitamínu C možno ešte potencovať súčasným podávaním ďalšej prírodnej látky rastlinného pôvodu — pektínom (Ginter E., Kubec F. J., Vozár J., Bobek P.: Natural hypocholesterolemic agent : pectin plus ascorbic acid, Internat. J. Vit. Nutr. Res. 49 : 406—412, 1979). Objav preto poskytuje podklady pre vypracovanie kombinácií rôznych

prírodných látok so zretelným hypocholesterolemickým účinkom. Vzhľadom na to, že liečba hypercholesterolémie musí byť trvalá, je potrebné používať také preparáty, u ktorých ani dlhoročný príjem nie je spojený s rizikom nežiaducich vedľajších účinkov. Prírodné látky sú v tomto smere nádejnejšie ako syntetické, telu cudzie preparáty. Objav dáva tiež podklady pre racionálne vysvetlenie významu zeleniny a ovocia v prevencii cievnych ochorení.

Texty k obrázkom:

Obr. 1. Hladiny vitamínu C v orgánoch morčiat v priebehu vývoja chronického skrytého nedostatku vitamínu C.
Šipka označuje začiatok podávania udržiavacej dávky askorbovej kyseliny.

Obr. 2. Lineárna korelácia medzi koncentráciou vitamínu C v pečeni a rýchlosťou premeny cholesterolu na žlčové kyseliny ($P < 0{,}001$).
● kontrolné morčatá
▲ morčatá so skrytým nedostatkom vitamínu C

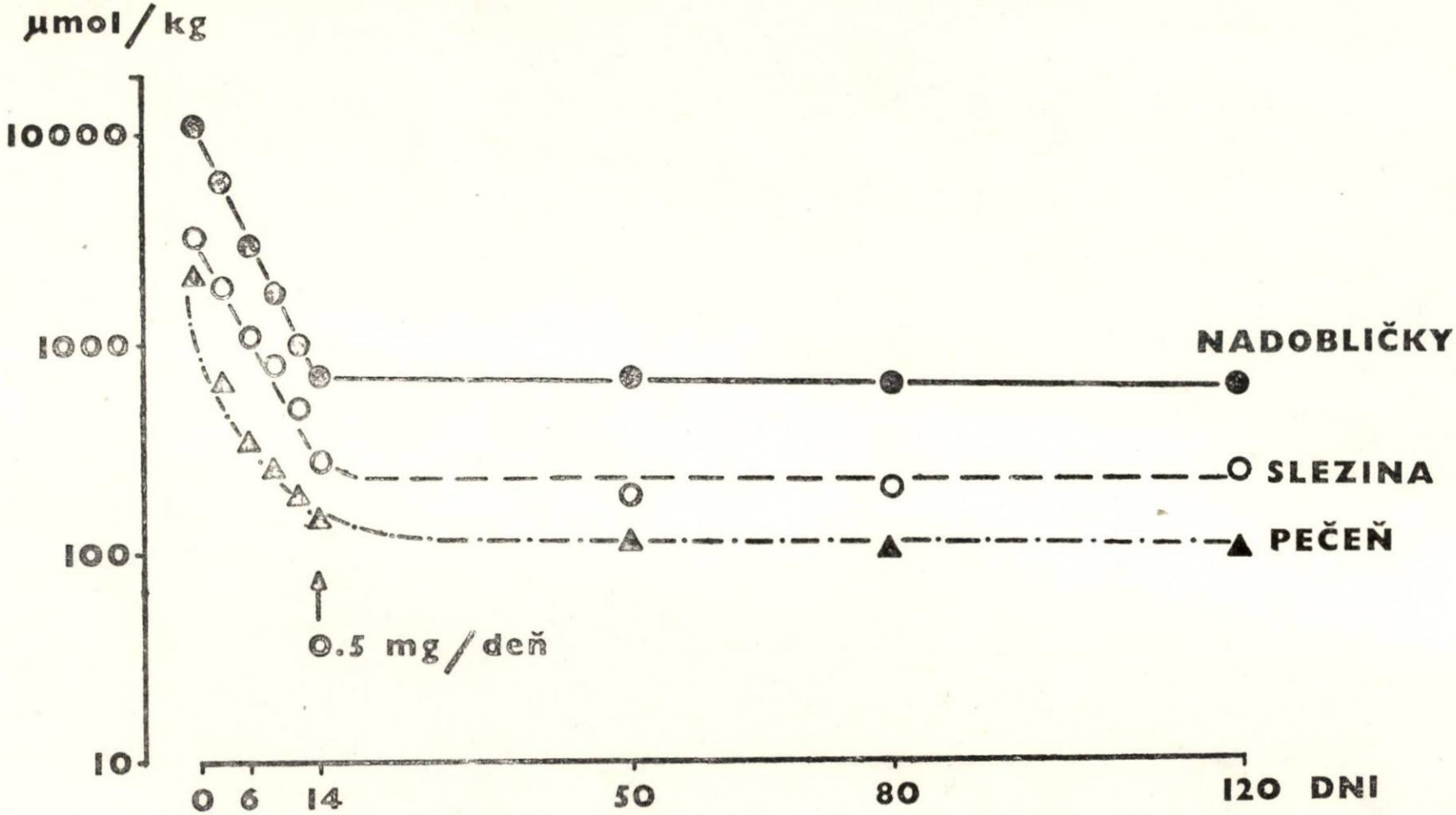
Obr. 3. Oxidácia 26-^{14}C-cholesterolu a 26-^{14}C-7α-hydroxycholesterolu ako percento injikovanej dávky u kontrolných (1, ● — — ●) a hypovitaminóznych (2 ▲ — — ▲) morčiat.
Skrytý nedostatok vitamínu C signifikantne spomaluje oxidáciu cholesterolu, ale nevplýva na oxidáciu 7α-hydroxycholesterolu. Vertikály označujú $\pm$ strednú chybu priemeru.

Obr. 4. Lokalizácia zásahu chronického skrytého nedostatku vitamínu C do systému reakcií, prostredníctvom ktorých pečeňová bunka transformuje cholesterol na žlčové kyseliny.

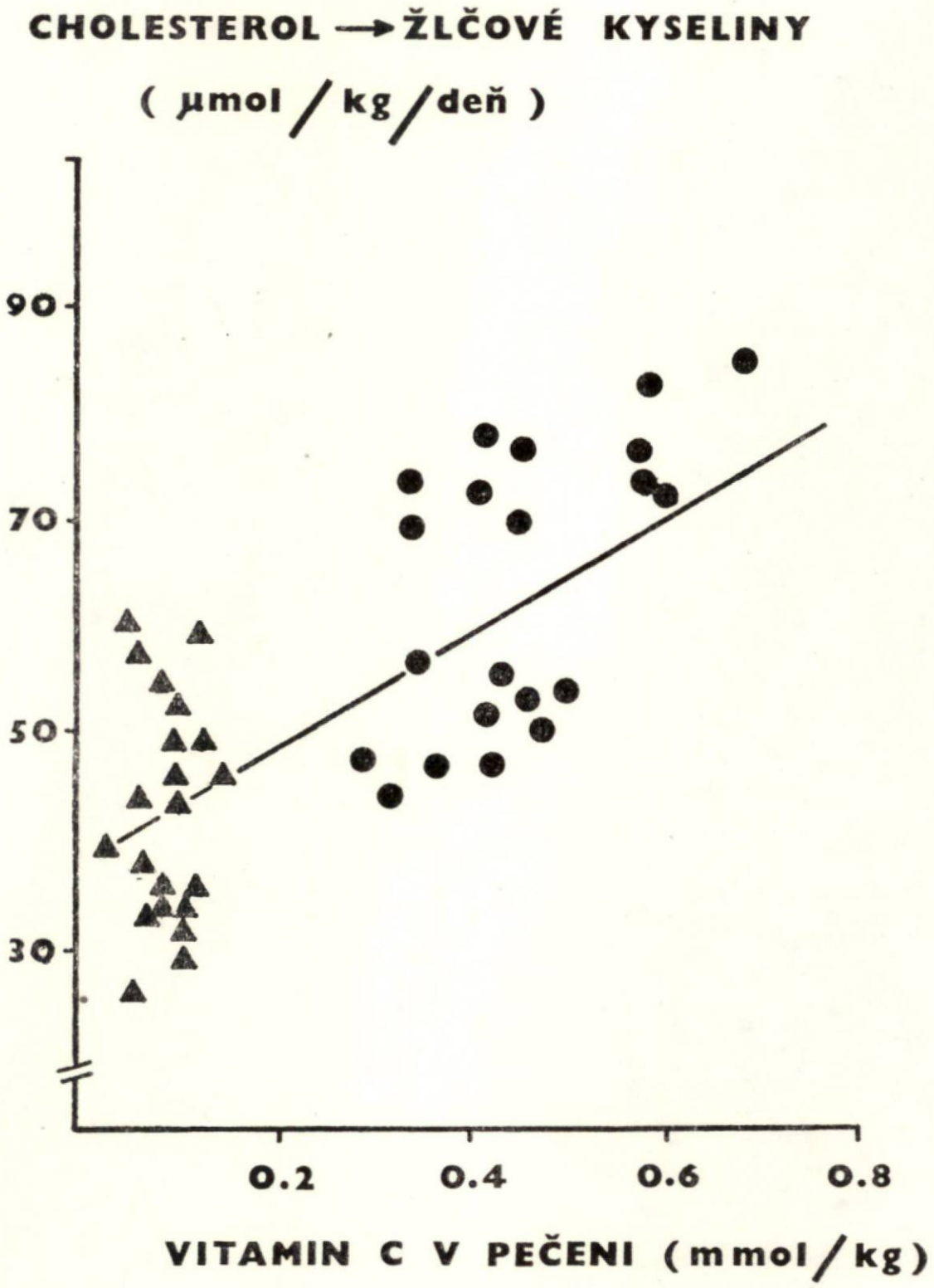
1 : cholesterol
2 : 7α-hydroxycholesterol
3 : 5β-cholestane-3α,7α-diol
4 : chenodeoxycholová kyselina

Proces premeny cholesterolu na žlčové kyseliny je úmyslne zjednodušený.

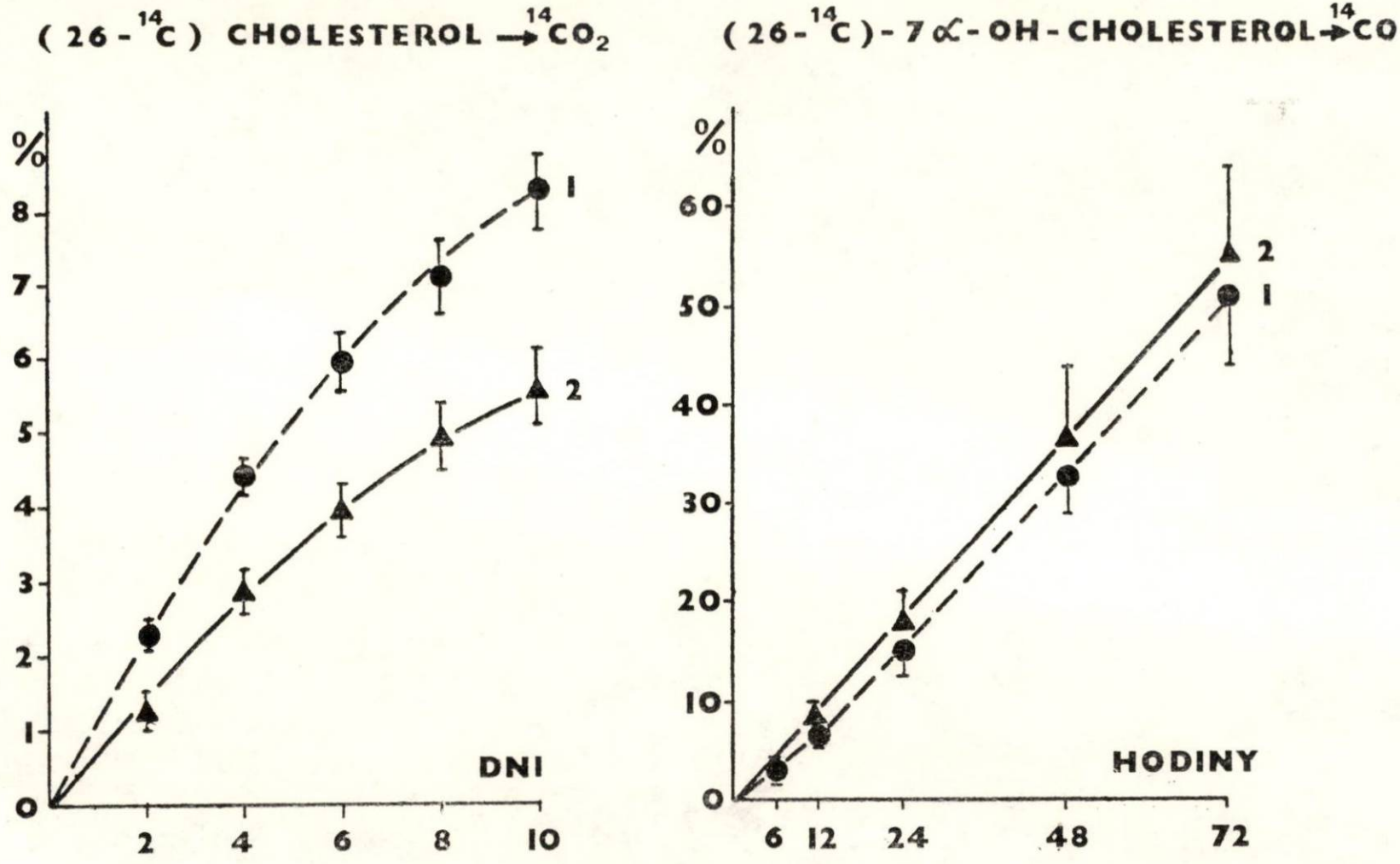
Severografia, n. p., závod 7, Most


µmol / kg
10000
1000
100
10
NADOBLIČKY
SLEZINA
PEČEŇ
0.5 mg / deň
0 6 14 50 80 120 DNI

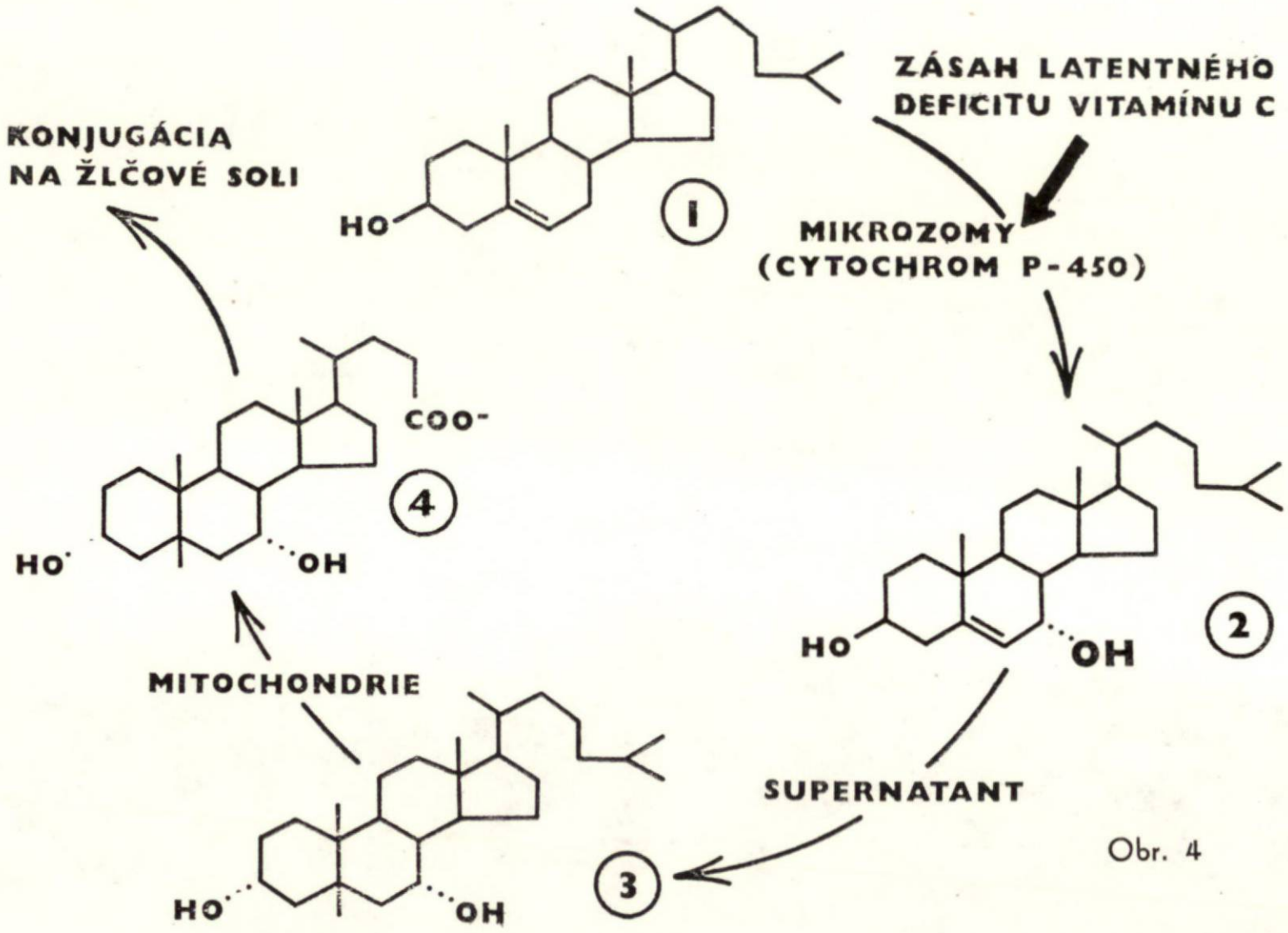
Obr. 1


CHOLESTEROL → ŽLČOVÉ KYSELINY
(µmol / kg / deň)
90
70
50
30
0.2
0.4
0.6
0.8
VITAMIN C V PEČENI (mmol/kg)

Obr. 2


(26 - ^{14}C) CHOLESTEROL → $^{14}CO_2$
%
8
7
6
5
4
3
2
1
0
1
2
DNI
2
4
6
8
10
(26 - ^{14}C) - 7α - OH - CHOLESTEROL → ^{14}CO
%
60
50
40
30
20
10
0
2
1
HODINY
6
12
24
48
72

Obr. 3


ZÁSAH LATENTNÉHO
DEFICITU VITAMÍNU C
MIKROZOMY
(CYTOCHROM P-450)
SUPERNATANT
MITOCHONDRIE
KONJUGÁCIA
NA ŽLČOVÉ SOLI
HO
OH
COO-
1
2
3
4

Obr. 4