

## Vliv huminových látek na absorpci cholesterolu

Tichá A.<sup>1</sup>, Hyšpler R.<sup>1</sup>, Kriesfalusyová L.<sup>2</sup>, Ježková D.<sup>2</sup>, Zadák Z.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika gerontologická a metabolická, LF UK a Fakultní nemocnice Hradec Králové

<sup>2</sup>Radioizotopové laboratoře a vivárium, LF UK v Hradci Králové

### SOUHRN

**Úvod a cíl studie:** Huminové látky jsou vývojově velmi staré organické složky půdy, které vznikají chemickým a biologickým rozkladem hmoty rostlinného původu a syntetickou činností mikroorganismů. Přirozeně se vyskytují v sedimentech, zeminách, rašelině, hnědém uhlí a lignitu. Cílem studie bylo optimalizovat metodu absorpce exogenního cholesterolu ve střevě *in vivo* a zhodnotit snížení této absorpce pomocí huminových kyselin a fytoosterolů.

**Typ studie:** Experiment na zvířatech.

**Název a sídlo pracoviště:** Klinika gerontologická a metabolická, LF UK a Fakultní nemocnice Hradec Králové; Radioizotopové laboratoře a vivárium LF UK v Hradci Králové.

**Materiál a metody:** Modelovými zvířaty ve studii byly laboratorní myši C57B16 (5 skupin, 6 myši v každé skupině). Absorpce cholesterolu ve střevě byla stanovena metodou kapalinné scintilační spektrometrie s užitím <sup>3</sup>H-cholesterolu. V experimentu byly testovány tyto látky: ezetimib, huminové látky (SD 01, B036fk) a fytoosteroly Flory Pro.Activ. Vzorky plné krve a jaterních homogenátů byly extrahovány Abell-Kendallovou metodou. Výsledky byly porovnány pomocí software SigmaStat (Systat Software, USA).

**Výsledky:** Byla stanovena závislost aplikované a zachycené dávky <sup>3</sup>H-cholesterolu. Rozmezí aplikovaných dávek bylo 37,5–185 kBq a stanovené zachycené dávky byly 1–7,75 kBq. Tato závislost byla za daných podmínek lineární ( $y = 0,0455x - 0,7014$ ,  $R^2 = 0,9999$ ). Byly nalezeny statistické významnosti pro snížení absorpce cholesterolu u skupin s ezetimibem ( $p = 0,013$ ) a Flory Pro.Activ ( $p = 0,017$ ) a pro zvýšení absorpce u skupiny s humáty šarže B036fk ( $p = 0,025$ ).

**Závěr:** Byla vyhodnocena účinnost látek ovlivňujících absorpci cholesterolu. Estery fytoosterolů účinně snížily tuto absorpci. Huminové látky jsou schopny ovlivnit biologickou dostupnost nutrientů, především lipofilního charakteru.

**Klíčová slova:** huminové látky, absorpce cholesterolu, kapalinná scintilační spektrometrie.

### SUMMARY

**Tichá A., Hyšpler R., Kriesfalusyová L., Ježková D., Zadák Z.: Humic substances influence on cholesterol absorption**

**Objective:** Humic substances are phylogenetically old components of soil and originate from the chemical and biological decomposition of organic mass and by microorganism activity. They occur in soil, peat and lignite. The aims of study were to optimise estimation of exogenous cholesterol absorption method in gut and to evaluate cholesterol absorption by phytosterols and humic substances.

**Design:** Experiment on animal model.

**Settings:** Department of gerontology and metabolic care, University hospital Hradec Králové and Radio-Isotope laboratory, Charles University – Faculty of Medicine in Hradec Králové.

**Material and Methods:** Female laboratory mouse C57B16 was a model animal chosen for the study (5 groups, six mice in each group). Cholesterol absorption in the gut was determined by liquid scintillation spectrometry with <sup>3</sup>H-cholesterol used as a tracer. Ezetimibe, humic substances (SD01 a B036fk) and phytosterols in Flora Pro.Activ were tested in the experiment. Samples of whole blood and liver tissue were extracted by Abell-Kendall method. Results were compared by software SigmaStat (Systat, USA).

**Results:** The relationship of applied and captured dose of <sup>3</sup>H-cholesterol was determined. Range of applied dose was 37,5–185 kBq and captured dose was 1–7,75 kBq. This relationship was linear ( $y = 0.0455x - 0.7014$ ,  $R^2=0.9999$ ). Statistically significant decrease in cholesterol absorption in ezetimibe group ( $p = 0,013$ ) and Flora Pro.Activ group ( $p = 0.017$ ) and increase in cholesterol absorption in group B036fk ( $p = 0,025$ ) were found.

**Conclusion:** The effectivity of cholesterol absorption-active substances was elucidated. Phytosterols esters reduced this absorption effectively. Humic substances have variable influence on the biological availability of nutrients, in particular lipophilic substances.

**Key words:** humic substances, cholesterol absorption, liquid scintillation spectrometry.

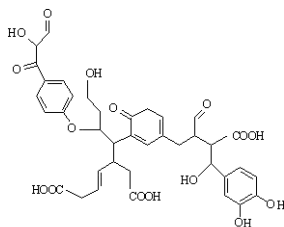
## Úvod

### Huminové látky

Huminové látky (HL) jsou přírodní organické sloučeniny vzniklé chemickým a biologickým rozkladem zbytků rostlin a živočichů a syntetickou činností mikroorganismů. Přirozeně se vyskytují v sedimentech, zeminách, rašelině, hnědém uhlí a lignitu. Jsou tvořeny procesem humifikace, což je převážně soubor anaerobních enzymatických a biochemických pochodů

a uskutečňuje se mineralizací výchozích látek [3]. Huminové látky definujeme jako směs amorfních, polydisperzních sloučenin žluté až hnědočerné barvy. Jsou strukturně velmi složité a doposud ne zcela přesně popsané (obr. 1). Hlavními složkami HL jsou huminové kyseliny, fulvokyseliny a humin. Tyto látky jsou od počátku 19. století předmětem intenzivního vědeckého zájmu, který vychází z jejich využitelných vlastností [1, 2, 4]. V důsledku svého chemického složení (aromatické jádro a funkční skupiny) jsou HL

schopné vázat polární a nepolární látky, a tak mohou mít vliv na biologickou dostupnost určitých nutrientů (stopové prvky, aminokyseliny, lipidy apod.). Jejich chemické a fyzikální vlastnosti závisí dále na stupni humifikace, polymerizace a oxidace [4]. Spolehlivých informací o biomedicínských účincích těchto látek je stále velmi málo. V současnosti mají HL rozsáhlé využití v zemědělství, ochraně životního prostředí, průmyslu a farmakologii [1, 2].



**Fig. 1.** Structure of humic acid molecule (Stein et al., 1997), reprinted from [4]

### Ovlivnění absorpce cholesterolu

V současné době je snížení absorpce cholesterolu ze střeva jedním z terapeutických přístupů při léčbě hypercholesterolemie. Užívanými přístupy ke snížení absorpce cholesterolu jsou aplikace rostlinných sterolů rozpuštěných v tuku (Flora Pro.Active), či přípravku ezetimib (Ezetrol 10 mg), popř. některé další látky (např. vláknina).

Fytosteroly mají schopnost snižovat koncentraci plazmatického cholesterolu tím, že redukují absorpci cholesterolu ze střeva kompeticí s cholesterolem o vazbu v micelách [5, 6]. Resorbované fytosteroly se podobně jako cholesterol metabolicky transformují ve žlučové kyseliny, které se však svým detergentním účinkem i rozpustností liší od žlučových kyselin, vznikajících z živočišných sterolů a cholesterolu [7, 8].

Hypolipidemikum ezetimib patří do skupiny tzv. selektivních inhibitorů absorpce cholesterolu. Ezetimib redukuje obsah esterifikovaného cholesterolu v chylomikronech a jejich remnantech, blokuje transportní protein Niemann-Pick C1 Like 1 protein, který je klíčovým proteinem absorpce cholesterolu, lokalizovaný v kartáčovém lemu tenkého střeva [9].

Rozpustná dietní vláknina účinkuje vlivem bakterií v tlustém střevě. Přesný mechanismus není zatím známý, ale předpokládá se, že vláknina snižuje absorpci žlučových kyselin, které vznikají z cholesterolu [10].

Vzájemné porovnání účinku látek ovlivňujících absorpci cholesterolu je však obtížné, protože absorpce cholesterolu *in vivo* je komplexním procesem. Tento proces vyžaduje emulzifikaci v žaludku a tenkém střevě, dostatečnou koncentraci žlučových kyselin a součinnost několika přenašečových systémů. Omezení absorpce cholesterolu z diety by mohlo být jedním z příznivých účinků HL na lidské zdraví. Huminové látky mají efekt chelatační a jsou

již využívány v nutričních doplncích jako nosiče stopových prvků. HL jsou také velmi aktivní v řadě tkání, zejména na povrchu buněčných membrán, a jsou rovněž schopny intermolekulové interakce s řadou lipofilních látek a za určitých okolností tvoří micely [11, 12]. Z tohoto důvodu byla provedena studie s cílem vyhodnocení vlivu huminových látek na absorpci cholesterolu ve střevě u myší. Jedním z možných postupů, jak ověřit absorpci cholesterolu, je využití izotopově značeného cholesterolu v pokusu na modelovém zvířeti.

### Cíl studie

Cílem studie bylo zavést a optimalizovat metodu absorpce cholesterolu a ověřit snížení absorpce cholesterolu *in vivo* pomocí fytosterolů a huminových kyselin. K tomuto účelu byla optimalizována metoda s izotopově značeným cholesterolem na modelovém experimentu ve střevě myší.

### Materiál a metoda

Pro stanovení absorpce cholesterolu a zhodnocení vlivu huminových látek na jeho absorpci byla modifikována metoda, kterou publikoval L. A. Morehouse v roce 1999. Tato metoda byla publikována pro stanovení saponinů, modelovým zvířetem byl králik [13].

Modelovými zvířaty ve studii byly samice laboratorních myší C57B16 (Velaz, s. r. o., Praha). V experimentu byly testovány tyto látky: ezetimib (Ezetrol – Schering-Pough (Brinny) CO., Heist-op-den-Berg, Belgie), huminová kyselina SD 01 (VÚAnCh, Ústí n. L.), nevysušený filtrační koláč šarže B03A6fk (VÚAnCh, Ústí n. L.), Flora Pro.Active (Unilever, ČR). Sondovaným tracerem byl  $7\text{-}^3\text{H}$  cholesterol (M.G.P. Zlín) rozpuštěný v etanolu ve směsi se smetanou (Kapucín, 10 %, Bohušovice nad Ohří). Pro extrakci byly použity tyto chemikálie: aceton (Merck, Darmstadt, Německo), etanol (Merck, Darmstadt, Německo), dále hydroxid draselný, redestilovaná voda (Goro, Praha), toluen (Merck, Darmstadt, Německo), scintilační roztok SLD-41 (Chemopetrol, Spolana Neratovice). Jako interní standard byl použit  $^{14}\text{C}$ -cholesterol (M.G.P. Zlín). Extrakce byla prováděna ve skleněných lahvičkách o objemu 5 ml s teflonovým uzávěrem. Přístrojovým vybavením pro studii byly: analytické váhy A + D company 202 M (Hradec Králové, Česká republika), homogenizátor IKA T10 Ultra – Turrax (Ika – Werke, Německo), laboratorní rotátor Stuart SB3 (Biolote, Velká Británie), centrifuga Heraeus 400 R (Hanau, Německo), termoblok (QBT 2, Tectra, a. s., Praha), kapalinový scintilační spektrometr (Beckman LS 6000 LL).

Laboratorní myši byly rozděleny do 5 skupin (A-E) po šesti jedincích (A – negativní kontrolní, B – ezetimib – jako pozitivní kontrola, C – huminová kyselina šarže SD 01, D – nevysušený filtrační koláč šarže B03A6fk, E – Flora Pro.Active. Negativní kontrolní skupině (A) byla podávána napájecí voda bez humátů a dalších inhibitorů absorpce, pozitivní kontrolní skupině (B) byl

aplikován ezetimib s krmivem v dávce 0,1 mg/myš a den po dobu pěti dnů. Skupinám C a D byla podána huminová kyselina v dávce 1,5 mg/myš s přidavkem hydrogenuhličitanu sodného (1,5 mg/myš, kvůli rozpustnosti HL) společně s tracerem. Skupina E dostala s tracerem Fluor Pro.Active v dávce 30 mg fytoosterolů/myš. Všem skupinám bylo intragastricky sondou aplikováno 0,3 ml traceru –  $^3\text{H}$  cholesterolu ve směsi se smetanou. Dávka traceru byla 5  $\mu\text{Ci}$  (tj. 185 MBq) rozpuštěného ve smetaně/myš. Po 48 hodinách byla zvířata utracena a stanovena extrahovatelná aktivita plné krve a homogenátu jaterní tkáně metodou kapalinové scintilační spektrometrie. Krev experimentálních zvířat byla odebrána v narkóze, z horní duté žíly do heparinu. Do 2 ml etanol-acetonové směsi (1 : 1) bylo pipetováno 500  $\mu\text{l}$  krve. Játra byla zvážena a celá zhomogenizována ve dvojnásobné hmotnosti fyziologického roztoku. Z homogenátu bylo odebráno 500  $\mu\text{l}$  a pipetováno do 2 ml etanol-acetonové směsi také v poměru 1 : 1. Do všech roztoků bylo přidáno 0,1 ml interního standardu –  $^{14}\text{C}$ -cholesterolu v dávce 50 nCi. Vzorky krve a jaterních homogenátů byly extrahovány na rotátoru po dobu 10 minut a následovala centrifugace (1900 rpm, teplota 4 °C po dobu 10 minut). Aceton-etanolový extrakt byl stáhnut, bylo přidáno 150  $\mu\text{l}$  nasyceného vodného roztoku hydroxidu sodného. Po dobu 60 minut probíhala alkalická hydrolýza v termobloku při teplotě 50 °C. Po ochlazení vzorků bylo přidáno 1,5 ml redestilované vody a 1 ml toluenu. Vzorky byly extrahovány na rotátoru po dobu 10 minut a poté opět centrifugovány (1900 rpm, teplota 4 °C po dobu 10 minut). Byl odebrán 1 ml horní organické vrstvy a smísen se scintilačním roztokem SLD-41.

Kapalinovým scintilačním spektrometrem byly stanoveny výsledné hodnoty dpm (decomposition per minute), které po přepočtu odpovídají účinnosti

absorpce značeného cholesterolu v gastrointestinálním traktu. Stanovené hodnoty dpm byly přepočteny na Bq (dpm/60) a po kompenzaci interním standardem a přepočtu na celkové množství krve myši a hmotnost jater byl vypočten zlomek zachycené dávky traceru.

Výsledky jsou uvedeny jako suma zachycené dávky podané  $^3\text{H}$ -cholesterolu v játrech a plné krvi. Získaná data byla porovnána pomocí software SigmaStat (Systat Software, Inc. Point Richmond, CA, USA).

Ověření závislosti aplikované a zachycené dávky traceru bylo provedeno stanovením hodnot 3 různých aplikovaných dávek (37 kBq, 92,5 kBq a 185 kBq). Každá z těchto dávek byla aplikována 3 myším. Následoval experiment za výše popsaných podmínek a byla stanovena závislost podaných a zachycených dávek traceru.

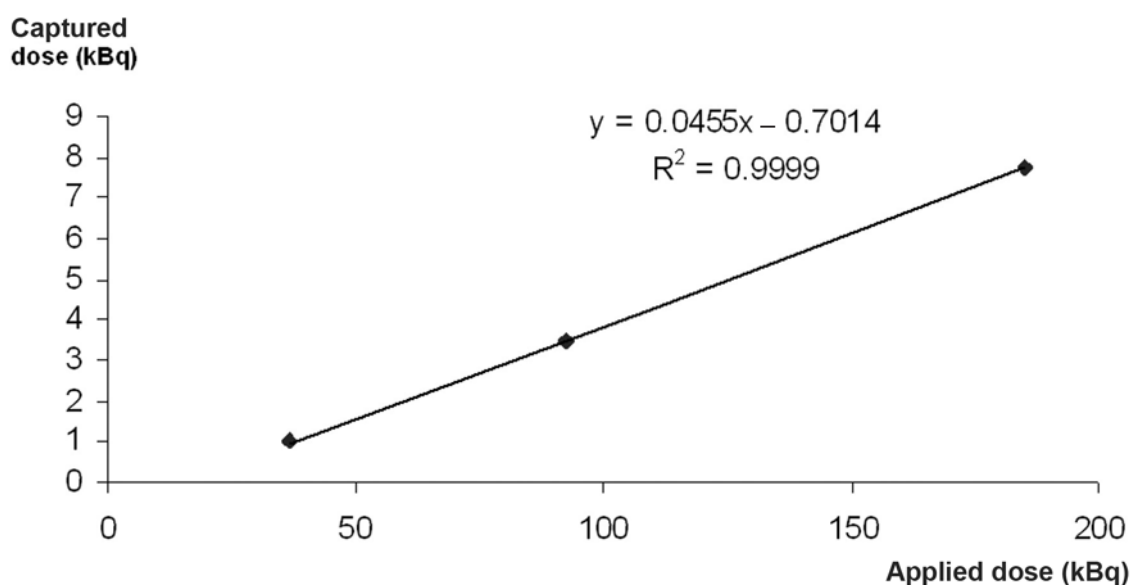
### Výpočet

$$\text{ZZD} = \frac{(m \cdot 0,585 \cdot \text{krev Bq} \cdot 2) + (6 \cdot m_{\text{jater}} \cdot \text{játra Bq})}{\text{podaná dávka Bq}}$$

(ZZD – zlomek zachycené dávky traceru, m – hmotnost myši, 0,585 – přepočet na hmotnost krve myši, krev Bq – stanovená hodnota z extraktu plné krve, játra Bq – stanovená hodnota z extraktu jater,  $m_{\text{jater}}$  – hmotnost jater, koeficient 2 – přepočet množství brané do extrakce krve, 6 – přepočet množství brané do homogenizace a extrakce jater).

### Výsledky

Byla stanovena závislost aplikované a zachycené dávky  $^3\text{H}$ -cholesterolu. Tato závislost byla za daných podmínek lineární (obr. 2).



**Fig. 2.** The relationship of applied and captured dose of  $^3\text{H}$ -cholesterol – linear regression – SigmaStat software (applied dose 37.5 kBq, 92.5 kBq and 185 kBq, three mice in each dose)

Výsledky jsou prezentovány jako medián  $\pm$  interkvartilový interval zlomku zachycené dávky traceru (tab. 1).

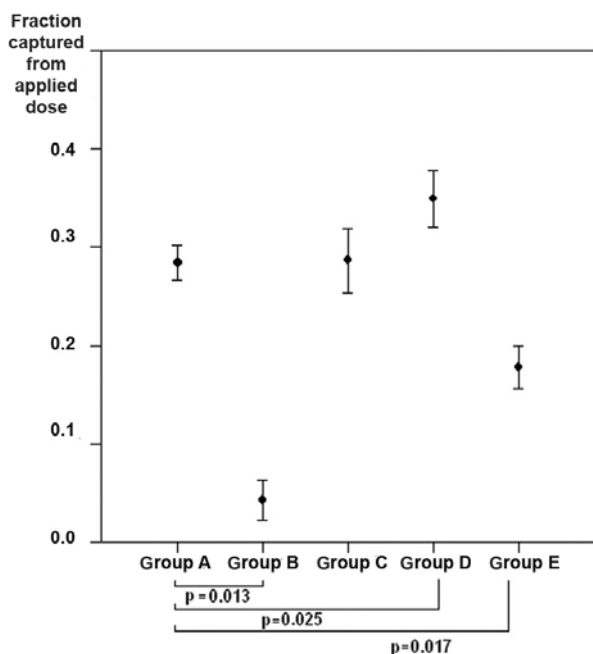
**Table 1.** Fraction captured from applied dose – descriptive statistics – SigmaStat software\*

Group	Median	25%	75%
A	0.282	0.271	0.297
B	0.0403	0.0260	0.0611
C	0.278	0.256	0.316
D	0.340	0.333	0.368
E	0.174	0.159	0.198

\*Experimental data are presented as the median and interquartile range – 25% and 75%.

Group A – controls, group B – ezetimibe, group C – humic substance SD01, group D – humic substance B036fk, group E – Flora Pro.Activ. Six mice in each group.

Byla nalezena snížená přítomnost značeného cholesterolu v jaterní tkáni a krvi u skupiny B a E a zvýšené hodnoty cholesterolu u skupiny D ve srovnání s kontrolní skupinou A. Statistické významnosti jsou uvedeny na obrázku 3.



**Fig. 3.** Fraction captured from applied dose – groups comparison – One Way Anova – SigmaStat software\*

\*Experimental data are presented as the median and interquartile range – 25% and 75%.

Group A – controls, group B – ezetimibe, group C – humic substance SD01, group D – humic substance B036fk, group E – Flora Pro.Activ. Six mice in each group.

## Diskuse

V naší práci jsme uvedenou metodu optimalizovali z hlediska podávané dávky traceru pro myši inbrední model. Rovněž způsob aplikace značeného chole-

sterolu má zásadní význam a jako optimální byla zjištěna aplikace po rozpuštění traceru ve smetaně. Pro celkové zhodnocení absorpce podávaného značeného cholesterolu se ukázala vhodná kalkulace sumy aktivity zachycené v krvi a játrech a dá se oprávněně předpokládat, že je přímo úměrná celkovému množství vstřebeného cholesterolu z lumen střeva. Tato hodnota vykazovala nejmenší biologický rozptyl. Oblast aplikace značených tracerů je touto metodou rozšířena o hodnocení kvality nutričních doplňků. Výhodou popsané metody je její nenáročnost z hlediska analytického provedení a vybavení.

Ve studii byla vyhodnocena účinnost nutričních doplňků ovlivňujících absorpci cholesterolu. V dostupné literatuře nebyly nalezeny zmínky o vzájemné interakci cholesterolu a huminových látek. Výsledky s huminovými látkami jsou vzhledem k jejich strukturní rozmanitosti a fyzikálně-chemickým vlastnostem nejednoznačné. Naše experimenty ukázaly, že huminové látky nesnižovaly absorpci cholesterolu, ale spíše naopak tuto absorpci podporovaly (skupina D – nevy-sušený filtrační koláč šarže B03A6fk). Je rovněž velmi složité predikovat působení HL v gastrointestinálním traktu, kde dochází k výrazným změnám pH prostředí (žaludek vs duodenum) a chování těchto látek je na pH závislé. Byly testovány různé šarže huminových látek a jak vyplynulo z výsledků, huminové látky mohou ovlivnit biologickou dostupnost jednotlivých nutrientů, především lipofilního charakteru (steroidních látek – tokoferoly, D a K vitamin). V budoucnu bude zapotřebí objasnit perspektivu využití huminových látek v řadě dalších studií.

## Závěr

Metoda stanovení absorpce cholesterolu, popsaná v práci, je vhodná pro ověření účinnosti látek, které mohou potenciálně tuto absorpci ovlivnit. Ve studii byla vyhodnocena účinnost látek ovlivňujících absorpci cholesterolu v experimentu na myším modelu po podání značeného cholesterolu. Lze tedy shrnout, že estery fytosterolů v margarínu (Flora Pro.Activ) neúčinněji snižují tuto absorpci ve srovnání s ostatními testovanými látkami. Naše práce zjistila, že huminové látky (B03A6fk) tuto absorpci spíše podporovaly. Huminové látky jsou tedy schopny ovlivnit biologickou dostupnost nutrientů, především lipofilního charakteru.

Experiment byl schválen komisí podle § 11 vyhlášky č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat.

## Literatura

1. Veselá, L., Kubal, M., Kozler, J., Innemanová, P. Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumulitu. *Chem. listy*, 2005, 99, 10, p. 711–717.
2. Humintech GmbH, Düsseldorf Germany [online]. Dostupné na [www: http://humintech.com](http://humintech.com).

3. **Skokanová, M., Tercová, K.** Huminové kyseliny, pôvod a štruktúra. *Chem. listy*, 2008, 102, 4, p. 262–268.
4. **Kučerík, J.** Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Institut fyzikální a aplikované chemie [online]. Dostupné na www: <http://www.fch.vutbr.cz/home/kucerik/frame1.htm>
5. **Hendriks, H. F. J., Westrate, J. A., van Vliet, T., Meijer, G. W.** Spreads enriched with three different levels of vegetable oil sterols and the degree of cholesterol lowering in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 1999, 53, p. 319–327.
6. **Miettinen, T. A., Pusska, P., Gylling, H., Vanhanen, H., Vartianen, E.** Reduction of serum cholesterol with sitostanol-ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population. *N. Engl. J. Med.*, 1995, 333, p. 1308–1312.
7. **Hallikainen, M. A., Usitupa, M. I.** Effects of 2 low-fat stanol ester-containing margarines on serum cholesterol concentrations as part of a low-fat diet in hypercholesterolemic subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1999, 69, p. 403–410.
8. **Law, M.** Plant sterol and margarines and health. *Brit. Med. J.*, 2000, 320, p. 861–864.
9. **Almann, S. W., Davis, H. R., Zhu, L. J.** Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*, 2004, 5661, 303, s. 1201–1204.
10. **Theuwissen, E., Mensink, R. P.** Water-soluble dietary fibers and cardiovascular disease. *Physiology & Behavior*, 2008, 94, 39, p. 285–292.
11. **Sutton, R., Sposito, G.** Molecular structure in soil humic substances: the new view. *Environ. Sci. Technol.*, 2005, 39, s. 9009–9015.
12. **Wijnja, H., Pignatello, J., Malekani, K.** Formation of pi-pi complexes between phenanthrene and model pi-acceptors humic subunits. *J. Environ. Qual.*, 2004, 233, 1, p. 265–275.
13. **Morehouse et al.** Synthetic saponin cholesterol inhibitors, Pfizer Research Center. *J. Lipid Res.*, 1999, 99, p. 464–474.

*Práce byla podpořena grantem MPO ČR FT-TA/038.*

*Do redakce došlo 2. 9. 2008.*

*Adresa pro korespondenci:  
RNDr. Mgr. Alena Tichá, Ph.D.  
Klinika gerontologická a metabolická  
Fakultní nemocnice Hradec Králové  
Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové  
tichaA@lfhk.cuni.cz*