

Aus dem Institut für Klinische Biochemie und Physiologische Chemie
der Medizinischen Hochschule Hannover
(Direktor: o. Prof. Dr. W. L a m p r e c h t)

Cholesterin-7 α -Hydroxylase-Aktivität in fettreich ernährten Ratten in Abhängigkeit vom Fettsäuren-Muster der mit der Nahrung angebotenen Fette

D. Mayer und Gabriele Mayer

Mit 4 Abbildungen und 1 Tabelle

(Eingegangen am 27. April 1974)

Die Geschwindigkeit der Gallensäurenbiosynthese wird durch die Aktivität der Cholesterin-7 α -Hydroxylase bestimmt (1, 2). Dieses Enzym ist abhängig vom Gallensäuregehalt des enterohepatischen Kreislaufs: Gallensäurenentzug führt zur Steigerung, Gallensäurenzufuhr zum Absinken der Enzymaktivität (3, 4, 5). Außerdem unterliegt diese einem Circadianrhythmus (4, 6, 7). Zusammenhänge zwischen Tagesrhythmus und biologischer Halbwertszeit der Gallensäuren im enterohepatischen Kreislauf werden aufgezeigt durch Untersuchungen der Cholesterin-7 α -Hydroxylase-Aktivität und durch Messung der Gallensäureausscheidung nach Applikation einer einmaligen Dosis von [24-¹⁴C]Cholsäure (4, 5). Kürzlich gemachte Beobachtungen an fettreich ernährten Ratten zeigten eine Abhängigkeit des Gallensäurentransports vom Fettsäurenmuster der mit der Nahrung angebotenen Fette (8); dabei kam es zu einer Verzögerung bei Ernährung mit gesättigten Fettsäuren.

Die Gallensäuren zirkulieren im enterohepatischen Kreislauf; bei jeder Darmpassage wird ein fester Prozentsatz mit den Faeces entfernt (2). Das Ausmaß der Neusynthese ist abhängig von der Menge der ausgeschiedenen Gallensäuren und damit von der Anzahl Zirkulationen pro Tag. Wenn gesättigte Fettsäuren zu einer Verlangsamung des Gallensäurentransportes führen, müßte gleichzeitig eine erniedrigte Syntheserate vorliegen.

Zur Beantwortung dieser Frage wird der Verlauf der Cholesterin-7 α -Hydroxylase-Aktivität an Ratten beobachtet, und zwar an 3 Tiergruppen mit unterschiedlichen Fettdiäten im Vergleich zu einer parallel geführten Kontrollgruppe mit Standarddiät; der Versuch erstreckt sich über 14 Tage ab Beginn der Nahrungsumstellung. Der Circadianrhythmus des untersuchten Enzyms macht 2 Untersuchungszeitpunkte pro Tag erforderlich, je einen zur Zeit niedriger (Hellphase) und hoher Enzymaktivität (Dunkelphase).

Methoden

Tiere

Die zu den Experimenten verwendeten männlichen Wistar-Ratten (Han., 140–160 g) wurden in einem künstlichen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten (Licht von 6.00 bis 18.00 Uhr). Die Kontrollgruppe (40 Tiere) erhielt Ratten-Standarddiät (C 1000; 2% Fettgehalt; Fa. Altromin, Lage/Lippe, BRD) und Wasser ad libitum.

3 Gruppen von je 35 Tieren wurden 14 Tage lang mit einer Spezialdiät ernährt von folgender Zusammensetzung: Casein 22% (Rohprotein 80%), Reisstärke DAB 6 46%, Zellulosepulver 4%, Mineralstoffmischung (Fa. Altromin) 6%, Vitaminmischung (auf Reisstärke; Fa. Altromin) 2%, Fettgehalt 20% (Diät I, II, III), Wasser ad libitum. Die Diäten I, II und III waren cholesterinfrei und unterschieden sich durch das Fettsäurenmuster (Tab. 1) (9). Pro Zeitpunkt wurden je 5 Tiere aus jeder Gruppe untersucht.

Tab. 1. Fettsäurezusammensetzung¹⁾ der Triglyceride von Ratten-Standarddiät, Diät I, Diät II²⁾ und Diät III

	Standarddiät	Diät I	Diät II	Diät III
C ₈	0,9	—	—	—
C ₁₀	2,6	7,7	—	—
C ₁₂	49,3	52,9	—	—
C ₁₄	21,4	19,4	—	—
C ₁₆	11,1	10,8	13,5	13,0
C ₁₈	3,6	3,3	2,3	4,4
C _{18:1}	7,7	5,9	26,4	69,4
C _{18:2}	3,4	—	56,3	13,2
C _{18:3}	—	—	1,6	—

¹⁾ Die Bestimmung der Fettsäuren erfolgte nach Extraktion mit CHCl₃/MeOH, die gaschromatographische Analyse nach Umesterung mit MeOH/HCl (9).

²⁾ Unter Verwendung von Mazola®-Keimöl (Maizena GmbH).

Radioaktiv markiertes Cholesterin

Käufliches [26-¹⁴C]Cholesterin (Radiochemical Centre, Amersham, GB) wird erst durch Säulenchromatographie gereinigt (Al₂O₃; Aktivität III; Laufmittel Benzol), dann zusammen mit Tween 20 (Fa. Serva, Heidelberg, BRD) (0,16 mg Tween 20 pro 1 μ Ci Cholesterin) in Benzol gelöst. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wird der Rückstand in Saccharosephosphatpuffer pH 7,4 emulgiert (1 ml Puffer pro 1 μ Ci; 1 μ Ci Cholesterin = 0,016 μ Mol).

Saccharosephosphatpuffer

0,008 M Phosphatpuffer pH 7,4 wird mit 9%iger Saccharoselösung im Verhältnis 1:2 gemischt. Pro ml Lösung werden 1,20 mg Nicotinsäureamid und 1,00 mg EDTA zugesetzt. Anschließend wird der pH-Wert mit 0,2 N NaOH auf 7,4 nachgestellt.

Bestimmung der Cholesterin-7 α -Hydroxylase-Aktivität

Inkubation und Aufarbeitung der Proben erfolgten nach der 1972 veröffentlichten Methode (10).

Quantitative Bestimmung des unveresterten Cholesterins in der Leber

500 mg Leberbrei werden in 20 ml eines Gemisches Chloroform/Methanol (2:1; v/v) 90 min am Rückfluß erhitzt. Nach Zentrifugieren bei 3000 Umdr./min wird dekantiert. Der Rückstand wird in der beschriebenen Weise nochmals

extrahiert. Das Lösungsmittel der vereinigten Überstände wird abgedampft, der dabei erhaltene Rückstand wird in 10 ml Aceton/Äthanol (1:2; v/v) aufgenommen. 2 ml dieser Lösung werden mit 1 ml Digitoninlösung (1 g/500 ml Wasser) versetzt. Nach 24stündigem Stehen wird zentrifugiert (3000 Umdr./min). Das Sediment wird 1mal mit 2 ml Aceton/Diäthyläther (1:3; v/v), anschließend 1mal mit 2 ml Diäthyläther gewaschen. Dann wird das gereinigte Digitonid mit 2 ml Cholesterinreagenz (Fa. Merck, Darmstadt, BRD) und 0,5 ml konz. H_2SO_4 versetzt. Nach 30minütigem Stehen wird die Extinktion bei 578 nm gegen Vergleichslösung ermittelt.

Als Bezugswert dient ein Cholesterinstandard (300 mg/ml Benzol), der analog der beschriebenen Aufarbeitung behandelt wird.

Berechnung

Der überwiegende Teil der Radioaktivität der dünnschichtchromatographisch getrennten Proben befindet sich in den Banden des $[26-^{14}C]$ Cholesterins und des $[26-^{14}C]$ Cholest-5-en-- $3\beta,7\alpha$ -diols (= radioaktiv markiertes 7α -Hydroxycholesterin) (10), so daß aus diesen der prozentuale Anteil des entstandenen radioaktiv markierten 7α -Hydroxycholesterins (= A) bestimmt werden kann.

$$A = \frac{\text{dpm}_{7\alpha\text{-Hydroxycholesterin}}}{\text{dpm}_{7\alpha\text{-Hydroxycholesterin}} + \text{dpm}_{\text{Cholesterin}}} \times 100 - 0,08^1)$$

Unter unseren Inkubationsbedingungen geht nur das freie Cholesterin (10) in die Reaktion ein, das entspricht ca. 70% des Gesamtcholesterins (11). Durch zusätzliche Bestimmung des Gesamtcholesterins in der Probe vor der Inkubation läßt sich unter Zuhilfenahme des prozentualen Umsatzes die entstandene Menge an 7α -Hydroxycholesterin berechnen.

$A \times [\mu\text{Mol Cholesterin}/50 \text{ mg Leber}] = \mu\text{Mol entstandenes } 7\alpha\text{-Hydroxycholesterin}/50 \text{ mg Leber}.$

Ergebnisse und Diskussion

Alle Tiere wurden in einem künstlichen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten (Licht von 6.00 bis 18.00 Uhr) und ad libitum ernährt. Die Bestimmungen wurden durchgeführt am 1., 2., 5. und 14. Tag, jeweils um 9.00 und um 23.00 Uhr; pro Zeitpunkt wurden je 5 Tiere aus jeder Gruppe untersucht. Die Nahrungsumstellung erfolgte am 1. Tag um 9.00 Uhr. Der erste, an insgesamt 5 Tieren bestimmte Wert wird durch die folgenden 9.00-Uhr-Werte der Kontrollgruppe bestätigt. Bestimmt wurde die Cholesterin- 7α -Hydroxylase-Aktivität in nMol entstandenes 7α -Hydroxycholesterin/50 mg Leber.

Abb. 1 bestätigt an den Kontrolltieren den bereits beschriebenen rhythmischen Verlauf (4, 5, 6, 7) der Enzymaktivität: niedrige Werte in der Hellphase um 9.00 Uhr, hohe Werte in der Dunkelphase um 23.00 Uhr, an allen Tagen das gleiche Bild.

Die folgenden Abbildungen (2, 3, 4) veranschaulichen die Ergebnisse bei fettreich ernährten Ratten. Während am 1. Tag noch ein normaler Rhythmus vorliegt, zeigt sich am 2. Tag bei allen Diäten eine durch die abrupte Nahrungsumstellung bewirkte Unordnung: Bei unauffälligen Werten in der Hellphase kommt es zu drastischer Erniedrigung der 23.00-Uhr-Werte, die praktisch gleich den 9.00-Uhr-Werten sind. Bei fortschreitender

¹⁾ Der Wert 0,08 ergab sich durch Aufarbeitung und Chromatographie von reinem $[26-^{14}C]$ Cholesterin.

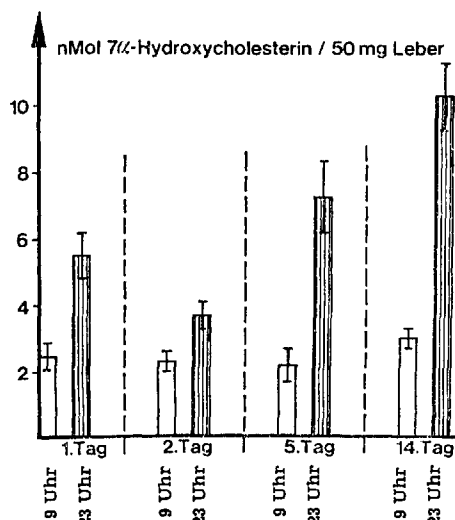


Abb. 1. Cholesterin-7 α -Hydroxylase-Aktivität von Ratten in nMol entstandenem 7 α -Hydroxycholesterin + s \bar{x} pro 50 mg Leber; Inkubationszeit 20 min. Ernährung mit Ratten-Standarddiät (Altromin C 1000), Wasser ad libitum; n = 5 Tiere pro Zeitpunkt; 2 unabhängige Inkubationen pro Leber.

Einpendelung eines „steady state“ (5. und 14. Tag) wird ein sehr unterschiedliches Verhalten der Enzymaktivität bei den einzelnen Diäten auffällig.

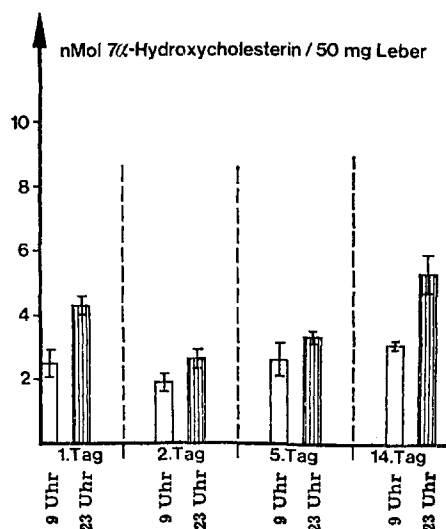


Abb. 2. Cholesterin-7 α -Hydroxylase-Aktivität bei fettreich ernährten Ratten in nMol entstandenem 7 α -Hydroxycholesterin + s \bar{x} pro 50 mg Leber; Inkubationszeit 20 min. Ernährung ab 1. Tag, 9.00 Uhr mit Diät I: vorwiegend gesättigte Fettsäuren. Wasser ad libitum; n = 5 Tiere pro Zeitpunkt; 2 unabhängige Inkubationen pro Leber.

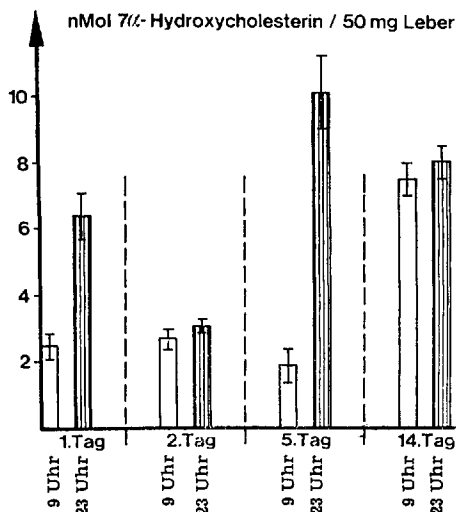


Abb. 3. Cholesterin-7 α -Hydroxylase-Aktivität bei fettreich ernährten Ratten in nMol entstandenem 7 α -Hydroxycholesterin \pm sx pro 50 mg Leber; Inkubationszeit 20 min. Ernährung ab 1. Tag, 9.00 Uhr mit Diät II: 26,4% 1fach ungesättigte Fettsäuren, 56,3% 2fach ungesättigte Fettsäuren, Wasser ad libitum; n = 5 Tiere pro Zeitpunkt; 2 unabhängige Inkubationen pro Leber.

Unter Diät I – gesättigte Fettsäuren – (Abb. 2) bildet sich ein stark gedämpfter Rhythmus aus, der auch nach 14 Tagen nur zu einer geringen Steigerung der 7 α -Hydroxylase-Aktivität um 23.00 Uhr führt.

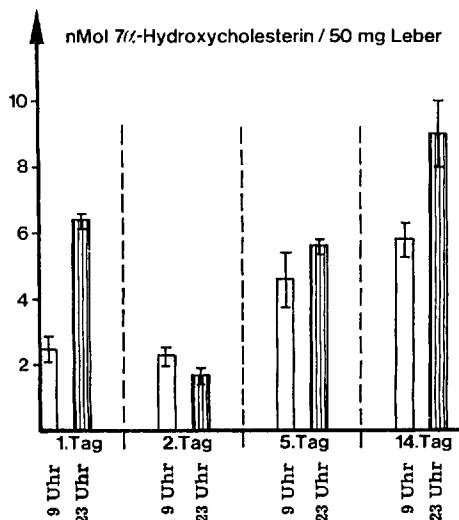


Abb. 4. Cholesterin-7 α -Hydroxylase-Aktivität bei fettreich ernährten Ratten in nMol entstandenem 7 α -Hydroxycholesterin \pm s \bar{x} pro 50 mg Leber; Inkubationszeit 20 min. Ernährung ab 1. Tag, 9.00 Uhr mit Diät III: 69,4% 1fach ungesättigte Fettsäuren, 13,2% 2fach ungesättigte Fettsäuren, Wasser ad libitum; n = 5 Tiere pro Zeitpunkt; 2 unabhängige Inkubationen pro Leber. Bestimmung um 9.00 Uhr, Bestimmung um 23.00 Uhr.

Die Tiere der Diät II – überwiegend polyungesättigte Fettsäuren – (Abb. 3) zeigen am 5. Tag einen normalen Tag-Nacht-Rhythmus; am 14. Tag kommt es zudem zu einer signifikanten Erhöhung der 9.00-Uhr-Werte. Unter Diät III – ca. 13% polyungesättigte Fettsäuren – (Abb. 4) treten am 5. und am 14. Tag normale Maximalwerte auf, dagegen sind die 9.00-Uhr-Werte an beiden Tagen deutlich erhöht.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich zwei Aussagen ableiten. Gültige Vorstellungen über das Verhalten der Cholesterin-7 α -Hydroxylase-Aktivität, die einem Tagesrhythmus unterliegt, können nicht durch 1-Punkt-Bestimmungen gewonnen werden. Erst das Erfassen tageszeitbedingter Unterschiede ermöglicht gesicherte Aussagen über den Wirkungsgrad der untersuchten Faktoren.

Bedingt durch unterschiedlichen Transport von Gallensäuren (8) kommt es bei fettreich ernährten Ratten zur Erniedrigung der Cholesterin-7 α -Hydroxylase-Aktivität, wenn überwiegend gesättigte, jedoch keine polyungesättigten Fettsäuren verfüttert werden. Polyungesättigte Fettsäuren – 13% der Gesamtfettsäuren ebenso wie 56% – bewirken Normalverhalten bis geringe Steigerung der Enzymaktivität.

Zusammenfassung

Der Verlauf der Cholesterin-7 α -Hydroxylase-Aktivität wurde während 14 Tagen an 3 Gruppen fettreich (20%) ernährter Ratten beobachtet (Messungen jeweils um 9.00 und 23.00 Uhr), wobei die einzelnen Diäten sich in der Fettsäurezusammensetzung unterschieden. Während die Werte der Kontrollgruppe den Circadianrhythmus des untersuchten Enzyms bestätigten, führt Ernährung mit gesättigten Fettsäuren zu einem Absinken der 7 α -Hydroxylierung des Cholesterins in der Dunkelphase. Dagegen weisen die Diäten mit polyungesättigten Fettsäuren (13% bzw. 56% des Fettsäuregehaltes) in der Dunkelphase unveränderte, in der Hellphase eher erhöhte Cholesterin-7 α -Hydroxylase-Aktivität auf.

Summary

The course of cholesterol-7 α -hydroxylase activity was observed for 14 days in 3 groups of rats on 20% fat diets which were of different fatty acid compositions. Determinations were done at 09.00 and 23.00 hr. In the controls the circadian variations of the enzyme were confirmed. Feeding of saturated fatty acids lead to a reduced 7 α -hydroxylation of cholesterol in the dark period, whereas feeding of polyunsaturated fatty acids (13% as well as 56% of total fatty acids) showed an enzyme activity unchanged in the dark period but slightly enhanced in the light period.

Literatur

1. Danielsson, H., K. Einarsson and G. Johannsson, *Europ. J. Biochem.* **2**, 44 (1967).
2. Shefer, S., S. Hauser, I. Bekersky and E. H. Mosbach, *J. Lipid Res.* **11**, 404 (1970).
3. Shefer, S., S. Hauser, J. Bekersky and E. H. Mosbach, *J. Lipid Res.* **10**, 646 (1969).
4. Mayer, D., in: P. Back and W. Gerok (Hrsg.), *Bile Acids in Human Diseases*, S. 103 (Stuttgart-New York 1972).
5. Mayer, D. and A. Voges, *J. Chronobiology* (in Vorb.).
6. Gielen, J., J. van Cantfort, B. Robaye and R. Courrier, *C. R. Acad. Sci.* **269**, 731 (1969).
7. Mitropoulos, K. A., S. Balasubramaniam and N. B. Myant, *Biophys. Acta* **326**, 428 (1973).
8. Mayer,

D. und G. Mayer, Z. Ernährungswiss. 13, 89 (1974). – 9. Stoffel, W., F. Chu and E. H. Ahrens, Anal. Chem. 31, 307 (1959). – 10. Mayer, D., F.-W. Koss und A. Glasenapp, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 353, 921 (1972). – 11. Balasubramaniam, S., K. A. Mitropoulos and N. B. Myant, Europ. J. Biochem. 34, 77 (1973).

Anschrift der Verfasser:

Priv.-Doz. Dr. Dieter Mayer, Institut für Klin. Biochemie und Physiol. Chemie,
Medizinische Hochschule, 3000 Hannover, Karl-Wiechert-Allee 9