

Szybkości absorpcji i zdolność do usuwania wolnych rodników metabolitów tłuszczowych witaminy C w ludzkich limfoblastach.

Benjamin S. Weeks¹, Pedro Perez²

1 Department of Biology and Environmental Sciences Program, Adelphi University, Garden City, NY, U.S.A.

2 Innovation Laboratories, Inc., Mount Sinai, NY, U.S.A.

Wprowadzenie:

W niniejszym badaniu analizowano szybkość absorpcji oraz właściwości antyoksydacyjne i wymiatające wolne rodniki tłuszczowych metabolitów witaminy C. Absorpcja mierzona była w ludzkich komórkach limfoblastycznych przy użyciu spektrofotometrii.

Materiały i metody:

Poziom witaminy C w linii komórkowej ludzkich limfoblastów H9 mierzony był przy użyciu 2,4-dinitrofenylohydrazyny techniką spektrofotometrii. Zdolność do usuwania wolnych rodników przez tłuszczowe metabolity witaminy C mierzony był przez redukcję 1,1-difenylo-2-pikryl hydrazylu (DPPH) do 1,1-difenylo-2-pikryl hydrazyny. Zdolność tłuszczowych metabolitów witaminy C do pochłaniania wolnych rodników tlenowych (ORAC) określana była metodą spektrofotometrii fluorescencyjnej.

Rezultaty:

W porównaniu do kwasu askorbinowego (AA), askorbinianu wapnia (CaA) oraz i askorbinianu, treonianu, dehydroksyaskorbinianu wapnia (Ester-C[®]), tłuszczowe metabolity witaminy C (PureWay-C[®]) był szybciej absorbowany przez H9 ludzkie limfocyty T. Metabolity tłuszczowe witaminy C (PureWay-C[®]) redukowały również indukowaną pestycydami agregację limfocytów T o 84%, gdzie askorbinian, treonian, dehydroksyaskorbinian wapnia (Ester-C[®]) redukował agregacje jedynie o 34%. Metabolity tłuszczowe witaminy C (PureWay-C[®]) posiadały zdolność do usuwania wolnych rodników bliską 100% redukcji DPPH przy stężeniu 20µg/ml oraz pochłaniania wolnych rodników tlenowych ponad 1200 µ równoważników Trolox[®] na gram.

Podsumowanie:

Powyższe dane pokazują, że tłuszczowe metabolity witaminy C (PureWay-C[®]) są szybciej absorbowane przez komórki niż inne formy witaminy C, włącznie z Ester-C[®]. Ten wzrost tempa absorpcji skorelowany jest z większą ochroną limfocytów T przed toksycznym działaniem pestycydów. Ponadto, tłuszczowe metabolity witaminy C (PureWay-C[®]) są silnym antyoksydantem i mają dużą zdolność do usuwania wolnych rodników.

Wprowadzenie

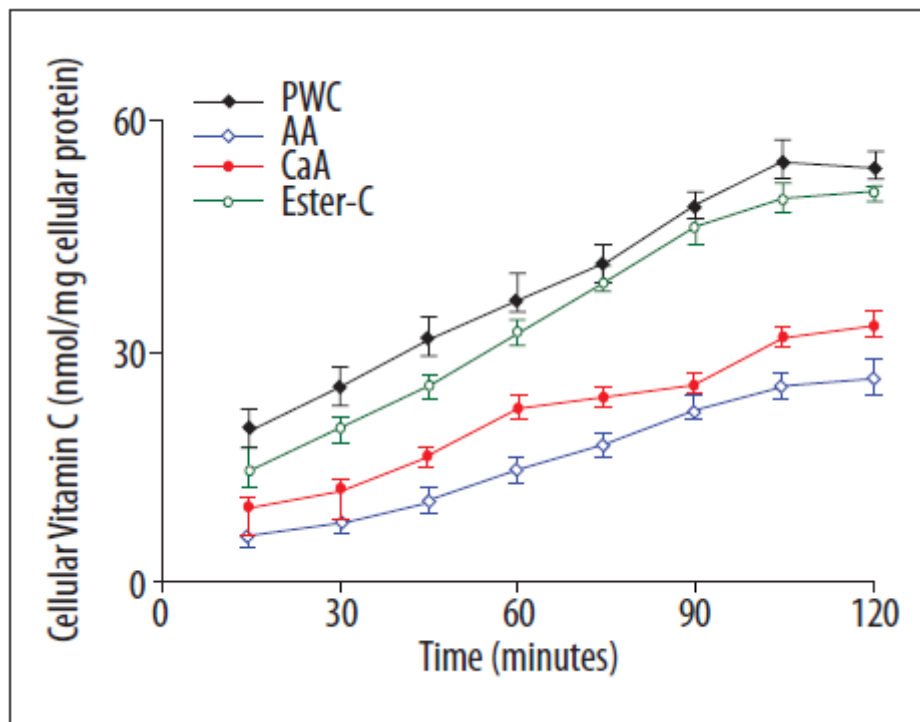
Witamina C jest ważnym składnikiem diety, który jest niezbędny dla zachowania normalnych i zdrowych aktywności fizjologicznych i metabolicznych takich jak rozrost neurytów, funkcjonowanie neuronów, gojenie się ran oraz dla zdrowego układu odpornościowego. Dlatego, biodostępność witaminy C jest niezwykle istotna i stała się przedmiotem licznych badań naukowców. Mieszanka askorbinianu wapnia z niewielkimi ilościami dehydroaskorbinianu, treonianu wapnia i ksylonianu i lyksonianu prowadziło do zwiększenia wchłaniania witaminy C przez komórki, co prowadziło do ochrony przed niedoborem witaminy C u szczurów i zwiększało wchłanianie oraz poziom krążącej witaminy C w surowicy u ludzi. Dużo nowsze badania wykazały, że tłuszczowe metabolity witaminy C znacznie bardziej stymulują rozrost neurytów, adhezję fibroblastów oraz lepiej chronią komórki układu immunologicznego w porównaniu do wszystkich pozostałych form witaminy C. Ta zwiększona biodostępność sugeruje większą szybkość wchłaniania przez komórki tłuszczowych metabolitów witaminy C w porównaniu do innych formułacji witaminy C.

W niniejszym badaniu mierzono wchłanianie tłuszczowych metabolitów witaminy C (PureWay-C[®]) w porównaniu do askorbinianu wapnia, kwasu askorbinowego oraz

askorbinianu, treonianu, dehydroksyaskorbinianu wapnia (Ester-C®). Potwierdzono również, że tłuszczowe metabolity witaminy C (PureWay-C®) posiadają silne zdolności antyoksydacyjne i usuwają wolne rodniki.

Rezultaty

Tempo absorpcji witaminy C przez ludzkie limfocyty T porównywane było dla różnych formuacji witaminy C. Odkryto że szybkości te są różne w zależności od formuacji witaminy C. Po okresie ponad dwóch godzin, poziom dla tłuszczowych metabolitów witaminy C był w konsekwencji wyższy niż ten obserwowany dla kwasu askorbinowego, askorbinianu wapnia, oraz askorbinianu, treonianu, dehydroksyaskorbinianu wapnia (Rys.1).



Rys.1 Szybkość absorpcji witaminy C przez hodowlę ludzkich limfocytów T H9

Po 15 minutach poziom witaminy C w komórkach osiągnął $7 \pm 1,4$ nmol/mg dla kwasu askorbinowego, dla tłuszczowych metabolitów witaminy C poziom ten był ponad dwa razy wyższy ($15 \pm 2,4$ nmol/mg). Poziom zaabsorbowanej witaminy C rósł w sposób znaczący z czasem, osiągając najwyższe wartości po około 2 godzinach, od 31 nmol/mg dla kwasu askorbinowego do 50 nmol/mg dla metabolitów tłuszczowych witaminy C.

Skoro kwas askorbinowy wykazał się najniższą wchłanianością we wszystkich badanych okresach czasu, to wartości dla kwasu askorbinowego zostały uznane jako 100% dla wszystkich punktów w czasie, po to aby określić procent wzrostu wchłanianości dla innych formuacji witaminy C. W porównaniu do kwasu askorbinowego askorbinian, treonian, dehydroksyaskorbinian wapnia (Ester-C®) wykazał się 189% wzrostem wchłaniania w 45 minucie, co jest wartością zbliżoną do wcześniejszych analiz (177% w 30 min). Metabolity tłuszczowe witaminy C (PureWay-C®) uzyskały 233% wzrost zarówno w 30 jak i w 45 minucie w porównaniu do kwasu askorbinowego., co stanowi blisko 120% wzrost w absorpcji w pierwszych 45 minutach w porównaniu do askorbinianu, treonianu, dehydroksyaskorbinianu wapnia (Ester-C®) (Tab.1.).

Tab.1. Procent absorpcji różnych form witaminy C w linii komórkowej ludzkich limfocytów t H9

	Procent		Wzrost	W porównaniu do kwasu askorbinowego
	CaA	Ester-C [®]		PureWay-C [®]
Czas po dodaniu				
15 min	128	171		214
30 min	122	189		233
45 min	133	192		233
	Procent		Wzrost	W porównaniu do Ester-C [®]
	CaA	Ester-C [®]		PureWay-C [®]
Czas po dodaniu				
15 min	-	0		125
30 min	-	0		124
45 min	-	0		122

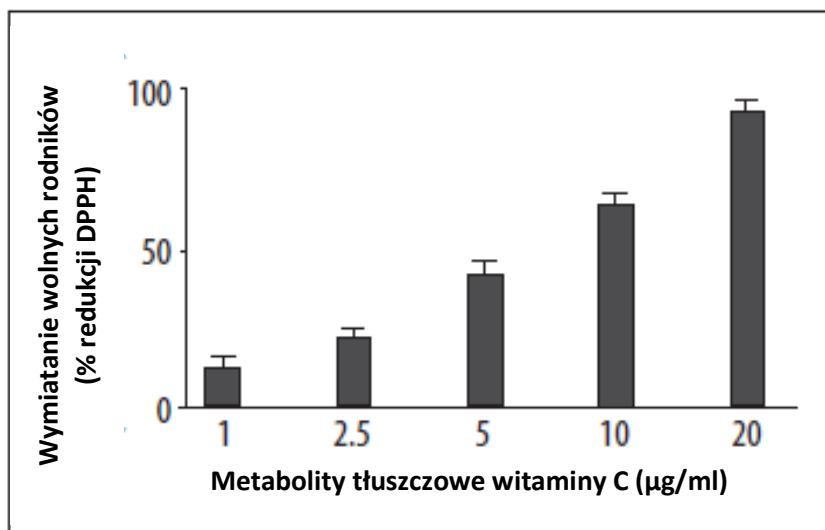
Zwiększona wchłanianość tłuszczowych metabolitów witaminy C skorelowana jest z ich większym efektem ochronnym po 30 minutowej ekspozycji na pestycydy (Tab.2.). Kiedy komórki poddawane były działaniu pestycydu – bifentrynu (insektycyd oddziałujący na układ nerwowy owadów) i różnych formułacji witaminy C w czasie zero, w rezultacie będąca wynikiem działania pestycydu agregacja limfocytów T zredukowana została przez PureWay-C[®] o 84% i tylko o 34% przez askorbinian, treonian, dehydroksyaskorbinian wapnia (Ester-C[®]).

Tab.2. Tłuszczowe metabolity witaminy C (PureWay-C[®]) hamowały indukowaną ksenobiotykami agregację ludzkich limfocytów T wiele bardziej efektywnie niż askorbinian, treonian, dehydroksyaskorbinian wapnia (Ester-C[®]).

	Aktywatory agregacji limfocytów T		
	Brak	PHA	Bifentryn
Dodana Wit.C			
Brak	10±5	170±15	300±15
AA	9±4	75±12	120±5
CaA	12±4	110±10	137±8
Ester-C [®]	8±2	130±17	200±8
*PureWay-C [®]	11±6	20±9	50±10

*Wszystkie formułacje witaminy C powodowały znaczącą statystycznie redukcję w agregacji, PureWay-C® wykazał statystycznie znaczącą największą redukcję w porównaniu do Ester-C®. PHA (fitochemaglutynina) została użyta jako kontrola pozytywna aktywacji agregacji.

Dodatkowo mierzono zdolność do wymiatania wolnych rodników oraz zdolności antyoksydacyjne tłuszczowych metabolitów witaminy C metodą ORAC, otrzymane wartości porównane zostały z innymi źródłami antyoksydantów, także mierzonymi metodą ORAC (Tab.3.). Tłuszczowe metabolity witaminy C wykazały najsilniejsze zdolności antyoksydacyjne w przeliczeniu na gram bazy niż inne naturalne źródła antyoksydantów. Metabolity tłuszczowe witaminy C (PureWay-C®) posiadały zdolność do usuwania wolnych rodników bliską 100% redukcji DPPH przy stężeniu 20µg/ml (Rys.2).



Rys.2 Zdolność do wymiatania wolnych rodników przez PureWay-C®. Mierzono efektywność redukcji DPPH w %. Przy stężeniu 20 µg/ml PureWay-C® redukował 100% DPPH.

Tab.3. Wartość ORAC dla tłuszczowych metabolitów witaminy C (PureWay-C®) w porównaniu do innych naturalnych antyoksydantów (µM odpowiedników Trolox® /gram substancji)

Źródło	ORAC [µM TE/g]
PureWay-C®	3782
Cynamon	1243
Acai (mrożone)	1027
Zielona i czarna herbata	761,1
Aronia	161
Brokuły	65,8 do 121,6
Płatki owsiane	32-48
Agrest	21

Dyskusja wyników

Witamina C jest niezbędna w wielu fizjologicznych i metabolicznych aktywnościach takich jak rozwój zdrowego układu nerwowego, ochrona przed chorobami neurodegeneracyjnymi, proces gojenia się ran, funkcjonowanie systemu odpornościowego. Z tych powodów

rekomendowana jest suplementacja witaminą C. Na przykład, witamina C jest niezbędna dla rozrostu neurytów. Dalej, interakcja fibroblastów z proteinami macierzy zewnątrzkomórkowej i ich późniejsza migracja są wskaźnikami procesu gojenia się ran, i faktycznie badania wykazały, że witamina C zwiększa adhezję fibroblastów i interakcje z macierzą zewnątrzkomórkową. Kolejno, adhezja leukocytów typu komórka-komórka jest związana z indukowaną ksenobiotykami hiperaktywacją i niszczącym stanem zapalnym. Witamina C wykazała działanie ochronne przed powodowanym paleniem tytoniu procesem agregacji leukocytów i ich przyczepiania się do śródbłonna naczyń. Witamina C redukuje również indukowaną pestycydami hiperaktywacją limfocytów T. Dla każdej z powyższych korzystnych aktywności witaminy C, jej tłuszczowe metabolity (PureWay-C[®]) są bardziej aktywne i działają szybciej niż askorbinian, treonian, dehydroksyaskorbinian wapnia (Ester-C[®]).

W kolejności, aby witamina C wykazała się pozytywnymi właściwościami, musi zostać wchłonięta przez komórki. Dlatego, wchłanianie przez komórki i retencja witaminy C mają kluczowe znaczenie, a przedmiotem analizy naukowej stało się zbadanie szybkości absorpcji różnych form witaminy C. Najszybsze wchłanianie tłuszczowych metabolitów witaminy C (PureWay-C[®]) przez komórki, w porównaniu do kwasu askorbinowego, askorbinianu wapnia i askorbinianu, treonianu, dehydroksyaskorbinianu wapnia (Ester-C[®]) tłumaczy jednocześnie fakt, że ta formuacja jest zdolna do większej stymulacji formowania neurytów oraz adhezji fibroblastów. W tym badaniu potwierdzono, że zwiększona absorpcja tłuszczowych metabolitów witaminy C (PureWay-C[®]) jest bezpośrednio powiązana ze zwiększonym działaniem ochronnym na ludzkie limfocyty T przed indukowaną przez ksenobiotyki hiperaktywacją.

Witamina C jest pod względem chemicznym reduktorem (antyoksydantem) w wielu wewnątrzkomórkowych i zewnątrzkomórkowych reakcjach takich jak utlenianie DNA i niszczenie białek, utlenianie LDL, peroksydacja lipidów, oksydanty i nitrozaminy w sokach gastrycznych, zewnątrzkomórkowe utleniacze z neutrofilii i rozszerzanie naczyń krwionośnych (zależne od śródbłonna). Tłuszczowe metabolity witaminy C (PureWay-C[®]), które prezentują silne zdolności antyoksydacyjne i neutralizujące wolne rodniki in vitro, mogą zatem stanowić dobre uzupełnienie diety ze względu na swoją bio-efektywność oraz potwierdzony w badaniach naukowych efekt antyoksydacyjny i mogą stanowić dobrą i efektywną ochronę dla ludzi i zwierząt przed niekorzystnym działaniem produktów utleniania i procesów oksydacji, które prowadzą do patogenezы raka, chorób sercowo-naczyniowych oraz związanych z wiekiem zaburzeń cytotoksycznych, genotoksycznych oraz mechanizmów pro-zapalnych i arterosklerozy.

Podsumowanie

Metabolity tłuszczowe witaminy C (PureWay-C[®]) są znakomitym antyoksydantem i efektywnie zwalczają wolne rodniki, ponadto są o wiele szybciej absorbowane i prowadzą do większego poziomu witaminy C w komórkach niż askorbinian, treonian, dehydroksyaskorbinian wapnia i wszystkie inne badane formuacje witaminy C. To szybkie wchłanianie tłuszczowych metabolitów witaminy C (PureWay-C[®]) wyjaśnia lepszą ich zdolność do stymulowania wzrostu neurytów i gojenia się ran i prowadzi do ochrony komórek układu nerwowego przed niekorzystnym działaniem ekspozycji na pestycydy co wykazano w opisanym powyżej badaniu.

Referencje

1. Weeks BS, Perez PP: A novel vitamin C preparation enhances neurite formation and fibroblast adhesion and reduces xenobiotic-induced T-cell hyperactivation. *Med Sci Monit*, 2007; 13(3): BR51–58
2. Zhou X, Tai A, Yamamoto I: Enhancement of neurite outgrowth in PC12 cells stimulated with cyclic AMP and NGF by 6-acylated ascorbic acid 2-O-alpha-glucosides (6-Acyl-AA-2G), novel lipophilic ascorbate derivatives. *Biol Pharm Bull*, 2003; 26(3): 341–46
3. Boothby LA, Doering PL: Vitamin C and vitamin E for Alzheimer's disease. *Ann Pharmacother*, 2005; 39(12): 2073–80
4. Landmark K: Could intake of vitamins C and E inhibit development of Alzheimer dementia?. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 2006; 126(2): 159–61
5. Marionnet C, Vioux-Chagnoleau C, Pierrard C et al: Morphogenesis of dermal-epidermal junction in a model of reconstructed skin: beneficial effects of vitamin C. *Exp Dermatol*, 2006; 15(8): 625–33
6. Kaplan B, Gonul B, Dincer S et al: Relationships between tensile strength, ascorbic acid, hydroxyproline, and zinc levels of rabbit full-thickness incision wound healing. *Surg Today*, 2004; 34(9): 747–51.
7. Lehr HA, Frei B, Arfors KE: Vitamin C prevents cigarette smoke-induced leukocyte aggregation and adhesion to endothelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; 91(16): 7688–92
8. Weber C, Erl W, Weber K, Weber PC: Increased adhesiveness of isolated monocytes to endothelium is prevented by vitamin C intake in smokers. *Circulation*, 1996; 93(8): 1488–92
9. Fay MJ, Verlangieri AJ: Stimulatory action of calcium L-threonate on ascorbic acid uptake by a human T-lymphoma cell line. *Life Sci*, 1991; 49(19): 1377–81
10. Fay MJ, Bush MJ, Verlangieri AJ: Effect of aldonic acids on the uptake of ascorbic acid by 3T3 mouse fibroblasts and human T lymphoma cells. *Gen Pharmacol*, 1994; 25(7): 1465–69
11. Verlangieri AJ, Fay MJ, Bannon AW: Comparison of the anti-scorbutic activity of L-ascorbic acid and Ester C in the non-ascorbate synthesizing Osteogenic Disorder Shionogi (ODS) rat. *Life Sci*, 1991; 48(23): 2275–81
12. Wright JV, Suen RM, Kirk FR: Comparative studies of "Ester C" versus L-ascorbic acid. *International Clinical Nutrition Review*, 1990; 10: 267–70
13. Bessey O, Lowry O, Brock M: The quantitative determination of ascorbic acid in small amounts of white blood cells and platelets. *J Biol Chem*, 1947; 168(1): 197–205
14. Vani T, Rajini M, Sarkar S, Shishoo CJ: Antioxidant properties of the Ayurvedic formulation-Triphala and its constituents. *Int J Pharmac*, 1997; 35(5): 313–17
15. Cao G, Alessio H, Cutler RG: Oxygen-Radical Absorbency Capacity Assay for Antioxidants. *Free Rad Biol Med*, 1993; 14: 303–11
16. Sua L, Yinb J-J, Charlesc D et al: Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. *Food Chem*, 2007; 100(3): 990–97
17. Schauss A, Xianli W, Prior R et al: Antioxidant Capacity and Other Bioactivities of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleracea*

- Mart. (Acai). *J Agric Food Chem*, 2006; 54(22): 8604–10
18. Prior RL, Cao G: Antioxidant capacity and polyphenolic components of teas: implications for altering in vivo antioxidant status. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1999; 220(4): 255–61
 19. Wu X, Gu L, Prior RL, McKay S: Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity. *J Agric Food Chem*, 2004; 52(26): 7846–56
 20. Kurilich AC, Jeffery EH, Juvik JA et al: Antioxidant capacity of different broccoli (*Brassica oleracea*) genotypes using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. *J Agric Food Chem*, 2002; 50(18): 5053–57
 21. Moore J, Hao Z, Zhou K et al: Carotenoid, tocopherol, phenolic acid, and antioxidant properties of Maryland-grown soft wheat. *J Agric Food Chem*, 2005; 53(17): 6649–57
 22. Lipton A, Klinger I, Paul D, Holley RW: Migration of mouse 3T3 fibroblasts in response to a serum factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971; 68(11): 2799–801
 23. DeBiasio R, Bright GR, Ernst LA et al: Five-parameter fluorescence imaging: wound healing of living Swiss 3T3 cells. *J Cell Biol*, 1987; 105(4): 1613–22
 24. Chen Y, Abraham DJ, Shi-Wen X et al: CCN2 (connective tissue growth factor) promotes fibroblast adhesion to fibronectin. *Mol Biol Cell*, 2004; 15(12): 5635–46
 25. Cimini M, Boughner DR, Ronald JA et al: Dermal fibroblasts cultured on small intestinal submucosa: Conditions for the formation of a neotissue. *J Biomed Mater Res A*, 2005; 75(4): 895–906
 26. Wha Kim S, Lee IW, Cho HJ et al: Fibroblasts and ascorbate regulate epidermalization in reconstructed human epidermis. *J Dermatol Sci*, 2002; 30(3): 215–23
 27. Hoffman N, Tran V, Daniyan A et al: Bifenthrin activates homotypic aggregation in human T-cell lines. *Med Sci Monit*, 2006; 12(3): BR87–94
 28. Lee W, Hamernyik P, Hutchinson M et al: Ascorbic acid in lymphocytes: cell preparation and liquid-chromatographic assay. *Clin Chem*, 1982; 28(10): 2165–69
 29. Ikeda T: Comparison of ascorbic acid concentrations in granulocytes and lymphocytes. *Tohoku J Exp Med*, 1984, 142(1): 117–18
- Basic Research Med Sci Monit*, 2007; 13(10): BR205-210