



# **Hepariinijärgsest vereplasmast lipoproteiinlipaasi aktiivsuse usaldusväärne määramine hüpertriglütserideemia põhjuste väljaselgitamiseks**

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Elizabet Solovjova

Üliõpilaskood: 213054LAAB

Juhendaja: Robert Risti, Tallinna Tehnikaülikool, insener

Õppekava: Rakenduskeemia, geenitehnoloogia ja toidutehnoloogia

Tallinn 2024

## **Autorideklaratsioon**

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Elizabet Solovjova

29.05.2024

Töö vastab bakalaureusetööle esitatud nõuetele.

Juhendaja: Robert Risti

29.05.2024

## Sisukord

Lühendite ja mõistete sõnastik .....	5
Sissejuhatus.....	6
1. Kirjanduse ülevaade .....	7
1.1 Lipoproteiinid .....	7
1.1.1 Külomikronid .....	7
1.1.2 VLDL.....	7
1.1.3 LDL.....	8
1.1.4 HDL .....	8
1.2 Lipoproteiinlipaas .....	9
1.3 Endoteelne lipolüüs.....	10
1.4 Hüpertriglütserideemia .....	11
1.5 LPL-i aktiivsuse määramine .....	12
1.5.1 Kalorimeetriline meetod .....	12
1.5.2 Kunstlikud vesilahustuvad substraadid .....	12
1.5.3 Radioaktiivsus.....	13
1.5.4 NEFA kit .....	13
1.5.5 Fluorestseeruv diglütseriid.....	14
2. Töö eesmärk.....	15
3. Materjalid ja meetodid.....	16
3.1 Kasutatud kemikaalid ja preparaadid.....	16
3.2 LPL-i aktiivsuse määramine fluorestsents-spektroskoopiaga .....	16
3.2.1 DGGR.....	16
3.2.2 EnzChek.....	16
3.3 LPL-i aktiivsuse määramine kalorimeetrilise meetodiga.....	17
3.3.1 Intralipiid .....	17
3.4 Avastamis- ja määramispiiri arvutamine.....	18
3.5 Keelekorrekatuur .....	18
4. Tulemused ja arutelu.....	19
4.1 Mõõtmistingimuste optimeerimine.....	19
4.1.1 Temperatuuri valik.....	19

4.1.2 Albumiini kontsentratsiooni valik EnzChek puhul .....	20
4.1.3 Albumiini vajadus DGGR puhul .....	21
4.2 Optimeeritud mõõtmistingimustega tulemused .....	22
4.2.1 EnzChek .....	22
4.2.2 DGGR .....	23
4.2.3 Intralipiid .....	24
4.2.4 Intralipiid - bLPL.....	24
4.3 Avastamiskiir/Määramiskiir .....	25
4.4 Maksa lipaasi vastase antikeha kasutamine .....	25
4.5 Teised mõõtmistingimuste optimeerimised.....	26
Tänuavaldused .....	28
Kasutatud kirjanduse loetelu .....	29
Annotatsioon.....	32
Abstract .....	33
Lisad.....	34
Lisa 1.....	34

## Lühendite ja mõistete sõnastik

ANGPTL – angiopoietiini-sarnased valgud

antiHL – maksa lipaasi antikeha

bLPL – veise lipoproteiinlipaas

BSA – veise seerumi albumiin

DGGR – 1,2-di-o-laurüül-glütsero-3-(glutarhappe 6-metüülresorufiin ester)

GPIHBP1 - glükosüülfosfatidüülinositolankurdatud kõrge tihedusega lipoproteiine siduv valk 1

HDL – kõrge tihedusega lipoproteiin

HSPG - heparaansulfaadi proteoglükaan

ITC - isotermiline tiitrimiskalorimeetria

LDL – madala tihedusega lipoproteiin

LPL – lipoproteiinlipaas

NEFA – mitte-esterdatud vabad rasvhapped

SDS - naatriumdodetsüülsulfaat

TRL - triglütseriidirikad lipoproteiinid

VLDL – väga madala tihedusega lipoproteiin

## Sissejuhatus

Lipoproteiinlipaas (LPL) on ensüüm, mis mängib olulist rolli rasvade metabolismis. Selle ülesanne on lagundada triglütseriide, mis on pakitud vereringes lipoproteiinidesse, nagu näiteks külmikronid ja väga madala tihedusega lipoproteiinid. Lipoproteiinide tasakaalu hoidmine on oluline südame ja veresoonekonna tervise säilitamiseks.

Hüpertriglütserideemia on seisund, kus veres on kõrgeenenud triglütseriidide tase. See võib olla põhjustatud mitmest tegurist, sealhulgas geneetilistest eelsoodumustest, dieedist, ülekaalulisusest, alkoholi tarbimisest ja teatud ravimitest. Üks oluline tegur, mis võib mõjutada triglütseriidide taset veres, on lipoproteiinlipaasi aktiivsus.

Kui LPL-i aktiivsus on vähenenud või puudub, ei suuda organism triglütseriide efektiivselt lagundada, mis võib põhjustada nende kogunemist veres ja hüpertriglütserideemia tekkimist. See seisund võib omakorda suurendada südame-veresoonekonna haiguste riski.

Seetõttu on lipoproteiinlipaasi aktiivsuse uurimine oluline hüpertriglütserideemia diagnoosimisel ja ravimisel. Arstid võivad kasutada seda teavet, et paremini mõista patsiendi triglütseriidide taseme tõusu põhjuseid ning välja kirjutada sobivat ravi, sealhulgas dieedimuutusi, elustiilimuutusi ja vajadusel ravimeid, mis võivad mõjutada lipoproteiinlipaasi aktiivsust. Lisaks võib LPL-i aktiivsuse jälgimine olla oluline ravivastuse hindamisel ja ravi kohandamisel.

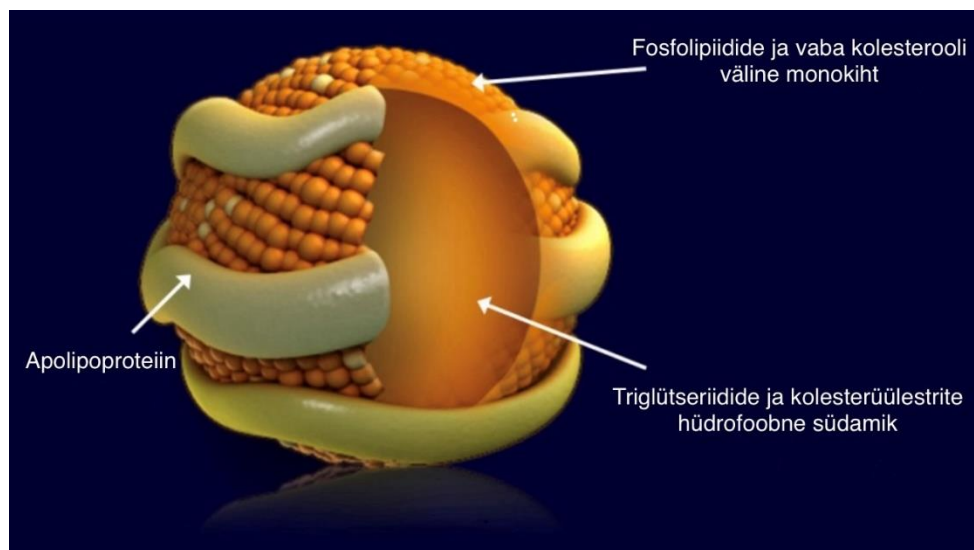
Antud töös kasutati lipoproteiinlipaasi aktiivsuse mõõtmiseks fluorestsentsmeetodit ja isothermilis-tiitrimise kalorimeetriat (ITC). Fluorestsentsmeetodi puhul kasutatakse fluoroogeenseid substraate, mille hüdroolüüsil lipoproteiinlipaasi poolt tekkinud produkti mõõdetakse fluorestsenti abil. ITC meetod põhineb reaktsiooni tulemusel tekkinud soojuse mõõtmisel.

Käesoleva töö eesmärgiks on uurida, milline valitud substraatidest ja meetoditest on usaldusväärsem lipoproteiinlipaasi aktiivsuse mõõtmiseks.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Lipoproteiinid

Lipoproteiinid - kompleksed osakesed, mille keskne hüdrofoobne südamik koosneb mittepolaarsetest lipiididest - kolesterooli estritest ja triglütseriididest. [1] Kolesterooli estrid ja triglütseriidid on plasmas lahustumatud biomolekulid ning selleks, et neid transportida vereringes, pakendatakse need lipoproteiinidesse. [2] Hüdrofoobne südamik on ümbritsetud hüdrofiilse membraaniga, mis koosneb fosfolipiididest, vabast kolesteroolist ja apolipoproteiinidest (Joonis 1). [1] On neli peamist lipoproteiiniosakest: külomikron, väga madala tihedusega lipoproteiin (VLDL), madala tihedusega lipoproteiin (LDL) ja kõrge tihedusega lipoproteiin (HDL). [2]



Joonis 1. Lipoproteiini struktuur. [1]

### 1.1.1 Külomikronid

Külomikronid on suured lipoproteiinid, mida toodetakse enterotsüütides toidulipiididest – rasvhapetest ja kolesteroolist. Külomikronid koosnevad peamisest tsentraalsest lipiidisüdamikust, mis sisaldab enamjaolt triglütseriide, kuid nagu teised lipoproteiinid, kannavad nad ka esterdatud kolesterooli ja fosfolipiide. [2] Külomikronid osalevad toidu triglütseriidide ja kolesterooli transportimisel perifeersesse kudedesse ja maksa. Külomikroni osake on moodustunud ümber apolipoproteiin B-48, lisaks sisaldavad külomikronid apolipoproteiine A-I, A-II, A-IV, A-V, C-II, C-III ja E. Külomikronite suurus sõltub imendunud rasva kogusest. Suure rasvasisaldusega toit põhjustab suurte külomikroniosakeste moodustumist tänu suurenenud transportitavale triglütseriidi ja kolesterooli kogusele. Samas, paastunud olekus on külomikronid väikesed, mis viitab vähenenud triglütseriidide kogusele. [1]

### 1.1.2 VLDL

VLDL koosneb ligikaudu 90% lipiididest ja 10% valkudest. See suhe annab VLDL-ile väga madala tiheduse, mis jääb vahemikku 0,96–1,006 g/ml. Kõikidest lipiididest moodustavad triglütseriidid

kuni 70% VLDL-i massist, ülejäänud osa koosneb kolesterooli estritest ja rasvhapetest. Erinevalt külomikronist, on VLDL-i keskne apolipoproteiin täispikk B-100, kuid samuti on VLDL seotud mitme teise apolipoproteiiniga, sealhulgas Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III ja Apo E. Nende apolipoproteiinidega on tihedalt seotud VLDL-i bioloogilised funktsioonid ja metabolism, samuti selle potentsiaalne roll haiguste arengus. [3]

### **1.1.3 LDL**

LDL on veelgi enam rikastatud kolesterooliga kui VLDL. LDL kannab suuremat osa veres olevast kolesteroolist. LDL tekib VLDL-i lipolüüsil LPL-i poolt, mille käigus vabanevad lipoproteiini pinnalt apolipoproteiinid. LDL koosneb mitmesuguste suuruste ja tihedustega osakestest. LDL-osakeste arvukus on seotud mitmete seisunditega, sealhulgas hüpertriglütserideemiaga, madala HDL-tasemega, rasvumisega, II tüüpi diabeediga (metaboolse sündroomiga patsientidel) ning nakkus- ja põletikuliste seisunditega. Väikese tihedusega LDL-osakesi peetakse mitmetel põhjustel pro-aterogeensemaks kui suuri LDL-osakesi. Need osakesed seonduvad halvemini LDL-retseptoritega, mis tähendab nende pikemat ringlust veres. Lisaks tungivad nad läbi arteriaalsete seinte kergemini ja seonduvad tihedamalt intraarteriaalsete proteoglükaanidega, mis hoiavad neid arteriaalsetes seintes kinni. Lõpuks on väikese tihedusega LDL-osakesed vastuvõtlikumad oksüdatsioonile, mis võib suurendada nende omastamist makrofaagide poolt. [1]

### **1.1.4 HDL**

HDL mängib olulist rolli kolesterooli pöördtranspordil perifeersetest kudedest maksa, mis on üks võimalik mehhanism, kuidas HDL võib olla antiaterogeenne. Lisaks omavad HDL-osakesed antioksidantseid, põletikuvastaseid, tromboosivastaseid ja apoptootilisi omadusi, mis võivad samuti aidata kaasa nende võimele ateroskleroosi pidurdada. HDL-osakesed on rikkad kolesterooli ja fosfolipiidide poolest ning nendega seostuvad apolipoproteiinid A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III ja E. Apolipoproteiin A-I on peamine struktuurvalk ning iga HDL-osake võib sisaldada mitut Apo A-I molekuli. HDL-osakesed on väga heterogeensed ja neid saab klassifitseerida omakorda alamklassideks tiheduse, suuruse, laengu või apolipoproteiini koostise alusel. [1] HDL alampopulatsioonide, eriti HDL-3 funktsionaalne hindamine on ateroskleroosi ennetamisel olulisem kui lihtsalt kolesteroolitaseme mõõtmine. HDL-3 osutus tõhusamaks VLDL-i triglütseriidide ja teatud apolipoproteiinide eemaldamisel, mis viitab sellele, et HDL-3-l on suurem roll VLDL-i katabolismis ja seega ka ateroskleroosi ennetamises. Seega võib HDL-2 ja HDL-3 jaotuse muutused mõjutada ateroskleroosi progresseerumist, rõhutades vajadust keskenduda HDL alamtüüpide tasakaalule terviseriskide hindamisel ja ravis. [4]

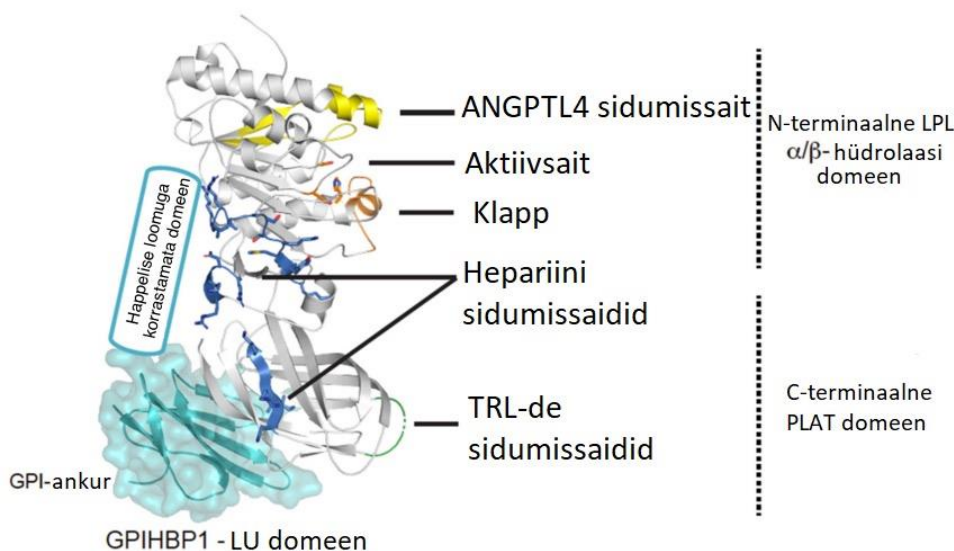


## 1.2 Lipoproteiinlipaas

Lipoproteiinlipaas (LPL) on vaskulaarse endoteeli pinnal asuv ensüüm. Seda leidub peamiselt rasvkoos, lihastes ja südamekoos, kuid mitte maksas, kus on maksa lipaas. [5] LPL-i toodetakse ja sekreteeritakse parenhüümirakkudest, nagu adipotsüüdid ja müotsüüdid. [6] Pärast nende rakkude poolt vabastamist transporditakse LPL rakkudevahelisest ruumist kapillaaride vaskulaarsele endoteelile. Seal hüdrolüüsib LPL triglütseriide külomikronitest ja VLDL-st vereringes, tekitades vabu rasvhappeid ja monoatsüülgütserooli. [7] Hiljutine uuring on näidanud, et 70% LPL-i asub glükosüülfosfatidüülinositolankurdatud kõrge tihedusega lipoproteiine siduva valgu 1 (GPIHBP1) küljes ja 30% heparaansulfaadi proteoglykaanide (HSPG) küljes. [8]

LPL-il on võime seonduda samaaegselt nii lipoproteiinide kui ka rakupinna retseptorite/proteoglykaanidega, mis võimaldab tal täita mitte-katalüütilist sildfunktsiooni. [9]

LPL-i struktuur (Joonis 2) koosneb kahest erinevast piirkonnast - lipolüütilise aktiivse tsentriga N-terminaalne domeen ja C-terminaalne domeen [6], mis vahendab seostumist hepariiniga [7] ning sisaldab trüptofaanirikkaid piirkondi lipiididest piirpindadele seostumiseks. Suur ja pidev positiivselt laetud piirkond, mis ulatub läbi LPL-i N- ja C-terminaalse piirkonna, võib olla seotud interaktsiooniga negatiivselt laetud ekstratsellulaarse HSPG-ga ja GPIHBP1 happelise domeeni ajutise seondumisega. [10] [11] GPIHBP1 happelise loomuga korrastamata domeen stabiliseerib LPL-i  $\alpha/\beta$ -hüdrolaasi domeeni ja arvatakse, et see interakteerub suure basaalse laiguga LPL-i pinnal. [12] Hiljutised röntgenkristallograafia ja biokeemilised katsed on andnud rohkem struktuurseid tõendeid, mis näitavad, et LPL võib olla aktiivne monomeerina [5] kui ka dimeerina. [13]



**Joonis 2.** LPL-i struktuur. Läbipaistva sinisega on näidatud GPIHBP1 LU domeeni (Ly6/uPAR valgu domeeni perekond) molekulaarne pind. Kollasega on märgitud ANGPTL4 sidumisega seotud LPL elemendid. Aktiivne koht, mis sisaldab katalüütilist triadi (Ser134, Asp158 ja His243) on esindatud oranžide jääkidega ja oranž heliks on klapp, mis katab aktiivse koha ja vastutab substraadi spetsiifilisuse eest. TRL-de sidumiskoht on näidatud rohelisena ja hepariini sidumise jaoks olulised jäägid on näidatud sinisena. [12]

### 1.3 Endoteelne lipolüüs

Plasma triglütseriidide lipolüüs LPL-i poolt mängib olulist rolli lipiidide ainevahetuses, olles mehhanismiks vabade rasvhapete tarnimiseks kudedele energia või ladustamise jaoks. [14]

Plasma triglütseriidid võivad olla nii eksogeense (toidurasvadest) kui ka endogeense (maksas sünteesitud) päritoluga. Toidust imendunud rasvasid transporditakse külomikronites ning maksast pärit rasvasid VLDL-des. Rasv- ja lihaskoe kapillaarides hüdrolüüsitakse triglütseriidid TRL-des LPL-i toimel vabadeks rasvhapeteks. Pärast sööki pärineb enam kui 90% vereringes olevatest triglütseriididest soolestikust, samas kui paastumise ajal domineerivad endogeensed triglütseriidid. Patoloogiline TRL-de taseme tõus plasmas võib tuleneda kas suurenenud tootmisest maksas ja soolestikus (ülesreguleeritud sünteesi- ja sekretsiooniradade kaudu) või vähenenud perifeersest katabolismist (peamiselt LPL-i aktiivsuse vähenemisest). [15]

LPL-il on mitmed regulaatorid, nagu apoC-II, mis on vajalik lipolüüsi jaoks. Selle puudulikkus põhjustab plasmas triglütseriidide eemaldamise ebaõnnestumist. [10] Praegused epidemioloogilised andmed viitavad sellele, et apoC-II taseme tõstmine veres võib vähendada kardiovaskulaarse haiguse riski. Seda toetab leid, et maksimaalne GPIHBP1-LPL ensümaatilise aktiivsus nõuab optimaalset apoC-II kontsentratsiooni. [16] ApoC-I ja apoC-III aga inhibeerivad LPL-i. Samuti ka angiopoietiini-sarnased valgud inhibeerivad LPL-i ning ka vastutavad selle koespetsiifilise aktiivsuse eest. [10]

## 1.4 Hüpertriglütserideemia

Hüpertriglütserideemia viitab paastunud olekus plasma triglütseriidide mõõtmisele, mis on tavaliselt vanuse ja soo järgi üle 95% – kuigi võib esineda ka täiendavaid kvantitatiivseid või kvalitatiivseid lipoproteiinide kõrvalekaldeid. Suurenenud plasma triglütseriidide kontsentratsioon suurendab selliste südame-veresoonkonna haiguste tekkimise riski, nagu rasvumine, metaboolne sündroom, põletikueelsed ja protromboosilised biomarkerid ning II tüüpi suhkurtõbi. Kui patsiendi triglütseriidide tase on väga kõrge (tavaliselt > 10 mmol/L), tuleb arvestada ägeda pankreatiidi suurenenud riskiga. [15] Hüpertriglütserideemiat saab ravida farmakoloogiliselt statiinide, fibraatide, niatsiini ja oomega-3 hapetega ning mittefarmakoloogiliselt elustiili muutustega, nagu piiratud kalorisisaldusega dieet ja füüsiline koormus. Ravi eesmärk on vähendada südame-veresoonkonna haiguste ja pankreatiidi riski. [17] Kuigi statiinravi on parandanud aterosklerootilise kardiovaskulaarse haiguse tulemusi, jääb mõningane südame-veresoonkonna haiguse jääkrisk püsima. Sellises aterosklerootiliste kardiovaskulaarsete haiguste riski tingimustes on paljudes uuringutes näidatud, et kerge kuni mõõdukas hüpertriglütserideemia on kardiovaskulaarse haiguse sõltumatu riskifaktor. Samas ei näita andmed kindlaid tõendeid selle kohta, et südame-veresoonkonna haiguste risk väheneb hüpertriglütserideemia raviga. [18] 2019. aastal tehtud uuring näitas, et hüpertriglütserideemia ja apoB osakeste vahel on tihe seos. Triglütseriidide ja LDL-kolesterooli (LDL-C) taseme alandamise kliiniline kasu võib olla võrdeline apoB absoluutse muutusega. [19]

Triglütseriidide taset alandavaid ravimeetodeid rakendatakse praegu kõigile inimestele samasuguselt. Triglütseriidide taset tõstvad patogeensed mehhanismid on aga üksikisikute vahel heterogeensed. [17]

Hüpertriglütserideemia on paljudel juhtudel multifaktoriaalne, mis tuleneb geneetiliste tegurite kombinatsioonist ja muudest põhjustest, mis põhjustavad TRL-de suurenenud tootmist ja/või katabolismi halvenemist. [18]

Eestis on kõrge triglütseriidide tase oluline terviseteema. 2017. aastal tehtud uuring Tallinna elanikkonna (20–65-aastaste) hulgas näitas, et 23,5%-l inimestest oli triglütseriidide tase normist kõrgem. Hüpertriglütserideemia esineb Eestis rohkem meeste (30,9%) seas kui naiste seas (17,0%). [20]

## 1.5 LPL-i aktiivsuse määramine

LPL-i aktiivsust saab mõõta *in vitro*, kasutades kunstlikke, tavaliselt emulgeeritud radioaktiivselt märgistatud triglütseriide, fluorogeenseid või kromogeenseid vesilahustuvaid substraate või isoleeritud TRL-e. Reaktsiooni produktid määratakse teatud ajahetkel keemilise kvantifitseerimise, radioaktiivsuse määramise või fluorestsentsi teel. Neid meetodeid on kasutatud LPL-i tegevuse oluliste aspektide lahti harutamiseks ja ka LPL-i aktiivsuse taseme määramiseks rakkudes ja kudedes. Vereringes esineb tavaliselt vähe aktiivset LPL-i. Seetõttu tehakse hepariini intravenoossed süstid, et vabastada seotud LPL-i endoteelilt. On pakutud, et LPL-i aktiivsuse määramine hepariinijärgses plasmas, [6] kus selle kontsentratsiooniks on 5 nM, [21] tehissubstraadisüsteeme kasutades, annab hinnangu aktiivse LPL-i kogusele vaskulaarses endoteelis. [6]

### 1.5.1 Kalorimeetriline meetod

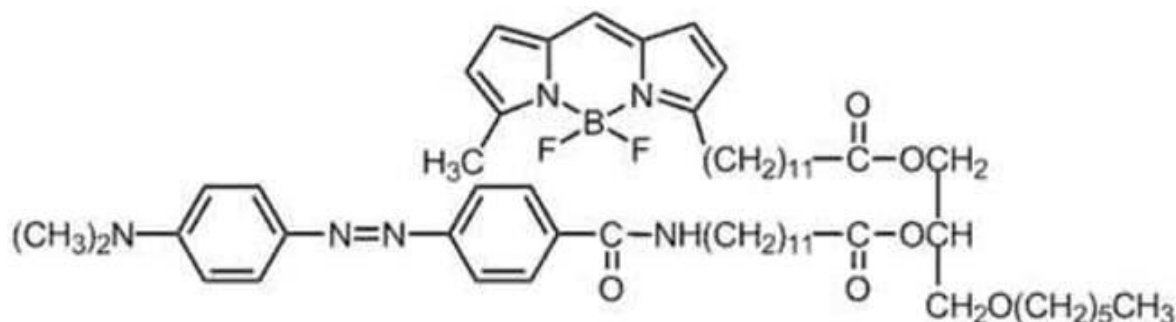
Isotermiline tiitrimiskalorimeetria (ITC) võimaldab pidevat analüüsi, kasutades jälgitavat soojusvoogu, mis on otseselt proportsionaalne lipolüüsi kiirusega. ITC katsete toorandmed esitatakse termogrammidenä, milles konstantsel temperatuuril jälgitakse soojusvoogu. ITC-d saab kasutada LPL-i aktiivsuse määramiseks inimese plasmas, kus substraadiks on füsioloogilised lipoproteiinid. Mõõta saab nii algkiirusi (nulljärku kineetikat) kui ka täieliku lipolüüsi kineetikat, kus hüdrolüüsitakse kõik LPL-le kättesaadavad triglütseriidid proovis. Meetod on piisavalt tundlik, et määrata LPL-i aktiivsust isegi madalates kontsentratsioonides, mis võimaldab avastada ka väiksemaid muutusi. ITC-d saab kasutada ka, näiteks, valkude aktiveerimise ja inhibeerimise mõju uurimiseks LPL-i aktiivsusele. Meetodi puudusteks on see, et ITC-seadmete soetamine ja hooldamine võib olla kulukas, mis muudab selle meetodi rakendamise keerukamaks laborites, kus pole vajalikke ressursse. Samuti ITC-meetod võib olla aeganõudev, eriti kui tegemist on mitmete proovide analüüsimisega. Mõned LPL-i regulaatorvalgud või muud tegurid võivad mõjutada ITC tulemusi või segada analüüsi täpsust, mis võib piirata meetodi kasutamist teatud uurimistöös. [6]

### 1.5.2 Kunstlikud vesilahustuvad substraadid

Kunstlikud vesilahustuvad fluorogeensed (DGGR (1,2-di-o-laurüül-glütsero-3-(glutarhappe 6-metüülresorufiin ester)), EnzChek) või kromogeensed (p-nitrofenüülbuturaat) substraadid võimaldavad odavalt ja mugavalt määrata LPL-i aktiivsust. Samas tuleb arvestada, et sellisel juhul määratakse LPL-i esteraasset aktiivsust, mis ei pruugi peegeldada täpselt kõiki muutuseid LPL-i struktuuris ja funktsioonis. Samuti sisaldavad kunstlikud substraadisüsteemid detergente, mis võivad lagundada LPL-i agregaadid või LPL-inhibiitor kompleksid. [22]

Fluorestsentsmeetodis saab kasutada EnzChek (Joonis 3) lipaasi substraati. Mõõdetakse LPL-i aktiivsust kõrge läbilaskevõimega, kus EnzChek substraadi hüdrolüüsil tekkinud produkti mõõdetakse fluorestsentsi abil. Meetod hõlmab ajapunktide mõõtmist. Kui ajapunktide vahelised intervallid on liiga pikad, võib oluline info reaktsiooni kiiruse ja dünaamika kohta kaduma minna. Tavaliselt PHP-d lahjendatakse. Proovi lahjendamisel võivad tekkida vead, mis võivad mõjutada mõõtmiste täpsust, eriti kui tegemist on madalate kontsentratsioonidega. Meetod on kiire ja

tõhus, kuid võib olla vähem tundlik kui radioaktiivsusega meetod ja spetsiifiline teatud bioloogiliste proovide puhul, vajab optimeerimist eri proovitüüpide jaoks. [23]



**Joonis 3.** EnzChek-i keemiline struktuur. Peale rasvhappe lõikamist, fluorestseeruv määrgis (pildil ülemised aromaatsed tsüklid) hakkab fluorestseeruma. [24]

Samuti kasutatakse fluorestsentsmeetodis DGGR (1,2-di-o-laurüül-glütsero-3-(glutarhappe 6-metüülresorufiin ester)) substraati. Seda kasutades ei ole tehtud veel uuringuid inimese vereplasmaga, aga on uuritud selle spetsiifilisust kasside ja koerte pankrease lipaasi vastu. [25]

### 1.5.3 Radioaktiivsus

Radioaktiivsete substraatide (3H või 14C märgistatud trioleiin) kasutamine on väga töömahukas, aga samas määratakse lipolüütilist aktiivsust ning on hästi tundlik ja spetsiifiline. Ei võimalda mõõtmisi teostada reaajas. Tundlikkus sõltub radioaktiivse märgistuse täpsusest ja võimest eraldada hüdrolyüsitud rasvhapped mittehüdrolyüsitud triglütseriididest. Proove tavaliselt lahjendatakse. Meetod on aeganõudev, madala läbilaskevõimega ning nõuab radioaktiivsete materjalide kasutamist, mis on tervise- ja keskkonnamislik. [23]

### 1.5.4 NEFA kit

Meetod määrab LPL-i aktiivsust hepariinijärgses plasmas (PHP), kasutades VLDL substraati. Plasmaproove inkubeeritakse tavaliselt temperatuuril 37°C ja toodetud mitte-esterdatud vabad rasvhapped (NEFA) määratakse iga tunni järel nelja tunni jooksul. LPL-i aktiivsus väljendatakse mmol/l/min, lahutades maksa lipaasi aktiivsuse, mis saadakse LPL-i inhibeerimisel NaCl-ga. Kuigi VLDL on optimaalne substraat LPL-i jaoks, võib maksa lipaasi vähenenud aktiivsus siiski mõjutada tulemusi. Määratakse lipolüütilist aktiivsust. Minimaalne tuvastatav LPL-i aktiivsus on 1.68 mmol/l/min soojendatud 37°C juures PHP-s ja 2.7 mmol/l/min pre-hepariin plasmas. Meetod on väga tundlik, võimaldades tuvastada LPL-i aktiivsuse väikesed muutused. Saab kasutada lahjendatud vereplasmast, kuid see võib muuta tulemust, sest lahjenevad ka LPL-i regulaatorid. Kuigi korrelatsioon radioaktiivselt märgistatud substraate kasutava meetodiga on hea, võib täpsus mõnel juhul olla madalam. [26]

### 1.5.5 Fluorestseeruv diglütseriid

Uus meetod, mis põhineb absorptsiooni mõõtmisel 546 nm juures, mis tuleneb kinuondiimiinivärvi tekkest ensümaatiliste reaktsioonide tulemusena, kasutades substraadina dioleüülgütserooli. Mõõtmine toimub reaalajas, kuna kasutatakse automaatset kliinilist analüsaatorit, mis viib läbi analüüsid, eristades maksa lipaasi ja LPL-i aktiivsust apoC-II olemasolu või puudumise järgi, mis tähendab, et mõõdetakse LPL-i lipolüütilist aktiivsust. Selle meetodi tulemused korreleeruvad hästi tavapärase isotoopmeetodite ja ELISA-ga, tagades usaldusväärsuse ja täpsuse. Proove mõõdetakse lahjendamata vereplasmast. Puudusteks on see, et meetod nõuab automaatset kliinilist analüsaatorit, mis ei pruugi olla kõigis laborites saadaval ning selle efektiivsus sõltub spetsiifilistest reaktiividest, mis ei pruugi olla kõikjal saadaval või võivad kvaliteedis erineda. [27]

## 2. Töö eesmärk

Antud töö eesmärgiks oli võrrelda hepariinijärgsest vereplasmast pärit lipoproteiinlipaasi aktiivsust kolmes erinevas substraadisüsteemis, et selgitada välja, milline meetod võiks olla kõige sobilikum hüpertriglütserideemia põhjuste väljaselgitamiseks.

## 3. Materjalid ja meetodid

### 3.1 Kasutatud kemikaalid ja preparaadid

MilliQ vesi; veise seerumi albumiin 96,78 mg/ml (#A7030, Sigma-Aldrich); hepariin 500 IU/ml (#411312500, Acros Organics); 150 mM NaCl, 200 mM TRIS, pH 7.4; 150 mM NaCl, 200 mM HEPES, pH 7.4; 1,33% SDS; 11,3  $\mu$ M veise lipoproteiinlipaas (bLPL) (20 mM BIS-TRIS, 1M NaCl, pH 6.5); inimese hepariinijärgne plasma Rootsist; 0,62  $\mu$ M EnzChek (#E33955, Invitrogen); 24  $\mu$ M DGGR (#30058, Sigma-Aldrich); 20% Intralipiid (#1141, Sigma-Aldrich); 4M NaCl; 1M TRIS puhver pH 7,4; 10x PBS.

### 3.2 LPL-i aktiivsuse määramine fluorestsents-spektroskoopiaga

#### 3.2.1 DGGR

LPL-i aktiivsust mõõdeti Shimadzu RF-5301 PC spektrofluomeetriga ning üheks kasutatavaks substraadiks oli DGGR. Mõõtmissegud valmistati järgmistest komponentidest: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, PHP, 24  $\mu$ M DGGR. Esialgu segati kokku HEPES/NaCl ja MilliQ vesi, homogeniseeriti ning pandi termostaati 37°C juurde kuumutama 10 minutit. Peale kuumutamist viidi segu üle ühekordsesse plastikküveti, lisati PHP ja DGGR ning suspendeeriti hoolikalt ja asendati 37°C juurde spektrofluoromeetrisse. Fluorestsentsi mõõdeti 5 minuti jooksul. Iga mõõtmissegu maht oli 500  $\mu$ l. Ergastuse lainepikkuseks oli 572 nm ja emissiooni lainepikkuseks 605 nm. Kokku tehti 3 paralleelkatset iga järgmise PHP kogusega: 0,5  $\mu$ l; 1  $\mu$ l; 3  $\mu$ l; 5  $\mu$ l; 10  $\mu$ l.

Maksa lipaasi inhibeerimiseks kasutati antikeha (antiHL, IgG). Valmistati 27 PHP ja IgG segu, kus antikeha lõppkontsentratsiooniks oli 1,67 mg/ml. Segu pandi jääle inkubeerima 2-ks tunniks. Peale inkubeerimist valmistati mõõtmissegud järgmistest komponentidest: 24  $\mu$ M DGGR; 7,5  $\mu$ l PHP ja IgG segu; 20 mM HEPES, 150 mM NaCl. Esialgu segati kokku HEPES/NaCl ja MilliQ vesi, homogeniseeriti ning pandi termostaati 37°C juurde kuumutama 10 minutit. Peale kuumutamist viidi segu üle ühekordsesse plastikküveti, lisati PHP ja IgG segu ning DGGR ja suspendeeriti hoolikalt ning asendati 37°C juurde spektrofluoromeetrisse. Fluorestsentsi mõõdeti 5 minuti jooksul. Iga mõõtmissegu maht oli 500  $\mu$ l. Ergastuse lainepikkuseks oli 572 nm ja emissiooni lainepikkuseks 605 nm. Kokku tehti 3 paralleelkatset.

Kontrollkatseteks olid tehtud mõõtmissegud, kus IgG asemel oli 1x PBS puhver.

Saadud andmed anlüüsiti Microsoft Exceli kaudu ja ülevaatlikuid graafikuid valmistati kasutades SigmaPlot.

#### 3.2.2 EnzChek

Teiseks substraadiks kasutati EnzChek ning fluorestsentsi mõõdeti sama seadmega Shimadzu RF-5301 PC. Mõõtmissegud olid valmistatud järgmistest komponentidest: 2 mg/ml veise seerumi albumiin; 0,62  $\mu$ M EnzCheck; 150 mM NaCl, 200 mM TRIS, pH 7.4; PHP. Esialgu segati kokku TRIS/NaCl, veise seerumi albumiin ja MilliQ vesi, segu homogeniseeriti ning pandi termostaati 37°C juurde kuumutama 10 minutit. Peale kuumutamist viidi segu üle ühekordsesse plastikküveti, lisati PHP ja EnzChek ning suspendeeriti hoolikalt ja asendati 37°C juurde spektrofluoromeetrisse.



Fluorestsentsi mõõdeti 5 minuti jooksul. Iga mõõtmisega maht oli 500 µl. Ergastuse lainepikkuseks oli 507 nm ja emissiooni lainepikkuseks 515 nm. Kokku tehti 3 paralleelkatset iga PHP kogusega: 1 µl; 3 µl; 5 µl; 10 µl; 20 µl; 40 µl.

Maksa lipaasi inhibeerimiseks kasutati antikeha (antiHL, IgG). Valmistati PHP ja IgG segu, kus antikeha lõppkontsentratsiooniks oli 1,67 mg/ml. Segu pandi jääle inkubeerima 2-ks tunniks. Peale inkubeerimist valmistati mõõtmisega järgmistest komponentidest: 0,62 µM EnzCheck; 200 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 7.4; 7,5 µl PHP ja IgG segu; 2 mg/ml veise seerumi albumiin. Esialgu segati kokku TRIS/NaCl, veise seerumi albumiin ja MilliQ vesi, segu homogeniseeriti ning pandi termostaati 37°C juurde kuumutama 10 minutit. Peale kuumutamist viidi segu üle ühekordsesse plastikküveti, lisati PHP ja IgG segu ning EnzChek ja suspendeeriti hoolikalt ning asendati 37°C juurde spektrofluoromeetrise. Fluorestsentsi mõõdeti 5 minuti jooksul. Iga mõõtmisega maht oli 500 µl. Ergastuse lainepikkuseks oli 507 nm ja emissiooni lainepikkuseks 515 nm. Kokku tehti 3 paralleelkatset.

Kontrollkatseteks olid tehtud mõõtmisega, kus IgG asemel oli 1x PBS puhver.

Saadud andmed anlüüsiti Microsoft Exceli kaudu ja ülevaatlilikuid graafikuid valmistati kasutades SigmaPlot.

### 3.3 LPL-i aktiivsuse määramine kalorimeetrilise meetodiga

#### 3.3.1 Intralipiid

LPL-i aktiivsuse määramiseks kalorimeetrilise meetodiga kasutati isotermilise tiitrimise kalorimeetrit MICROCAL PEAQ-ITC firmalt Malvern. Substraadisegu valmistati järgmistest komponentidest: 50 mg/ml veise seerumi albumiin; 5% kitseseerum; 1% Intralipiid; 150 mM NaCl; 20 mM TRIS puhver pH 7,4; 10 IU/ml hepariin; puhas MilliQ vesi. Saadud substraadisegust (360 µl) 200 µl viidi üle mõõterakku. Kalorimeetri büretti laaditi 35 µl PHP-d. Oli tehtud 3 süsti 5 µl kaupa ning mõõdeti soojusvoogu.

Maksa lipaasi inhibeerimiseks kasutati antikeha (antiHL, IgG). Substraadisegu valmistati järgmistest komponentidest: : 50 mg/ml veise seerumi albumiin; 5% kitseseerum; 1% Intralipiid; 150 mM NaCl, 20 mM TRIS puhver pH 7,4; 10 IU/ml hepariin; puhas MilliQ vesi. Saadud substraadisegust (360 µl) 200 µl viidi üle mõõterakku. Valmistati PHP + antiHL segu (antikeha lõppkontsentratsiooniks oli 1,67 mg/ml) ning 35 µl laaditi kalorimeetri büretti. Oli tehtud 3 süsti 10 µl kaupa ning mõõdeti soojusvoogu.

Kontrollkatseteks olid tehtud mõõtmisega, kus IgG asemel oli 1x PBS puhver.

Katse parameetrid:

Temperatuur:	37°C
Segamiskiirus:	1000 rpm

Andmed analüüsiti MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software ja Microsoft Excel kaudu ning ülevaatlilikuid graafikuid valmistati kasutades SigmaPlot.

### 3.4 Avastamis- ja määramispiiri arvutamine

DGGR ja EnzChek puhul arvutati parameetrid järgmiste valemite abil kalibreerimisgraafiku põhjal:

$$\text{Avastamispiir LoD} = 3,3 \times \frac{S_y}{b}$$

$$\text{Määramispiir LoQ} = 10 \times \frac{S_y}{b}$$

- $b$  on kalibreerimisgraafiku tõus avastamispiiri lähedal
- $S_y$  on kalibreerimisgraafiku jääkliikmete (residuaalide) standardhälve

Kalorimeetrilise mõõtmise puhul Intralipiidiga hinnati signaal/müra suhet:

$$\text{Avastamispiir LoD} = 3 \times \text{müra standardhälve}$$

$$\text{Määramispiir LoQ} = 10 \times \text{müra standardhälve}$$

### 3.5 Keelekorrekatuur

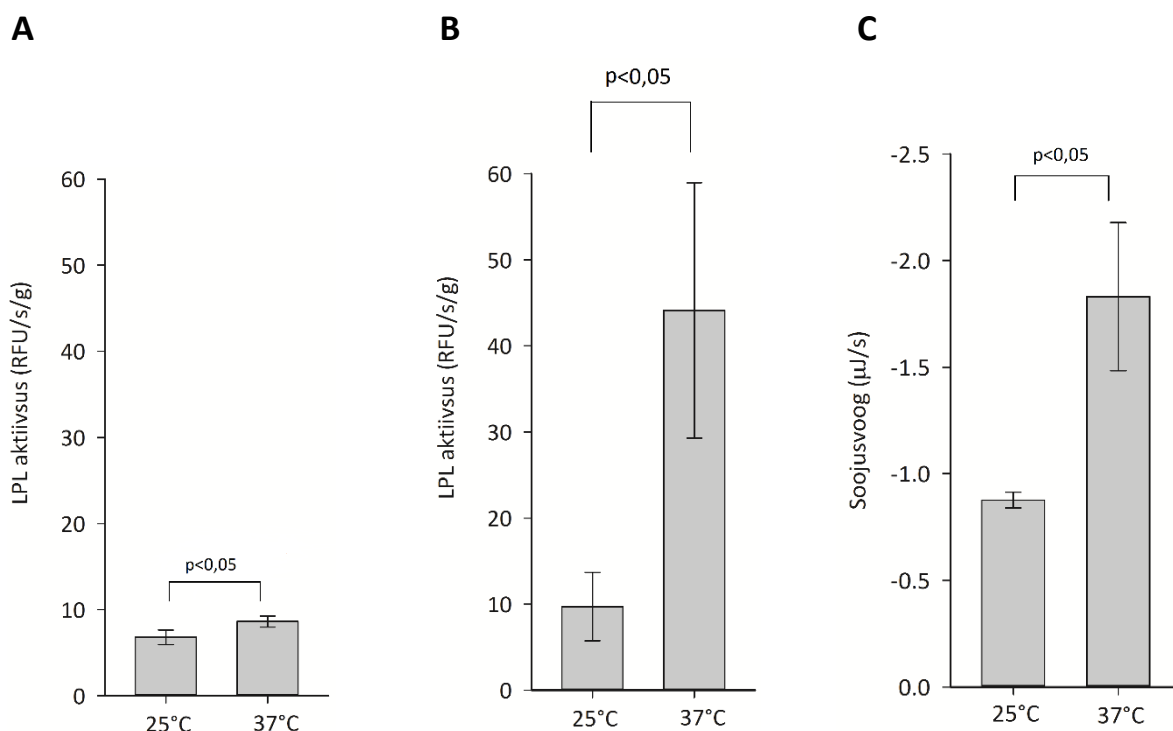
Töös kasutati keelekorrektoori eesmärkidel ChatGPT keelemudelit.

## 4. Tulemused ja arutelu

### 4.1 Mõõtmistingimuste optimeerimine

#### 4.1.1 Temperatuuri valik

Esimeseks uuriti temperatuuri mõju PHP-st pärit LPL-i aktiivsusele kolme erineva substraadiga – EnzChek, DGGR ja Intralipiid. Tulemused on näidatud kolme mõõtmise keskmisena koos standardhällbega Joonisel 4, kus tehti mõlemal temperatuuril kolm paralleelmõõtmist.



**Joonis 4.** (A) EnzChek. (B) DGGR. (C) Intralipiid. Graafikutel on LPL-i aktiivsus esialgu 25°C juures ja siis 37°C juures.

Kõikide substraatidega tulemus oli sama – temperatuuri tõstmine 37°C-ni annab statistiliselt ( $p < 0,05$ ) parema LPL-i aktiivsuse, seeläbi tõstes meetodite tundlikkust. Samuti on see temperatuur füsioloogilisem. Üldiselt võib öelda, et LPL on väga ebastabiilne, näiteks on vesinik-deuteerium vahetus mass-spektromeetria katsed näidanud, et ANGPTL4 langetab LPL N-terminaase domeeni sulamistemperatuuri  $\leq 15$  °C -ni või 37.8°C juurde kui LPL on GPIHBP1-ga seotud, GPIHBP1 tõstab jällegi 34.8°C juurest 57.6°C juurde. Seetõttu võib olla oluline regulaatorite ja ravimikandidaatide uurimisel viia läbi mõõtmised 37°C juures. [28] [29]

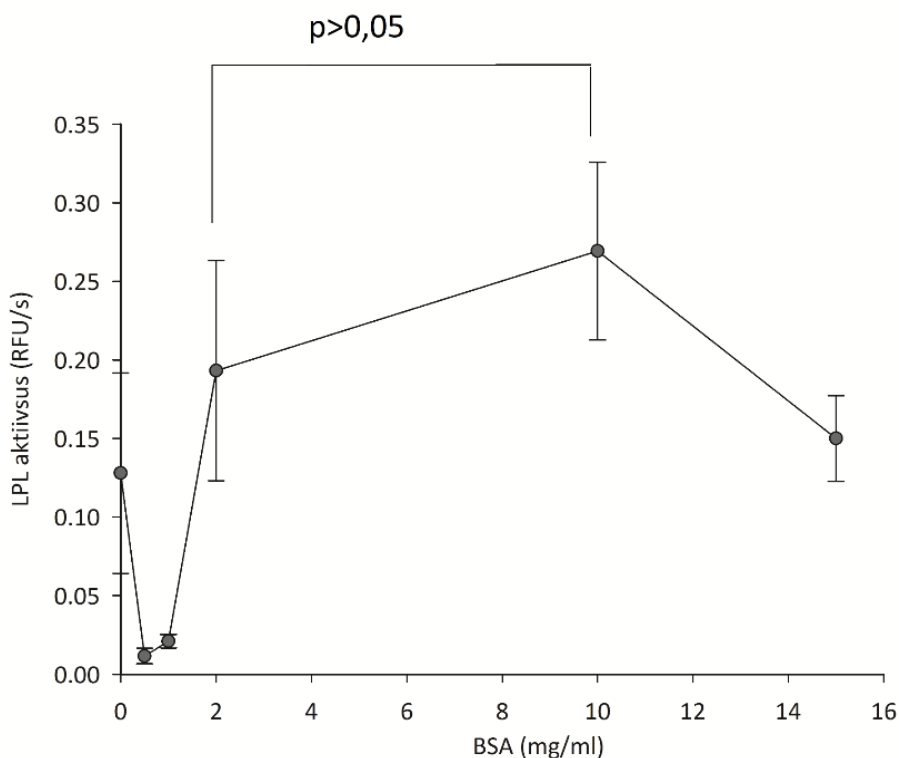
### 4.1.2 Albumiini kontsentratsiooni valik EnzChek puhul

Ühes töös kasutati EnzChek puhul albumiini kontsentratsiooniga 15 mg/ml. [30] Kui arvestada seda, et albumiin saab siduda vähemalt 7 rasvhappet, [31] siis saab teha järgmist arvutust:

$$15 \text{ mg/ml} \rightarrow \frac{15 \frac{\text{g}}{\text{l}}}{66000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 0,000227 \frac{\text{mol}}{\text{l}}$$

$0,227 \text{ mM} \times 7 = 1,59 \text{ mM}$  - nii suures kontsentratsioonis rasvhappeid suudab 15 mg/ml albumiini siduda.

Mõõtmistel kasutati 0,62  $\mu\text{M}$  EnzChek substraati, mille täielikul hüdroolüüsil tekib kuni 1,24  $\mu\text{M}$  kontsentratsioonis rasvhappeid. See on umbes 1000 korda vähem kui 15 mg/ml albumiini suudab siduda. Samuti fluorestsentsmeetodis ei jälgitud EnzChek-i tervet hüdroolüüsi. Seega prooviti teha katsed järgmiste albumiini kontsentratsiooniga: 0 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1 mg/ml; 2 mg/ml; 10 mg/ml; 15 mg/ml.

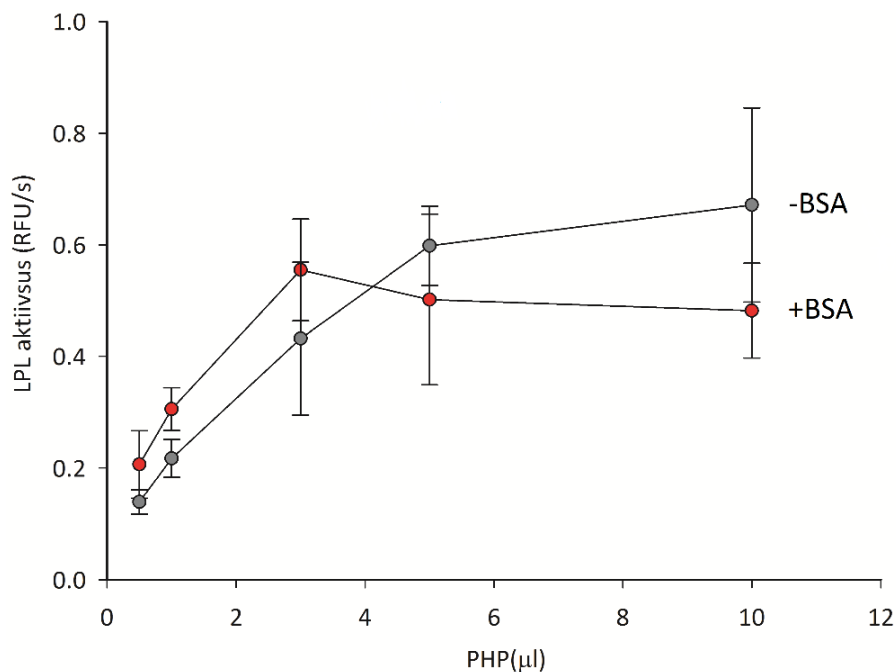


**Joonis 5.** LPL-i aktiivsus, kasutades substraadi EnzChek albumiini erinevate kontsentratsioonidega.

Otsustati kasutada albumiini kontsentratsiooniks 2 mg/ml, kuna statistiliselt ( $p > 0,05$ ) ei ole erinevust 2 mg/ml ja 10 mg/ml vahel. Vaatamata sellele, et eelnevates töödes on kasutatud 15 mg/ml albumiini kontsentratsiooni, [30] siis käesolevas töös hakkas LPL-i aktiivsus langema kõrgematel albumiini kontsentratsioonidel, seega seda ei kasutatud. Madalamatel albumiini kontsentratsioonidel oli LPL-i aktiivsus väiksem, kuigi ka nende puhul peaks albumiin kõik tekkinud rasvhapped siduma. Tõenäoliselt on albumiini afiinsus tekkinud rasvhapete suhtes ebapiisav, sest need sisaldavad kogukaid aromaatsid tsükleid. Oluline on märkida, et kui teha katsed näiteks 10  $\mu\text{l}$  PHP-ga, siis tuleb plasmast kaasa mõõtmissegusse 1 mg/ml albumiini (PHP-s on 35-50 mg/ml albumiin). [32]

### 4.1.3 Albumiini vajadus DGGR puhul

Töös, kus mõõdeti LPL-i aktiivsust kasutati DGGR-ga mõõtes albumiini kontsentratsiooniga 10 mg/ml. [30] Kuigi on teada, et pikemad rasvhapped (C18:1) inhibeerivad LPL-i, [33] siis DGGR-s leiduvad C12 rasvhapped seda teha ei pruugi. Seetõttu prooviti läbi viia katsed koos ja ilma albumiinita, et võimalusel vältida albumiini kasutamist, mis võib mõõtmiste tegemist ja tulemuste interpreteerimist keerulisemaks teha.



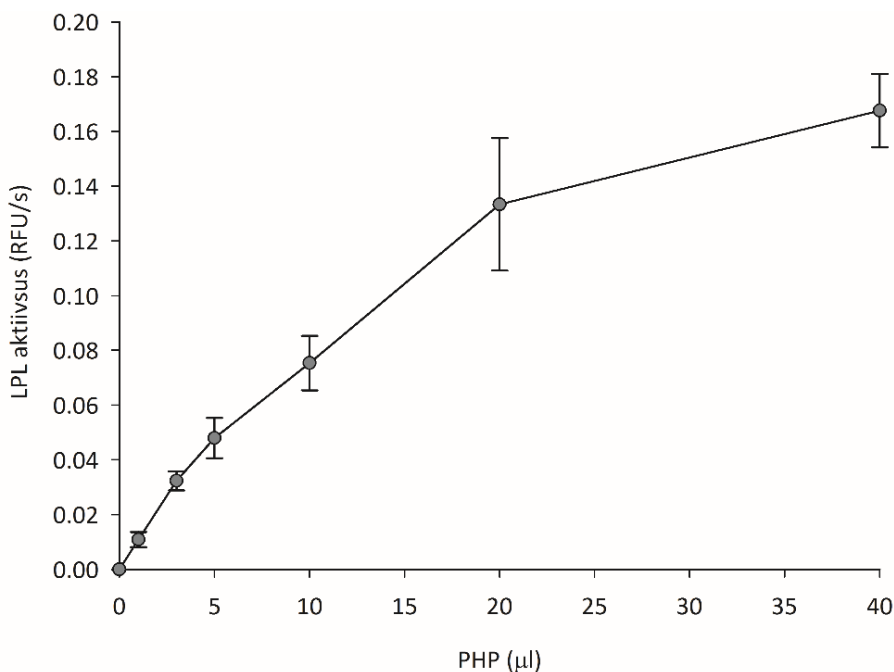
**Joonis 6.** LPL-i aktiivsus kasutades substraadi DGGR albumiini juuresolekul ja ilma selleta.

Vaadates graafikut, võib järeldada et albumiin ei mõjuta LPL-i aktiivsust, kasutades DGGR substraati ning isegi hakkab inhibeerima seda. Põhjuseks võib olla see, et albumiin hakkab seoma substraati ning ei lase LPL-il sellele seostuda. Samuti selline tulemus võib olla tingitud sellest, et DGGR-i hüdrolüüsil tekkinud produktid erinevad EnzChek-ist ning ei inhibeeri LPL-i. Albumiini lisamine DGGR substraadile oleks ebamõistlik.

## 4.2 Optimeeritud mõõtmistingimustega tulemused

Järgmiseks viidi läbi PHP LPL-i aktiivsuse mõõtmised optimeeritud tingimustes.

### 4.2.1 EnzChek

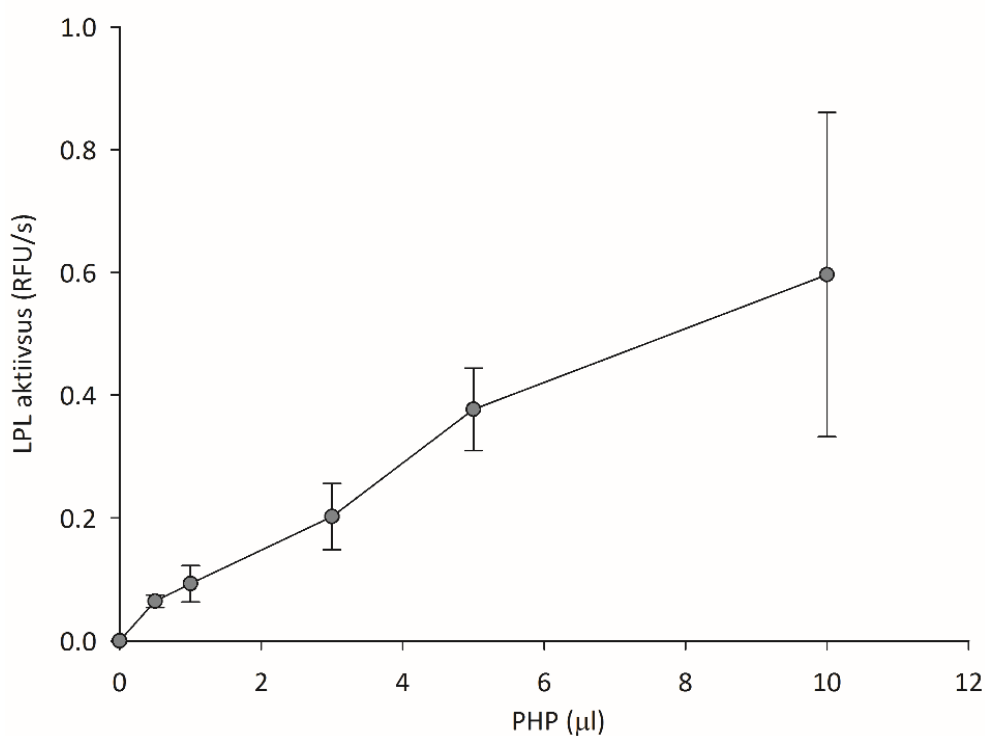


**Joonis 7.** LPL-i aktiivsus 37 °C juures erinevate PHP kogustega kasutades substraadi EnzChek.

Joonisel 7 on näha, et EnzChek-i puhul on määratud LPL-i aktiivsus lineaarne kuni 20 μl PHP lisamiseni. Kõrgematel kontsentratsioonidel ei sõltunud enam LPL-i aktiivsus lineaarselt lisatud PHP kogusest. Tõenäoliselt kuna plasmast tuleb lisaks LPL-ile kaasa mõni muu komponent, mis hakkab mõõtmist segama või LPL-i inhibeerima.

Varasemates töödes on EnzChek-i katsed tehtud Zwittergendiga, [30] mille asemel selles töös kasutati SDS. SDS kasutati ka Maria Simmul bakalaureusetöös, [34] kus märgati LPL-i kõrgemat aktiivsust SDS-i kasutamisel võrreldes EnzChekiga. See võis samuti mõjutada tulemusi, kuna SDS võib muuta substraadi osakese omadusi erinevalt Zwittergentist.

## 4.2.2 DGGR

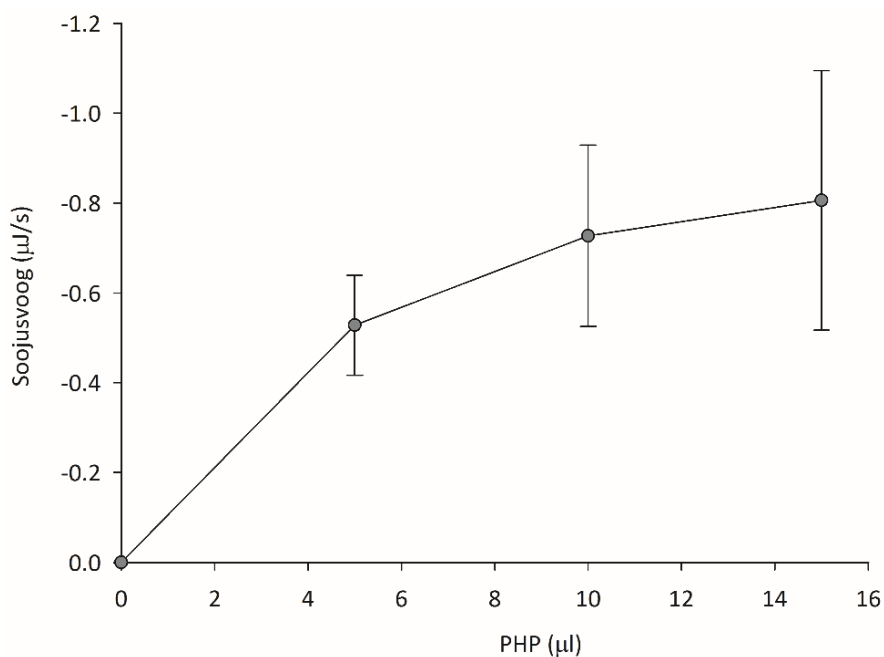


**Joonis 8.** LPL-i aktiivsus 37 °C juures erinevate PHP kogustega, kasutades substraadi DGGR.

DGGR-i puhul ei olnud võimalik mõõtmisi teostada rohkem kui 10 μl PHP kogusega kuna lahus muutus häguseks ning fluorestsenti signaal küllastus.

Joonisel 8 on näha, et DGGR-i puhul signaal on lineaarne kuni 10 μl PHP lisamiseni. Nagu ka EnzChek-i korral, kõrgematel kontsentratsioonidel ei sõltunud enam LPL-i aktiivsus linearselt lisatud PHP kogusest (pole joonisel näidatud).

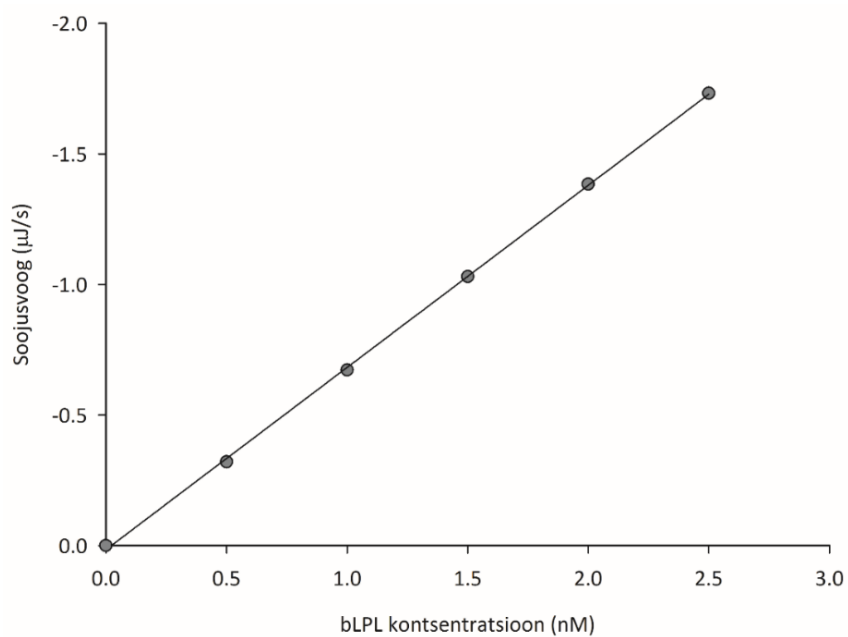
### 4.2.3 Intralipiid



**Joonis 9.** PHP LPL aktiivsuse määramine kalorimeetrilise meetodiga 37 °C juures, kasutades Intralipiidi

Joonisel 9 on tehtud kolm järjestikust 5 μl PHP süsti Intralipiidi. Selgus, et peale esimest 5 μl süsti ei muutu signaal enam lineaarselt, sellepärast analüüsiti edasisi tulemusi ainult esimest süsti arvestades.

### 4.2.4 Intralipiid - bLPL



**Joonis 10.** Soojusvoo muutus kasutades substraadina Intralipiidi.



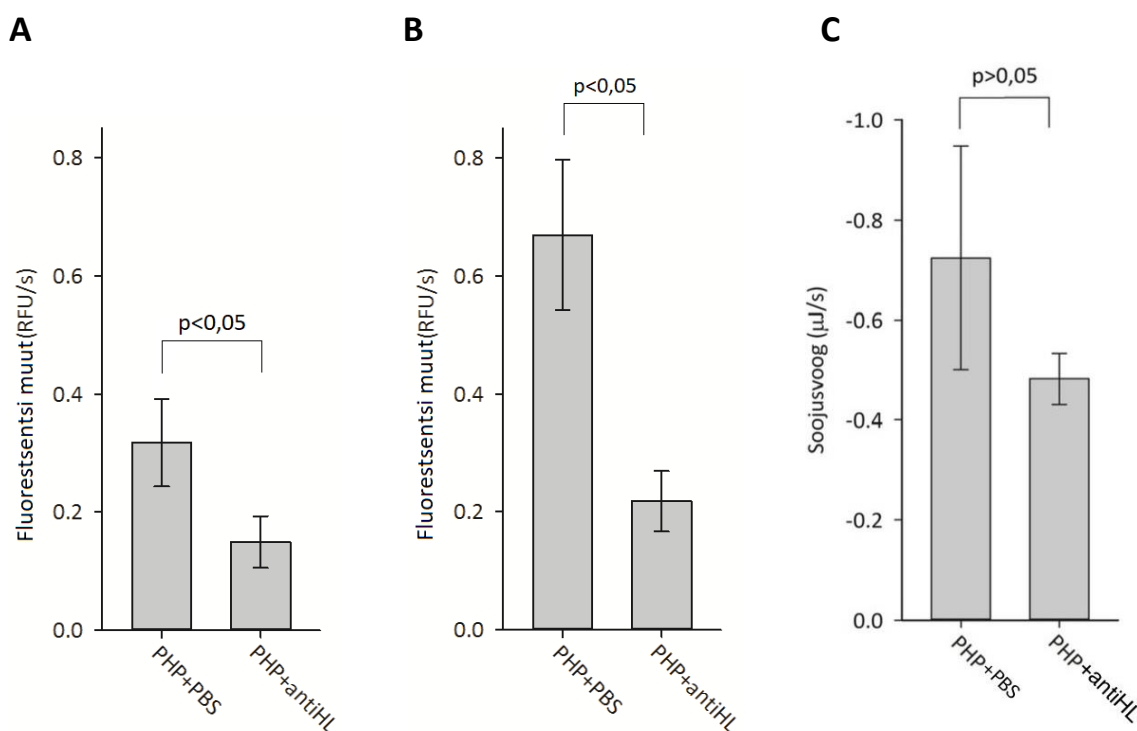
Selleks, et kontrollida kas kitsas lineaarne vahemik tuleneb PHP kasutamisest, korraldati ITC katset sama substraat Intralipiidiga, aga veise LPL-iga ja on näha lineaarset signaali. Saab järeldada, et lineaarsuse probleem PHP katses ei tulene LPL-i kontsentratsioonist, vaid tõenäoliselt tuleb PHP-st mingi teine komponent süstides, mis hakkab mõõtmist segama.

### 4.3 Avastamispiir/Määramispiir

Substraat	LoD ( $\mu\text{l}$ )	LoQ ( $\mu\text{l}$ )	LoD (pM)	LoQ (pM)
DGGR	0,91	2,76	9,1	30
EnzChek	2,58	7,82	25,8	84
Intralipiid	0,07	0,23	0,7	6

Järgnevalt kasutati Jooniste 7 ja 8 andmeid regressioonisirge loomiseks, Intralipiidi puhul hinnati termogrammi põhjal signaal/müra suhet. Parima tundlikkusega meetodiks osutus kalorimeetriline mõõtmine Intralipiidiga 37°C juures, mis võimaldas kvantitatiivselt hinnata alates 6 pM LPL ( $\sim 0,23 \mu\text{l}$  PHP) aktiivsust. Samal ajal peab fluorogeensete kunstlike substraatidega mõõtmissegus ületama LPL-i kontsentratsioon DGGR puhul 30 pM ( $\sim 2,76 \mu\text{l}$  PHP) ja EnzChek-i puhul 84 pM ( $\sim 7,82 \mu\text{l}$  PHP). Lisaks, kasutades substraadina Intralipiidi, jälgitakse LPL-i lipolüütilist aktiivsust, mis on füsioloogilisem ning peegeldab paremini muutuseid LPL-i struktuuris ja funktsioonis. [22] [35]

### 4.4 Maksa lipaasi vastase antikeha kasutamine



**Joonis 11.** (A) EnzChek-ga mõõtmine PBS puhvriga ja antiHL-ga. (B) DGGR-ga mõõtmine PBS puhvriga ja antiHL-ga. (C) Intralipiidiga mõõtmine PBS puhvriga ja antiHL-ga.

EnzChek ja DGGR substraatidega on näha, et maksa lipaasi inhibeerimisel näiline LPL-i aktiivsus langeb, mis tähendab, et rohkem kui 50% fluorestsenti signaalist annab maksa lipaas. Intralipiidi puhul aga erinevust ei ole, mis viitab sellele, et maksa lipaas ei sega ITC meetodi kasutamisel Intralipiid substraadiga.

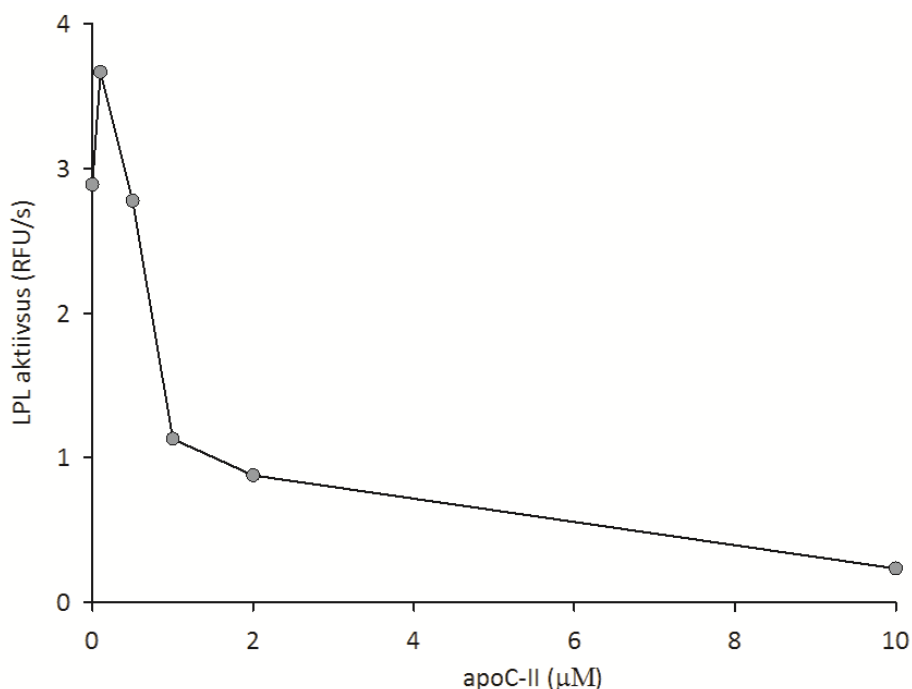
Maksa lipaas eelistab teisi substraate nagu HDL ja väiksemate VLDL fosfolipiidid, kuid suudab hüdrolüüsida ka triglütseriidide estersidemeid, seetõttu on Intralipiidi puhul maksa lipaasi panus soojusvoogu väga madal võrreldes LPL-iga. [6]

Maksa lipaasi antikeha kasutati vastavalt tööle, kus uuriti LPL-i aktiivsust PHP-s kasutades kalorimeetrilist meetodit. [6]

LPL-i aktiivsuse uurimiseks saab kasutada ka, näiteks, LPL-vastase monoklonaalse antikeha 5D2, kus ülejäänud aktiivsuseks peetakse maksa lipaasi aktiivsuseks. [30]

#### 4.5 Teised mõõtmistingimuste optimeerimised

Eelnevalt on näidatud, et PHP LPL-i aktiivsuse mõõtmisel EnzChek-iga on võimalik LPL-i aktiivsust tõsta lisades mõõtmissegusse apoC-II peptiidi [23]. Valmistati mõõtmissegud järgmistest komponentidest: puhas MilliQ vesi; 2 mg/ml veise seerumi albumiin; 150 mM NaCl, 200 mM TRIS, pH 7,4; 0,62  $\mu\text{M}$  EnzChek; 5 nM veise lipoproteiinlipaas; apoC-II. Esialgu lisati MilliQ vesi, TRIS/NaCl, albumiin. Segu homogeniseeriti ning pandi termostaati 37°C juurde kuumutama 10 minutit. Peale kuumutamist viidi segu üle ühekordsesse plastikküveti, lisati bLPL, EnzChek ja apoC-II. Tehti katsed järgmiste apoC-II kontsentratsioonidega: 0,1  $\mu\text{M}$ ; 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ ; 2  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$ .



**Joonis 12.** LPL-i aktiivsus kasutades substraadi EnzChek ja lisades erinevaid apoC-II kontsentratsioone.

Huvitava kombel aktiivsus oli langenud, mis võib olla põhjustatud sellest, et oli kasutatud täispikk apoC-II, mis lõpuks võiks hakata LPL-i inhibeerima. Seda on nähtud ka varasemates töödes nähtud kus liiga kõrge apoC-II kontsentratsioon mõjub LPL-le negatiivselt [23].

Kuigi Joonisel 12 100 nM apoC-II kontsentratsioon tõstis LPL-i aktiivsust, siis olid tehtud mõõtmised puhastatud LPL-ga, mitte PHP-ga. Kui viia mõõtmised läbi PHP-ga, siis tuleb apoC-II kaasa plasmast, seega ei hakatud seda lisama. [23] Arvatavasti, kui apoC-II oleks lisatud, siis on võimalik, et PHP mõõtmisel 100 nM apoC-II ikkagi hakkaks inhibeerima. Lõpuks otsustati apoCII antud töös mitte kasutada.

DGGR-i puhul teostati katsed esialgu koos Triton X-100, aga LPL-i aktiivsus oli nii madal, et otsustati proovida ilma Triton X-100 ning LPL-i aktiivsus oli tunduvalt suurem.

## Tänuavaldused

Soovin avaldada suurt tänu oma juhendajale Robert Ristile, kes oli alati abivalmis, oskas vastata kõikidele küsimustele ja andis väga kasulikke soovitusi bakalaaurusetöö kirjutamisel. Samuti tänan Aivar Löökest heade ideede pakkumise eest ja Naatan-Natjan Seebat laboratooriumis abi eest. Olen väga tänulik kõikidele laboratooriumi kollegidele, kes ühel või teisel määral aitasid selle töö kirjutamisel.

Avaldan ka siirast tänu lähedastele, kes olid toeks selle töö valmimisel.

## Kasutatud kirjanduse loetelu

- [1] K. R. Feingold, „Introduction to Lipids and Lipoproteins“, *Endotext*, K. R. Feingold, B. Anawalt, M. R. Blackman, A. Boyce, G. Chrousos, E. Corpas, W. W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, J. Hofland, S. Kalra, G. Kaltsas, N. Kapoor, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, C. S. Kovacs, W. Kuohung, B. Laferrère, M. Levy, E. A. McGee, R. McLachlan, M. New, J. Purnell, R. Sahay, A. S. Shah, F. Singer, M. A. Sperling, C. A. Stratakis, D. L. Trence, ja D. P. Wilson, Toim, South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc., 2000. Vaadatud: 26. mai 2024. [Online]. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>
- [2] S. Rahmany ja I. Jialal, „Biochemistry, Chylomicron“, *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024. Vaadatud: 29. mai 2024. [Online]. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545157/>
- [3] F. M. Juarez Casso ja K. Farzam, „Biochemistry, Very Low Density Lipoprotein“, *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024. Vaadatud: 29. mai 2024. [Online]. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK587400/>
- [4] E. Wiecezorek, A. Ćwiklińska, A. Kuchta, B. Kortas-Stempak, A. Gliwińska, ja M. Jankowski, „The Differential Effects of HDL Subpopulations on Lipoprotein Lipase (LPL)-Mediated VLDL Catabolism“, *Biomedicines*, kd 9, nr 12, lk 1839, dets 2021, doi: 10.3390/biomedicines9121839.
- [5] Y. Pirahanchi, M. Anoruo, ja S. Sharma, „Biochemistry, Lipoprotein Lipase“, *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024. Vaadatud: 29. mai 2024. [Online]. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537040/>
- [6] M. Reimund, O. Kovrov, G. Olivecrona, ja A. Lookene, „Lipoprotein lipase activity and interactions studied in human plasma by isothermal titration calorimetry“, *J. Lipid Res.*, kd 58, nr 1, lk 279–288, jaan 2017, doi: 10.1194/jlr.D071787.
- [7] S. Kersten, „Physiological regulation of lipoprotein lipase“, *Biochim. Biophys. Acta*, kd 1841, nr 7, lk 919–933, juuli 2014, doi: 10.1016/j.bbaliip.2014.03.013.
- [8] W. Song *et al.*, „The lipoprotein lipase that is shuttled into capillaries by GPIHBP1 enters the glycocalyx where it mediates lipoprotein processing“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, kd 120, nr 44, lk e2313825120, okt 2023, doi: 10.1073/pnas.2313825120.
- [9] J. R. Mead, S. A. Irvine, ja D. P. Ramji, „Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease“, *J. Mol. Med. Berl. Ger.*, kd 80, nr 12, lk 753–769, dets 2002, doi: 10.1007/s00109-002-0384-9.
- [10] S. A. Wu, S. Kersten, ja L. Qi, „Lipoprotein Lipase and Its Regulators: An Unfolding Story“, *Trends Endocrinol. Metab. TEM*, kd 32, nr 1, lk 48–61, jaan 2021, doi: 10.1016/j.tem.2020.11.005.
- [11] R. Risti, M. Reimund, N.-N. Seeba, ja A. Lookene, „A negatively charged cluster in the disordered acidic domain of GPIHBP1 provides selectivity in the interaction with lipoprotein lipase“, mai 2024.
- [12] A. Kumari, K. K. Kristensen, M. Ploug, ja A.-M. L. Winther, „The Importance of Lipoprotein Lipase Regulation in Atherosclerosis“, *Biomedicines*, kd 9, nr 7, lk 782, juuli 2021, doi: 10.3390/biomedicines9070782.
- [13] K. H. Gunn ja S. B. Neher, „Structure of dimeric lipoprotein lipase reveals a pore adjacent to the active site“, *Nat. Commun.*, kd 14, nr 1, lk 2569, mai 2023, doi: 10.1038/s41467-023-38243-9.
- [14] S. J. Murdoch ja W. C. Breckenridge, „Influence of lipoprotein lipase and hepatic lipase on the transformation of VLDL and HDL during lipolysis of VLDL“, *Atherosclerosis*, kd 118, nr 2, lk 193–212, dets 1995, doi: 10.1016/0021-9150(95)05606-8.
- [15] G. Yuan, K. Z. Al-Shali, ja R. A. Hegele, „Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment“, *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.*, kd 176, nr 8, lk 1113–1120, apr 2007, doi: 10.1503/cmaj.060963.

- [16] G. Silbernagel *et al.*, „Inverse association between apolipoprotein C-II and cardiovascular mortality: role of lipoprotein lipase activity modulation“, *Eur. Heart J.*, kd 44, nr 25, lk 2335–2345, juuli 2023, doi: 10.1093/eurheartj/ehad261.
- [17] G. D. Carrasquilla, M. R. Christiansen, ja T. O. Kilpeläinen, „The Genetic Basis of Hypertriglyceridemia“, *Curr. Atheroscler. Rep.*, kd 23, nr 8, lk 39, juuni 2021, doi: 10.1007/s11883-021-00939-y.
- [18] H. Karanchi, V. Muppidi, ja K. Wyne, „Hypertriglyceridemia“, *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024. Vaadatud: 29. mai 2024. [Online]. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459368/>
- [19] B. A. Ference *et al.*, „Association of Triglyceride-Lowering LPL Variants and LDL-C-Lowering LDLR Variants With Risk of Coronary Heart Disease“, *JAMA*, kd 321, nr 4, lk 364–373, jaan 2019, doi: 10.1001/jama.2018.20045.
- [20] M. Kaldmäe, G. Zemtsovskaja, J. Abina, T. Land, ja M. Viigimaa, „Prevalence of cardiovascular disease risk factors in Tallinn, Estonia“, *Med. Kaunas Lith.*, kd 53, nr 4, lk 268–276, 2017, doi: 10.1016/j.medic.2017.07.002.
- [21] T. Hirano, F. Nishioka, ja T. Murakami, „Measurement of the serum lipoprotein lipase concentration is useful for studying triglyceride metabolism: Comparison with postheparin plasma“, *Metabolism.*, kd 53, nr 4, lk 526–531, apr 2004, doi: 10.1016/j.metabol.2003.10.021.
- [22] A. Lookene ja G. Bengtsson-Olivecrona, „Chymotryptic cleavage of lipoprotein lipase. Identification of cleavage sites and functional studies of the truncated molecule“, *Eur. J. Biochem.*, kd 213, nr 1, lk 185–194, apr 1993, doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17747.x.
- [23] D. Oldham *et al.*, „Using Synthetic ApoC-II Peptides and nAngptl4 Fragments to Measure Lipoprotein Lipase Activity in Radiometric and Fluorescent Assays“, *Front. Cardiovasc. Med.*, kd 9, lk 926631, 2022, doi: 10.3389/fcvm.2022.926631.
- [24] Invitrogen, „EnzChek™ Lipase Substrate, green fluorescent, 505/515“ [Online]. Available at: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/E33955>
- [25] S. Y. Lim *et al.*, „The 1,2-o-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid-(6'-methylresorufin) ester (DGGR) lipase assay in cats and dogs is not specific for pancreatic lipase“, *Vet. Clin. Pathol.*, kd 49, nr 4, lk 607–613, dets 2020, doi: 10.1111/vcp.12906.
- [26] M. Di Filippo *et al.*, „Post-heparin LPL activity measurement using VLDL as a substrate: a new robust method for routine assessment of plasma triglyceride lipolysis defects“, *PLoS One*, kd 9, nr 5, lk e96482, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0096482.
- [27] S. Imamura *et al.*, „A novel method for measuring human lipoprotein lipase and hepatic lipase activities in postheparin plasma“, *J. Lipid Res.*, kd 49, nr 7, lk 1431–1437, juuli 2008, doi: 10.1194/jlr.M700528-JLR200.
- [28] K. K. Kristensen *et al.*, „GPIHBP1 and ANGPTL4 Utilize Protein Disorder to Orchestrate Order in Plasma Triglyceride Metabolism and Regulate Compartmentalization of LPL Activity“, *Front. Cell Dev. Biol.*, kd 9, lk 702508, juuli 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.702508.
- [29] Y. S. Rajput ja R. Sharma, Toim, *Enzymes beyond traditional applications in dairy science and technology*. Foundations and frontiers in enzymology. London, UK ; San Diego, CA, United States ; Cambridge, MA, United States ; Oxford, UK: Academic Press, an imprint of Elsevier, 2023.
- [30] D. Basu, J. Manjur, ja W. Jin, „Determination of lipoprotein lipase activity using a novel fluorescent lipase assay“, *J. Lipid Res.*, kd 52, nr 4, lk 826–832, apr 2011, doi: 10.1194/jlr.D010744.
- [31] M. Huq, H. Rosales-Solano, ja J. Pawliszyn, „Investigation of binding of fatty acids to serum albumin to determine free concentrations: Experimental and in-silico approaches“, *Anal. Chim. Acta*, kd 1192, lk 339370, veebr 2022, doi: 10.1016/j.aca.2021.339370.
- [32] R. N. Moman, N. Gupta, ja M. Varacallo, „Physiology, Albumin“, *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024. Vaadatud: 29. mai 2024. [Online]. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459198/>

- [33] F. Karpe, T. Olivecrona, G. Walldius, ja A. Hamsten, „Lipoprotein lipase in plasma after an oral fat load: relation to free fatty acids“, *J. Lipid Res.*, kd 33, nr 7, lk 975–984, juuli 1992.
- [34] M. Simmul ja A. Lookene, „Lipoproteiinlipaasi puhastamine ja aktiivsuse määramine“, Tallinna Tehnikaülikool, 2011.
- [35] R. Risti *et al.*, „Combined action of albumin and heparin regulates lipoprotein lipase oligomerization, stability, and ligand interactions“, *PloS One*, kd 18, nr 4, lk e0283358, 2023, doi: 10.1371/journal.pone.0283358.

## Annotatsioon

Käesolevas töös uuriti, milline valitud substraatidest ja meetoditest on usaldusväärsem lipoproteiinlipaasi aktiivsuse mõõtmiseks.

Meetoditeks valiti fluorestsentsmeetod kasutades EnzChek ja DGGR substraate ning kalorimeetriline meetod kasutades Intralipiidi substraati.

Suurima tundlikkusega meetodiks osutus kalorimeetriline mõõtmine Intralipiidiga 37°C juures. Meetod võimaldab kvantitatiivselt määrata 5,75 pM LPL aktiivsust, mis on 5–14 madalam võrreldes töös hinnatud fluorogeensete substraatidega.

Analüüsidest meetodite spetsiifilisust plasmas sisalduvate lipaaside suhtes, leiti, et kunstlike substraatide kasutamisel tuleneb ligi 50% signaalist maksa lipaasist. Samal ajal on Intralipiidi puhul maksa lipaasi panus soojusvoogu statistiliselt mitteoluline ( $p < 0,05$ ). See võimaldab kalorimeetrilisi meetodeid teostada ilma, et peaks plasmat eelnevalt lipaasi inhibiitoritega töötleva.

Samuti kasutades substraadina Intralipiidi, jälgitakse LPL-i lipolüütilist aktiivsust, mis on füsioloogilisem ning peegeldab paremini muutuseid LPL-i struktuuris ja funktsioonis. DGGR ja EnzChek substraatidega mõõtmine võib anda valesid tulemusi kui kadunud on lipolüütiline aktiivsus, kuid säilinud esteraasne. Viimaks, kalorimeetriline meetod lubab mõõta LPL algaktiivsust ning jälgida selle muutumist reaajas. See võimaldab paremini hinnata substraadi omaduste muutust ning regulaatorite või potentsiaalsete ravimikandidaatide mõju.

Meetodi edasises arenduses pakuks huvi substraadina kasutada konkreetse patsiendi enda pre-hepariin plasmat ning süstida sinna sama patsiendi post-hepariin plasmat. See võimaldab personaliseeritud lähenemise ravivastuse hindamisel ja ravi kohandamisel.



## Abstract

This study investigated which of the selected substrates and methods is more reliable for measuring lipoprotein lipase (LPL) activity.

The methods chosen were a fluorescence method using EnzChek and DGGR substrates, and a calorimetric method using an Intralipid substrate.

The method with the highest sensitivity was found to be calorimetric measurement with Intralipid at 37°C. This method allows for the quantitative determination of LPL activity at 5.75 pM, which is 5–14 times lower compared to the fluorogenic substrates evaluated in this study. When analyzing the specificity of the methods for lipases present in plasma, it was found that approximately 50% of the signal from artificial substrates comes from hepatic lipase. Meanwhile, the contribution of hepatic lipase to the heat flow with Intralipid is statistically insignificant ( $p < 0.05$ ). This allows calorimetric methods to be performed without the need to pre-treat plasma with lipase inhibitors.

Additionally, using Intralipid as a substrate tracks the lipolytic activity of LPL, which is more physiological and better reflects changes in LPL structure and function.

Finally, the calorimetric method allows for the measurement of initial LPL activity and real-time monitoring of its changes. This enables a better assessment of substrate property changes and the impact of regulators or potential drug candidates.

In the further development of the method, it would be interesting to use the patient's own pre-heparin plasma as a substrate and inject the same patient's post-heparin plasma. This allows for a personalized approach to assessing treatment response and adjusting therapy.

# Lisad

## Lisa 1

Lisa  
rektori 07.04.2020 käskkirjale nr 1-8/17

### **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks<sup>1</sup>**

Mina Elizabet Solovjova

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose Hepariniijärgsest vereplasmast lipoproteiinlipaasi usaldusväärne mõõtmise hüpertriglütserideemia põhjuste väljaselgitamiseks,

mille juhendaja on Robert Risti,

- 1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

---

29.05.2024

---

<sup>1</sup> Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingulise tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtjaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.