

**Isotermilise tiitrimis-kalorimeetria rakendamine maolipaasi
aktiivsuse mõõtmiseks füsioloogiliselt sarnastes tingimustes**

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Viktoriia Paršina, 213005 LAAB

Juhendaja: Natjan-Naatan Seeba, TalTech doktorant-nooremteadur

Õppekava: Rakenduskeemia ja geenitehnoloogia

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: Viktoriia Paršina
/allkirjastatud digitaalselt/

Töö vastab bakalaureusetööle/magistritööle esitatavatele nõuetele.
Juhendaja: Natjan-Naatan Seeba
/allkirjastatud digitaalselt/

Töö on lubatud kaitsmisele.
Kaitsmiskomisjoni esimees: Katrin Laos

**Application of isothermal titration calorimetry for the
measurement of gastric lipase activity in physiologically similar
conditions**

Bachelor's Thesis

Student: Viktoriia Paršina 213005 LAAB

Supervisor: Natjan-Naatan Seeba, TalTech doctoral student-junior researcher

Curriculum: Applied Chemistry and Gene Technology

Sisukord

Autorideklaratsioon	2
Kasutatud lühendid.....	6
Annotatsioon	8
Abstract	9
Sissejuhatus	10
1 Kirjanduse ülevaade.....	11
1.1 Seedemudelite olulisus	11
1.2 Lipiidide seedimine.....	11
1.3 Maolipaas	13
1.3.1 Maolipaasi struktuur	13
1.3.3 Inimese maolipaasi ja küüliku maolipaasi homoloogia	14
1.3.4 Maolipaasi aktiivsuse mõõtmise olulisus	15
1.4 Olemasolevad meetodid maolipaasi aktiivsuse mõõtmiseks	15
1.4.1 pH-staat.....	15
1.4.2 Vabade rasvhapete analüüs	16
1.4.3 Radioaktiivselt märgistatud substraadi kasutamine	16
1.4.4 Fluorestseeruva substraadiga aktiivsuse määramine	16
1.5 Isotermiline tiitrimis-kalorimeetria	16
2 Töö eesmärgid	19
3 Materjalid ja meetodid	20
3.1 Kasutatud reagentid	20
3.2 Polüakrüülamiid geel.....	20
3.3 Spektrofluoromeetri mõõtmised	20
3.4 ITC mõõtmised	21
3.5 Õhukese kihi kromatograafia	21

4. Tulemused	23
4.1 Maolipaasi puhtuse kontroll geelelektroforeesiga ning aktiivsuse mõõtmine fluorestseeruva substraadiga	23
4.2 Isotermilise tiitrimis-kalorimeetria kasutamine maolipaasi aktiivsuse mõõtmiseks füsioloogiliselt sarnastes tingimustes.....	23
4.3 Õhukese kihi kromatograafia kasutamine hüdrolüüsi protsessi kontrolliks.....	25
4.4 Isotermilise tiitrimis-kalorimeetria rakendamine maolipaasi inhibeerimise uurimiseks füsioloogiliselt sarnastes tingimustes.....	25
4.5 Isotermilise tiitrimis-kalorimeetria rakendamine erinevaes emulsioonides maolipaasi aktiivsuse mõõtmiseks	26
4.6 Õhukese kihi kromatograafia rakendamine emulsioonides toimuva hüdrolüüsi kontrolliks.	27
5 Arutelu ja järeldused	30
Tänuavaldused.....	32
Kasutatud kirjanduse loetelu	33
Lisad	36
Lisa 1 Õhukese kihi kromatograafia plaadite originaalpildid.....	36

Kasutatud lühendid

ACOD – atsüül koensüüm A oksüdaas (*acyl CoA oxidase*)

ACS – atsüül koensüüm A süntetaas (*acyl CoA synthetase*)

APS – ammooniumpersulfaat

ATP – adenosiintrifosfaat

BSA – veise seerumi albumiin (*bovine serum albumin*)

CoA – Koensüüm A

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

ELISA – ensüümiga seotud immunosorbentanalüüs (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

FATP – rasvhapete transpordi valk (*fatty acid transport protein*)

HDL – kõrge tihedusega lipoproteiin (*high-density lipoprotein*)

HGL – inimese maolipaas (*human gastric lipase*)

IDL – keskmise tihedusega lipoproteiin (*intermediate-density lipoprotein*)

ITC – Isotermiline tiitrimis-kalorimeetria

kDa – kilodalton

LBF – lipiidipõhised preparaadid (*lipid-based formulations*)

LC-FA – pika ahelalised rasvhapped (*long chain fatty acids*)

LC-IF – pika ahelalisi triglütseriidide sisaldav imiku piimasegu (*long chain infant formula*)

LoD – avastamispiir (*limit of detection*)

LoQ – määramispiir (*limit of quantification*)

LPL – Lipoproteiinlipaas

MC-FA – keskmise ahelaga rasvhapped (*medium chain fatty acids*)

MC-IF – keskmise ahela pikkuse triglütseriididega imiku piimasegu (*medium chain infant formula*)

MTP – mikrosomaalne triglütseriidide ülekande valk (*microsomal triglyceride transfer protein*)

NaTDOC – naatrium taurodesoksükolaat

NEFA – esterdamata rasvhapped (*non-esterified fatty acids*)

PNLIP (PL) – pankrease lipaas

PPI – pürofosfaat (*pyrophosphate*)

Rf – retentsioonifaktor (*retention factor*)

RFU – suhtelise fluorestsentsi ühikud (*relative fluorescence units*)

RGL – küüliku maolipaas (*rabbit gastric lipase*)

rHGL – rekombinantne inimese maolipaas (*recombinant human gastric lipase*)

ROL – *Rhizopus Oryzae* lipaas

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat (*sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE – naatriumdodetsüülsulfaat-polüakrüülamiidgeelelektroforees (*sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SGF – simuleeritud maovedelik (*simulated gastric fluid*)

STDEV – standardhälve (*standard deviation*)

TEMED – tetrametüületüleendiamiin

VLDL – väga madala tihedusega lipoproteiin (*very low-density lipoprotein*)

Annotatsioon

Maolipaas on seedeensüüm, mis katalüüsib mao happelises keskkonnas triglütseriidide hüdroolüüsi alfaasi. Käesolev töö keskendub maolipaasi aktiivsuse uurimisele, füsioloogiliselt sarnastes tingimustes, kasutades isotermilist tiitrimis-kalorimeetriat (ITC). ITC-meetod on suure tundlikkusega ning võimaldab jälgida hüdroolüüsist tekkivaid termilisi muutusi reaalajas, mistõttu rakendatakse meetodit ensüümide aktiivsuste uurimiseks keerulistes bioloogilistes süsteemides. Käesoleva uuringu eesmärk on hinnata ITC efektiivsust ja piiranguid maolipaasi aktiivsuse mõõtmise kontekstis, kasutades erinevaid substraate, mis imiteerivad maos seedimise tingimusi. Tulemused näitasid, et ITC-meetodit saab edukalt rakendada maolipaasi aktiivsuse uurimiseks tributüriini substraadi emulsioonis, kus avastamiskiir maolipaasi kontsentratsiooniks on 0,207 nM ja määramiskiir maolipaasi kontsentratsiooniks on 0,626 nM, kuid meetodi ei olnud võimalik rakendada keerukamate substraatsüsteemide analüüsimisel, näiteks oliiviõli ja kookosõli emulsioonide korral. Lisaks näitasid töö tulemused, et ITC on efektiivne meetod maolipaasi inhibiitorite mõju hindamisel. ITC-d kasutades leiti, et kuldjuure (*Rhodiola*) ekstrakt, vähendas maolipaasi aktiivsust märkimisväärselt, 51,4% võrra. Saadud tulemused rõhutavad ITC potentsiaali, kui võimsat vahendit maolipaasi ensüümireaktsioonide uurimiseks, kuid rõhutavad ka vajadust meetodi edasiarendamiseks, et tagada selle efektiivsus keerukamate substraatide analüüsimisel.

Abstract

Gastric lipase is an enzyme secreted by stomach epithelial cells, active in the acidic environment, and catalyzes the initial phase of triglyceride hydrolysis. This thesis focuses on studying gastric lipase activity using isothermal titration calorimetry (ITC) under conditions that closely simulate the stomach's physiological environment. The ITC method enables real-time and highly sensitive monitoring of thermal changes resulting from hydrolysis, making it a valuable tool for studying enzyme activity in complex biological systems. The aim of this study was to assess the effectiveness and limitations of ITC in the context of gastric lipase activity measurements, using various substrates that mimic stomach digestion conditions. Results showed that the ITC method can be effectively utilized to study the activity of gastric lipase using tributyrin as a substrate with limits of detection and quantification of 0.207 nM and 0.626 nM of enzyme concentrations respectively, but faced challenges when analyzing more complex substrate systems like olive oil and coconut oil emulsions. Additionally, ITC proved useful in evaluating the impact of inhibitors on gastric lipase activity, as seen with the *Rhodiola* extract significantly reducing enzyme activity by 51.4%. These findings underscore the potential of ITC as a powerful tool for continuously monitoring gastric lipase enzyme reactions, while also highlighting the need for further method development to enhance its effectiveness in analyzing more complex substrate systems.

Sissejuhatus

Maolipaas on mao epiteelirakkude poolt sekreteeritav ensüüm, mis mängib olulist rolli triglütseriidide seedimise algaasis. Maolipaas kuulub α/β -hüdrolaaside superperekonda ja jääb happelises keskkonnas aktiivseks. Maolipaas katalüüsib toidust saadavate triglütseriidide estrisidemete hüdrolüüsi. Selle protsessi käigus tekivad triglütseriididest di- ja monoglütseriidid ning vabad rasvhapped, mis on rasvade seedimise algaasiks. Mao keskkond on keeruline biokeemiline süsteem, milles happelise keskkonna tagab soolhape (HCl) ja mida reguleerivad mitmesugused puhversüsteemid, sealhulgas bikarbonaat- ja fosfaatpuhvid. Lisaks eelnimetatule, leidub maos pindaktiivseid aineid, nagu fosfolipiidid ja vähesel määral sapphappe soolad, mis stabiliseerivad emulsioone. Need komponendid vähendavad pindpinevust lipiidide ja vesifaasi piiril, mis soodustab väikeste rasvatilkade moodustumist ja säilitamist, suurendades maolipaasi juurdepääsu substraatidele. Seega on mao keskkond keerukas süsteem nii füüsilises, kui ka keemilises mõistes. Maolipaasi aktiivsuse määramine on oluline seedimise mehhanismide mõistmiseks, ravimite lipiidipõhiste preparaatide (LBF) efektiivsuse hindamiseks ning rasvade imendumist vähendavate ravimite arenduseks. Traditsioonilised *in vitro* seedimise meetodid ei arvesta sageli seedimise mao faasi, mis võib oluliselt mõjutada ravimi imendumist ja biosaadavust. On oluline, et LBF-i aktiivsed komponendid jõuaksid peensoolde stabiilses olekus, et need saaksid efektiivselt vereringesse imenduda. Selleks, et tagada LBF-ide stabiilsust ja prognoositavat mõju organismile, on vaja mõista, kuidas LBF-d käituvad maokeskkonnas. Maolipaasi aktiivsuse uurimiseks on oluline luua *in vitro* tingimused, mis on võimalikult sarnased *in vivo* tingimustega. Selle eesmärgi täitmiseks on olemas simuleeritud maovedelik (SGF), mis on kunstlikult loodud keskkond, mis imiteerib mao keskkonna keemilist koostist ja füüsikalise-keemilisi tingimusi, võttes arvesse elektrolüütide ja pindaktiivsete komponentide kontsentratsioone. Käesolevas töös kasutati maolipaasi aktiivsuse mõõtmiseks isotermilise tiitrimis-kalorimeetria meetodit (ITC). ITC-meetod põhineb triglütseriidide hüdrolüüsi tulemusena vabaneva soojusvoo muutuste registreerimisel. Soojusvoo muutused on tavaliselt proportsionaalsed reaktsioonikiirusega. Varasemad uuringud on kinnitanud ITC tõhusust lipolüütiliste ensüümide analüüsimisel. Näiteks, on uuritud lipoproteiinilipaasi (LPL) aktiivsust inimese plasmas, pankrease lipaasi (PNLIP) inhibeerimise mehhanisme ning uuritud LPL-i aktiivsuseid erinevates vereseerumites, võrreldes veganeid ja omnivoore. Töö teoreetilise osa esimeses pooles keskendutakse seedemudelite olulisusele teaduslikes uuringutes, arutatakse lipiidide seedimise protsessi organismis ning kirjeldatakse inimese maolipaasi (HGL) struktuuri ja funktsiooni. Seejärel võrreldakse inimese maolipaasi ja küüliku maolipaasi (RGL) omadusi. Lisaks rõhutatakse maolipaasi aktiivsuse mõõtmise tähtsust ja vaadeldakse erinevaid meetodeid selle ensüümi aktiivsuse mõõtmiseks. Eritähelepanu pööratakse ITC-le, kus kirjeldatakse meetodi põhimõtet. Töö eksperimentaalses osas kirjeldatakse polüakrüülamiid geeli (SDS-PAGE) rakendamist kommertsiaalse maolipaasi puhtuse analüüsiks ning spektrofloveetrometri mõõtmise ülevaadet, et veenduda kommertsiaalse ensüümi aktiivsuses. Samuti on olemas detailsed kirjeldused ITC mõõtmisprotsesside kohta. Lisaks esitatakse ülevaade õhukese kihi kromatograafia meetodist (TLC) hüdrolüüsi protsessi kontrollimiseks substraatsüsteemides ning uuritakse potentsiaalse maolipaasi inhibiitori mõju ensüümi aktiivsusele.

1 Kirjanduse ülevaade

1.1 Seedemudelite olulisus

Arvestatav osa seedeprotsessist toimub maos, mille peamine ülesanne on toidu ettevalmistamine ja järkjärguline edastamine peensoolde, et optimeerida edasist seedimist. Selles faasis puutub makku sisenev toidukogumik (boolus) kokku maomahla. Maomahl aitab kaasa mitte ainult toidu mehaanilisele peenestamisele maoseina lihaskontraktsioonide (*peristalsis*) kaudu, vaid ka valkude ja rasvade keemilisele lagundamisele. Maomahla üks põhikomponente, vesinikkloriid (HCl), tekitab happelise keskkonna, mille pH on umbes 3. Madal pH on vajalik valkude seedimise protsessi käivitava ensüümi, pepsini, aktiveerimiseks ning valkude denatureerimiseks, mis hõlbustab nende hilisemat hüdrolyüsi pepsini poolt. See faas hõlmab ka rasvade seedimise algfaasi, mis on tingitud maolipaasi toimest. Mao seedefaasi modelleerimist reguleerivad paljud tegurid, nagu pH, ioontugevus ja seedimise aeg, mis mõjutavad ensüümide aktiivsust. Lisaks mängivad olulist rolli seedimisel parameetrid, nagu fosfolipiidide olemasolu, seedeensüümide kontsentratsioonid (maolipaas ning proteaasid), seedimisemulgaatorid ja nende kombinatsioonid (näiteks pankreatiin ja sapisoolid) ning booluse ja seedimisvedeliku suhe.¹

Maos leidub ka pindaktiivseid aineid, näiteks fosfolipiide ning ka vähesel määral sapphappe soolad. Sapphappe sattumine makku on tingitud füsioloogilisest nähtusest, kus toimub mõõdukas sapi tagasivool kaksteistsõrmiksoolest makku². Pindaktiivsed ained vähendavad piirpinevust toidu lipiiditilkade ja vesifaasi vahel, mis on oluline emulsioonide stabiliseerimiseks happelises keskkonnas. Pindaktiivsed ained takistavad õlitilkade koalestsentsust (liitumist), mis aitab säilitada suuremat kokkupuutepinda, suurendades seeläbi maolipaasi toime tõhusust.³

Maos on keerukas puhversüsteem, sealhulgas bikarbonaat- ja fosfaatpuhvid. Lisaks sellele, sisaldab makku sisenev toit sageli puhverdavaid aineid, mis aitavad reguleerida happesust^{1,4}. SGF – *simulated gastric fluid* (simuleeritud maovedelik) on kunstlikult loodud keskkond, mis imiteerib mao keskkonna keemilist koostist ja füüsikalise-keemilisi tingimusi. See võimaldab teostada *in vitro* katseid, vältides loom- või inimuuringutega seotud eetilisi ja tehnilisi raskusi. SGF-mudelites võetakse arvesse selliseid parameetreid nagu K^+ , Na^+ , Cl^- , $H_3PO_4^-$, HCO_3^- , CO_3^{2-} , Mg_2^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} elektrolüütide kontsentratsioonid. Ioontugevus on oluline emulsioonide stabiilsuse seisukohalt ja võib mõjutada molekulide lahustuvust maomahlas. Pindaktiivsete komponentide, nagu fosfolipiidide ja sapphappe soolade lisamine seedemudelisse aitab simuleerida tingimusi, milles lipiidid emulgeeruvad ja lagunevad.¹

Maos toimuva seedimise keskkonna keerukusest tulenevalt on oluline uurida seedeprotsesse võimalikult füsioloogiliselt sarnastes tingimustes, sest see aitab paremini mõista seedimise ja toitainete imendumise mehhanisme ning uurida erinevate toidu komponentide ning ravimite vastastikmõju füsioloogilisi tingimusi imiteerivas keskkonnas.

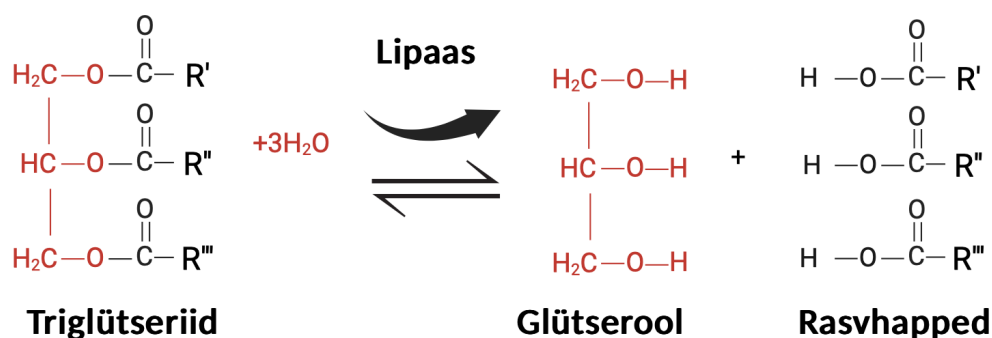
1.2 Lipiidide seedimine

Lipiidide seedimine on mitmeastmeline protsess, mis algab suus ja viiakse lõpule peensooles. Toitu mäludes, sekreteerivad keelel asuvad näärmed esmalt keele lipaasi (*lingual lipase*), mis

hüdrolüüsib triglütseriide diglütseriidideks ja vabadeks rasvhapeteks. Mälumise protsess suurendab rasvade kokkupuutepinda lipaasiga, mis omakorda kiirendab nende lagundamist.^{5,6} Pärast neelamist liiguvad lipiidid läbi söögitoru makku, kus nad puutuvad kokku happelise keskkonna ja maolipaasiga. Maos leidub ka pindaktiivseid fosfolipiide, mis adsorbeeruvad õli-vesi piiril, mõjutades rasvatilga piiripinna omadusi. Emulsiooni keskkonnas alustab maolipaas triglütseriidide hüdrolüüsi protsessi, mida mõjutab mao pH ja ioontugevus.^{5,7} Kui rasvad jõuavad kaksteistsõrmiksoolde, stimuleerib see lipaase, amülaase ja proteaase sisaldava kõhunäärmemahla vabanemist ning sapipõie kokkutõmbumist, mis omakorda sekreteerib sappi. Sapisoolad, fosfolipiidid ja kolesterool katavad lipiidiosakesed kaksteistsõrmiksooles, takistades nende liitumist ja moodustades mitselle, mis suurendab pankrease lipaasi tõhusust. Pankrease lipaas lagundab mitsellides leiduvad rasvad monoglütseriidideks ja vabadeks rasvhapeteks.⁵

Mitsellidest vabanevad monoglütseriidid, rasvhapped ja muud lipiidid jõuavad seejärel peensoole epiteelirakkudesse ehk enterotsüütidesse. Rasvhapped imenduvad läbi enterotsüütide membraani kas difusiooni teel või spetsiifiliste transportvalkude, nagu FATP (*fatty acid transport protein*) ja CD36 perekonda kuuluvate valkude abil.⁸ Enterotsüütides esterdatakse rasvhapped uuesti triglütseriidideks ja pakendatakse külomikroniteks. Külomikronid on lipoproteiinid, mis sisaldavad triglütseriide ja kolesterooli estreid oma tuumas, mida ümbritseb fosfolipiidide monokiht, kolesterool ja apolipoproteiinid. Need osakesed sünteesitakse enterotsüütide Golgi aparaadi sekretoorilistes vesiikulites MTP toimel (*microsomal triglyceride transfer protein*) ja transporditakse seejärel basolateraalsele membraanile.⁹ Seal vabanevad külomikronid eksotsütoosi teel lümfikapillaaridesse ning lõpuks rindkere kaud vereringesse. Vereringesse jõudes hüdrolüüsitakse külomikronites leiduvad triglütseriidid ensüümi lipoproteiinlipaasi toimel.¹⁰ Lisaks lipoproteiinlipaasile, osaleb maksa lipaas külomikronite ja VLDL (*very low-density lipoprotein*) jäänukite ehk IDL (*intermediate-density lipoprotein*) hüdrolüüsis. Samuti hüdrolüüsib endoteeli lipaas HDL-i (*high-density lipoprotein*) fosfolipiide. Seedeptsessi lõpuks imenduvad mitsellide moodustamisega seotud sapisoolad 95% ulatuses peensoolestiku ileumis ja ringlevad tagasi maksa

^{11,12}.



Joonis 1. Triglütseriidide hape-alus katalüüsitud hüdrolüüsireaktsioon lipaasi toimel. Triglütseriid, mis koosneb glütseroolist ja kolmest rasvhappejäägist (tähistatud R', R'' ja R''') lagundatakse vee (H₂O) nukleofiilse asendusreaktsiooni toimel di-glütseriidiks ja vabaks rasvhappe molekuliks. Täielikul hüdrolüüsil on produktideks glütserooli molekul ning kolm vabanevat rasvhappe molekuli.¹³

1.3 Maolipaas

Maolipaas on ensüüm, mis püsib happelises keskkonnas stabiilsena ja kuulub happeliste lipaaside perekonda, kuhu kuuluvad ka keele- ja lüsoosomaalsed lipaasid. Happelistel lipaasidel on madal pH-optimum ja nendel ensüümidel puuduvad spetsiifilised kofaktorid. Inimese maolipaas HGL (*human gastric lipase*) on täielikult aktiivne maomahlas pH 2 juures, pepsiini juuresolekul ja füsioloogilisel temperatuuril.¹⁴

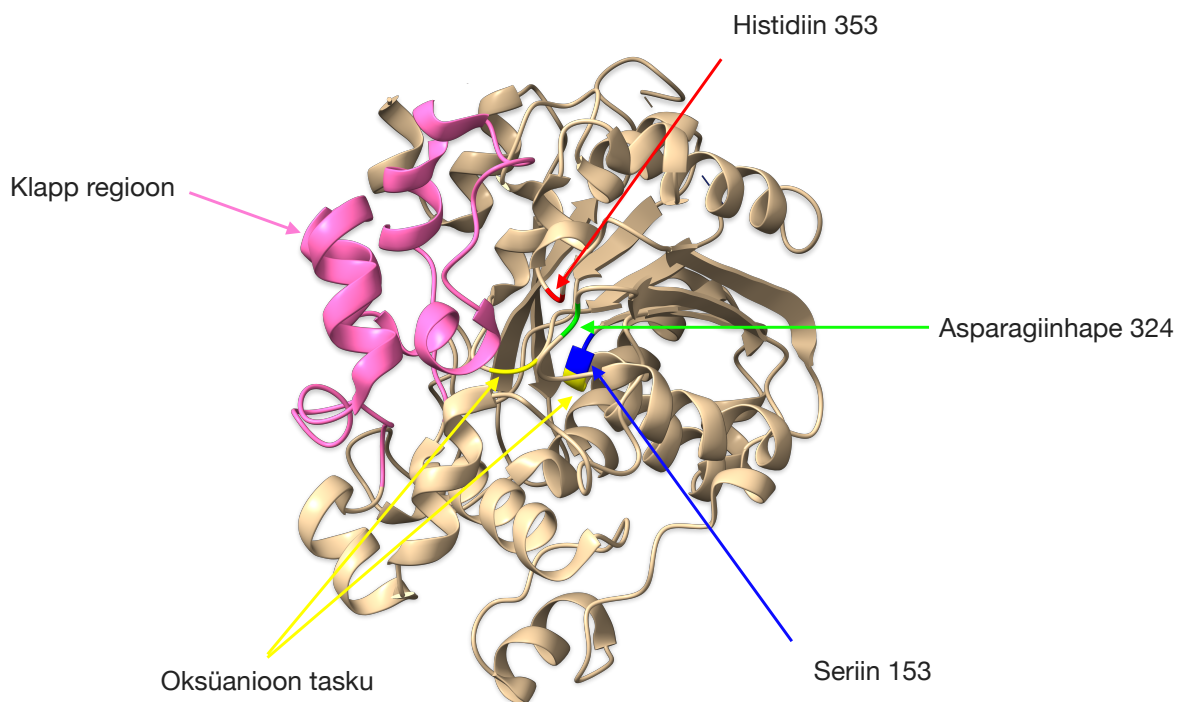
Maolipaas, kuulub α/β -hüdrolaaside superperekonda, millele on iseloomulikud klapp regioonid ja oksüanioon tasku struktuurielemendid, mis on olulised ensümaatilistes reaktsioonides aktiivsaidi ning üleminekuseisundi stabiliseerimiseks. Maolipaas kuulub seriinensüümide hulka ja seda määratleb katalüütiline kolmik, mis koosneb seriinist 153, asparagiinhappest 324 ja histidiinist 353.¹⁵ Inimese maolipaasi molekulmass on 50 kDa ja aminohapete järjestuse pikkus on 371 aminohappejääki^{15,16}. Maolipaas sekreteeritakse mao epiteelirakkudest ja sellel on oluline roll toidurasvade seedimise algfaasis. Ehkki enamuse maolipaasi poolset triglütseriidide hüdrolüüsi toimub maos, on ensüüm jätkuvalt aktiivne ka kaksteistsõrmiksooles, kus see on võimeline endiselt hüdrolüüsima 7,5% sooletsikus leiduvatest triglütseriididest. Üldiselt suudab maolipaas seedimise käigus hüdrolüüsida 17,5% kogu triglütseriidide atsüülahelatest.¹⁷ Erinevalt vähem selektiivsest pankrease lipaasist, mis katalüüsib triglütseriidi estersideme hüdrolüüsi sn-1 ja sn-3 positsioonis, on maolipaas spetsiifiline glütserooli kolmanda süsiniku estersidemetele. HGL aktiivsus *in vitro* on umbes kuus korda madalam kui HPL aktiivsus, ehkki mõlemad ensüümid eelistavad lühikese ahelaga substraate. Kuigi maolipaasi tõhusus triglütseriidide hüdrolüüsimisel on märkimisväärselt väiksem kui pankrease lipaasi oma, võib maolipaasi aktiivsus oluliselt suureneada, näiteks pankrease eksokriinse puudulikkuse korral. Maolipaas on pankrease puudulikkuse korral võimeline kompenseerima pankrease lipaasi vähenemist ning võib tagada rohkem kui 30% kogu rasva seedimisest.¹⁵

Inimese maolipaasi (HGL) kodeerib LIPF geen. Biotehnoloogia arenguga on aktiivselt toodetud rekombinantset maolipaasi (rHGL), kasutades erinevaid ekspressioonisüsteeme, sealhulgas pärmi *Saccharomyces cerevisiae* ja *Schizosaccharomyces pombe*, putukarakke bakuloviiruse süsteemiga ja *Nicotiana benthamiana* taimi. Siiski ei ole kõik meetodid osutunud sobivaks tööstuslikuks tootmiseks, kuna tootmismahud ei ole piisavad või on probleeme ensüümi puhastamisega. Kõige tõhusam on siiani olnud transgeensete taimede kasutamine rekombinantse lipaasi tootmiseks.¹⁴

1.3.1 Maolipaasi struktuur

Inimese maolipaasi kristallstruktuur määrati 1999 aastal Canaan et al poolt kindlaks 3,0 öngströmi (Å) resolutsiooniga. HGL struktuur sisaldab ühte globulaarset domeeni ning ensüümi katalüütiline kolmik koosneb seriinist 153, histidiinist 353 ja asparagiinhappest 324, mis paiknevad α/β -hüdrolaasidele iseloomulikus regioonis, mida nimetatakse "oksüanioon taskuks". Katalüütilist triaadi ümbritsev oksüanioon tasku tagab katalüüsi ajal ülemineku seisundi stabiilsuse läbi vesiniksidemete, mis on lipaasi toimimiseks kriitilise tähtsusega. HGLi põhidomeen hõlmab jääke 9-183 ja 309-379, mis sisaldab tsentraalset β - lehte, mis koosneb kaheksast ahelast (seitse paralleelset ja üks antiparalleelne) ja kuute α - heeliksit, mis paiknevad ühtlaselt mõlemal pool tsentraalset β - lehte. Täiendav domeen on 6. ja 7. ahela vahel, mida tuntakse klapp regioonina ja mis toimib

"kaanena", reguleerides juurdepääsu aktiivsaidile. Klapp on oluline ensüümi stabiliseerimiseks, aktiveerimiseks ja substraatidega interakteerumiseks. N-glükosüleerimissaidid asparagiinidel 15, 80, 252 ja 308 aitavad kaasa ensüümi stabiilsusele ja lahustuvusele. Kolm tsüsteiinijääki, millest üks on vaba ning kaks moodustavad disulfiidsilla, panustavad veelgi rHGLi struktuurilisse stabiilsusesse.¹⁵



Joonis 2. Inimese rekombinantse maolipaasi (rHGL) struktuuriskeem¹⁶. Joonisel on näidatud rHGLi põhilised struktuurilelemendid katalüütiline triaad: seriin 153 (sinise värvusega), histidiin 353 (punase värvusega) ja asparagiinhape 324 (rohelise värvusega) asuvad kõik kollase värvusega märgitud oksüanioon taskus. Klapp regioon on kujutatud roosa värviga.

1.3.3 Inimese maolipaasi ja küüliku maolipaasi homoloogia

Sassene et al testisid seedetrakti prognostilistes mudelites kolme ensüümi, *Rhizopus Oryzae* lipaasi (ROL), küüliku maolipaasi (RGL) ja rekombinantse HGL (rHGL) tõhusust kahte tüüpi imiku piimasegu seedimisel, millest üks sisaldas keskmise ahelaga triglütseriide (MC-IF – *medium chain infant formula*) ja teine valdavalt pika ahelaga triglütseriide (LC-IF – *long chain infant formula*)¹⁸.

ROL katalüüsis triglütseriidide hüdrolyüsi suurima kiirusega ja oli mittespetsiifiline rasvhappeahela pikkuse suhtes, vabastades nii MC-FA kui ka LC-FA-sid sama kiiresti. rHGL eelistas mõlemas preparaadis vabastada keskmise ahelaga rasvhappeid, kuid suutis ka mõned pikema ahelaga rasvhapped vabastada MC-IF seedimise ajal, mis sarnaneb rohkem HGLi *in vivo* toimimisega. RGL näitab ka eelistust keskmise ahelaga rasvhapete (MC-FA) hüdrolyüsi suhtes, rõhutades sarnasusi

substraadi eelistuses HGL-ga. See ühine omadus viitab sellele, et mõlemad lipaasid töötlevad eelistatult MC-FA-sid, mis on toidurasvades levinud komponent. Selline sarnasus on oluline *in vitro* maomudelite väljatöötamisel, kuna see rõhutab RGL potentsiaali HGL-i asendajana seedemudelites, kus on vajalik inimese maolipaasiga sarnane ensüümide aktiivsus.¹⁸

1.3.4 Maolipaasi aktiivsuse mõõtmise olulisus

Maolipaasi aktiivsuse uurimine mängib olulist rolli seedemehhanismide mõistmisel ja ravimite lipiidipõhiste preparaatide (LBF) tõhususe mõjutamisel. Lipiidipõhised ravimpreparaadid on ravimid, mille toimeained on kapseldatud lipiididesse. LBF-id on tavaliselt lihtsad isotroopsed vedelikud, mis koosnevad õlidest, pindaktiivsetest ainetest ja/või kaaslahustitest. Neid preparaate kasutatakse halvasti vees lahustuvate ravimite biosaadavuse parandamiseks, lihtsustades nende transportimist läbi bioloogiliste membraanide ja suurendades nende imendumist seedetraktis.¹⁹

Seedetraktis on heterogeenne keskkond, mistõttu interakteeruvad LBF-ühendid seal leiduvate komponentidega üsna keerukalt. Kui ravimit võetakse LBF-na, jaotuvad lipiidilgad soolestikus tekkinud emulsioonis ja läbivad ensüümide poolt seedimise. See protsess vähendab sageli LBF-i võimet ravimit lahustada, mis võib viia ravimi üleküllastumiseni. Üleküllastumine võib aidata parandada ravimi imendumist, kuid soodustab ka sadestumist. Ravimi füüsikalis-keemilised omadused, nagu osakeste suurus, võivad varieeruda, mis mõjutab ravimi lahustumisprotsessi pärast selle sadestumist.¹⁹ LBF-i toimeaine imendumine peensooles peab olema tagatud, et see jõuaks vereringesse. Sellega seoses on LBF-is sisalduvate triglütseriidide hüdrolüüsi vältimine maomahla poolt kriitilise tähtsusega, et säilitada ravimvormi stabiilsust ja toimeainete imendumise efektiivsust.

Traditsioonilised *in vitro* seedimise meetodid lipiidipõhiste preparaatide (LBF) toimivuse hindamiseks ei anna sageli täpset vastavust *in vivo* uuringutele. Need katsed kujutavad tavaliselt tingimusi peensoole ülemises osas ja ei arvesta seedimise mao faasi, mis võib oluliselt mõjutada ravimi imendumist ja biosaadavust. Maoetapi lisamine *in vitro* katsetele parandab nende katsete prognoositavat täpsust, võimaldades seedimis- ja imendumisprotsesside täpsemat hindamist. See parandab ravimi stabiilsust, annustamise täpsust ja patsiendi ohutust.²⁰

1.4 Olemasolevad meetodid maolipaasi aktiivsuse mõõtmiseks

1.4.1 pH-staat

pH-staat meetod maolipaasi aktiivsuse mõõtmiseks hõlmab tiitrimetriilise analüüsi kasutamist, mis põhineb triglütseriidide hüdrolüüsi käigus vabanevate rasvhapete määramisel. Reaktsioonisegu hoitakse stabiilse pH juures, lisades titranti, näiteks NaOH, mis võimaldab täpselt mõõta vabanenud rasvhapete kogust. See meetod võimaldab ensüümi aktiivsuse kvantifitseerimist, kuid võib olla aeganõudev ja nõuab suuremaid ensüümi koguseid²¹. Tavaliselt kasutatavad substraadid on oliiviõli ja tributüriin, mida tuleb hüdrolüüsi kiiruse suurendamiseks emulgeerida.²²

1.4.2 Vabade rasvhapete analüüs

NEFA (*non-esterified fatty acids*) analüüs, milles kasutatakse ensümaatilist kolorimeetrilist meetodit ACS-ACOD, võimaldab mõõta vabasid rasvhappeid bioloogilistes proovides. Esiteks muudetakse vabad rasvhapped atsüül-koensüümiks A atsüül-CoA süntaasi toimel, adenosiintrifosfaadi (ATP) ja koensüüm A (CoA) juuresolekul. Kõrvalproduktideks on adenosiinmonofosfaat (AMP) ja pürofosfaat (PPi). Seejärel oksüdeerib atsüül-CoA-d atsüül-CoA oksüdaas, mille tulemusena tekib 2,3-trans-enoüül-CoA ja vesinikperoksiid (H_2O_2). Vesinikperoksiid reageerib 4-aminoantipüriini ja MEHA-ga (värvi reagent) peroksidaasi katalüüsi toimel, moodustades sini-violettvärvi. Tekkinud värvilise reagenti neelduvust mõõdetakse spektrofotomeetriliselt, mis on otseselt proportsionaalne NEFA kontsentratsiooniga.²³

1.4.3 Radioaktiivselt märgistatud substraadi kasutamine

Lipaasi aktiivsuse määramiseks kasutatakse radioaktiivselt märgistatud substraate. Selleks kasutatakse sageli süsinik-14 (^{14}C) või tritium (3H) radioaktiivsete isotoopidega märgistatud oleoüülgütseroole ning jood-131-ga (^{131}I) märgistatud triglütseriidide analooge. Nimetatud substraadid võimaldavad mõõta ensüümi toimel vabanevate radioaktiivsete produktide kogust. Detekteeritavad produktide kogused on tavaliselt nanogrammi suurusjärgus. Vaatamata radioaktiivsete analüüside suurele spetsiifilisusele ja tundlikkusele on nende kasutamine piiratud ekstraheerimisprotseduuride keerukuse ja ohtlike radioaktiivsete materjalide vajaduse tõttu.²²

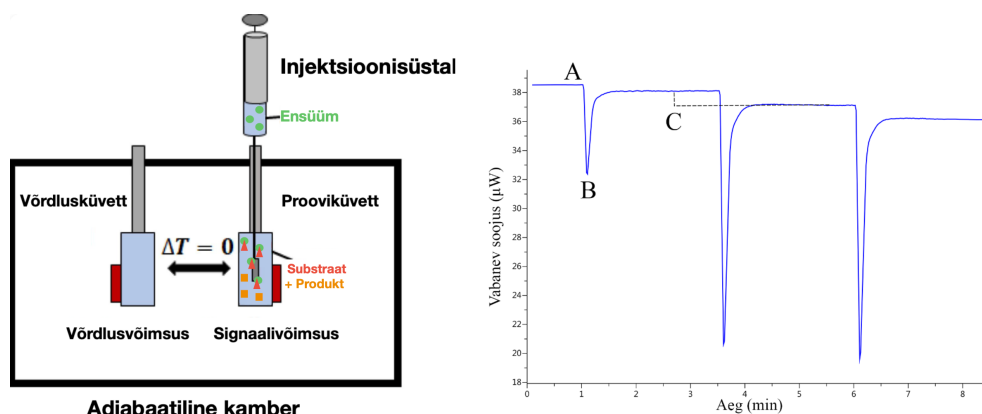
1.4.4 Fluorestseeruva substraadiga aktiivsuse määramine

1,2-O-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid-(6'-methylresorufin) ester (DGGR) on fluorestseeruv substraat, mida kasutatakse esteraaside, sealhulgas mitmesuguste lipaaside aktiivsuse määramiseks. Aktiivse lipaasiga reageerides vabastab DGGR fluorestseeruva metüülresorufiini. Fluorestsentsi intensiivsus mõõdetakse ja see on otseselt proportsionaalne aktiivse lipaasi kogusega proovis. Risti et al töös kasutati fluorestseerivat substraati DGGR lipoproteiinilipaasi (LPL) aktiivsuse määramiseks, kasutades spektrof fluoromeetrit, et hinnata erinevate tingimuste ja stabilisaatorite, nagu albumiin ja hepariin, mõju ensüümi aktiivsusele²⁴. Samuti on mitmetes uuringutes kasutatud DGGR-i pankrease lipaasi aktiivsuse kolorimeetriliseks määramiseks, eesmärgiga diagnoosida akuutset pankreatiiti koertel²⁵. Mõlemad uuringud näitasid edukalt meetodi sobivust erinevate lipaaside aktiivsuse mõõtmiseks. Arvestades DGGR-i tõhusust teiste lipaaside aktiivsuse mõõtmisel, võib seda kohandada maolipaasi aktiivsuse määramiseks lihtsamas substraatsüsteemis.

1.5 Isotermiline tiitrimis-kalorimeetria

Isotermiline tiitrimis-kalorimeetria (ITC) on meetod, mis mõõdab vabanevat või neelduvat soojust reaajas ühe lahuse tiitrimisel teise lahusega. ITC-seadmed registreerivad muutuse soojusvoos, mis tekib, kui seadme süstlast tiitritakse lahus proovi küveti. Seade on varustatud paari küvettidega, proovi- ja võrdlusküvetiga, mis sisaldavad analüüsivat lahust ja võrdluspuhvrit (või puhast vett) ning on paigutatud termostaatiliselt reguleeritavasse adiabaatilisse kambrisse. Elektrilised takistussoojendid hoiavad küvettide temperatuurid konstantsena. Küvettide vahel asuv seade jälgib

temperatuuri erinevust ja reguleerib kütteseadme väljundit, et hoida mõlemad küvetid samal temperatuuril. Titranti süstitakse prooviküveti automaatse süstla abil. Sõltuvalt sellest, kas reaktsioon on ekso- või endotermiline, vähendatakse või suurendatakse kütteseadme võimsust, et hoida küvetide temperatuuri konstantsena. Kui reaktsioon on lõppenud, taastatakse võimsus algsele tasemele. Mõõtmistulemusteks on ajavahemike järel salvestatud soojendusvõimsus, mida kasutatakse reaktsioonide termodünaamiliste ja kineetiliste parameetrite, näiteks entalpia muutuste ja reaktsioonikiiruse analüüsimiseks.²⁶ ITC-d kasutatakse ka ensümaatilise katalüüsi kineetika analüüsimiseks. Samuti kasutatakse ITC-d toiduainete uurimisel, näiteks molekulaarsete vastastikmõjude uurimiseks toidusüsteemides ja lipiidide biosaadavuse uurimiseks. ITC-d kasutatakse pindaktiivsete lipiidide mitselliseerumise analüüsimiseks ja erinevate toiduainete komponentide, näiteks valkude, süsivesikute ja lipiidide vaheliste vastastikmõjude mõistmiseks.^{7,26}



Joonis 3. Vasakul pool on toodud tüüpiline katse ensüümi aktiivsuse kineetika mõõtmiseks ITC-s. Ensüüm lisatakse süstlast rakku, kus on juba substraat olemas. Sõltuvalt sellest, kas reaktsiooni ajal eraldub või neeldub soojust, reguleerib seade automaatselt raku soojusvoolu, et hoida temperatuur konstantsena ja võrdsena kontrollraku temperatuuriga. Temperatuuri säilitamiseks vajaliku võimsuse muutus on peamine signaal, mida ITC registreerib.²⁶ Paremal pool on isotermilise tiitrimis-kalorimeetria termogramm. A – stabiilne soojusnivoo enne maolipaasi süsti; B – süstist tingitud soojusefekt; C – eksotermilisest hüdroolüüsist tingitud soojusvoo langemine (soojuse vabanemine). Triglutseriidide hüdroolüüsi käigus vabanev soojus on otseselt proportsionaalne vabanevate rasvhapete kogusega²⁷.

Isotermilist tiitrimis-kalorimeetriat (ITC) on TalTech-i laboris juba kasutatud lipaaside aktiivsuse uuringutes. Ühes neist analüüsiti lipoproteiinilipaasi (LPL) aktiivsust inimese plasmas, et valideerida triglutseriidide hüdroolüüsist vabneva soojuse ja rasvhapete vahelist seost²⁷. Teises töös uuriti pankrease lipaasi (PNLIP) inhibeerimise mehhanisme ANGPTL4 valgu poolt²⁸. Meetodit kasutati ka LPL-i aktiivsuse mõõtmiseks erinevates vereseerumites, võrreldes veganeid ja omnivoore, mis näitas, et rühmade vahel ei ole lipolüüsi korral olulisi erinevusi²⁹.

Analüütiliste meetodide tundlikkuse määramiseks kasutatakse selliseid parameetreid, nagu avastamiskiir (LoD) ja määramiskiir (LoQ). Avastamiskiir (LoD) on defineeritud kui väikseim signaali väärtus või analüüdi kontsentratsioon, mida saab usaldusväärselt tuvastada võrreldes taustafooni tasemega ja arvutatakse valemiga:

$$\text{Avastamiskiir (LoD)} = \frac{3,3 \cdot Sy}{b}, (1)$$

Kus b on kalibreerimisgraafiku tõus avastamisiiri lähedal, S_y on kalibreerimisgraafiku jääklikmete (residuaalide) standardhälve.

Kvantifitseerimispiir (LoQ) on minimaalne kontsentratsioon, mille juures saab analüüti mitte ainult usaldusväärselt tuvastada, vaid ka kvantifitseerida ja arvutatakse valemiga:

$$\text{Määramispiir (LoQ)} = \frac{10 \cdot S_y}{b}, (2)$$

Kus b on kalibreerimisgraafiku tõus avastamisiiri lähedal, S_y on kalibreerimisgraafiku jääklikmete (residuaalide) standardhälve.^{30,31}

2 Töö eesmärgid

1. Rakendada isotermilise tiitrimis-kalorimeetria (ITC) meetodit maolipaasi aktiivsuse mõõtmiseks füüsioloogiliselt sarnastes tingimustes. Määrata kindlaks meetodi tundlikkus ja hinnata selle rakendatavust eri tüüpi substraatides.
2. Hinnata kuldjuure ekstrakti kui võimaliku inhibiitori mõju maolipaasi aktiivsusele, kasutades isotermilist tiitrimis-kalorimeetriat (ITC).

3 Materjalid ja meetodid

3.1 Kasutatud reagentid

Veise seerumi albumiin – Sigma, naatriumdivesinikfosfaat NaH_2PO_4 – Scharlau, kaaliumdivesinikfosfaat KH_2PO_4 – Scharlau, magneesiumkloriid heksahüdraat $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – MERCK, kaaliumkloriid KCl – MERCK, tributüriin – ACROS organics, NaDOC – MERCK, NaCl – Fisher Scientific, letsitiin (muna) – Fisher Scientific, NaHCO_3 – MERCK, kuldjuure ekstrakt (analüütika laboris ekstraheeritud Pille-Riin Laaneti poolt), rasvhapped C14, C15, kommertsiaalne puhastatud küüliku maolipaas – Lipolytech RGL500 (lahustatud 20mM NaH_2PO_4 puhvril, mille pH on 5,5), ekstra neitsioliiviõli – Rimi, rafineerimata kookosõli – Lidl, DGGR – Sigma-Aldrich.

3.2 Polüakrüülamiid geel

Kommertsiaalse küüliku maolipaasi (RGL) puhtuse määramiseks kasutati naatriumdodetsüülsulfaatpolüakrüülamiid-geelelektroforeesi (SDS-PAGE) meetodit. Ettevalmistusprotsess algas 12% lahutava geeli valmistamisega, mis koosnes järgmistest komponentidest: 12% akrüülamiid, 0,1% SDS, 0,1% ammooniumpersulfaat (APS), 0,1% TEMED ja Tris-puhver pH 8,8. Segu valati klaasplaatide vahele ja õhumullide eemaldamiseks kanti peale etanooli kiht. Geel jäeti 30 minutiks polümeriseeruma.

Pärast eraldusgeeli polümeriseerimist valmistati kontsentreeriv geel 3,5% akrüülamiidi, 0,1% SDSi, 0,1% APSi, 0,1% TEMEDi ja Tris-puhvri pH 6,8 sisaldusega. Etanool eemaldati kontsentreerivalt geelilt ning seejärel pipeteeriti lahus lahutava geeli peale. Pärast kammi asetamist kaevude moodustamiseks jäeti geel 30 minutiks polümeriseeruma, seejärel asetati geel elektroforeesi nõusse, lisati Tris puhver ning eemaldati kamm.

Enne elektroforeesi kuumutati valguproovid denatureerimiseks 10 minutit temperatuuril 95 °C ja seejärel tsentrifuugiti. Proovid ja valgumarker kanti geelile, millele järgnes elektroforees 100-150 V ja 20-45 mA voolutugevuse juures. Geel eemaldati klaasist vormilt ning valkude visualiseerimiseks kasutati värvilahust PageBlue. Geeli pilt tehti Syngene'i G:BOX seadmega ja visualiseeriti GeneSnap tarkvara abil.

3.3 Spektrofluoromeetri mõõtmised

Küüliku maolipaasi (RGL) eriaktiivsust mõõdeti Shimadzu RF-5301 PC spektrofluoromeetriga. Analüüsi reaktsioonisegu valmistati, lisades järgmised komponendid: NaCl lõppkontsentratsioonini 68 mM, puhver NaH_2PO_4 (pH 5,5) lõppkontsentratsioonini 20 mM, 1 nM RGL ja 23,94 μM substraati *1,2-O-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid-(6'-methylresorufin) ester* (DGGR). Reaktsioonisegu lõplik maht viidi 700 μl -ni, kasutades puhastatud Milli-Q vett.

Enne mõõtmist suspendeeriti lahus küvetis põhjalikult, et tagada segu homogeensus. Küvett laaditi spektrofluoromeetrisse ja RGLi eriaktiivsuse määramiseks teostati fluorestsentsimõõtmine. Reaktsiooni järgiti 3 minutit, kasutades eksitatsiooni lainepikkust 572 nm ja emissiooni lainepikkust 605 nm. Protseduuri korrati kolmel paralleelsel katsel, kusjuures iga reaktsioonisegu valmistati

sõltumatult. Kontrollmõõtmised viidi läbi, asendades maolipaasi 0,7 µl puhverlahusega, ning mõõtmisi korrati samuti kolm korda. Saadud andmeid analüüsiti statistiliselt, kasutades tarkvara SigmaPlot.

3.4 ITC mõõtmised

Mao lipaasi aktiivsuse mõõtmiseks füsioloogiliselt sarnastes tingimustes kasutati isotermilist-tiitrimis-kalorimeetriat (ITC), mida teostati seadmega MICROCAL PEAQ-ITC firmalt Malvern.

Vabanenud soojuse ja ensüümikontsentratsiooni vahelise seose mõõtmiseks valmistati järgmise koostisega substraadi emulsioon: 3% tributüriin, 20 mM NaH₂PO₄ (pH 5,5), 68 mM NaCl, 20 µM letsitiin, 2 mg/ml BSA, 80 µM NaTDOC (pH 5,5), 6,9 mM KCl, 0,9 mM KH₂PO₄, 0,1 mM MgCl₂·6H₂O ja 25 mM NaHCO₃. Komponentide segamiseks kasutati CML-3 sonikaatorit (seerianumber EP1028). Küüliku maolipaasi (RGL) lahused valmistati kontsentratsioonides 50 nM, 75 nM, 100 nM ja 200 nM, mis sisaldasid 20 mM NaH₂PO₄ (pH 5,5) ja 68 mM NaCl. Kontrollmõõtmiseks kasutati sama ensüümi lahust, kus ensüüm oli asendatud 20 mM NaH₂PO₄ puhvriga (pH 5,5). Kalorimeetri mõõteküveti viidi 300 µl substraadi emulsiooni. Ensüümilahus laaditi kalorimeetri büretti. Katsed viidi läbi 25 °C juures, segamiskiirusega 750 rpm. Tehti 4 süsti, iga süsti maht oli 2 µl.

Maolipaasi inhibeerimise uurimiseks kasutati 60% etanoolis lahustatud kuldjuure ekstrakti. Inhibeerimissubstraat: 20 mM NaH₂PO₄ (pH 5,5), 68 mM NaCl, 20 µM letsitiin, 2 mg/ml BSA, 80 µM NaTDOC, 6,9 mM KCl, 0,9 mM KH₂PO₄, 0,1 mM MgCl₂·6H₂O, 25 mM NaHCO₃, 2,04 mg/ml kuldjuure ekstrakt, Milli-Q. Ekstrakt lisati substraadile pärast seda, kui substraat oli ultraheli abil segatud. Kontrollimiseks valmistati sarnane substraat, kus kuldjuure ekstrakti asemel kasutati 60 % etanooli lõppkontsentratsioonis 5%. Sellega välditi etanooli võimalikku mõju maolipaasi aktiivsusele. Mõlema katsetingimuse ensüümilahused sisaldasid: 200 nM maolipaasi (RGL), 20 mM NaH₂PO₄ (pH 5,5), 68 mM NaCl, Milli-Q. Kalorimeetri mõõteküveti viidi 300 µl substraati. Lahus ensüümiga laaditi eraldi kalorimeetri büretti. Katsed viidi läbi 25 °C juures, segamiskiirusega 1000 rpm. Tehti 4 süsti, iga süsti maht oli 2 µl.

Uuringu raames viidi läbi katsed maolipaasi aktiivsuse mõõtmiseks, kasutades kookos- ja oliiviõlipõhiseid substraate. Mõlemad substraadid sisaldasid 3% vastavat õli ja järgmisi komponente: 20 mM NaH₂PO₄ (pH 5,5), 68 mM NaCl, 20 µM letsitiin, 2 mg/ml BSA, 80 µM NaTDOC, 6,9 mM KCl, 0,9 mM KH₂PO₄, 0,1 mM MgCl₂·6H₂O, 25 mM NaHCO₃, Milli-Q. Ensüümilahused sisaldasid: 200 nM RGL, 20 mM NaH₂PO₄ (pH 5,5), 68 mM NaCl, Milli-Q. Andmeid analüüsiti Microsoft Exceli ja SigmaPlot tarkvara abil.

3.5 Õhukese kihi kromatograafia

Triglütseriidide hüdrolüüsi protsessi valideerimiseks kasutati õhukese kihi kromatograafiat (TLC). Tributüriini hüdrolüüsi jälgimiseks valmistati kaks substraadi emulsiooni, mis sisaldasid 3% tributüriini, 20 mM NaH₂PO₄ (pH 5,5), 68 mM NaCl, 20 µM letsitiini, 2 mg/ml BSA, 80 µM NaTDOC, 6,9 mM KCl, 0,9 mM KH₂PO₄, 0,1 mM MgCl₂·6H₂O, 25 mM NaHCO₃. Komponentide segamiseks kasutati CML-3 sonikaatorit (seerianumber EP1028).

Lisaks valmistati veel kaks 69 µl lahust, mis sisaldasid 20 mM NaH₂PO₄ puhverlahust (pH 5,5), 68 mM NaCl, 2 mg/ml BSA, 80 µM NaTDOC. Ühele lahusele lisati 1,725 µl RGL, et saavutada lõppkontsentratsioon 250 nM, ning teisele lisati samaväärne kogus NaH₂PO₄-puhvrit (pH 5,5) kontrollkatseks.

Esimene substraat asetati isothermisse kalorimeetrisse (ITC), kus see tiitriti RGL-lahusega ja kus inkubeerimine toimus kuni soojust vabanemise lõppemise fikseerimiseni. Kontrollsubstraati inkubeeriti Eppendorf Thermomixer comfort termostaadis 25 °C juures, pidevalt segades 1000 rpm ning inkubatsioon lõpetati ITC katsega samal ajal.

Analüüsid viidi läbi MERCK-i Silikageel 60 plaatidega. Plaadile kanti järjestikku järgmised proovid: tributüriini standard, hüdrolüüsitud substraat isothermisest kalorimeetrist (ITC), kontrollsubstraat ja C-15 rasvhappe lahus kontsentratsiooniga 0,42 mg/ml. Plaat asetati mobiilsesse faasi, mis koosnes etüülatsetaatist ja petrooleeterist suhtega 1:3. Pärast plaadi elueerimist, asetati plaat 2,5% fosfomolübddeenhappe lahusesse ja kuumutati tulemuste visualiseerimiseks. Sarnased katsed viidi läbi, kasutades tributüriini asemel 3% kookos- ja oliiviõli emulsioone. Plaatidele pandi kookos- ja oliiviõli standardid, vastavad hüdrolüüsitud substraadid, kontrollproovid ning C-15 ja C-14 rasvhapete lahuse standardid kontsentratsiooniga vastavalt 5,88 mg/ml ja 0,25 mg/ml.

Täiendavaks kontrollimiseks tehti TLC-analüüs hüdrolüüsitud oliiviõli substraadile ja kontrollproovile, mida inkubeeriti termostaadis Eppendorf Thermomixer comfort 25 °C juures pideva segamisel 1000 rpm juures 72 tundi, kasutades eelnevalt mainitud reagentide kontsentratsioone.

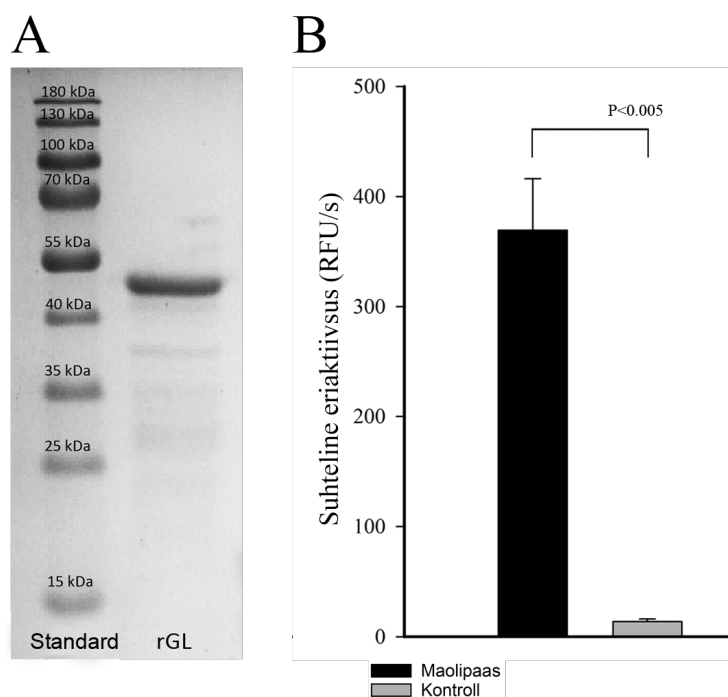
Katse tulemusena arvutati retentsioonikoefitsiendid (R_f). R_f-väärtus arvutatakse proovi kauguse suhtena lähtejoonest keskpunktini ja liikuva faasi poolt läbitud kaugusele lähtejoonest keskpunktini. R_f valem on järgmine:

$$R_f = \frac{\text{proovi poolt läbitud kaugus lähtejoonest}}{\text{lahusti poolt läbitud kaugus lähtejoonest}} (3)^{32}$$

4. Tulemused

4.1 Maolipaasi puhtuse kontroll geelelektroforeesiga ning aktiivsuse mõõtmine fluorestseeruva substraadiga

Naatriumdodetsüülsulfaat-polüakrüülamiid geelelektroforeesiga kontrollitud kommertsiaalne maolipaas on geelil näha 49kDa-50kDa piirkonnas, mis vastab kirjanduse alusel toodud molekulmassi väärtusele¹⁵. Geelipildilt on näha, et kommertsiaalne küüliku maolipaasi on puhas, tootja väitel 98%. (Joonis 4A). *1,2-o-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid-(6'-methylresorufin) ester* ehk DGGR-ga mõõdetud maolipaasi eriaktiivsuseks saadi $369 \pm 46,7$ RFU-d/s (*Relative Fluorescence units per second*), mis iseloomustab fluoretsentsi signaali intensiivsust 1µg maolipaasi kohta sekundis. Kontrollkatses, kus mõõtmissegus puudus maolipaas, mõõdeti fluoretsentsi signaaliks $13,6 \pm 2,3$ RFU/s.



Joonis 4. Maolipaasi puhtuse ja aktiivsuse kontroll A - SDS-PAGE geelipilt B - Maolipaasi aktiivsus mõõdetud DGGR-ga RFU – Suhteline fluoretsentsi intensiivsus 1µg maolipaasi kohta sekundis.

4.2 Isotermilise tiitrimis-kalorimeetria kasutamine maolipaasi aktiivsuse mõõtmiseks füsioloogiliselt sarnastes tingimustes

Isotermilise tiitrimis-kalorimeetria rakendamiseks maolipaasi aktiivsuse mõõtmiseks, läbi hüdroolüüsist tingitud vabaneva soojuse, teostati 3% tributüriini ja simuleeritud maomahlade emulsiooni 66 nM maolipaasi süst (Joonis 5A - 1). Vabanevat soojust mõõdeti kuniks reaktsioon lõppes, reaktsiooni lõppemist kontrolliti 19 nM maolipaasi süstiga peale mida lisa soojust ei eraldunud (Joonis 5A, soojusvoog ei muutu). Esimese süsti kineetikat vaadates, on näha ajas substraadi hulga vähenemist soojusefekti vähenemise kaudu. Järgnevalt kontrolliti ITC-ga

maolipaasi aktiivsuse mõõtmises vabaneva soojuse hulga sõltuvust lisatava ensüümi kontsentratsioonist (Joonis 5B). Iga kontsentratsiooni korral tehti 4 süsti. Mõõtmiste tulemusel leiti, et iga 0,5 nM maolipaasi süstimisel substraadi emulsiooni vabaneb keskmiselt 0,455 μW soojust, mida kinnitab ka lineaarne regressioon $R^2 = 0,994$ (Joonis 5B).

Järgmisena leiti ITC meetodi tundlikkus, selleks kasutades valemit 1 arvutati LoD väärtuseks 0,207:

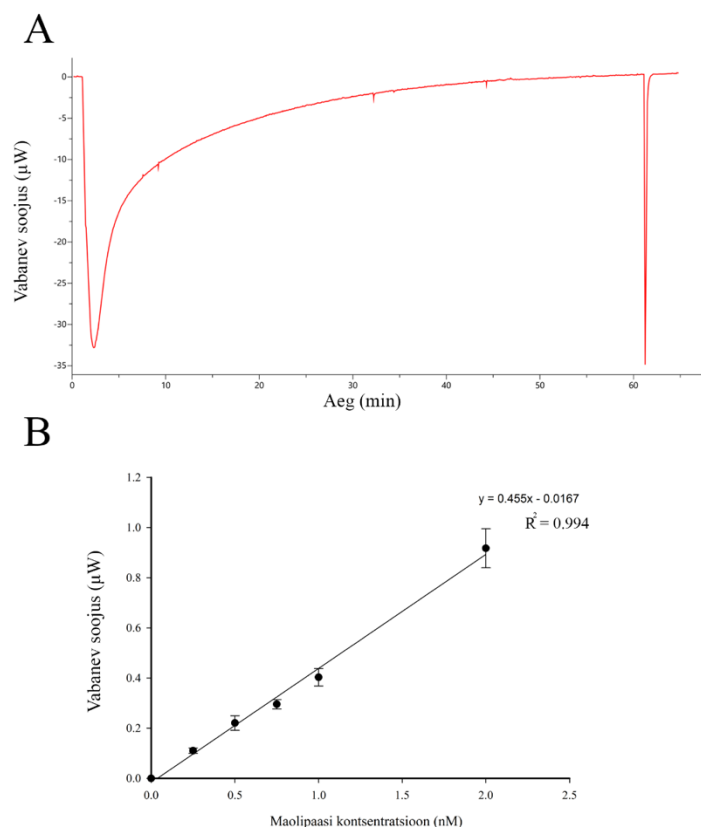
$$\text{Avastamispää (LoD)} = \frac{3,3 \cdot 0,0285}{0,455},$$

Samuti kasutades valemit 2 arvutati LoQ väärtuseks 0,626:

$$\text{Määramispää (LoQ)} = \frac{10 \cdot 0,0285}{0,455},$$

Kus 0,455 on kalibreerimisgraafiku tõus avastamispääri lähedal (Joonis 5B), 0,0285 on kalibreerimisgraafiku jääkliikmete (residuaalide) standardhälve.

Kasutades kalibreerimiskõverat (Joonis 5B) arvutati, et 0,626 nM RGL kontsentratsiooni süstiga vabaneb keskmiselt 0,268 μW soojust.



Joonis 5. Maolipaasi aktiivsuse mõõtmine isotermlise tiitrimis-kalorimeetriga (ITC) füsioloogiliselt sarnastes tingimustes. A - Tributüürini täieliku hüdrolyüsi termogramm (vabanev soojus ajas), B - RGL-i aktiivsus, mida väljendatakse vabanenud soojusena (μW) ja määratakse ITC abil, süstides järjestikku RGL-i emulsiooni.

4.3 Õhukese kihi kromatograafia kasutamine hüdrolüüsi protsessi kontrolliks



Tabel 1. Retensiooniteguri (Rf) väärtused riini hüdrolüüsi jälgimisel TLC abil.

Proov	Rf väärtus
Tributüriin	0,54
Tributüriin emulsioon ITC-st	0,13
Kontroll	0,44
C-15 rasvhapped	0,18

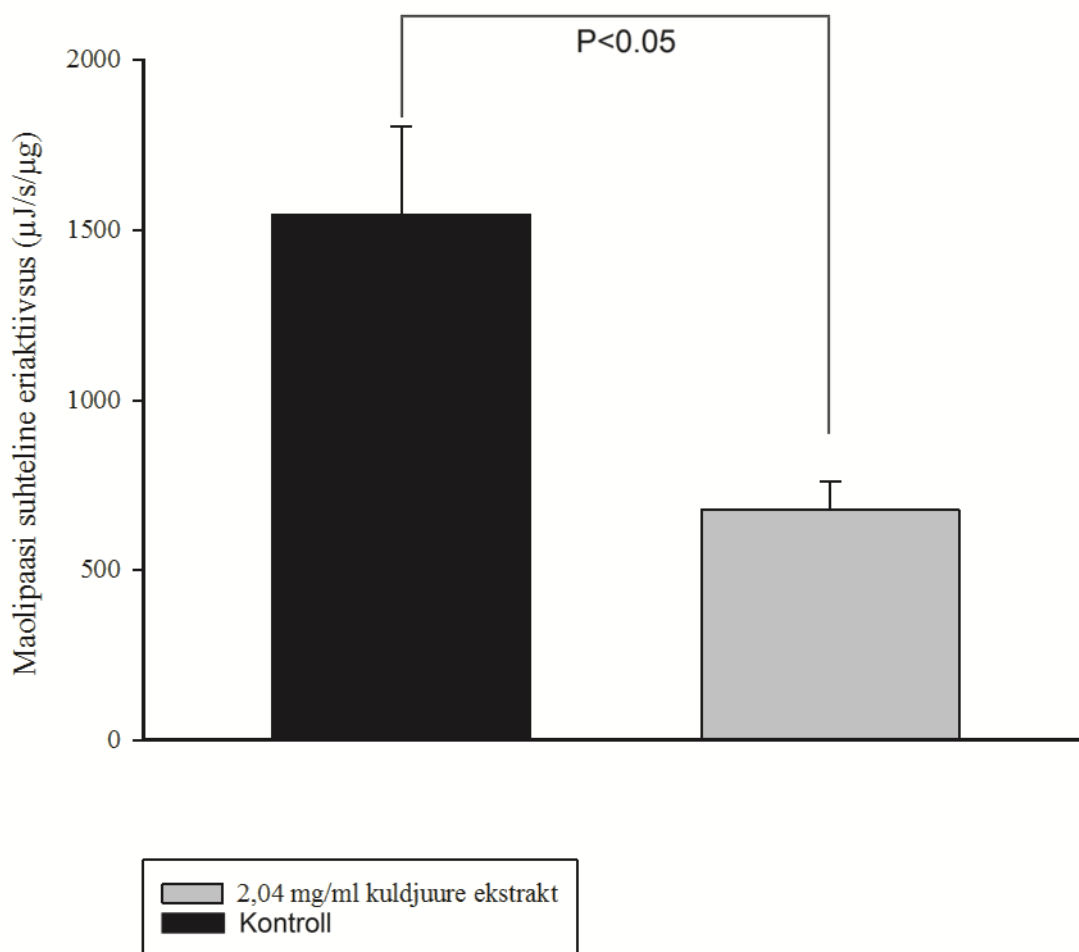
Joonis 6. Õhukese kihi kromatograafia (TLC) kasutamine tributüriini hüdrolüüsi jälgimiseks. Plaadil on kujutatud erinevate proovide jäljed: punase värvusega on märgitud tributüriin ($R_f = 0,54$), tributüriini ITC-emulsioon, mis on tähistatud lilla värviga ($R_f = 0,13$), rohelise värviga kontrollproov ($R_f = 0,44$) ja C-15 rasvhapete standard on tähistatud sinise värviga ($R_f = 0,18$).

Tributüriini hüdrolüüsi protsessi valideerimiseks kasutati õhukese kihi kromatograafiat (TLC). See võimaldas hinnata hüdrolüüsi reaktsiooni efektiivsust ja tuvastada reaktsiooniprodukte. Katse tulemusena arvutati retensioonikoefitsiendid (R_f). Rakendades valemit 3, arvutati R_f väärtused. R_f -väärtus arvutatakse proovi kauguse suhtena lähtejoonest keskpunktini ja liikuva faasi poolt läbitud kaugusele lähtejoonest keskpunktini. Standardina kasutatud tributüriin näitas R_f -väärtust 0,54, mis on kooskõlas selle eeldatavate keemiliste ja füüsikaliste omadustega (triglütseriid). ITC-s inkubeeritud tributüriini emulsiooni R_f väärtuseks saadi 0,13, mis näitas vabade rasvhapete teket ning hüdrolüüsi toimumist. Kontrollproov, tributüriini emulsioon ilma lipaasi lisamiseta, näitas R_f väärtust 0,44, mis kinnitab lähteaine stabiilsust ensümaatilise aktiivsuse puudumisel. C-15 ahelaga rasvhapete R_f -väärtus oli 0,18, mis näitab nende suuremat polaarsust võrreldes tributüriiniga ning langeb kokku hüdrolüüsitud proovi R_f väärtusega.

4.4 Isotermilise tiitrimis-kalorimeetria rakendamine maolipaasi inhibeerimise uurimiseks füsioloogiliselt sarnastes tingimustes

Käesolevas eksperimendis uuriti kuldjuure ekstrakti mõju maolipaasi aktiivsusele. Katsed näitasid, et 2.0% kuldjuure ekstrakt inhibeeris oluliselt maolipaasi aktiivsust võrreldes kontrolliga, kus ekstrakti asemel kasutati ainult etanooli. Nagu on näidatud Joonisel 7, vähenes maolipaasi aktiivsus 2,04mg/ml kuldjuure ekstrakti juuresolekul 51,4 % võrreldes kontrolliga. Mõõtmistingimuste vahelised erinevused olid statistiliselt olulised ($P < 0,05$), mis näitab kuldjuure ekstrakti

potentsiaalset tõhusust maolipaasi inhibiitorina ning ITC meetodi rakendatavust maolipaasi inhibiitorite mõju uurimisel.

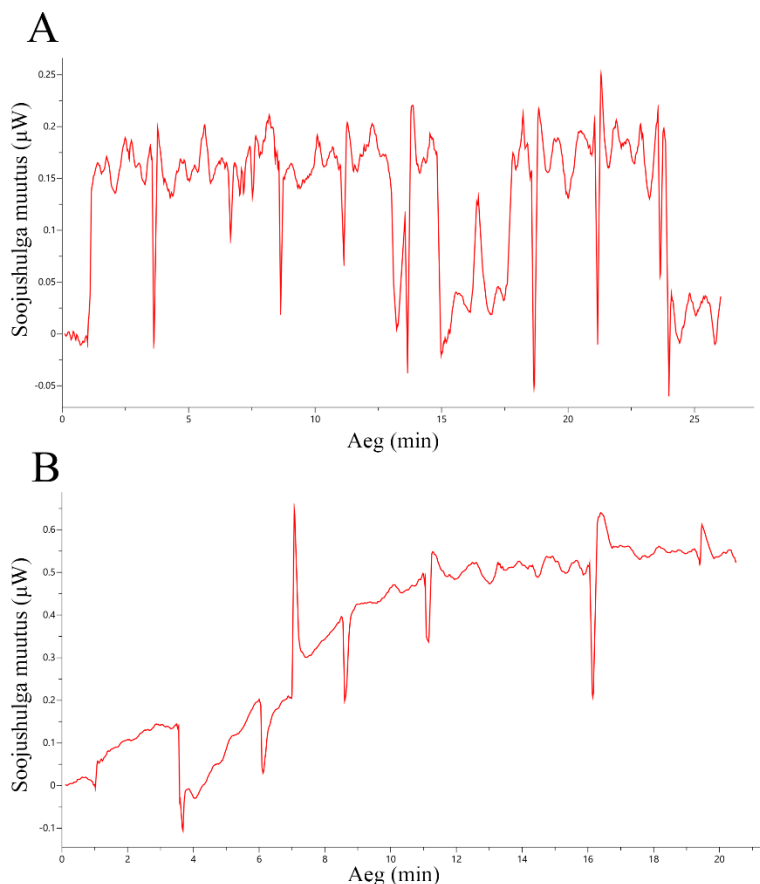


Joonis 7. Kuldjuure ekstrakti mõju maolipaasi aktiivsusele. Aktiivsus mõõdeti ITC meetodiga ning väljendatakse vabanenud soojus sekundis 1 μg maolipaasi kohta (μJ/s/μg).

4.5 Isotermilise tiitrimis-kalorimeetria rakendamine erinevaes emulsioonides maolipaasi aktiivsuse mõõtmiseks

Oliiviõli emulsiooni katse eesmärk oli uurida, kas ITC-d on võimalik kasutada, et uurida maolipaasi mõju pikemaajaste rasvhappe ahelaid sisaldavatele triglütseriidide emulsioonidele. Saadud termogrammilt (Joonis 8A) on näha stabiilse soojusvoo puudumist enne lipaasi süstimist substraati ning positiivseid soojusefekte peale ensüümi süstimist. Kookoseõli emulsiooni kasutati selleks, et uurida maolipaasi mõju keskmise pikkusega rasvhappe ahelaid sisaldavatele emulsioonidele. Kookosõli emulsiooni termogram (Joonis 8B) näitas samuti ebastabiilset süstide eelset soojusvoogu ning positiivseid soojusefekte peale ensüümi süstimist. Positiivsed soojusefektid mõlemal termogrammil viitavad endotermiliste protsesside toimumisele substraatsüsteemis. Tulemused näitavad, et isotermilise tiitrimise kalorimeetria meetod, mis töötab hästi tributüüniga

substraatide puhul, ei pruugi sobida maolipaasi aktiivsuse mõõtmiseks substraatide puhul, millel on keerulisem ja mitmekesisem triglütseriidide molekulaarstruktuur.



Joonis 8. Soojusvoo muutuste termogrammid maolipaasi aktiivsuse mõõtmisel erinevates emulsioonides. A – Oliiviõli termogramm, B – kookosõli termogramm. Termogrammidest on näha, et ITC meetodi rakendades ei ole võimalik ensüümi aktiivsust ebastabiilsest signaalist tingituna mõõta.

4.6 Õhukese kihi kromatograafia rakendamine emulsioonides toimuva hüdrolyüsi kontrolliks.

Eelnevatest katsetest on näha, et ITC meetod ei võimalda mõõta pikema rasvhapete ahelatega triglütseriidide emulsioonide hüdrolyüsi maolipaasi toimet. Käesolevas katses kasutati õhukese kihi kromatograafiat (TLC), et analüüsida triglütseriidide hüdrolyüsi toimumist oliivi- ja kookosõli emulsioonides maolipaasi mõjul.

Oliiviõli õhukese kihi kromatograafia (TLC) käigus (Joonis 9) analüüsiti järgmisi proove: puhas oliiviõli, 3% oliiviõli emulsioon ITC-st, 3% oliiviõli emulsiooni kontroll (ensüümi asemel lisatud puhver) ning C14 rasvhapped. Puhas oliiviõli näitas triglütseriidide puhul R_f -väärtust 0,8 ja rasvhapete puhul 0,25, mis näitab vabade rasvhapete olemasolu õlis. ITC-s inkubeeritud 3%-lise oliiviõli emulsioon koos maolipaasiga näitas sarnaseid R_f -väärtusi triglütseriidide puhul ja R_f 0,24 rasvhapete puhul. Rasvhapete plekk oli laiem ning värvus intensiivsem, mis viitab hüdrolyüsi protsessile. Kontrollemulsioon puhverlahusega ilma maolipaasita näitas triglütseriidide puhul sarnaseid R_f -väärtusi. Rasvhapete plekk oli siiski väiksem ja vähem intensiivne, mis kinnitab

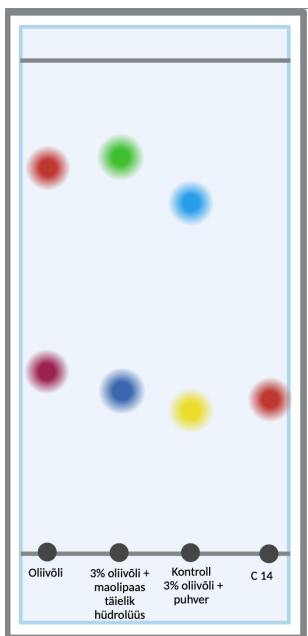
hüdrolüüsi puudumist. Rasvhapete kontrollimiseks kasutati standardina C-14 rasvhappeid, mille R_f -väärtus oli 0,21.



Tabel 2. Retensiooniteguri (R_f) väärtused ITC-s inkubeeritud oliiviõli hüdrolüüsi protsessi jälgimisel TLC abil.

Proov	R_f väärtus (triglütseriidid)	R_f väärtus (rasvhapped)
Oliivõli	0,8	0,25
Oliivõli emulsioon ITC-st	0,8	0,24
Kontroll	0,8	0,24
C-14 rasvhapped	-	0,21

Joonis 9. Õhukese kihi kromatograafia (TLC) kasutamine ITC-s inkubeeritud oliiviõli hüdrolüüsi jälgimiseks. Plaadi ülemine osa näitab triglütseriide: **hele-sinine** täpp – oliiviõli ($R_f = 0,8$), **kollane** on oliiviõli ITC-emulsioon ($R_f = 0,8$), **roheline** on kontrollproov ($R_f = 0,8$). Plaadi alumine osa kujutab rasvhappeid: **punane** täpp – oliiviõli ($R_f = 0,25$), **roheline** on oliiviõli ITC-emulsioon ($R_f = 0,24$), **lilla** täpp – kontrollproov ($R_f = 0,24$), **sinine** täpp on C-14 rasvhapete standard ($R_f = 0,21$).



Tabel 3. Retensiooniteguri (R_f) väärtused termostaadis inkubeeritud (72h) oliiviõli hüdrolüüsi protsessi jälgimisel TLC abil.

Proov	R_f väärtus (triglütseriidid)	R_f väärtus (rasvhapped)
Oliivõli	0,77	0,36
Oliivõli emulsioon (täielik hüdrolüüs)	0,81	0,33
Kontroll	0,71	0,28
C-14 rasvhapped	-	0,31

Joonis 10. Õhukese kihi kromatograafia (TLC) kasutamine termostaadis inkubeeritud oliiviõli hüdrolüüsi jälgimiseks. Plaadi ülemine osa näitab triglütseriide: **punane** täpp – oliiviõli ($R_f = 0,77$), **roheline** on termostaadis inkubeeritud oliiviõli emulsioon ($R_f = 0,81$), **hele-sinine** on kontrollproov ($R_f = 0,71$). Plaadi alumine osa näitab rasvhappeid: **lilla** täpp – oliiviõli ($R_f = 0,36$), **sinine** on termostaadis inkubeeritud oliiviõli emulsioon ($R_f = 0,33$), **kollane** täpp – kontrollproov ($R_f = 0,28$), **punane** täpp on C-14 rasvhapete standard ($R_f = 0,31$).

Selleks, et kinnitada maolipaasile kättesaadavate triglütseriidide täieliku hüdrolyüsi toimumist inkubatsiooniaja jooksul, viidi läbi täiendav katse. Katses analüüsiti 3% oliiviõli emulsiooni mida inkubeeriti 250nM maolipaasiga temperatuuril 25°C termostaadis 72 tundi. Esimese oliiviõli proovi triglütseriidide Rf-väärtused olid 0,77 ja rasvhapete korral 0,36. Teine proov, 3% oliiviõli emulsioon koos mao lipaasiga, mida inkubeeriti 72 tundi, näitas Rf väärtusi 0,81 triglütseriidide ja 0,33 rasvhapete puhul, kusjuures rasvhapete plekk oli oluliselt laiem (Lisa 1C). Kolmas proov, oliiviõli emulsioon puhverlahusega ilma maolipaasita, näitas Rf väärtusi 0,71 triglütseriidide ja 0,28 rasvhapete puhul. Neljas proov sisaldas C-14 rasvhappeid, mille Rf-väärtus oli 0,31. Lisa 1C on näha, et hüdrolyüs toimub kuid kõik triglütseriidid oliiviõli emulsioonis ei ole kättesaadavad või ensüüm inaktiveerub mingil ajahetkel.



Tabel 3. Retensiooniteguri (Rf) väärtused ITC-s inkubeeritud kookosõli hüdrolyüsi protsessi jälgimisel TLC abil.

Proov	Rf väärtus (triglütseriidid)	Rf väärtus (rasvhapped)
Kookosõli	0,81	0,23
Kookosõli emulsioon ITC	0,81	0,23
Kontroll	0,8	-
C-15 rasvhapped	-	0,31

Joonis 11. Õhukese kihi kromatograafia (TLC) kasutamine ITC-s inkubeeritud kookosõli hüdrolyüsi jälgimiseks. Plaadi ülemine osa näitab triglütseriidide: **punane** täpp – kookosõli (Rf = 0,81), **roheline** on kookosõli ITC-emulsioon (Rf = 0,81), **hele-sinine** on kontrollproov (Rf = 0,8). Plaadi alumine osa näitab rasvhappeid: **lilla** täpp – kookosõli (Rf = 0,23), **sinine** on kookosõli ITC-emulsioon (Rf = 0,23), **kollane** täpp on C-15 rasvhapete standard (Rf = 0,31). Kontrollproovis puudub täpp rasvhapete tsoonis.

Kolmandat TLC-plaati kasutati kookosõli hüdrolyüsi protsessi analüüsimiseks maolipaasi toimel. Esimesele rajale kanti puhas kookosõli, mille triglütseriidide Rf-väärtus oli 0,81 ja rasvhapete korral 0,23. Järgmine proov oli 3% kookosõli emulsioon koos maolipaasiga, mida inkubeeriti ITC-s. Proovis jäid Rf-väärtused triglütseriidide ja rasvhapete puhul muutumatuks. Kolmas proov oli emulsioon puhverlahusega ilma maolipaasita, mille Rf-väärtus triglütseriidide puhul oli 0,8. Rasvhapete eeldatava Rf väärtuse juures proovi ei leidunud, mis viitab hüdrolyüsi puudumisele. Neljas proov oli C-15 rasvhapped, mille Rf väärtus oli 0,31, mida kasutati rasvhapete standardina.

5 Arutelu ja järeldused

Käesolevas töös näidati, et ITC-meetod on sobilik maolipaasi aktiivsuse mõõtmiseks füsioloogiliselt sarnastes tingimustes. ITC meetodi eelised eelnevalt kasutatud maolipaasi aktiivsuse mõõtmise meetodidega on selle lihtsus²³, reporter- või märgistatud molekulide kasutamise vajaduse puudumine²², signaali jälgimine reaajas (reaktsiooni kineetika), komplekses füsioloogiliselt sarnastes tingimustes mõõtmise võimalus, suurem tundlikkus²² ning meetod ei ole destruktiivne, mis võimaldab proovi edasist järeltöötlust või analüüsi. Kuid käesolevas töös leiti, et ITC-meetod ei sobi maolipaasi aktiivsuse mõõtmiseks igat tüüpi substraatide jaoks. Lisaks on isotermilise tiitrimis-kalorimeetri seade kallis, mis piirab selle laialdast kasutamist.

Töös kasutati inimese maolipaasile sarnast kommersiaalselt puhastatud ja aktiivset RGL-i, mida kinnitasid SDS-PAGE ja fluorestsentsanalüüs DGGR-substraadi abil. SDS-PAGE ning fluorestsentsanalüüsi tulemused on olulised, sest need näitavad ensüümi aktiivsuse hindamiseks kasutatud ITC meetodi usaldusväärsust ja kinnitavad ensüümi sobivust biokeemilisteks uuringuteks. ITC meetodi LoD ja LoQ väärtusteks saadi vastavalt 0,207 nM ja 0,626 nM, mis näitab meetodi tundlikkust. Oluline on rõhutada, et ITC-ga mõõtmiseks vajalik ensüümi kontsentratsioon ja kogus on palju väiksem võrreldes ph-staatiga²¹. Lisaks kinnitati ITC-d rakendades, et kuldjuure (*Rhodiola*) ekstrakt inhibeerib maolipaasi aktiivsust. Need andmed näitavad, et tulevikus võib viia läbi uuringuid, et paremini mõista maolipaasi ja erinevate inhibiitorite vahelise koostoime mehhanisme. Mitmesuguste inhibiitorite ja maolipaasi koostoimete uurimine võib aidata välja töötada efektiivsemaid ravimeid rasvumise ja sellega seotud metaboolsete haiguste ravimiseks.

Nagu eelnevalt märgitud, näitavad töö tulemused, et kõik substraatsüsteemid ei sobi RGL aktiivsuse mõõtmiseks ITC abil. Leiti, et ITC ei suutnud registreerida maolipaasi aktiivsust oliivi- ja kookosõli sisaldavates substraatides, vaatamata sellele, et hüdrofüüsi reaktsiooni toimumine kõnealustes keskkondades leidis töös kinnitust. Varasemad uuringud on näidanud, et ITC-meetod on võimeline mõõtma pankrease lipaasi (PNLIP) aktiivsust oliiviõliga substraatides²⁸. Erinevalt RGL-st, on pankrease lipaas siiski spetsiifiline ja aktiivne ka pika rasvhappe ahelaga triglütseriidide suhtes, mis on domineerivad oliiviõlis^{18,33}. Pankrease lipaasi uuriti ka suurema sapisoolade (NaTDOC) kontsentratsiooni tingimustes, mis soodustavad rasvade emulgeerumist, suurendades substraadi kättesaadavust²⁸. Lisaks võib spekulatsioon, et ehkki RGL on aktiivne, võib oliiviõli ja kookosõli hüdrofüüsi käigus vabanev soojus olla liiga väike, et seda ITC abil registreerida. Samuti on võimalik, et rasvhapete vabanemisel substraatsüsteemis toimuvad ümberkorraldused võivad olla endotermilised ning varjata hüdrofüüsis tingitud eksotermilist soojusefekti.

Eelnimetatud asjaolusid arvestades on potentsiaalikas edasi uurida meetodi piiranguid ning arendada ITC meetodi rakendamist maolipaasi aktiivsuse mõõtmiseks keerulistemates substraatsüsteemides. Näiteks, oleks võimalik kasutada inimese rekombinantset maolipaasi (rHGL), lisada juurde emulsiooni stabilisaatoreid või proovida erinevaid puhversüsteeme. Rekombinantse HGL-i kasutamise eeliseks on ensüümi võime täpsemini jäljendada HGL-i funktsionaalseid ja biokeemilisi omadusi. Erinevalt RGL-st, on rHGL tõhusam pika ahelaga rasvhapete eraldamisel, mis muudab selle universaalsemaks eri tüüpi substraatide uurimiseks ITC-tingimustes.¹⁸ Kokkuvõtteks

võib öelda, et ITC on võimas meetod maolipaasi aktiivsuse uurimiseks. Võrreldes teiste meetoditega on ITC-l mitmeid eeliseid: lihtne analüüs, suur tundlikkus ja võimalus reaktsiooni pidevalt jälgida.

Tänuavaldused

Tahan avaldada tänu Aivar Lõokesele võimaluse eest töötada laboris, mis oli minu töö jaoks väga oluline. Suur tänu minu juhendajale Naatan Seebale tema juhendamise ja kannatlikkuse eest. Ideed ja toetus töös olid hindamatud. Hindan, et leiti aega aidata ja arutada töö olulisi aspekte hoolimata paljudest muudest kohustustest. Samuti tahan tänada Robert Ristit tema abi ja väärtuslike nõuannete eest töö osas. Tänan kõiki labori liikmeid meeldiva koostöö eest.

Tänan oma perekonda ja sõpru armastuse ja toetuse eest, mis aitasid mulle leida jõudu töö jätkamiseks.

Kasutatud kirjanduse loetelu

1. Minekus M, Alminger M, Alvito P, et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.* 2014;5(6):1113-1124. doi:10.1039/C3FO60702J
2. Ahmed M. Functional, Diagnostic and Therapeutic Aspects of Bile. *Clin Exp Gastroenterol.* 2022;15:105-120. doi:10.2147/CEG.S360563
3. Infantes-Garcia MR, Verkempinck SHE, Gonzalez-Fuentes PG, Hendrickx ME, Grauwet T. Lipolysis products formation during *in vitro* gastric digestion is affected by the emulsion interfacial composition. *Food Hydrocoll.* 2021;110:106163. doi:10.1016/j.foodhyd.2020.106163
4. Buffer Systems | MedicTests. Accessed May 23, 2024. <https://medictests.com/units/buffer-systems>
5. 7.5: Digestion and Absorption of Lipids. Medicine LibreTexts. Published February 28, 2021. Accessed May 23, 2024. [https://med.libretexts.org/Courses/Allan_Hancock_College/Introduction_to_Nutrition_Science_\(Bisson_et._al\)/07%3A_Lipids/7.05%3A_Digestion_and_Absorption_of_Lipids](https://med.libretexts.org/Courses/Allan_Hancock_College/Introduction_to_Nutrition_Science_(Bisson_et._al)/07%3A_Lipids/7.05%3A_Digestion_and_Absorption_of_Lipids)
6. Kulkarni BV, Mattes RD. Lingual lipase activity in the orosensory detection of fat by humans. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2014;306(12):R879-R885. doi:10.1152/ajpregu.00352.2013
7. Arroyo-Maya IJ, McClements DJ. Application of ITC in foods: A powerful tool for understanding the gastrointestinal fate of lipophilic compounds. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 2016;1860(5):1026-1035. doi:10.1016/j.bbagen.2015.10.001
8. Cifarelli V, Abumrad N. Intestinal CD36 and Other Key Proteins of Lipid Utilization: Role in Absorption and Gut Homeostasis. *Compr Physiol.* 2018;8. doi:10.1002/cphy.c170026
9. Hussain MM, Nijstad N, Franceschini L. Regulation of microsomal triglyceride transfer protein. *Clin Lipidol.* 2011;6(3):293-303. doi:10.2217/clp.11.21
10. Lim SY, Steiner JM, Cridge H. Lipases: it's not just pancreatic lipase! *Am J Vet Res.* 2022;83(8). doi:10.2460/ajvr.22.03.0048
11. Ticho AL, Malhotra P, Dudeja PK, Gill RK, Alrefai WA. Intestinal Absorption of Bile Acids in Health and Disease. *Compr Physiol.* 2019;10(1):21-56. doi:10.1002/cphy.c190007
12. Chiang JYL. Bile Acid Metabolism and Signaling. *Compr Physiol.* 2013;3(3):1191. doi:10.1002/cphy.c120023
13. Ribeiro BD, Castro A, Coelho MA, Freire D. Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. *Enzyme Res.* 2011;2011:615803. doi:10.4061/2011/615803

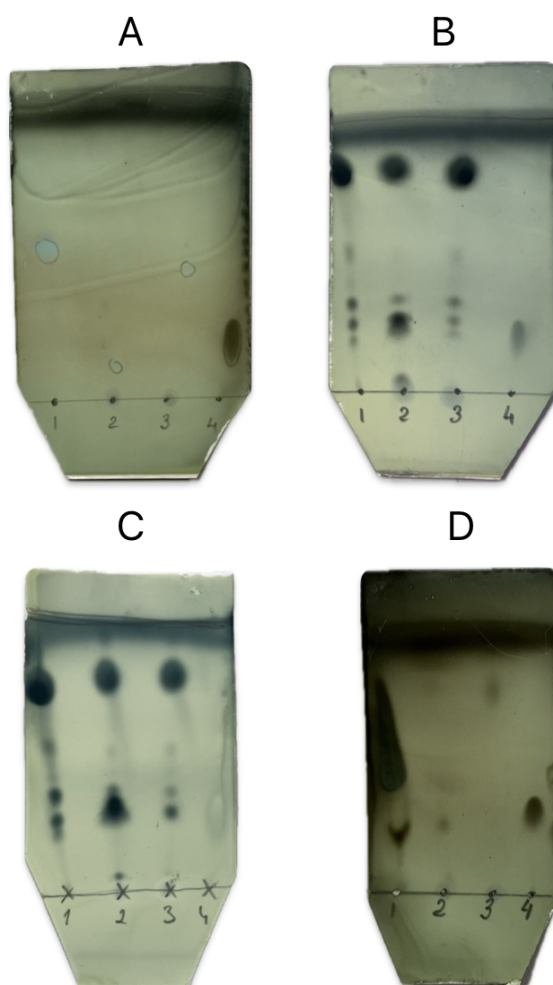
14. Sams L, Amara S, Chakroun A, et al. Constitutive expression of human gastric lipase in *Pichia pastoris* and site-directed mutagenesis of key lid-stabilizing residues. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 2017;1862(10, Part A):1025-1034. doi:10.1016/j.bbalip.2017.07.002
15. Canaan S, Roussel A, Verger R, Cambillau C. Gastric lipase: crystal structure and activity. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 1999;1441(2):197-204. doi:10.1016/S1388-1981(99)00160-2
16. Bank RPD. RCSB PDB - 1HLG: CRYSTAL STRUCTURE OF HUMAN GASTRIC LIPASE. Accessed May 23, 2024. <https://www.rcsb.org/structure/1HLG>
17. Carriere F, Barrowman JA, Verger R, René L. Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology*. 1993;105(3):876-888. doi:10.1016/0016-5085(93)90908-U
18. J. Sassene P, Fanø M, Mu H, et al. Comparison of lipases for in vitro models of gastric digestion: lipolysis using two infant formulas as model substrates. *Food Funct*. 2016;7(9):3989-3998. doi:10.1039/C6FO00158K
19. Tanaka Y, Doi H, Katano T, Kasaoka S. Effects of Lipid Digestion and Drug Permeation/Re-Dissolution on Absorption of Orally Administered Ritonavir as Different Lipid-Based Formulations. *Eur J Pharm Sci*. 2021;157:105604. doi:10.1016/j.ejps.2020.105604
20. Andreadis II, Schulzen A, Quodbach J, Bergström CAS. Exploring the use of modified *in vitro* digestion assays for the evaluation of ritonavir loaded solid lipid-based formulations. *Eur J Pharm Sci*. 2023;189:106524. doi:10.1016/j.ejps.2023.106524
21. Grundy MML, Abrahamse E, Almgren A, et al. INFOGEST inter-laboratory recommendations for assaying gastric and pancreatic lipases activities prior to *in vitro* digestion studies. *J Funct Foods*. 2021;82:104497. doi:10.1016/j.jff.2021.104497
22. Stoytcheva M. Analytical methods for lipases activity determination: A review. *Curr Anal Chem*. 2012;8:400-407.
23. NEFA elisa kit | Human NEFA (Non-Esterified Fatty Acid) ELISA Kit. Accessed May 23, 2024. <https://www.mybiosource.com/human-elisa-kits/nefa-non-esterified-fatty-acid/8807634>
24. Risti R, Gunn KH, Hiis-Hommuk K, et al. Combined action of albumin and heparin regulates lipoprotein lipase oligomerization, stability, and ligand interactions. *PloS One*. 2023;18(4):e0283358. doi:10.1371/journal.pone.0283358
25. Hope A, Bailen EL, Shiel RE, Mooney CT. Retrospective study evaluation of DGGR lipase for diagnosis, agreement with pancreatic lipase and prognosis in dogs with suspected acute pancreatitis. *J Small Anim Pract*. 2021;62(12):1092-1100. doi:10.1111/jsap.13379

26. Wang Y, Wang G, Moitessier N, Mittermaier AK. Enzyme Kinetics by Isothermal Titration Calorimetry: Allostery, Inhibition, and Dynamics. *Front Mol Biosci.* 2020;7:583826. doi:10.3389/fmolb.2020.583826
27. Reimund M, Kovrov O, Olivecrona G, Lookene A. Lipoprotein lipase activity and interactions studied in human plasma by isothermal titration calorimetry. *J Lipid Res.* 2017;58(1):279-288. doi:10.1194/jlr.D071787
28. Villo L, Risti R, Reimund M, Kukk K, Samel N, Lookene A. Calorimetric approach for comparison of Angiopoietin-like protein 4 with other pancreatic lipase inhibitors. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2020;1865(2):158553. doi:10.1016/j.bbalip.2019.158553
29. Seeba NN, Risti R, Lookene A. Lipoprotein Lipase Activity Does Not Differ in the Serum Environment of Vegans and Omnivores. *Nutrients.* 2023;15(12):2755. doi:10.3390/nu15122755
30. Armbruster DA, Pry T. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. *Clin Biochem Rev.* 2008;29(Suppl 1):S49-S52.
31. Solutions SSH. Chromatographic Measurements, Part 5: Determining LOD and LOQ Based on the Calibration Curve. Separation Science. Published February 9, 2021. Accessed May 23, 2024. <https://www.sepscience.com/hplc-solutions-126-chromatographic-measurements-part-5-determining-lod-and-loq-based-on-the-calibration-curve/>
32. Thin Layer Chromatography. Chemistry LibreTexts. Published October 2, 2013. Accessed May 27, 2024. https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Demos_Techniques_and_Experiments/General_Lab_Techniques/Thin_Layer_Chromatography
33. Zhang Y, Luo XA, Zhu LJ, Wang SZ, Jia MQ, Chen ZX. Catalytic behavior of pancreatic lipase in crowded medium for hydrolysis of medium-chain and long-chain lipid: An isothermal titration calorimetry study. *Thermochim Acta.* 2019;672:70-78. doi:10.1016/j.tca.2018.12.015

Lisad

Lisa 1 Õhukese kihi kromatograafia plaadite originaalpildid

Pildil on toodud hüdrolyüsi protsessi jälgimiseks tehtud TLC plaadid. A - TLC plaat tributüriini hüdrolyüsi jälgimiseks, kus 1 - tributüriin, 2 - inkubeeritud ITC-s emulsioon (3% tributüriin, RGL), 3 - inkubeeritud termostaadis kontroll emulsioon (3% tributüriin, puhver), 4 - C-15 rasvhapped. B - TLC plaat oliiviõli hüdrolyüsi protsessi jälgimiseks, kus 1 - oliiviõli, 2 - inkubeeritud ITC-s emulsioon (3% oliiviõli, RGL), 3 - inkubeeritud termostaadis kontroll lahus (3% oliiviõli, puhver), 4 - C-14 rasvhapped. C - TLC plaat oliiviõli hüdrolyüsi protsessi jälgimiseks, kus 1 - oliiviõli, 2 - inkubeeritud termostaadis 72 tunni jooksul emulsioon (3% oliiviõli, RGL), 3 - inkubeeritud termostaadis 72 tunni jooksul kontroll lahus (3% oliiviõli, puhver), 4 - C-14 rasvhapped. D - TLC plaat kookosõli hüdrolyüsi protsessi kontrollimiseks, kus 1 - kookosõli, 2 - inkubeeritud ITC-s emulsioon (3% kookosõli, RGL), 3 - inkubeeritud termostaadis kontroll lahus (3% kookosõli, puhver), 4 - C-15 rasvhapped.



rektori 07.04.2020 käskkirjale nr 1-8/17

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina, Viktoriia Paršina,

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Isotermilise tiitrimis-kalorimeetria rakendamine maolipaasi aktiivsuse mõõtmiseks füsioloogiliselt sarnastes tingimustes“,

mille juhendaja on Natjan-Naatan Seeba,

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.

31.05.2024

¹ 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 tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.