

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie



Kateřina Zemánková

**REGULACE AKTIVITY LIPOPROTEINOVÉ
LIPÁZY V CIRKULACI**

Diplomová práce

Praha 2013

Vedoucí práce: RNDr. Jan Kovář, CSc.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce a ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 3. 5. 2013

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Kovářovi, CSc. za možnost vypracování diplomové práce. Mé díky mu náleží za odborné vedení, cenné rady, velkou trpělivost a projevený zájem při vypracování této diplomové práce. Rovněž bych ráda poděkovala Ing. Miluši Vlachové za technické a praktické rady při práci v laboratoři.

Zvláštní poděkování patří zaměstnancům Lipidové laboratoře IKEM, Laboratoře klinické patofyziologie IKEM a oddělení Klinické biochemie Thomayerovy nemocnice za spolupráci při experimentální části.

Poděkování patří i mé rodině a přátelům za podporu a porozumění nejen v průběhu celého studia a při psaní této závěrečné práce.

Ráda bych také poděkovala všem dobrovolníkům.

Abstrakt

Lipoproteinová lipáza (LPL) je klíčový enzym v metabolismu lipoproteinů. Enzym katalyzuje hydrolýzu triacylglycerolů (TG), které jsou součástí chylomikronů a lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL). V současné době však není plně objasněn mechanismus regulace tohoto proteinu. Cílem práce proto bylo studium vybraných aspektů regulace aktivity LPL.

Nedávno objevený apolipoprotein A-V (apo A-V) významně ovlivňuje triglyceridémii a předpokládá se, že by mohl být aktivátorem LPL. Jeho koncentrace v cirkulaci je ovšem příliš nízká a proto bylo zjišťováno, zda většina apo A-V není vázána na heparansulfátproteoglykanu (HSPG) cévní stěny podobně jako LPL. Intravenózní aplikace heparinu byla u zdravých dobrovolníků spojena s očekávaným vzestupem aktivity LPL, koncentrace apo A-V se však po podání heparinu neměnila. Tyto nálezy tedy nesvědčí pro hypotézu, že podstatná část apo A-V je v cirkulaci vázána na HSPG kapilárního endotelu.

Úlohu v regulaci LPL hraje i konzumace alkoholu. Zatímco dlouhodobá umírněná konzumace aktivitu enzymu zvyšuje, předpokládá se, že bezprostředně po konzumaci alkoholu dochází k inhibici aktivity LPL. Pro tuto inhibici však v literatuře chybí přímé důkazy. Dalším cílem studie tedy bylo zjistit, jak je aktivita LPL regulována akutním podáním alkoholu zdravým dobrovolníkům. Aktivita LPL byla hodnocena pomocí intravenózního tukového tolerančního testu (IVTTT), protože tato metoda je považována za míru aktivity LPL *in vivo*. Bylo zjištěno, že aktivita LPL byla po podání alkoholu nižší než po podání vody v kontrolním pokusu. Tyto výsledky lze tedy považovat za první přímý důkaz, že LPL je inhibována podáním alkoholu. V rámci tohoto experimentu byly porovnány dvě metody hodnocení IVTTT a zjištěno, že se jejich výpovědní hodnota zásadně liší a pro hodnocení aktivity LPL je nutné použít nefelometrické stanovení.

Klíčová slova: lipoproteinová lipáza, apolipoprotein A-V, triacylglyceroly, lipoproteiny, alkohol

Abstract

Lipoprotein lipase (LPL) is a key enzyme in lipoprotein metabolism. The enzyme catalyzes hydrolysis of triacylglycerols (TG) of chylomicrons and of very low density lipoproteins (VLDL). However, the mechanisms involved in the regulation of this protein are not fully understood yet. Therefore, the aim of the theses is to study selected aspects of LPL activity regulation.

Recently discovered apolipoprotein A-V (apo A-V) substantially affects triglyceridemia and it is presumed that it may function as LPL activator. However, its concentration in the blood is extremely low and we therefore investigated whether most of apo A-V could be bound to the heparan sulfate proteoglycan (HSPG) of vascular wall similarly to LPL. Intravenous heparin application in healthy volunteers resulted in an expected increase in LPL activity but apo A-V concentration did not change. Our results do not support the hypothesis that most of apo A-V is bound to HSPG of the capillary endothelium.

An alcohol consumption plays also a role in LPL regulation – the long-term moderate alcohol consumption is known to increase enzyme activity; on the contrary, it is presumed that LPL activity is inhibited immediately after alcohol consumption. However, the direct evidence for such a premise is missing. The other aim of the theses was to determine whether acute alcohol administration affects LPL activity in healthy volunteers. LPL activity was evaluated using intravenous fat tolerance test (IVFTT) that reflects LPL activity *in vivo*. It was found that LPL activity is lower after alcohol administration than after water administration in control experiment. These results can be considered to be the first direct evidence that LPL is inhibited after an acute alcohol administration. In this experiment we also compared two methods of evaluating IVFTT and found that they substantially differ in the interpretation of results and that the nephelometry have to be used for evaluation of the LPL activity.

Key words: lipoprotein lipase, apolipoprotein A-V, triacylglycerols, lipoproteins, alcohol

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	3
1. ÚVOD	4
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	5
2.1 Triacylglyceroly	5
2.2 Metabolismus triacylglycerolů a mastných kyselin	5
2.3 Lipoproteiny	8
2.3.1 Chylomikrony (CM)	10
2.3.2 Lipoproteiny o velmi nízké, střední a nízké hustotě	10
2.3.3 Lipoproteiny o vysoké hustotě	10
2.4 Lipázy štěpící TG v cirkulaci	11
2.4.1 Endoteliální lipáza (EL)	11
2.4.2 Jaterní lipáza (HL)	12
2.4.3 Lipoproteinová lipáza (LPL)	12
2.5 Lipoproteinová lipáza (LPL)	12
2.5.1 Funkce LPL	12
2.5.2 Struktura a exprese LPL	13
2.5.3 Deficience LPL	14
2.5.4 Faktory ovlivňující funkci LPL	14
2.5.5 Regulace aktivity LPL	18
2.5.6 Stanovení LPL	19
3. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	21
4. MATERIÁL A METODY	22
4.1 Uspořádání experimentu u zdravých dobrovolníků	22
4.1.1 Vliv intravenózní aplikace heparinu na koncentraci apo A-V	22
4.1.2 Regulace lipoproteinové lipázy po podání alkoholu	22
4.2 Materiál a metody	26
4.2.1 Stanovení lipidů, glukózy a NEMK	26
4.2.2 Stanovení etanolu	26
4.2.3 Ultracentrifugace	26
4.2.4 Stanovení glycerolu	27
4.2.5 Stanovení inzulínu	28
4.2.6 Stanovení LPL	29

4.2.7 Stanovení apolipoproteinů	36
4.3 Statistické zpracování výsledků	39
4.3.1 Vliv <i>i.v.</i> aplikace heparinu na koncentraci apo A-V	39
4.3.2 Regulace lipoproteinové lipázy po podání alkoholu	40
5. VÝSLEDKY	41
5.1 Vliv <i>i.v.</i> aplikace heparinu na koncentraci apo A-V	41
5.2 Regulace lipoproteinové lipázy po podání alkoholu	43
5.2.1 Vliv podání alkoholu na koncentraci etanolu v plazmě	43
5.2.2 Vliv podání alkoholu na aktivitu a koncentraci LPL.....	44
5.2.3 Vliv podání alkoholu na lipidové parametry	46
5.2.4 Vliv podání alkoholu na inzulín a glukózu.....	50
5.2.5 Vliv podání alkoholu na složení VLDL	51
5.3 Porovnání metod hodnocení výsledků IVTTT.....	53
6. DISKUZE	56
6.1 Vliv <i>i.v.</i> aplikace heparinu na koncentraci apo A-V	56
6.2 Regulace lipoproteinové lipázy po podání alkoholu.....	57
6.3. Porovnání metod hodnocení výsledků IVTTT.....	58
7. ZÁVĚR	60
8. SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK	61
9. LITERATURA	62

SEZNAM ZKRATEK

Acetyl-CoA	Acetylkoenzym A	Acetyl coenzyme A
ANGPTL	Protein podobný angiopoietinu	Angiopoietin-like protein
ANOVA	Analýza rozptyl	Analysis of variance
Apo	Apolipoprotein	Apolipoprotein
ATGL	Triglyceridová lipáza tukové tkáně	Adipose triglyceride lipase
BMI	Index tělesné hmotnosti	Body mass index
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát	Cyclic adenosin monophosphate
CM	Chylomikron	Chylomicron
DG	Diacylglycerol	Diacylglycerol
EL	Endoteliální lipáza	Endothelial lipase
ER	Endoplazmatické retikulum	Endoplasmic reticulum
FCHL	Familiální kombinovaná hyperlipidémie	Familial combined hyperlipidemia
GA	Golgiho aparát	Golgi apparatus
GPI	Glykosylfosfatidylinositol	Glycosylphosphatidylinositol
GPIHBP1	Protein vázající HDL Ukotvený na GPI	GPI anchored HDL binding protein
HDL	Lipoprotein o vysoké hustotě	High density lipoprotein
HL	Jaterní lipáza	Hepatic lipase
HRP	Křenová peroxidáza	Horseradish peroxidase
HSL	Hormon senzitivní lipáza	Hormone sensitive lipase
HSPG	Heparansulfátproteoglykan	Heparan sulfate proteoglycan
IDL	Lipoprotein o střední hustotě	Intermediate density lipoprotein
i.v.	Intravenózní	Intravenous
IVTTT	Intravenózní tukový toleranční test	Intravenous fat tolerance test
LMF1	Lipázový maturační faktor	Lipase maturation factor
LCAT	Lecitincholesterol- acyltransferáza	Lecithin-cholesterol acyltransferase
LDL	Lipoprotein o nízké hustotě	Low density lipoprotein
LDLR	LDL receptor	LDL receptor
LPL	Lipoproteinová lipáza	Lipoprotein lipase
LRP	Protein příbuzný LDLR	LDLR related protein
MG	Monoacylglycerol	Monoacylglycerol
MK	Mastná kyselina	Fatty acid
NEMK	Neesterifikovaná mastná kyselina	Nonesterified fatty acid
TG	Triacylglycerol	Triglyceride
VLDL	Lipoprotein o velmi nízké hustotě	Very low density lipoprotein

1. ÚVOD

Zvýšená hladina triacylglycerolů (TG) je v současné době považována za jeden ze závažných zdravotních problémů, především kvůli tomu, že je součástí tzv. metabolického syndromu. Zvýšená hladina TG souvisí rovněž se zvýšeným rizikem kardiovaskulárního onemocnění. Extrémně zvýšená hladina TG (> 10 mmol/l) je spojena se zvýšeným rizikem ataku akutní pankreatitidy, která představuje komplikaci ohrožující život.

Klíčovou úlohu v regulaci triglyceridémie hraje lipoproteinová lipáza (LPL), enzym který hydrolyzuje TG v cirkulaci. Předložená práce se proto soustředila na vybrané aspekty regulace aktivity tohoto enzymu. Bylo zjišťováno, zda aplikace heparinu, který uvolňuje LPL z vazby na heparansulfát endoteliálního povrchu, uvolňuje i apolipoprotein A-V (apo A-V).

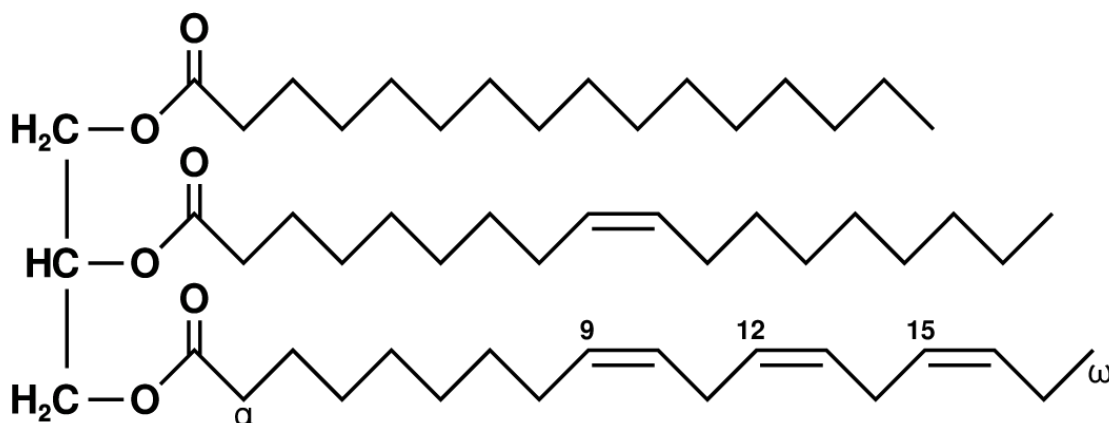
Úlohu v regulaci LPL hraje i konzumace alkoholu. Zatímco dlouhodobá umírněná konzumace aktivitu enzymu zvyšuje, předpokládá se, že bezprostředně po konzumaci alkoholu dochází k její inhibici. Pro tuto inhibici však v literatuře chybí přímé důkazy. Aktivita enzymu *in vivo* byla protoměřena pomocí intravenózního tukového tolerančního testu (IVTTT) před podáním alkoholu a po něm. V rámci tohoto experimentu byly dále porovnány dvě metody hodnocení IVTTT, a to nefelometrické nebo na základě stanovení koncentrace TG.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Triacylglyceroly

Lipidy hrají nezastupitelnou roli ve struktuře a metabolismu buněk. Triacylglyceroly (TG) jsou hlavní zásobárnou metabolické energie u živočichů. TG jsou vhodné pro uskladnění tuků, protože neváží vodu a jsou metabolicky inertní. Z chemického hlediska jsou TG estery trojsytného alkoholu glycerolu a vyšších mastných kyselin, např. palmitové a olejové (Obr. 1).

Mastné kyseliny (MK) jsou karboxylové kyseliny s dlouhými uhlovodíkovými řetězci. Většina mastných kyselin má sudý počet uhlíkových atomů, protože jejich biosyntéza vychází z dvouuhlíkatého acetylkoenzymu A (acetyl-CoA). MK můžeme dělit například podle délky řetězce nebo saturace. Nasycené MK neobsahují v řetězci žádnou dvojnou vazbu, mezi ně patří např. kyselina palmitová (C16:0) a kyselina stearová (C18:0). Nenasycené MK obsahují dvojnou vazbu, většina dvojných vazeb se vyskytuje v konfiguraci *cis*. Mononenasycené MK obsahují jednu dvojnou vazbu, např. kyselina olejová (C18:1). Polynenasycené MK mají v řetězci více než jednu dvojnou vazbu, např. kyselina α -linolenová (C18:3) (Voet, 2004).



Obr. 1: Příklad triacylglycerolu.

Shora dolů: kyselina palmitová, kyselina olejová, kyselina α -linolenová.

(http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Fat_triglyceride_shorthand_formula.PNG, 28. 3. 2013)

2.2 Metabolismus triacylglycerolů a mastných kyselin

Tuky přijaté v potravě jsou v tenkém střevě působením solí žlučových kyselin a lecitinu emulgovány za vzniku drobných kapének s velkým povrchem, a díky tomu je enzymy mohou lépe hydrolyzovat. TG jsou hydrolyzovány na monoacylglyceroly (MG)

a volné MK. Uvolněné MK a MG jsou absorbovány enterocyty a transportovány do endoplazmatického retikula (ER), kde jsou resyntetizovány na TG. Ty jsou v ER inkorporovány do chylomikronů, pomocí transportních váčků přeneseny do Golgiho aparátu (GA) a sekretovány. Chylomikrony jsou sekretovány do lymfatického systému a cestou *ductus thoracicus* se poté dostávají do krevního řečiště. Na endotelu kapilár mimojaterních tkání je navázána lipoproteinová lipáza (LPL), která hydrolyzuje TG v chylomikronech na volné MK a glycerol. Uvolněné MK jsou vycytávány tkáněmi, které je mohou použít jako zdroje energie a oxidovat je v mitochondriích nebo je reesterifikují a ukládají jako TG, které slouží jako zásobárna energie (tuková tkáň). Mastné kyseliny s krátkým řetězcem vstupují z enterocytů přímo do krve a portálním řečištěm jsou transportovány do jater. Lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL) vznikají v játrech a transportují TG z jater do ostatních tkání. LPL hydrolyzuje TG VLDL podobně jako TG chylomikronů (Obr. 2).

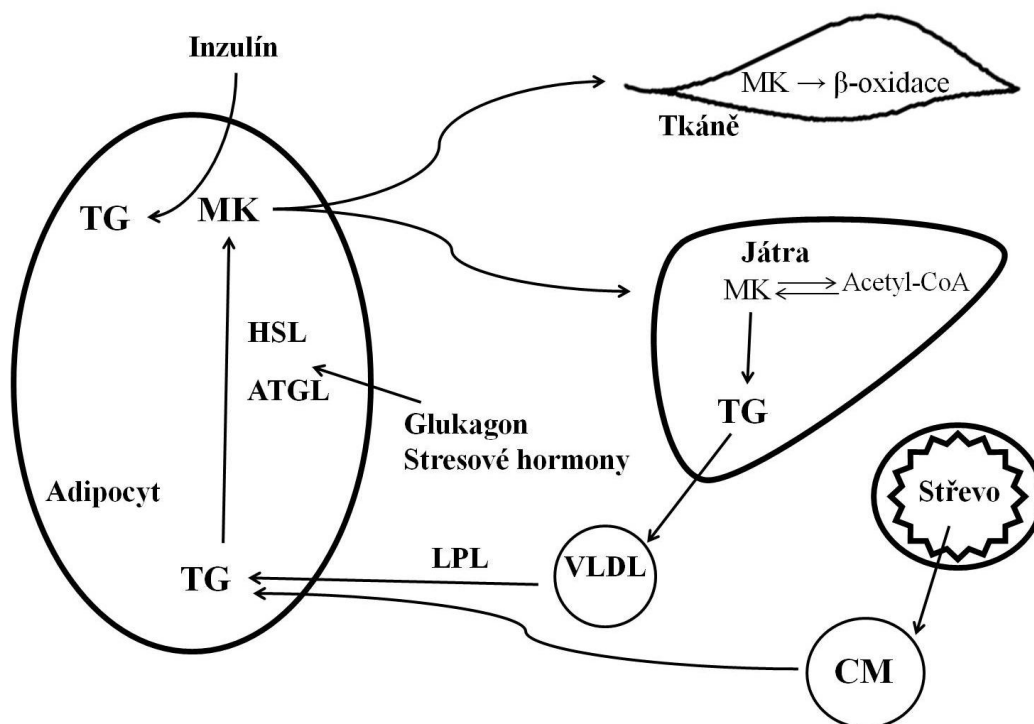
MK jsou v těle metabolizovány β -oxidací na acetyl-CoA, který vstupuje do citrátového cyklu. K odbourávání MK dochází v matrix mitochondrií. MK s krátkým a středně dlouhým řetězcem vstupují do mitochondrií poměrně snadno, MK s dlouhým řetězcem musí být navázány esterovou vazbou na karnitin.

Oxidace mastných kyselin je z velké části regulována koncentrací MK v krvi. Ta je určována rychlostí hydrolýzy TG v tukové tkáni, kterou katalyzují dva enzymy – triglyceridová lipáza tukové tkáně (ATGL) a hormon senzitivní lipáza (HSL). ATGL hydrolyzuje triacylglyceroly na diacylglyceroly (DG), které jsou preferovaným substrátem pro HSL. Za klíčový regulační enzym je považována HSL, která štěpí vznikající DG na volné MK a glycerol, a ty se poté uvolňují do cirkulace. Volné MK jsou v plazmě transportovány vázané na albumin. Tkáně, např. svaly a játra, začnou využívat volné MK jako energetický substrát. V játrech mohou být rovněž použity pro resyntézu TG a transportovány ve VLDL do cirkulace. Při dlouhodobém hladovění játra produkují ketonové látky, které jsou vylučovány do krevního řečiště a mohou být v periferních tkáních použity jako alternativní palivo místo glukózy.

Adrenalin, noradrenalin a glukagon zvyšují koncentraci cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), který alostericky aktivuje cAMP-dependentní proteinkinázu, která fosforyluje HSL. Tímto mechanismem je HSL aktivována a hladina volných MK v krvi stoupá. cAMP-dependentní proteinkináza zároveň inaktivuje acetyl-CoA-karboxylázu, která je jedním z enzymů určujících rychlost syntézy MK. cAMP-dependentní fosforylace tedy inhibuje syntézu MK a současně stimuluje jejich oxidaci.

Naopak inzulín stimuluje tvorbu glykogenu a TG. Inzulín je vylučován jako odpověď na vysokou koncentraci glukózy v krvi. Tento hormon snižuje hladinu cAMP, což vede k defosforylaci, a tedy inaktivaci hormon senzitivní lipázy a ke snížení množství MK pro oxidaci. Poměr glukagon-inzulín je tedy hlavním faktorem určujícím rychlost a směr metabolismu MK.

Syntéza MK *de novo* probíhá ve většině buněk v cytosolu, v době, kdy má organismus nadbytek energie. MK se syntetizují přidáváním dvouuhlíkatých jednotek acetyl-CoA (Voet, 2004).



Obr. 2: Metabolismus triacylglycerolů.

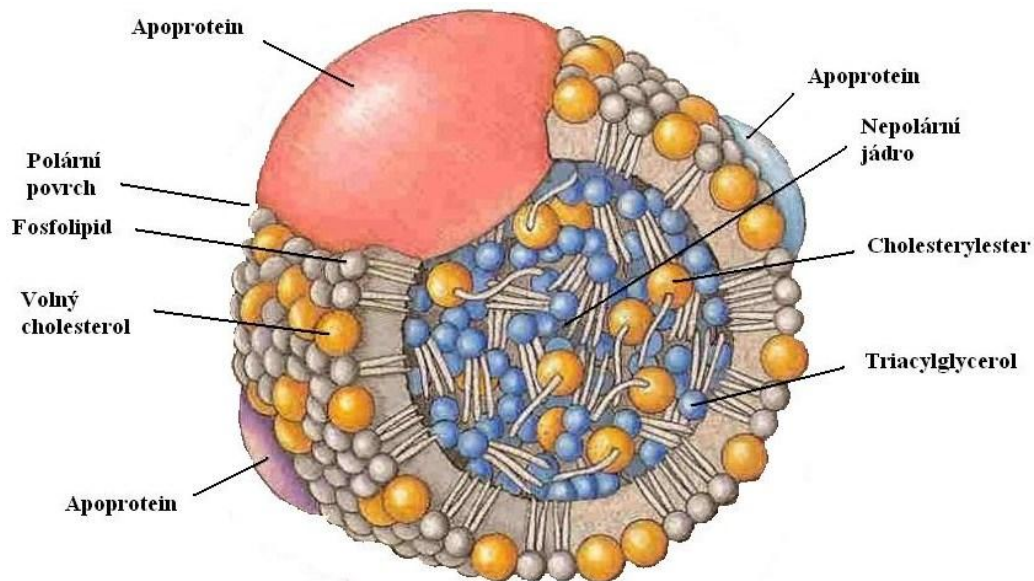
Při hladovění triglyceridová lipáza tukové tkáně (ATGL) a hormon senzitivní lipáza (HSL) hydrolyzují triacylglyceroly (TG) v adipocytu na volné mastné kyseliny (MK). MK se vážou na albumin a jsou v plazmě transportovány do tkání (např. do svalu), kde jsou oxidovány, a do jater. Játra mohou takto získané MK oxidovat na acetylkoenzym A (acetyl-CoA), který je po přeměně na citrát využit v citrátovém cyklu, nebo z nich resyntetizovat TG, které jsou potom transportovány do mimojaterních tkání v částicích lipoproteinů velmi nízké hustoty (VLDL).

Po jídle jsou TG dietního původu ze střeva transportovány pomocí chylomikronů. Z lipoproteinů - chylomikronů a VLDL - jsou TG v cirkulaci hydrolyzovány prostřednictvím lipoproteinové lipázy (LPL) a uvolněné MK jsou vychytány do tukové tkáně, kde mohou být znovu reesterifikovány a uloženy jako zásobárna energie, nebo do jiných tkání, které je mohou využít jako zdroje energie.

Glukagon a stresové hormony stimulují HSL a tím zvyšují hladinu volných MK v krvi. Naopak inzulín stimuluje tvorbu TG, které jsou ukládány do tukové tkáně.

2.3 Lipoproteiny

Lipoproteiny jsou částice, které přenášejí nepolární lipidy - TG a cholesterol - krví. Lipoproteiny vytvářejí kulovité částice, které obsahují nepolární hydrofobní jádro z TG a esterů cholesterolu. Jádro je obklopeno amfifilním obalem z proteinů, fosfolipidů a cholesterolu (Obr. 3).



Obr. 3: Struktura lipoproteinu.
(Upraveno podle Grundy, 1990)

Hustota lipoproteinů roste se snižujícím se poloměrem částice, a to proto, že hustota jejich vnějšího pláště, který obsahuje proteiny, je větší než hustota vnitřního jádra (Voet, 2004). Podle velikosti a hustoty můžeme lipoproteiny rozdělit do 5 tříd (Tab. 1):

1. Chylomikrony
2. Lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL)
3. Lipoproteiny o střední hustotě (IDL)
4. Lipoproteiny o nízké hustotě (LDL)
5. Lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL)

Tab. 1: Přehled hlavních tříd lipoproteinů.
(Upraveno podle Gotto, 2003; Li and Chan, 1999)

Lipoprotein	Velikost [nm]	Relativní hustota	Hlavní lipidová složka	% Podíl lipidů	% Podíl proteinů	Hlavní apoprotein
Chylomikrony	75-1000	< 0,95	TG	98-99	1-2	B-48, C, E
VLDL	30-80	< 1,006	TG	90-93	8	B-100, C
IDL	25-40	1,006-1,019	cholesterol, TG	89	10	B-100
LDL	20-25	1,019-1,063	cholesterol	79	20	B-100
HDL	7,5-10	1,063-1,210	cholesterol	50-55	45-50	A, C, E

Apolipoproteiny nebo apoproteiny (apo) jsou proteinové složky lipoproteinů, které mají strukturální funkci a také hrají klíčovou úlohu v metabolismu lipoproteinových částic (Voet, 2004). Rozhodují totiž o tom, do jakých specifických cílových tkání budou přenášeny lipidy transportovány. Některé apolipoproteiny fungují jako ligandy pro receptory na buněčném povrchu, jiné vystupují jako kofaktory pro enzymy, které transformují přenášeny lipidy (lipázy na buněčném povrchu, lecitin-cholesterolacyltransferáza (LCAT)). Proteinové komponenty lipoproteinů tedy určují, jak budou lipidy v jednotlivých lipoproteinových částicích metabolizovány (Mead *et al.*, 2002).

Tab. 2: Základní charakteristiky apolipoproteinů.
(Upraveno podle Gotto, 2003)

Apolipoprotein	Lipoprotein	Molekulová hmotnost	Plazmatická koncentrace [g/l]	Poznámky
A-I	HDL, chylomikrony	28 000	~ 1,3	Aktivátor LCAT
A-II	HDL, chylomikrony	17 000	~ 0,4	
A-IV	chylomikrony, HDL	44 500		
A-V	chylomikrony, VLDL, HDL	39 000	~ 0,0002	
B-100	VLDL, IDL, LDL	550 000	~ 0,8	Obligátní apolipoprotein VLDL, IDL a LDL, ligand pro LDL receptor
B-48	chylomikrony, remnanty	264 000		Obligátní apolipoprotein chylomikronů a remnantů
C-I	VLDL, HDL, chylomikrony	6 600	~ 0,06	
C-II	VLDL, HDL, chylomikrony	8 900	~ 0,03	Aktivátor LPL
C-III	VLDL, HDL, chylomikrony	8 800	~ 0,12	Inhibitor LPL
D	HDL	22 000	~ 0,10	
E	VLDL, HDL, chylomikrony, remnanty	34 000	~ 0,05	Ligand pro buněčné receptory (LDL receptor a další)

2.3.1 Chylomikrony (CM)

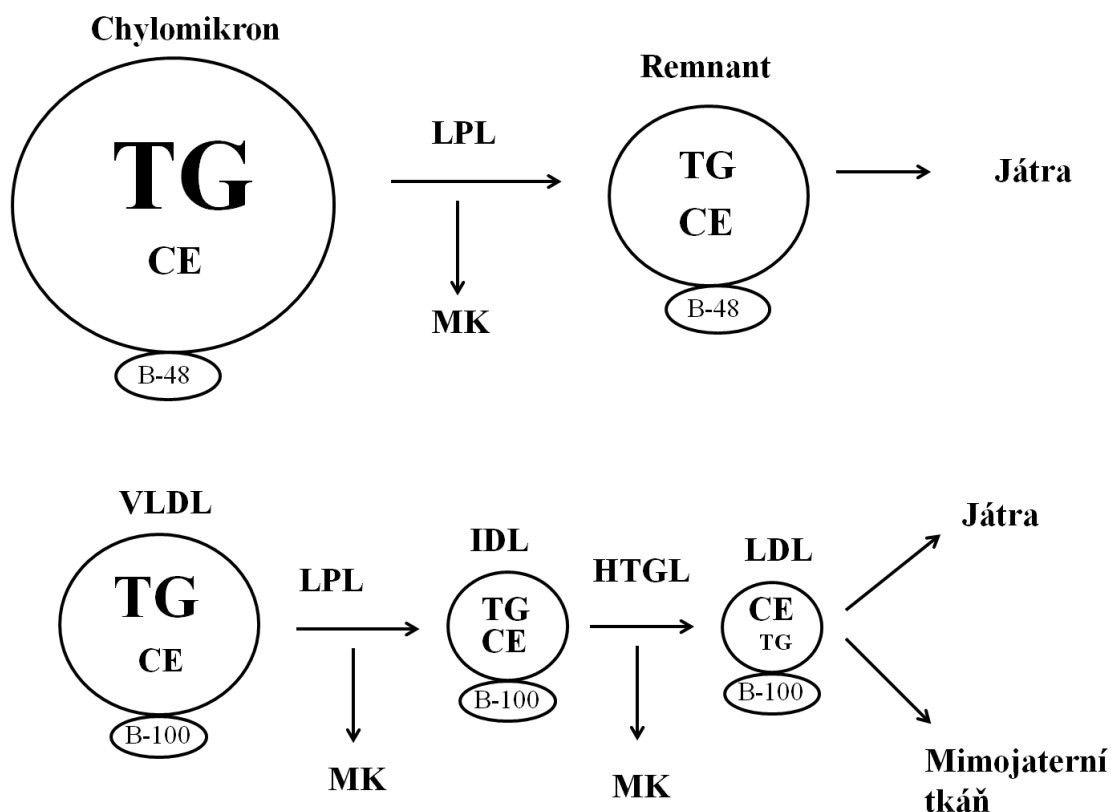
CM transportují TG a cholesterol přijímané v potravě ze střev do tkání. Produkty trávení lipidů – MK a monoacylglycerol (MG) - jsou v enterocytech reesterifikovány na TG a poté jsou inkorporovány do CM. CM vstupují do krevního řečiště prostřednictvím lymfatického systému. CM se vážou na vazebná místa na endotelu kapilár, kde pomocí lipoproteinové lipázy (LPL) dochází k hydrolýze jejich TG. Produkty hydrolýzy MG a MK jsou poté vychytávány tkáněmi. Chylomikrony se hydrolýzou TG zmenšují a vznikají z nich chylomikronové remnanty bohaté na cholesterol (Voet, 2004). Tyto remnanty chylomikronů jsou transportovány do jater, kde se váží na specifické receptory (LDL receptor a remnantní receptor (LRP) prostřednictvím apolipoproteinu E (apo E), přítomném na jejich povrchu (Obr. 4). Všechny chylomikrony obvykle zmizí z cirkulace během 12-14 hodin po tučném jídle (Mead *et al.*, 2002).

2.3.2 Lipoproteiny o velmi nízké, střední a nízké hustotě (VLDL, IL a LDL)

VLDL, IDL LDL přenášejí endogenní TG a cholesterol z jater do tkání. TG syntetizované v játrech jsou inkorporovány do VLDL a uvolňovány přímo do krve. VLDL jsou v cirkulaci stejně jako chylomikrony degradovány lipoproteinovou lipázou (Voet, 2004). VLDL se hydrolýzou TG zmenšují. Vznikající částice, které nesou přibližně stejně molekul cholesterolu a TG jsou označovány IDL. Zhruba polovina IDL je vychytána přímo v játrech podobně jako remnanty chylomikronů, TG zbývajících IDL jsou hydrolyzovány prostřednictvím jaterní lipázy (HL) a z IDL se tvoří částice LDL. LDL transportují zhruba tři čtvrtiny plazmatického cholesterolu. Při přeměně VLDL na LDL jsou téměř všechny jejich proteiny odstraněny a vznikající částice LDL nese jedinou molekulu apo B-100 (Obr. 4), (Voet, 2004).

2.3.3 Lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL)

HDL přenáší endogenní cholesterol z tkání do jater v procesu označovaném jako reverzní transport cholesterolu. Cirkulující HDL vychytávají přebytečný volný cholesterol z buněčných membrán, ten je v HDL esterifikován na cholesterylestery působením LCAT, enzymem aktivovaným apolipoproteinem A-1. Dalším zdrojem cholesterolu a fosfolipidů pro částice HDL jsou cholesterol a fosfolipidy z povrchu chylomikronů a VLDL, které jsou uvolňovány po hydrolýze jejich TG působením LPL (Voet, 2004).



Obr. 4: Metabolismus lipoproteinů transportujících TG v plazmě.

2.4 Lipázy štěpící TG v cirkulaci

Lipoproteinová, jaterní a endoteliální lipáza patří do stejné proteinové rodiny, ale liší se substrátem, který hydrolyzují. Zatímco LPL hydrolyzuje téměř výhradně TG ve velkých lipoproteinových částicích, jako jsou CM a VLDL, jaterní lipáza (HL) používá jako substrát fosfolipidy a TG v malých lipoproteinových částicích, jako jsou IDL, LDL a HDL. Endoteliální lipáza (EL) má převážně fosfolipázovou aktivitu a velmi malou triacylglyceridázovou aktivitu (Annema and Tietge, 2011; Das, 2005).

2.4.1 Endoteliální lipáza (EL)

Endoteliální lipáza (EL) je syntetizována a sekretována cévními endoteliálními buňkami. Na povrchu endoteliálních buněk je navázána pomocí heparansulfátproteoglykanu (HSPG). EL je exprimována v lidské placentě, štítné žláze, plicích, ledvinách, vaječnicích a varlatech. Tento enzym má primárně *sn*-1-fosfolipázovou aktivitu a je aktivní ve všech podtřídách lipoproteinů, nicméně preferovaným substrátem jsou fosfolipidy HDL. Tím, že EL snižuje obsah fosfolipidů v HDL, významně snižuje hladinu plazmatických HDL (Annema and Tietge, 2011).

U myši s knockoutovaným genem pro EL^(-/-) byla pozorována zvýšená hladina HDL-cholesterolu a také větší velikost částic HDL (Yasuda *et al.*, 2010).

2.4.2 Jaterní lipáza (HL)

HL je glykoprotein syntetizovaný a sekretovaný játry. Na buněčný povrch hepatocytů a endoteliálních buněk je vázána pomocí HSPG, obdobně jako LPL a EL.

Hlavní úloha jaterní lipázy je v katabolismu a přeměně IDL, LDL a HDL. Deficit jaterní lipázy u lidí má mnohem méně dramatický efekt na lipoproteinový profil než deficit LPL, ale je spojen s předčasnou aterosklerózou (Olivecrona and Olivecrona, 1995).

2.4.3 Lipoproteinová lipáza (LPL)

Již ve 40. letech zjistil Hahn, že *i.v.* aplikace heparinu vyčeřuje lipemické sérum (Hahn, 1943). V první polovině 50.let potom Korn prokázal, že faktorem odpovědným za vyčeření séra („lipid clearing factor“) je enzym, který pojmenoval lipoproteinová lipáza (Korn, 1955a, b).

Koncem 50. let Havel a Gordon studovali poheparinovou plazmu pacientů s těžkou formou geneticky podmíněné hypertriacylglycerolémie. Zjistili, že tito pacienti nejsou schopni z krevního oběhu odstranit CM a prokázali, že LPL je klíčovým enzymem pro jejich katabolismus (Havel and Gordon, 1960). Lipoproteinové lipáze je věnována následující kapitola.

2.5 Lipoproteinová lipáza (LPL)

2.5.1 Funkce LPL

LPL hydrolyzuje TG obsažené v lipoproteinech, především v CM a VLDL, a tím uvolňuje MK pro potřeby periferních tkání. To je nezbytný první krok v metabolismu lipoproteinů, které transportují TG. Jako důkaz slouží těžká hypertriglyceridémie, kterou lze pozorovat u pacientů s deficitem LPL (Olivecrona and Olivecrona, 1995). Lipoproteinové částice bohaté na TG jsou totiž příliš velké a nemohou proniknout kapilárním endotelem. Proto je LPL fyziologicky aktivní na lumenálnímu povrchu endoteliálních buněk kapilár, ke kterým je enzym připojen pomocí negativně nabitých membránově vázaných řetězců heparansulfátproteoglykanů (HSPG). Z této vazby může být kompetitivně vytěsněn heparinem, čehož se využívá při stanovení aktivity tohoto enzymu (Mead *et al.*, 2002). Intravenózní podání heparinu totiž vede k disociaci LPL

z vazby na HSPG a aktivitu LPL je potom možné stanovit v poheparinové plazmě (Merkel *et al.*, 2002).

LPL je nejvíce exprimována v tkáních, které MK používají jako palivo (např. srdce a kosterní sval) nebo MK ukládají jako TG (tuková tkáň). Proto jsou svaly a tuková tkáň považovány za hlavní tkáně, které kontrolují hladinu plazmatických TG. Nicméně, LPL je exprimována i v jiných tkáních - nervovém systému, nadledvinkách, makrofázích, proximálních tubulech ledvin, ostrůvcích pankreatu a plicích. V těchto orgánech může mít LPL i další specializované funkce (Merkel *et al.*, 2002). Během fetálního vývoje je LPL syntetizována i hepatocyty, ale tato produkce enzymu je brzy po narození suprimována, a proto je LPL považována za extrahepatální enzym (Davies *et al.*, 2012; Mead *et al.*, 2002).

2.5.2 Struktura a exprese LPL

LPL je glykoprotein obsahující 8-12 % sacharidů. Aktivní forma LPL je nekovalentní homodimer, jeho disociace vede k ireversibilní inaktivaci enzymu. Dimerní LPL má 600x vyšší afinitu k heparinu a váže se na HSPG. Tato interakce je zprostředkována kooperací několika heparin-vazebných domén obou podjednotek (Mead *et al.*, 2002).

Gen pro LPL je lokalizován na krátkém raménku 8. chromozómu (8p22), je tvořen 10 exony a vykazuje podstatnou sekvenční homologii mezi většinou zkoumaných druhů (Wong and Schotz, 2002). Lidský gen pro LPL kóduje protein o délce 475 aminokyselin, ze kterého po odstranění signálního proteinu vzniká protein obsahující 448 aminokyselin.

Ačkoliv fyziologické místo pro aktivitu LPL je na lumenálnímu povrchu krevních cév, cévní endoteliální buňky samotné LPL nesyntetizují. LPL je syntetizována parenchymálními buňkami příslušné tkáně (např. myocyty a adipocyty). Počátečním krokem v syntéze a sekreci je transkripce genu pro LPL v jádře. V hrubém endoplazmatickém retikulu (ER) je mRNA translatována do nascentního polypeptidu. Prvním krokem v posttranslačních úpravách je glykosylace, která je zahájena už v průběhu translace. Glykosylace začíná připojením oligosacharidu na *N*-konec v ER. Protein je dále transportován z ER do kompartmentů Golgiho aparátu (GA), kde je dokončena syntéza komplexních oligosacharidových řetězců (Braun and Severson, 1992). *N*-glykosylace proteinu je nezbytná pro jeho katalytickou aktivitu (Mead *et al.*, 2002). Maturovaná LPL je transportována do *trans*-GA, odkud je buď odštěpen

sekreční váček, který putuje na buněčný povrch, kde se enzym naváže na HSPG nebo je enzym směřován do lyzozomů, kde dochází k degradaci. Poté je enzym z parenchymálních buněk translokován do subendoteliálního prostoru a přenesen prostřednictvím GPIHBP1 („glycosylphosphatidylinositol-anchored HDL-binding protein 1“ – protein vázající HDL ukotvený na glykosylfosfatidylinositolu) na luminální stranu kapilárního endotelu. Zde se váže na HSPG případně zůstává ukotven prostřednictvím GPIHBP1 (Braun and Severson, 1992; Davies *et al.*, 2012).

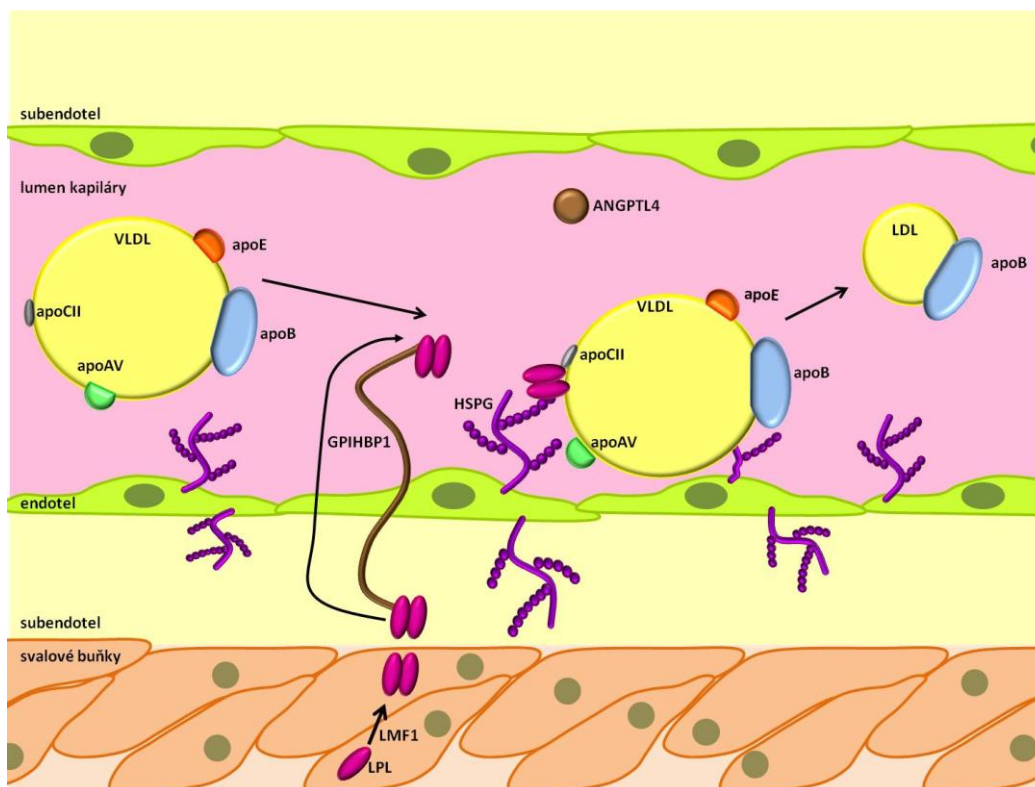
2.5.3 Deficience LPL

Deficience LPL je autozomálně recesivní porucha s odhadovanou frekvencí 1 : 1 000 000. Homozygotní deficit dramaticky ovlivňuje koncentraci a složení lipoproteinů. V cirkulaci se hromadí CM a koncentrace TG vzrůstá více než řádově, výrazně je snížena koncentrace LDL i HDL. Tento typ hyperlipoproteinémie je označován jako hyperlipoproteinémie typu I nebo hyperchylomikronémie. I když riziko aterosklerózy není u pacientů s touto poruchou pravděpodobně zvýšeno, při koncentracích TG nad 10 mmol/l prudce vzrůstá riziko ataku akutní pankreatitidy, která představuje komplikaci ohrožující život (Bhatnagar, 1999). Dosud byla sice popsána celá řada mutací v genu pro LPL spojených se ztrátou funkce enzymu, ale u většiny pacientů s hyperchylomikronémií nebyla nalezena mutace v genu pro LPL, což naznačuje, že vedle LPL je za rozvoj této poruchy odpovědný i deficit dalších proteinů, které se podílí na metabolismu TG (Dallinga-Thie *et al.*, 2010).

Heterozygotní deficit LPL je spojován se sníženou aktivitou LPL, což může zvyšovat riziko familiální kombinované hyperlipidémie (FCHL) a předčasné aterosklerózy. Ačkoliv se zdá být zřejmé, že redukce aktivity LPL by mohla vést k zvýšení TG a k poklesu HDL, a tedy k předčasné ateroskleróze, ne všechny studie tento vztah prokázaly. Typ mutace v LPL může ovlivňovat progresi aterosklerózy (Merkel *et al.*, 2002).

2.5.4 Faktory ovlivňující funkci LPL

Funkce LPL a účinnost lipolýzy je regulována několika proteiny, z nichž některé byly identifikovány teprve nedávno. Jejich předpokládanou úlohu zobrazuje následující obrázek (Obr. 5).



Obr. 5: Lipoproteinová lipáza a faktory ovlivňující její funkci a aktivitu.
(Upraveno podle Dallinga-Thie, 2009)

2.5.4.1 LMF1

LMF1 („lipase maturation factor 1“ – lipázový maturační faktor) má esenciální roli v procesu maturace lipázy, ve formování katalyticky aktivní LPL z nově syntetizovaného polypeptidu v ER. LMF1 je transmembránový protein lokalizovaný v ER (Dallinga-Thie *et al.*, 2010). LMF1 je chaperon, který v ER odpovídá za posttranslační aktivaci lipáz, za maturaci homodimerů a za vznik a stabilizaci aktivních dimerů LPL, HL i EL. Důležité aspekty biologie LMF1 zůstávají dosud nejasné (Peterfy, 2012).

Lidský gen pro LMF1 je lokalizován na krátkém raménku 16. chromozómu, skládá se z 11 exonů a kóduje protein skládající se z 567 aminokyselin o molekulové hmotnosti 65 kDa. Mutace v genu pro LMF1 způsobují kombinované deficity lipázy, neboť ovlivňují LPL i jaterní lipázu, což vede k těžkým hypertriglyceridemiím (Dallinga-Thie *et al.*, 2010).

2.5.4.2 GPIHBP1

Když Beigneux a kol. studovali u *Gpihbp1* deficitních myší funkci proteinu GPIHBP1 („glycosylphosphatidylinositol-anchored HDL-binding protein 1“ – protein vázající HDL ukotvený na glykosylfosfatidylinositolu), o kterém bylo známo, že váže

HDL, a zjistili, že jeho absence vede k hyperchylomikronémii. Protein se dle nich nachází na luminálním povrchu kapilár, kde váže LPL a CM. Byly nalezeny velké rozdíly v expresi GPIHBP1 v různých tkáních. Zatímco v kapilárách tkání jako jsou tuková tkáň, srdce a kosterní svaly byla exprese vysoká, v mozku nebyla prakticky žádná. Tím, že GPIHBP1 má schopnost vázat LPL i chylomikrony tvoří „platformu“ pro lipolýzu a hraje důležitou roli v regulaci přísunu MK do buněk (Beigneux *et al.*, 2007).

Později bylo dokázáno, že GPIHBP1 je esenciální pro vstup LPL do kapilár. Davies a kol. prokázali, že GPIHBP1 exprimované v endoteliálních buňkách má schopnost transportovat LPL a GPIHBP1-specifickou monoklonální protilátku z bazolaterálního povrchu na apikální povrch buňky. U *Gpihbp1*^{-/-} myši nebyla LPL navázána na lumen kapilár. Tyto důkazy svědčí pro hypotézu, že GPIHBP1 je zodpovědné za transport LPL z intersticiálního prostoru na lumen kapilár (Davies *et al.*, 2010).

2.5.4.3 Proteiny podobné angiopoietinu („angiopoietin-like proteins“)

ANGPTL3 („angiopoietin-like protein 3“ - protein podobný angiopoietinu 3) se tvoří hlavně v játrech a reverzibilně inhibuje aktivitu LPL tím, že blokuje katalytickou a i nekatalytickou funkci LPL. ANGPTL3 je specifickým inhibítozem LPL, neinhibuje EL ani HL. Hladina ANGPTL3 je zvýšena v postprandiálním stavu (Liu *et al.*, 2010).

ANGPTL4 („angiopoietin-like protein 4“ - protein podobný angiopoietinu 4) inhibuje LPL a zpomaluje katabolismus lipoproteinů tak, že ireverzibilně přeměňuje katalyticky aktivní dimery LPL na inaktivní monomery (Mattijssen and Kersten, 2012; Sukonina *et al.*, 2006). Hladina ANGPTL 4 je zvýšena při hladovění, čímž ovlivňuje změny plazmatických TG a metabolismus volných MK. (Mattijssen and Kersten, 2012). Inhibice aktivity LPL tedy vede ke zvýšení hladiny plazmatických TG. Mutace v ANGPTL4, vedoucí ke ztrátě jeho funkce, jsou vzácné a byly identifikovány u jedinců s nízkou hladinou plazmatických TG (Dallinga-Thie *et al.*, 2010).

2.5.4.4 Apolipoprotein C-II

Apolipoprotein C-II (apo C-II) je důležitým kofaktorem LPL. Pro aktivaci je nezbytná interakce záporně nabitých zbytků na C-konci apo C-II s doménou LPL

nesoucí kladný náboj. Aktivita LPL v nepřítomnosti apo C-II je prakticky nedetekovatelná (Mead, J. R. et al.; 2002)

Jeho deficit vede k rozvoji hyperchylomikronémie podobně jako deficit LPL (Bhatnagar, 1999; Dallinga-Thie *et al.*, 2010). Apo C-II je navázán na povrchu chylomikronů, VLDL a HDL. Plazmatická koncentrace apo C-II je přibližně 0,04 g/l. Gen pro apo C-II je lokalizován na dlouhém raménku 19. chromozómu (19q), protein se skládá ze 79 aminokyselin. Na N-konci proteinu se nachází vazebná doména pro lipoproteiny, zatímco C-konec je zodpovědný za aktivaci LPL. Apo C-II je exprimován v játrech a ve střevech (Kei *et al.*, 2012).

2.5.4.5 Apolipoprotein A-V

Důležitým mezníkem ve studiu metabolismu TG bylo v roce 2001 objevení nového apolipoproteinu, a to apolipoproteinu A-V (apo A-V). Byl popsán nezávisle na sobě dvěma skupinami. Jedna z nich ho identifikovala jako nový gen odpovědný za regulaci triglyceridémie metodou komparativního sekvenování (Pennacchio *et al.*, 2001), druhá skupina ho identifikovala jako jeden z nejvíce exprimovaných genů při regeneraci jater po 70% chirurgické resekci u myši (van der Vliet *et al.*, 2001). U člověka bylo poté objeveno několik variant genu, které jsou spojeny se zvýšenou hladinou TG (-1131T>C, -3A>F, S19W) a které vedou k defektní transkripci, translaci nebo sekreci proteinu (Sharma *et al.*, 2012).

Hypotézu, že apo A-V je důležitým faktorem, který reguluje plazmatickou hladinu TG, podpořil i nález, že transgenní myši s lidským apo A-V měli o dvě třetiny nižší plazmatickou hladinu TG oproti kontrolním myším a myši s knockoutovaným *Apoav* měli triglyceridémii čtyřikrát vyšší než myši kontrolní (Pennacchio *et al.*, 2001).

Ve studiích na myších *in vivo* i *in vitro* bylo zjištěno, že apo A-V urychluje hydrolyzu TG zprostředkovanou LPL (Schaap *et al.*, 2004). Mechanismus jeho působení na aktivitu LPL nebyl dosud jednoznačně objasněn, je možné, že spolu s GPIHBP1 usnadňuje interakci mezi LPL a chylomikrony na lumenálním povrchu kapilár (Sharma *et al.*, 2012). Proti přímé aktivaci svědčí jeho velmi nízká koncentrace v cirkulaci – je o více než 2 řády nižší než koncentrace apo C-II. Přímý efekt na aktivaci LPL se rovněž nepodařilo ukázat v pokusech *in vitro* (Lookene *et al.*, 2005), autoři však uzavřeli, že apo A-V na VLDL nebo chylomikronech se může vázat na HSPG a tak usnadnit interakci mezi částicí lipoproteinu a LPL.

Apo A-V má ale zřejmě vliv na koncentraci TG i na jiné úrovni. Bylo rovněž dokumentováno, že snižuje jaterní sekreci VLDL-TG (Schaap *et al.*, 2004). Zdá se, že apo A-V může ovlivnit proces redistribuce TG v hepatocytu mezi tukové kapénky a částice VLDL (Sharma *et al.*, 2012).

2.5.5 Regulace aktivity LPL

Aktivita LPL je regulována nutričním stavem, fyzickou aktivitou organismu a hormony jako jsou inzulín a katecholaminy. Podstatné je, že regulace aktivity LPL je tkáňově specifická - MK uvolněné při hydrolýze TG CM a VLDL jsou směřovány do tkání v souladu s metabolickými potřebami.

Po jídle je zvýšena aktivita LPL v tukové tkáni a uvolněné MK jsou tedy preferovaně vychytávány do tukové tkáně, reesterifikovány a ukládány jako TG. Současně klesá aktivita LPL ve svalu. Tyto změny aktivity LPL v postprandiálním stavu jsou zřejmě indukovány inzulínem. Při euglykemickém hyperinzulínovém clampu aktivita LPL v tukové tkáni několikanásobně vzrůstá a ve svalu klesá (Farese *et al.*, 1991; Kiens *et al.*, 1989; Sadur and Eckel, 1982). Naopak při hladovění se aktivita LPL v tukové tkáni snižuje a MK uvolněné z lipoproteinů jsou směřovány především do svalové tkáně. Ve studii u 30 zdravých mužů, kteří 30 hodin hladověli, byla naměřena zvýšená aktivita LPL v poheparinové plazmě, významně zvýšená aktivita LPL ve svalové tkáni a naopak snížená aktivita LPL v tukové tkáni (Ruge *et al.*, 2001; Ruge *et al.*, 2005).

Významným faktorem, který ovlivňuje aktivitu LPL je i fyzická aktivita. U netrénovaných jedinců, kteří začnou cvičit, dojde ke zvýšení cholesterolu v HDL a ke snížení triglyceridémie. Tyto změny jsou pravděpodobně způsobeny vzestupem aktivity LPL. Prodloužené cvičení indukuje vzestup aktivity LPL v poheparinové plazmě (Kantor *et al.*, 1984; Kantor *et al.*, 1987). U běžců – vytrvalců bylo zjištěno, že aktivita LPL je zvýšená nejen ve svalu, ale i v tukové tkáni oproti netrénovaným zdravým osobám nebo sprinterům (Nikkila *et al.*, 1978).

Dalším faktorem, který ovlivňuje aktivitu LPL, je konzumace alkoholu. Umírněná konzumace alkoholu příznivě ovlivňuje kardiovaskulární morbiditu a mortalitu a zhruba polovina protektivního účinku alkoholu je připisována zvýšené koncentraci cholesterolu v HDL částicích. Bylo ale také ukázáno, že dlouhodobá umírněná konzumace alkoholu zvyšuje aktivitu LPL (Kovář and Poledne, 2004; Nishiwaki *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1985). Pokud je alkohol podán s jídlem,

zvyšuje rozsah postprandiální lipémie (Fielding *et al.*, 2000; Mudráková *et al.*, 2013; Pownall, 1994; Wilson *et al.*, 1970). To by mohlo být vysvětleno tím, že bezprostředně po podání alkoholu dochází k inhibici aktivity LPL – pro toto tvrzení jsou však k dispozici pouze nepřímé důkazy (Pownall, 1994; Schneider *et al.*, 1985).

2.5.6 Stanovení LPL

Pro stanovení LPL se využívá celé řady metod, které se od sebe výrazně liší. Při interpretaci výsledků jednotlivých studií je proto nutné mít na zřeteli, jakým způsobem byla aktivita enzymu stanovena.

LPL je poměrně pevně vázána k povrchu endoteliálních buněk pomocí nabitých membránově vázaných řetězců HSPG a její aktivitu tedy nelze v plazmě stanovit. Z vazby na HSPG může být kompetitivně vytěsněna heparinem. Intravenózní podání heparinu totiž vede k disociaci LPL z vazby na HSPG a k uvolnění aktivní LPL do plazmy. Hodnoty aktivity LPL v poheparinové plazmě odráží celkovou aktivitu LPL v organismu, nevypovídají ale o aktivitě v jednotlivých orgánech.

Pro měření aktivity LPL ve specifických tkáních (svalové nebo tukové) lze u člověka využít biopticky získaných vzorků. Odebraný vzorek tkáně je extrahován pufrům obsahujícím heparin a aktivita enzymu se stanovuje v získaném eluátu (Bengtsson-Olivecrona and Olivecrona, 1992).

Aktivita LPL se obvykle stanovuje metodou využívající jako substrát radioaktivně značený trioleylglycerol. Vzorek se inkubuje s Intralipidem značeným ^3H -triolellyglycerolem, MK uvolněné během inkubace jsou separovány a je měřena radioaktivita uvolněného ^3H -oleátu, ze které je vypočítána aktivita vzorku. Aktivita HL se inhibuje specifickou protilátkou (Bengtsson-Olivecrona and Olivecrona, 1992).

Obdobně se stanovuje i aktivita HL – jako substrát je používána emulze trioleoylglycerolu značená ^3H -trioleoylglycerolem stabilizovaná arabskou gumou. Stanovení se provádí v pufru obsahujícím 1M chlorid sodný, který aktivitu LPL inhibuje – dochází k denaturaci enzymu (Bengtsson-Olivecrona and Olivecrona, 1992).

Aktivitu LPL je možné stanovit i *in vivo* pomocí tzv. intravenózního tukového tolerančního testu (IVTTT), kdy je studovaným subjektům *i.v.* aplikován Intralipid (infuzní tuková emulze používaná při parenterální výživě) a po dobu následujících 40 minut je v pětiminutových intervalech odebírána krev pro nefelometrické stanovení koncentrace velkých částic tukové emulze. Z naměřených hodnot se vypočítává

rychlostní konstanta k_2 (konstanta 2. řádu) pro vyčerení tukové emulze, která je považována za míru aktivity LPL *in vivo* (Lewis *et al.*, 1972; Rossner, 1974).

Vedle aktivity enzymu lze stanovit i jeho koncentraci v plazmě nebo poheparinové plazmě pomocí komerčně dostupných ELISA kitů.

3. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Úloha apo A-V v aktivaci LPL nebyla dosud jednoznačně prokázána a zdá se být nepravděpodobná vzhledem k jeho nízké koncentraci. Prvním cílem diplomové práce bylo zjistit, zda apo A-V může být uvolněn intravenózní aplikací heparinu do cirkulace podobně jako LPL, a zda tedy jeho koncentrace v cirkulaci stoupá po intravenózní aplikaci heparinu podobně jako aktivita LPL.

Umírněná konzumace alkoholu je spojena se zvýšenou aktivitou LPL. Naproti tomu se předpokládá, že bezprostředně po konzumaci dochází k inhibici enzymové aktivity. Pro toto tvrzení však v literatuře dosud chybí důkaz. Dalším cílem diplomové práce tedy bylo ověřit pomocí opakovaného IVTTT, zda je aktivita LPL *in vivo* po podání alkoholu skutečně inhibována.

Vyhodnocení IVTTT se provádí nefelometricky a cílem této práce bylo zjistit, zda výsledky tohoto testu lze hodnotit na základě stanovení TG.

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Uspořádání experimentu u zdravých dobrovolníků

4.1.1 Vliv intravenózní aplikace heparinu na koncentraci apo A-V

Vyšetření bylo provedeno u 6 dobrovolníků - 4 mužů a 2 žen (věk: $23 \pm 1,5$ roku, index tělesné hmotnosti (BMI): $22,4 \pm 0,7$ kg/m²). Dobrovolníci byli informováni o rizicích spojených s odběry krve, podáním heparinu a podepsali informovaný souhlas.

Vyšetření bylo provedeno nalačno v Laboratoři pro výzkum aterosklerózy Centra experimentální medicíny IKEM. Dobrovolníkům byla zavedena kanyla a proveden první odběr. Poté byl kanylou intravenózně (*i.v.*) aplikován heparin (100 IU/kg hmotnosti) a 5, 10, 20, 40 a 60 minut po aplikaci byla odebírána krev do odběrových zkumavek s heparinem.

Krev byla centrifugována (15 min, 3 000x g, 4 °C). V den experimentu byly z odebrané plazmy stanoveny hodnoty TG a cholesterolu. Veškerá manipulace se vzorky probíhala v lázni voda-led. Alikvoty odebrané plazmy pro měření dalších parametrů byly uchovány v -80 °C. V alikvotech plazmy byly stanoveny hodnoty koncentrace apo A-V a aktivita LPL.

4.1.2 Regulace lipoproteinové lipázy po podání alkoholu

Do studie bylo zařazeno 8 mladých zdravých mužů (věk 24 ± 1 rok, BMI: $24,5 \pm 2,2$ kg/m²). Dobrovolníci byli informováni o rizicích spojených s odběry krve, *i.v.* aplikací Intralipidu, podáním heparinu a podepsali informovaný souhlas. Před studií bylo u dobrovolníků provedeno kontrolní vyšetření zahrnující jaterní testy a vyšetření parametrů srážlivosti krve.

V rámci experimentu každý dobrovolník absolvoval 2 vyšetření. V jednom vyšetření mu byl podán alkohol (vodka Finlandia), v kontrolním vyšetření stejné množství vody. Vyšetření byla prováděna v Laboratoři klinické patofyziologie Centra diabetologie IKEM.

Na začátku vyšetření byla dobrovolníkům zavedena do žíly kanyla. Poté byl kanylou do žíly aplikován Intralipid (20% tuková emulze používaná pro nitrožilní výživu pacientů v kritickém stavu, obsahuje 20 % sójového oleje a jako pomocné látky vaječný lecitin a glycerol) v množství 0,5 ml/kg hmotnosti. Po dobu následujících

40 minut byly z kanyly odebírány v 5minutových intervalech vzorky krve. Toto vyšetření je označováno jako intravenózní tukový toleranční test (IVTTT). Šedesát minut po aplikaci Intralipidu dobrovolníci vypili 80 ml vodky. Dvě a čtyři hodiny po vypití alkoholu byl znovu kanylou aplikován Intralipid a provedeny další odběry krve v 5minutových intervalech po dobu 40 minut. Po skončení pokusu byl dobrovolníkům aplikován heparin (100 UI/kg hmotnosti) a 10 minut po aplikaci heparinu byl odebrán poslední vzorek krve (Obr. 6).

V časech 0, 40, 55, 90, 120, 180, 220, 300 a 340 minut byla odebírána krev pro stanovení lipidů, inzulínu a glukózy, v časech 55, 90, 120, 180 a 300 minut pro stanovení etanolu, v časech 0, 55, 120, 180 a 300 minut pro izolaci VLDL (Obr. 7).

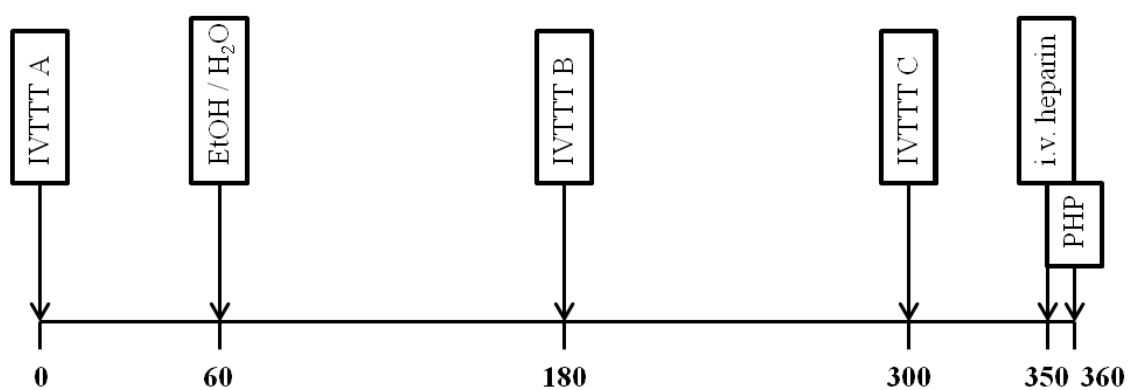
Během vyšetření byla kanyla kontinuálně promývána fyziologickým roztokem bez přídavku heparinu.

Odstup mezi jednotlivými vyšetření byl minimálně 1 týden. Dobrovolníci byli poučeni, aby se 2 dny před experimentem vyvarovali konzumace alkoholu. V průběhu jednotlivých vyšetření byli dobrovolníci v klidu na lůžku a obdrželi pouze vodu. Pořadí obou vyšetření - s vodou a s alkoholem - bylo randomizováno. Polovina dobrovolníků zahájila studii konzumací alkoholu, druhá polovina vodou.

Odebrané vzorky krve byly centrifugovány (15 min, 3 000x g, 4 °C). V den experimentu byly stanoveny koncentrace etanolu, TG, cholesterolu, glukózy a neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK), a ze vzorků séra odebíraných v průběhu IVTTT byla stanovena rychlostní konstanta k_2 pro vyčerení tukové emulze. Ve 3 křivkách získaných v průběhu IVTTT byla též stanovena koncentrace TG a glycerolu.

Alikvoty plazmy pro měření dalších parametrů byly uchovány v - 80 °C. Z těchto vzorků byly stanoveny aktivita LPL, koncentrace LPL a koncentrace inzulínu.

Ze zbývajících plazmy (2,5 – 4,5 ml) byly izolovány VLDL ultracentrifugací a stanoven VLDL-cholesterol, VLDL-TG a VLDL-apoB.



Obr. 6: Časová osa experimentu.

Na ose je znázorněn čas experimentu v minutách a provedení jednotlivých testů.

IVTTT – intravenózní tukový toleranční test, EtOH/H₂O - podání alkoholu nebo vody v kontrolním pokusu, PHP – odběr krve pro získání poheparinové plazmy.

Vliv orálně podaného alkoholu na rychlost clearance intravenózně podaného Intralipidu

VODKA

Dobrovolník:		Kód:
příjmení	Datum:
jméno		
r.č.		
hmotnost:		

Označení odběrových zkumavek:

N = nefelometrie (2,5 ml červ. vakueta) (A0-A40, B0-B40, C0-C40) ~ 1 ml krve	27x
L = "lipidy" (8 ml červ. vakueta s gelem) (A0, A0, A40, 0, 0, 30, 60, 60, B0,B0, B40, C0, C0, C40)	14x
H = poheparinová plazma (8 ml zelená vakueta)	1x
E = zelená vakueta s gelem (5 ml)	5x

Test	Čas (min)	Znač. zkumavek
IVTTT A	0	A0 zavedení kanyly O: N + 2xL i.v. podání 20% Intralipidu (0,5 ml/kg ~ml) [.....min..... s] * v okamžiku zahájení aplikace (max. 2 min) se spouští stopky - čas 0
	5	A5 O: N
	10	A10 O: N
	15	A15 O: N
	20	A20 O: N
	25	A25 O: N
	30	A30 O: N
	35	A35 O: N
	40	A40 O: N + L
	55	0 kanyla se kontinuálně promývá pomalu kapajícím fyziologickým roztokem O: 2xL + E
	vypítí 0,8 dl alkoholu (nebo vody v kontrolním pokusu)	
etanol	0	* v okamžiku, kdy dobrovolník dopije, spouští se stopky pro etanol = čas 0
	30	30 O: L + E
	60	60 O: 2xL + E
	120	120 = B0 O: 2xL + N + E
IVTTT B (180')		i.v. podání 20% Intralipidu (0,5 ml/kg ~ml) [.....min..... s] * v okamžiku zahájení aplikace (max. 2 min) se spouští stopky - čas 0
	5	B5 O: N
	10	B10 O: N
	15	B15 O: N
	20	B20 O: N
	25	B25 O: N
	30	B30 O: N
	35	B35 O: N
	40	B40 O: N + L
	120	C0 O: N + 2xL + E
	IVTTT C (300')	
5		C5 O: N
10		C10 O: N
15		C15 O: N
20		C20 O: N
25		C25 O: N
30		C30 O: N
35		C35 O: N
40		C40 O: N + L
50		i.v. aplikace heparinu (100 IU/kg = 1 ml/50 kg =ml)
60		H O: H

Obr. 7: Odběrový protokol.

4.2 Materiál a metody

4.2.1 Stanovení lipidů, glukózy a NEMK

Celkový cholesterol, TG, glukóza, NEMK, cholesterol ve frakcích izolovaných ultracentrifugací a TG ve frakcích izolovaných ultracentrifugací byly stanoveny enzymatickými metodami na analyzátoru Hitachi 902 Automatic analyzer (Roche, Mannheim, Německo) v Lipidové laboratoři Laboratoře pro výzkum aterosklerózy IKEM. Pro stanovení TG byl použit kit GPO-PAP Sys 917 Cobas (Roche, Mannheim, Německo), pro stanovení cholesterolu kit Cholesterol SYS 1 Cobas (Roche, Mannheim, Německo), pro stanovení glukózy kit Biotest Glu GOD (PLIVA Lachema Diagnostika s.r.o., Brno) a pro stanovení NEMK kit Nefa-HR (Wako Chemicals GmbH, Německo).

4.2.2 Stanovení etanolu

U dobrovolníků, kterým byla podána voda, byla odebrána krev pro stanovení koncentrace etanolu v krvi pouze v čase 0. U dobrovolníků, kterým byla podána vodka, byla odebrána krev pro stanovení koncentrace alkoholu v krvi před podáním alkoholu a 30, 60, 120 a 240 minut po něm. Krev byla nabírána do heparinizovaných vakuet se separačním gelem, ihned centrifugována (15 min, 3 000x g, 4 °C) a ponechána v lednici do stanovení.

Stanovení bylo provedeno na oddělení Klinické biochemie Thomayerovy nemocnice kitem Ethanol Gen. 2 COBAS (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo).

4.2.3 Ultracentrifugace

Princip metody:

Jednotlivé lipoproteiny se liší v obsahu tuků a proteinů, a tedy i hustotou. Této vlastnosti se využívá při jejich ultracentrifugační izolaci (Havel *et al.*, 1955). Lipoproteiny o hustotě nižší než je hustota roztoku flotují a lze je separovat. VLDL flotují při hustotě 1,006 g/ml, která odpovídá hustotě fyziologického roztoku. V oddělených frakcích je stanoven celkový cholesterol a TG.

Přístroje:

Ultracentrifuga LE 80-K (Beckman Coulter, USA)

Chemikálie:

Fyziologický roztok 0,9% (B. Braun, Německo)

Pracovní postup:

Plazma 2,5 – 4,5 ml byla přenesena do ultracentrifugační zkumavky (Ultra-Clear, 13 x 64 mm, Beckman Coulter). Zkumavka byla doplněna do celkového objemu 6,5 ml fyziologickým roztokem (hustota 1,006 g/ml) a uzavřena kloboučkem. Ultracentrifugace byla prováděna v rotoru 50.4 Ti (39 000 rpm, 8 °C, min. 18 hodin). Po ukončení centrifugace byly zkumavky přeříznuty. Horní frakce (označovaná 06 T) a spodní frakce (označována 06 B) byla kvantitativně sebrána. V obou frakcích byly stanoveny cholesterol a TG. Byla vypočtena koncentrace VLDL-cholesterolu a VLDL-TG.

Výpočet:

$$\text{VLDL-C} = 06\text{T-C} \times \frac{\text{objem } 06\text{T}}{\text{objem plazmy}}$$

$$\text{VLDL-TG} = 06\text{T-TG} \times \frac{\text{objem } 06\text{T}}{\text{objem plazmy}}$$

4.2.4 Stanovení glycerolu

Princip metody

Glycerol v séru byl stanoven enzymatickou soupravou (Free Glycerol Reagent, SIGMA-Aldrich). Glycerol je fosforylován glycerolkinázou a vzniklý glycerol-1-fosfát je oxidován glycerolfosfátoxidázou na dihydroxyacetonfosfát a peroxid vodíku (H₂O₂). Peroxidáza katalyzuje reakci H₂O₂ s 4-aminoantipyrinem a *N*-ethyl-*N*-(3-sulfopropyl) *m*-anisidinem sodným. Vzniká chinon-iminové barvivo, které má absorbanční maximum při 540 nm. Nárůst absorbance při 540 nm je přímo úměrný koncentraci glycerolu.

Přístroje:

Spektrofotometr Anthelie Junior 730 (Secoman, Francie)

Chemikálie:

Činidlo Free Glycerol Reagent (SIGMA-Aldrich)

Standardní roztok glycerolu (2,83 mmol/l, SIGMA-Aldrich)

Deionizovaná voda

Pracovní postup:

Činidlo bylo rozpuštěno ve 40 ml deionizované vody. Do každé kyvety bylo k 0,8 ml činidla přidáno 10 µl vody (blank), 10 µl standardního roztoku glycerolu, nebo 10 µl vzorku. Kyvety byly lehce protřepány a inkubovány 15 minut v laboratoři a poté změřena absorbance při vlnové délce 540 nm.

Výpočet:

$$\text{Koncentrace glycerolu} = \frac{(A_{\text{vzorek}} - A_{\text{blank}})}{(A_{\text{standard}} - A_{\text{blank}})} \times \text{koncentrace standardu}$$

4.2.5 Stanovení inzulínu

Pro stanovení inzulínu byl použit Insulin(e) IRMA Kit od firmy Beckman Coulter (Praha).

Princip metody

V soupravě jsou použity myší monoklonální protilátky proti dvěma různým epitopům inzulínu. Vzorky séra, kontrolní vzorky a kalibrátory se inkubují ve zkumavkách potažených první monoklonální protilátkou společně s druhou monoklonální protilátkou značenou ^{125}I . Po inkubaci se obsah zkumavek vymyje, aby se odstranila nenavázaná značená protilátka. Vázaná aktivita ^{125}I se poté měří na gamacounteru. Koncentrace inzulínu ve vzorcích je přímo úměrná změřené radioaktivitě a získá se interpolací z kalibrační křivky.

Přístroje

Gamacounter LB1204 (Berthold, USA)

Třepačka RH202 (RH Plus, Praha)

Promývačka W01 (Beckman Coulter, USA)

Chemikálie

Insulin(e) IRMA Kit od firmy Beckman Coulter (Praha) obsahující:

- zkumavky potažené monoklonální protilátkou
- monoklonální protilátku proti inzulínu značenou ^{125}I (radioindikátor)
- kalibrátor
- kontrolní vzorky
- koncentrovaný promývací roztok

Deionizovaná voda

Pracovní postup

Reagencie a zkumavky byly vytemperovány na laboratorní teplotu. Obsah lahvíček s kontrolními vzorky byl rozpuštěn deionizovanou vodou (do objemu uvedeného na štítku). Koncentrovaný promývací roztok byl zředěn do požadovaného objemu deionizovanou vodou. Pro určení celkové aktivity bylo do zkumavek T1 a T2 pipetováno 100 µl radioindikátoru. Do 5 zkumavek (S1-S5) bylo pipetováno po 50 µl kalibrátorů (koncentrační rozmezí 2,91 – 291 µU/ml), do 2 zkumavek (K1 a K2) bylo pipetováno 50 µl kontrolního vzorku a do zbylých zkumavek bylo pipetováno 50 µl vzorku dobrovolníků. Do všech zkumavek bylo přidáno po 100 µl radioindikátoru a všechny zkumavky byly protřepány. Za stálého třepání (670 kmitů/min) byly vzorky inkubovány 2 hodiny při laboratorní teplotě. Obsah zkumavek (s výjimkou 2 zkumavek pro stanovení celkové aktivity) byl pečlivě odsán, a následně 2x promyt 2 ml promývacího roztoku. Ve všech zkumavkách byla měřena radioaktivita v cpm („counts per minute“) po dobu 1 minuty.

4.2.6 Stanovení LPL

4.2.6.1 Intravenózní tukový toleranční test (IVTTT) – stanovení aktivity *in vivo*

Princip metody:

Vyšetřovaným osobám je *i.v.* aplikován 20% Intralipid (0,1 g tuku/1 kg hmotnosti). Intralipid je tuková emulze, která je metabolizována LPL analogicky jako částice chylomikronů. Změny koncentrace tukové emulze po podání Intralipidu jsou hodnoceny nefelometricky.

Nefelometrie je analytické stanovení koncentrace disperzních látek v kapalinách na základě měření rozptýleného světla disperzí. Při průchodu světelných paprsků kapalinou, která obsahuje jemně rozptýlené nerozpuštěné částice, dochází k rozptylu světla do všech směrů. Koncentraci suspendovaných částic zjistíme měřením světelného toku, který je částicemi odrážen kolmo nebo pod určitým úhlem na směr dopadajícího paprsku. (<http://amapro.cz/encyklopedie/chemie/nefelometrie.php>, 21. 3. 2013)

Přístroje:

Centrifuga Allegra X-12R (Beckman Coulter, USA)

Nefelometr typ 238 (Scientific Furnishings Ltd., UK)

Chemikálie:

Heparin (Léčiva a.s., Dolní Měcholupy; 5 000 IU/ml)

Intralipid 20% (Frasenius Kabi, Uppsala, Švédsko)

Fyziologický roztok 0,9% (B. Braun, Německo)

Pracovní postup:

Dobrovolníkům byl intravenózně aplikován Intralipid v množství 0,5 ml/kg hmotnosti. Po aplikaci byla dobrovolníkům po dobu 40 minut odebírána krev v 5minutových intervalech pro nefelometrické stanovení koncentrace tukové emulze v séru.

Krev byla odebrána do 2,5ml vakuet se separačním gelem. Vzorky byly ponechány 10 – 50 minut při pokojové teplotě a následně stočeny v centrifuze (15 min, 3 000x g, 4 °C). Separační gel ve vakuetě vytvoří po centrifugaci bariéru mezi krevním sérem a sraženou krví. Sérum ve vakuetě bylo promícháno obracením zkumavky a 100 µl séra bylo přeneseno do plastové zkumavky s 5 ml fyziologického roztoku. Vzniklý 50x ředěný vzorek byl důkladně vortexován a změřen v nefelometru. Měření bylo prováděno v duplikátech.

Vyhodnocení:

Z naměřených hodnot „light scattering index“ se po logaritmické transformaci vypočítává rychlostní konstanta k_2 (konstanta 2. řádu) pro vyřešení tukové emulze, která je považována za míru aktivity LPL *in vivo* (Obr. 8).

ETANOL

	1.	2.	průměr	[min]	ln	
A0	7	6	6,5		0	
A5	164	165	164,5	158	5	5,063
A10	95	99	97	90,5	10	4,505
A15	72	76	74	67,5	15	4,212
A20	58	60	59	52,5	20	3,961
A25	50	51	50,5	44	25	3,784
A30	38	40	39	32,5	30	3,481
A35	24	24	24	17,5	35	2,862
A40	23	23	23	16,5	40	2,803

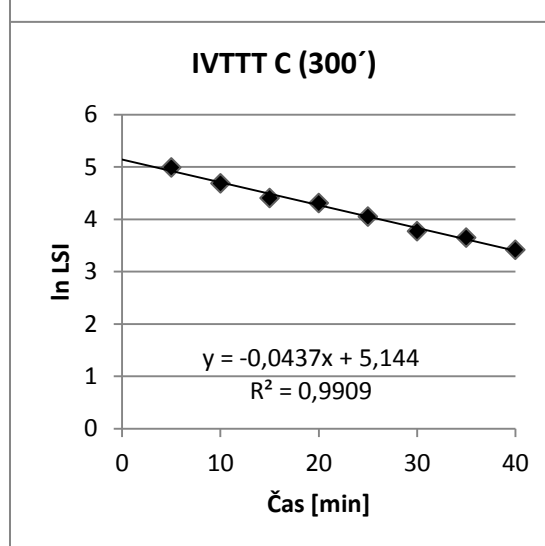
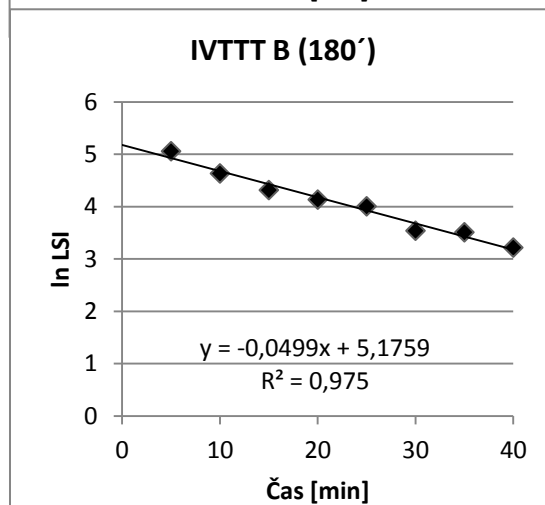
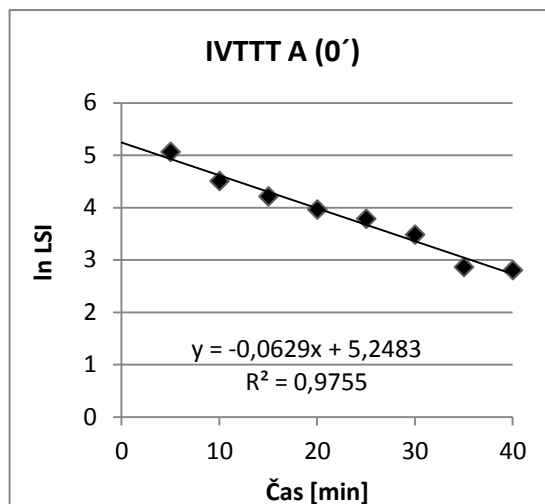
intercept 5,248
 směrnice -0,06
 k2 6,286
 r = -0,99

	1.	2.	průměr	[min]	ln	
B0	7	7	7,0		0	
B5	165	164	164,5	157,5	5	5,059
B10	110	110	110,0	103,0	10	4,635
B15	82	82	82,0	75,0	15	4,317
B20	70	69	69,5	62,5	20	4,135
B25	64	60	62,0	55,0	25	4,007
B30	42	41	41,5	34,5	30	3,541
B35	41	40	40,5	33,5	35	3,512
B40	33	31	32,0	25,0	40	3,219

intercept 5,176
 směrnice -0,05
 k2 4,990
 r = -0,99

	1.	2.	průměr	[min]	ln	
C0	8	7	7,5		0	
C5	155	154	154,5	147,0	5	4,990
C10	119	113	116,0	108,5	10	4,687
C15	88	91	89,5	82,0	15	4,407
C20	84	80	82,0	74,5	20	4,311
C25	66	64	65,0	57,5	25	4,052
C30	51	51	51,0	43,5	30	3,773
C35	47	45	46,0	38,5	35	3,651
C40	39	37	38,0	30,5	40	3,418

intercept 5,144
 směrnice -0,04
 k2 4,369
 r = -1



Obr. 8: Protokol nefelometrického stanovení hodnoty k2.

Protokol nefelometrického stanovení hodnoty k2 v opakovaných IVTTT u jednoho z dobrovolníků, kterému byl podán alkohol.

4.2.6.2 Stanovení aktivity LPL

Princip metody

Aktivita LPL byla stanovena metodou využívající jako substrát radioaktivně značený trioleylglycerol. Vzorek se inkubuje s Intralipidem značeným ^3H -triolelglycerolem při 26 °C a měří se množství ^3H -oleátu uvolněného při inkubaci. Uvolněné volné MK jsou separovány a z jejich radioaktivity vypočítána aktivita vzorku. Aktivita HL se inhibuje specifickou protilátkou a do reakční směsi je přidáváno tepelně inaktivované sérum jako zdroj aktivátoru - apo C-II (Bengtsson-Olivecrona and Olivecrona, 1992).

Přístroje:

Sonikátor UP 2005 (Hielscher, Německo)

Beta Counter Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer, USA)

Centrifuga Allegra X-12R (Beckman Coulter, USA)

MiniCentrifuga (Labnet International, Inc., USA)

Chemikálie:

^3H -triolein v toluenu-etanolu (1:1), (Perkin Elmer, USA)

2,47 TBq/mmol, 66,8 Ci/mmol,

Aktivační sérum

- tepelně inaktivované sérum - zdroj apo C-II (poolované sérum zdravých osob, které bylo inkubováno 45 minut při 58 °C)

Deionizovaná voda

Fyziologický roztok 0,9% (B. Braun, Německo)

Heptan p.a. (Penta, Praha)

Chloroform p.a. (Penta, Praha)

Inkubační pufr

0,3 M Tris p.a. (Penta, Praha)

0,2 M Heparin (Léčiva a.s., Dolní Měcholupy; 5 000 IU/ml)

12% Hovězí sérový albumin (PAA Laboratories GmbH, Francie)

pH upraveno pomocí HCl na hodnotu 8,5

Intralipid 20% (Frasenius Kabi, Uppsala, Švédsko)

Metanol (J.T. Baker, Nizozemsko)

Scintilační roztok Rotiszint ecco plus (Carl Roth GmbH + Co.KG, Německo)

Specifická protilátka proti HL (antiHL)

- dar Prof. H. Jansena, Erasmus University, Nizozemsko

Uhličitan sodný (Na_2CO_3), pH 10,5, 0,1 M

Pracovní postup

Příprava vzorků

Vzorky pro stanovení aktivity LPL byly odebrány 10 minut po intravenózní aplikaci heparinu, centrifugovány (15 min, 3 000x g, 4 °C) a plazma uložena v - 80 °C. V den stanovení byly vzorky rozmrazeny v lázni voda-led a veškerá manipulace se vzorky probíhala v této lázni.

Specifická protilátka antiHL, která inhibuje jaterní lipázu, byla rozmrazena a 10x naředěna fyziologickým roztokem. Do mikroskopické Eppendorf (1,5 ml) bylo pipetováno 45 μl naředěné antiHL a přidáno 45 μl vzorku. Vzorky byly 3 hodiny inkubovány v lázni voda-led v chladové místnosti. Po ukončení inkubace byly vzorky centrifugovány (6 min, 10 000x g, 4 °C).

Příprava substrátu

Do skleněné zkumavky bylo pipetováno 60 μl ^3H -trioleinu a rozpouštědlo bylo evaporováno pod dusíkem. Do zkumavky byl přidán 1 ml 20% Intralipidu a 1 ml deionizované vody. Vzniklá směs byla sonikována 10 minut za stálého chlazení v lázni voda-led (nastavení sonikátoru: cycle 0,6; amplituda 35 %).

Příprava inkubačního média

Inkubační médium bylo připraveno smísením jednotlivých komponent v níže uvedených poměrech:

10 dílů inkubačního pufru pro stanovení LPL

1 díl substrátu

1 díl aktivačního séra

6 dílů deionizované vody.

Médium bylo důkladně promícháno a pipetováno do skleněných zkumavek dle připraveného rozpisu.

Inkubace

Do skleněné zkumavky pro inkubaci bylo pipetováno 180 μl inkubačního média. Do zkumavek sloužících jako blank bylo pipetováno 180 μl inkubačního média a 20 μl vody. Zkumavky byly přeneseny do vodní lázně o teplotě 26 °C a temperovány 5 minut. Poté bylo do každé zkumavky pipetováno 20 μl vzorku po preinkubaci dle předem připraveného časového rozpisu, každý vzorek byl inkubován v triplicáttech. Inkubace

probíhala ve vodní lázni při teplotě 26 °C za stálého mírného třepání. Inkubace každého vzorku trvala 1 hodinu a byla ukončena přidáním 3,25 ml směsi metanolu : chloroformu : heptanu (MCH) v poměru 1,41 : 1,25 : 1 (v/v/v).

Extrakce

Vzorky byly v MCH ponechány alespoň 5 minut. Poté bylo přidáno 1,05 ml Na₂CO₃ a vzorky ponechány 20 minut při pokojové teplotě. Vzorky byly důkladně vortexovány a centrifugovány (15 minut, 3 000x g, 22 °C). Z horní metanolicke fáze, která obsahuje volné MK, bylo odebráno 0,8 ml, přeneseno do scintilační lahvičky a přidáno 8 ml scintilačního roztoku. Pro stanovení celkové aktivity bylo použito 180 µl inkubačního média. V každém měření byl jako pozitivní kontrola použit kontrolní vzorek lidské poheparinové plazmy, a také částečně purifikovaná LPL z kravského mléka.

Měření

Radioaktivita každého vzorku byla měřena na betacounteru po dobu 5 minut. Pro další výpočty byly použity hodnoty dpm („desintegration per minute“ - rozpady za minutu.)

Výpočet aktivity

Aktivita je vyjadřována jako množství MK [mmol] uvolněných lipoproteinovou lipázou přítomnou v 1 l poheparinové plazmy za 1 hodinu.

Aktivita byla vypočtena podle vzorce:

$$A = \frac{\text{dpm}_{\text{vzorku}} - \text{dpm}_{\text{blank}}}{\text{dpm}_{\text{celková}}} \times \frac{V_{\text{c horní fáze}}}{V_{\text{odebraný}}} \times \frac{10}{M_{\text{m trioleinu}}} \times \frac{100\,000}{V_{\text{vzorku}}} \times 3$$

$V_{\text{c horní fáze}}$ - celkový objem horní fáze = 2,45 ml

$V_{\text{odebraný}}$ - objem odebraný z horní fáze použitý pro měření = 0,8 ml

V_{vzorku} - objem vzorku = 10 µl

M_{m} - molekulová hmotnost trioleinu = 885,7

3 - korekce na počet molekul MK v jedné molekule trioleinu

4.2.6.3 Měření koncentrace LPL pomocí ELISA kitu

Pro měření koncentrace LPL byl použit ELISA kit od společnosti ALPCO Diagnostics (Salem, NH).

Princip metody

Koncentrace LPL byla stanovena pomocí metody nazývané sendvičová ELISA. Purifikovaná myší monoklonální protilátka (LPL-MoAb) je pevně navázána k polystyrenové matici. Sledovaný antigen (LPL) reaguje s touto protilátkou. Následně je přidáno kuřecí antisérum proti LPL (Anti-LPL-PoAb), které se váže na jiný epitop LPL. Poté jsou přidány kozí protilátky proti kuřecím IgG značené křenovou peroxidázou (PoAb) za vzniku komplexu protilátka-antigen-protilátka-protilátka. Nakonec je přidán substrát, *o*-fenyldiamin. Křenová peroxidáza katalyzuje oxidaci substrátu peroxidem vodíku za vzniku tmavě modrého produktu, který se po jejím zastavení stop činidlem (H_2SO_4) změní na žlutý produkt a následně dochází ke spektrofotometrickému stanovení.

Přístroje

Destičkový reader Synergy 2 (BioTek, USA)

Chemikálie

ELISA kit od společnosti ALPCO Diagnostics (Salem, NH) obsahující:

- 96jamkovou destičku potaženou monoklonální protilátkou (LPL-MoAb)
- koncentrovaný promývací pufr
- ředicí pufr
- lyofilizovanou kuřecí polyklonální protilátku (Anti-LPL-PoAb)
- roztok kozí polyklonální protilátky označené křenovou peroxidázou (PoAb)
- lyofilizovaný substrát
- pufr pro ředění substrátu
- lyofilizovaný kalibrátor
- stop činidlo

Deionizovaná voda

Pracovní postup

Koncentrovaný promývací pufr byl naředěn deionizovanou vodou do výsledného objemu 1 l. Reagencie, které vyžadovaly ředění, byly náležitě naředěny podle instrukcí výrobce.

Ke stanovení byly použity vzorky získané před aplikací heparinu a 10 minut po ní. Vzorky získané před aplikací heparinu byly naředěny 21x (20 µl vzorku + 400 µl ředicího pufru). Poheparinové vzorky byly naředěny 81x ve dvou krocích (1. ředění: 20 µl vzorku + 160 µl ředicího pufru; 2. ředění: 20 µl roztoku + 160 µl ředicího pufru).

Naředěním lyofilizovaného kalibrátoru byl získán kalibrační roztok o koncentraci 24 ng/ml. Postupným ředěním (1:1) kalibračního roztoku ředicím pufrům byla připravena kalibrační řada o koncentracích 24, 12, 6, 3, 1,5, 0,75 a 0,375 ng/ml.

Na 96jamkovou destičku bylo pipetováno po 50 µl kalibrátorů, po 50 µl ředicího pufru (blank) a po 50 µl naředěných vzorků dle předem připraveného rozpisu. Destička byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě. Inkubace byla ukončena vyklepnutím roztoku z jamek. Jamky byly 3x promyty 350 µl promývacího pufru. Na destičku bylo pipetováno 50 µl roztoku Anti-LPL-PoAb. Destička byla inkubována 30 minut při laboratorní teplotě. Inkubace byla ukončena vyklepnutím roztoku z jamek. Jamky byly 3x promyty 350 µl promývacího pufru. Na destičku bylo pipetováno 50 µl roztoku polyklonální protilátky označené křenovou peroxidázou (PoAb). Destička byla inkubována 30 minut při laboratorní teplotě. Inkubace byla ukončena vyklepnutím roztoku z jamek. Jamky byly 3x promyty 350 µl promývacího pufru. Na destičku bylo pipetováno 50 µl roztoku substrátu, *o*-fenylendiaminu, a byla ponechána 15 minut při laboratorní teplotě. Po 15 minutách bylo pipetováno 50 µl stop činidla. Ihned byla měřena absorbance při vlnové délce 492 nm. Hodnocení bylo prováděno pomocí programu přístroje Synergy 2.

4.2.7 Stanovení apolipoproteinů

4.2.7.1 Stanovení koncentrace apo A-V v plazmě

Pro měření koncentrace apo A-V byl použit ELISA kit od společnosti Cusabio Biotech Co., Ltd. (Čína).

Princip metody:

Koncentrace apo A-V byla stanovena pomocí metody nazývané sendvičová ELISA. Purifikovaná specifická protilátka proti apo A-V je pevně navázána k polystyrenové matrici. Apo A-V ze vzorku reaguje s touto protilátkou. Na navázaný apo A-V se váže další protilátka konjugovaná s biotinem, která rozpoznává jiný epitop antigenu. Následně je přidána křenová peroxidáza (HRP) konjugovaná s avidinem. Avidin se váže k molekule biotinu. Nakonec je přidán substrát. Křenová peroxidáza

katalyzuje oxidaci substrátu peroxidem vodíku za vzniku tmavě modrého produktu, který se po zastavení reakce změnil na žlutý spektrofotometricky kvantifikovatelný produkt.

Přístroje:

Destičkový reader Synergy 2 (BioTek, USA)

Biologický termostat BT120 (Laboratorní přístroje, Československo)

Chemikálie:

ELISA kit od společnosti Cusabio Biotech Co., Ltd. (Čína) obsahující:

96jamková destička s navázanou protilátkou

100x koncentrovaná protilátka konjugovaná s biotinem

100x koncentrovaný avidin konjugovaný s HRP

koncentrovaný promývací pufr

ředicí pufr

lyofilizovaný standard

TMB substrát

stop činidlo

Pracovní postup:

Reagencie, které vyžadovaly ředění, byly náležitě naředěny podle instrukcí výrobce.

Ke stanovení koncentrace byly použity vzorky získané před aplikací heparinu a 5, 10, 15, 20, 40 a 60 minut po ní. Vzorky byly naředěny ve dvou krocích 400x (1. ředění: 5 μ l vzorku + 95 μ l ředícího pufru; 2. ředění: 15 μ l roztoku + 285 μ l ředícího pufru).

Naředěním standardu byl získán zásobní roztok o koncentraci 2 000 pg/ml. Postupným ředěním (1:1) zásobního roztoku ředícím puftrem byla připravena kalibrační řada o koncentracích 2 000, 1 000, 500, 250, 125, 62,5 a 31,25 pg/ml.

Na destičku bylo pipetováno po 100 μ l kalibrátorů, po 100 μ l ředícího pufru (blank) a po 100 μ l naředěných vzorků dle předem připraveného rozpisu. Destička byla inkubována 2 hodiny v termostatu při 37 °C. Inkubace byla ukončena vyklepnutím roztoku z jamek. Na destičku bylo pipetováno 100 μ l roztoku protilátky konjugované s biotinem. Destička byla inkubována 1 hodinu v termostatu při 37 °C. Inkubace byla ukončena vyklepnutím roztoku z jamek. Jamky byly 3x promyty 200 μ l promývacího pufru. Na destičku bylo pipetováno 100 μ l roztoku avidinu konjugovaného s HRP.

Destička byla inkubována 1 hodinu v termostatu při 37 °C. Inkubace byla ukončena vyklepnutím roztoku z jamek a jamky byly 5x promyty 200 µl promývacího pufru. Na destičku bylo pipetováno 90 µl TMB substrátu a destička byla inkubována 30 minut v termostatu při teplotě 37 °C. Po 30 minutách bylo pipetováno 50 µl stop činidla. Ihned byla měřena absorbance při vlnové délce 450 nm. Hodnocení bylo prováděno pomocí programu přístroje Synergy 2.

4.2.7.2 Měření koncentrace apo B pomocí ELISA kitu

Pro měření koncentrace Apo B byl použit ELISA Kit od společnosti Abcam plc. (UK).

Princip metody

Koncentrace Apo B byla stanovena pomocí metody nazývané sendvičová ELISA. Purifikovaná polyklonální protilátka proti apo B je pevně navázána k polystyrenové matici. Apo B ze vzorku reaguje s touto protilátkou. Přidaná druhá polyklonální protilátka konjugovaná s biotinem se váže na apo B na jiný epitop. Následně je přidána křenová peroxidáza konjugovaná se streptavidinem, který se váže na molekulu biotinu. Nakonec je přidán substrát. Křenová peroxidáza katalyzuje oxidaci substrátu peroxidem vodíku za vzniku tmavě modrého produktu, který se po zastavení reakce stop činidlem změní na žlutý produkt a následně dochází ke spektrofotometrickému stanovení.

Přístroje

Destičkový reader Synergy 2 (BioTek, USA)

Chemikálie

ELISA Kit od společnosti Abcam plc. (UK) obsahující:

- 96jamkovou destička s navázanou polyklonální protilátkou
- lyofilizovaný standard lidského Apo B
- koncentrovanou biotinylovanou protilátku proti Apo B
- koncentrovaný ředící pufr
- koncentrovaný promývací pufr
- koncentrovanou konjugovanou streptavidin-peroxidázu
- chromogenní substrát
- stop činidlo

Deionizovaná voda

Pracovní postup

Reagencie, které vyžadovaly ředění, byly náležitě naředěny podle instrukcí výrobce.

Apo B bylo měřeno ve VLDL izolovaných ultracentrifugací. Vzorky byly ředěny ve 2 krocích 500x (1. ředění: 20 μ l vzorku + 380 μ l ředícího pufru; 2. ředění: 20 μ l roztoku + 480 μ l ředícího pufru), vzorky od jednoho dobrovolníka byly ředěny 1 000x (1. ředění: 20 μ l vzorku + 780 μ l ředícího pufru; 2. ředění: 20 μ l roztoku + 480 μ l ředícího pufru) vzhledem k jeho vysoké koncentraci VLDL-TG a VLDL-cholesterolu.

K Apo B standardu byl přidán odpovídající objem ředícího pufru tak, aby výsledná koncentrace Apo B byla 0,25 μ g/ml (k 0,75 μ g standardu byly přidány 3 ml ředícího pufru). Postupným ředěním (1:1) kalibračního roztoku ředícím pufrům byla připravena kalibrační řada o koncentracích 0,25, 0,125, 0,063, 0,031, 0,016 a 0,008 μ g/ml.

Na destičku bylo pipetováno po 50 μ l kalibrátorů, po 50 μ l ředícího pufru (blank) a po 50 μ l naředěných vzorků dle předem připraveného rozpisu. Destička byla inkubována 2 hodiny při laboratorní teplotě. Inkubace byla ukončena vyklepnutím roztoku z jamek. Jamky byly 5x promyty 200 μ l promývacího pufru. Na destičku bylo pipetováno 50 μ l roztoku biotinylované Apo B protilátky. Destička byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě. Inkubace byla ukončena vyklepnutím roztoku z jamek a jamky byly 5x promyty 200 μ l promývacího pufru. Na destičku bylo pipetováno 50 μ l peroxidázy konjugované se streptavidinem. Destička byla inkubována 30 minut při laboratorní teplotě. Inkubace byla ukončena vyklepnutím roztoku z jamek. Jamky byly 5x promyty 200 μ l promývacího pufru. Na destičku bylo pipetováno 50 μ l chromogenního substrátu a byla ponechána 10 minut při laboratorní teplotě. Po 10 minutách bylo pipetováno 50 μ l stop činidla. Ihned byla měřena absorbance při vlnové délce 450 nm. Hodnocení bylo prováděno pomocí programu přístroje Synergy 2.

4.3 Statistické zpracování výsledků

4.3.1 Vliv *i.v.* aplikace heparinu na koncentraci apo A-V

Časový průběh jednotlivých parametrů byl hodnocen analýzou rozptylu pro opakovaná měření v programu GraphPad InStat 3. V případě, že byly pomocí této

metody zjištěny statisticky významné rozdíly, byly rozdíly identifikovány s pomocí následného (post hoc) t-testu s Bonferroniho korekcí.

4.3.2 Regulace lipoproteinové lipázy po podání alkoholu

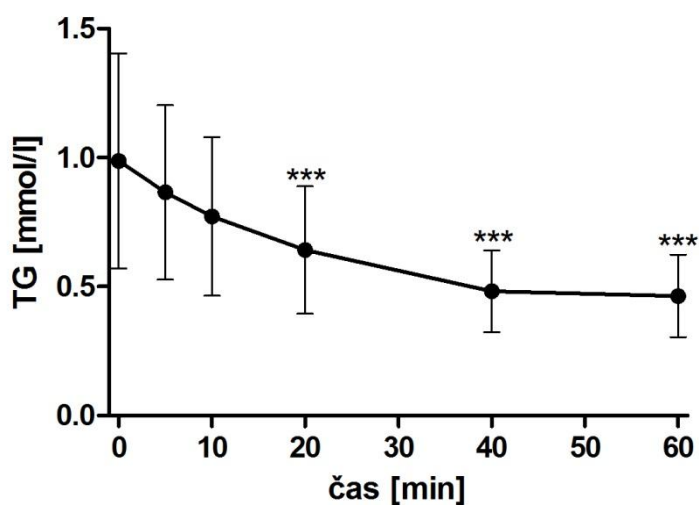
Dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA) pro opakovaná měření byla použita pro zjištění, zda se od sebe liší průběh změn jednotlivých parametrů po podání alkoholu a vody. Hodnocení bylo provedeno RNDr. Věrou Lánskou, CSc. s použitím programu JMP[®] 10.0.0 SAS Institute Inc. V případě, že byly touto metodou detekovány rozdíly, byly provedeny následné t-testy pro jednotlivé časové body s Bonferroniho korekcí. Časový průběh jednotlivých parametrů byl dále hodnocen analýzou rozptylu pro opakovaná měření v programu GraphPad InStat 3.

Výsledky jsou prezentovány jako průměr \pm směrodatná odchylka.

5. VÝSLEDKY

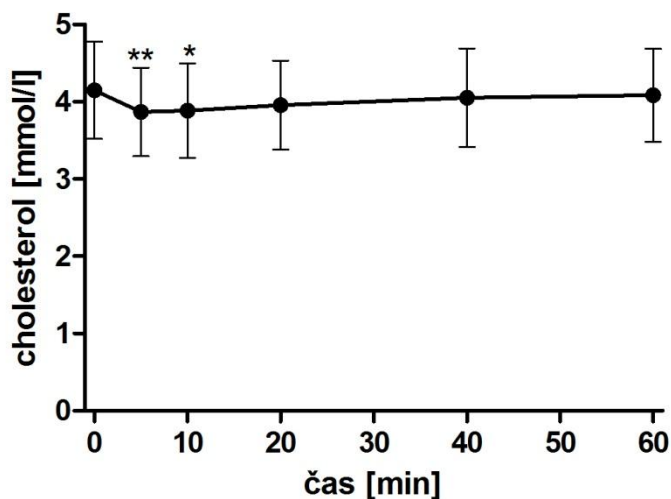
5.1 Vliv *i.v.* aplikace heparinu na koncentraci apo A-V

Intravenózní aplikace heparinu vyvolala pokles triglyceridémie až na zhruba poloviční hodnotu po 40 minutách a dále se neměnila (Obr. 9). Hladina cholesterolu přechodně poklesla bezprostředně po aplikaci heparinu o 7 % a poté se vrátila k původním hodnotám (Obr. 10).



Obr. 9: Koncentrace TG po *i.v.* podání heparinu.

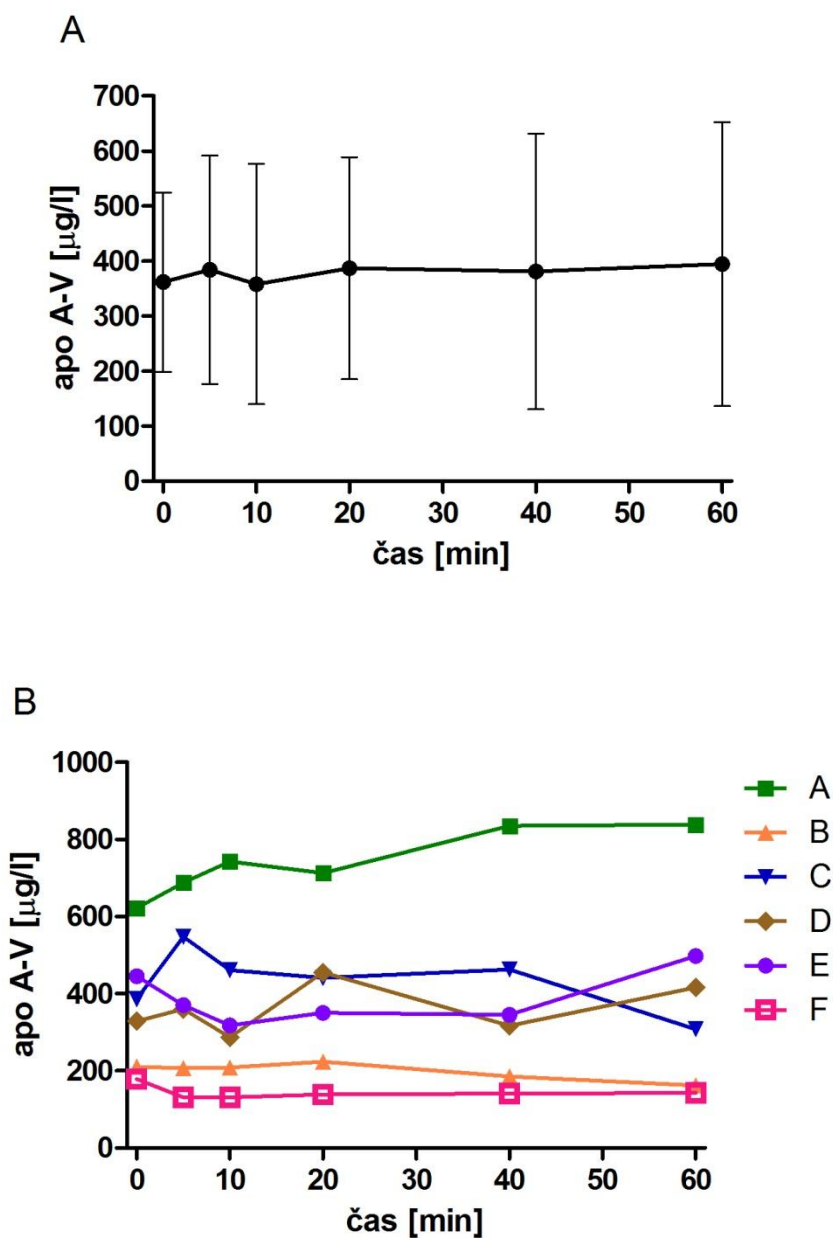
*** $p < 0,001$ proti času 0 (n = 6).



Obr. 10: Koncentrace cholesterolu po *i.v.* podání heparinu.

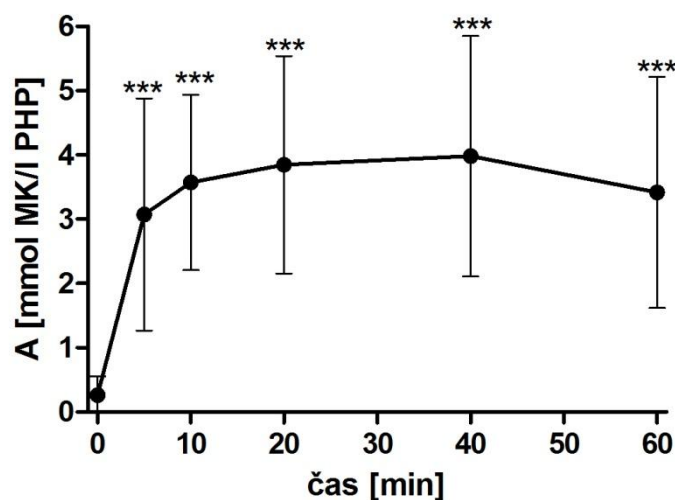
** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ proti času 0 (n = 6).

Průměrná koncentrace apo A-V se po aplikaci heparinu významně neměnila (Obr. 11 A). To je patrné i z průběhu změn v koncentraci apo A-V u jednotlivých dobrovolníků (Obr. 11 B). Z těchto výsledků je zřejmé, že apo A-V vykazuje velkou interindividuální variabilitu.



Obr. 11: Koncentrace apo A-V po *i.v.* aplikaci heparinu.
A – průměrné hodnoty, B – individuální hodnoty (n = 6).

Aktivita LPL výrazně vzrostla po i.v. aplikaci heparinu s maximem mezi 10. až 40. minutou (Obr. 12).



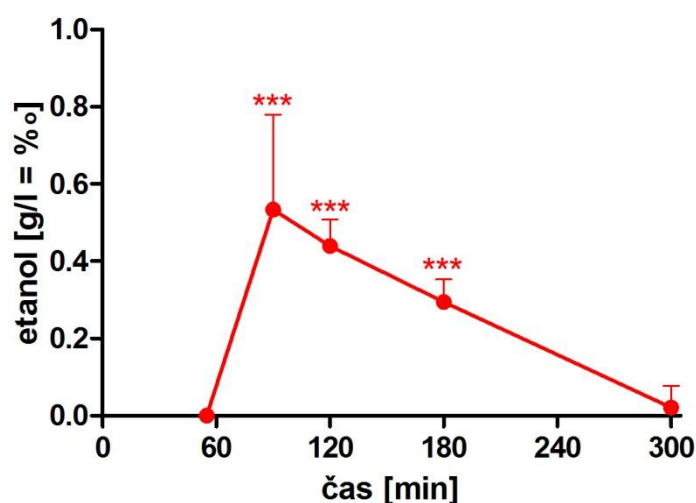
Obr. 12: Aktivita LPL po i.v. podání heparinu.

*** $p < 0,001$ proti času 0 (n = 6).

5.2 Regulace lipoproteinové lipázy po podání alkoholu

5.2.1 Vliv podání alkoholu na koncentraci etanolu v plazmě

Koncentrace alkoholu na počátku experimentu byla u všech dobrovolníků pod mezí detekce. Třicet minut po konzumaci vodky (32 g etanolu) bylo naměřeno maximum, poté koncentrace lineárně klesala (Obr. 13).



Obr. 13: Změny koncentrace alkoholu.

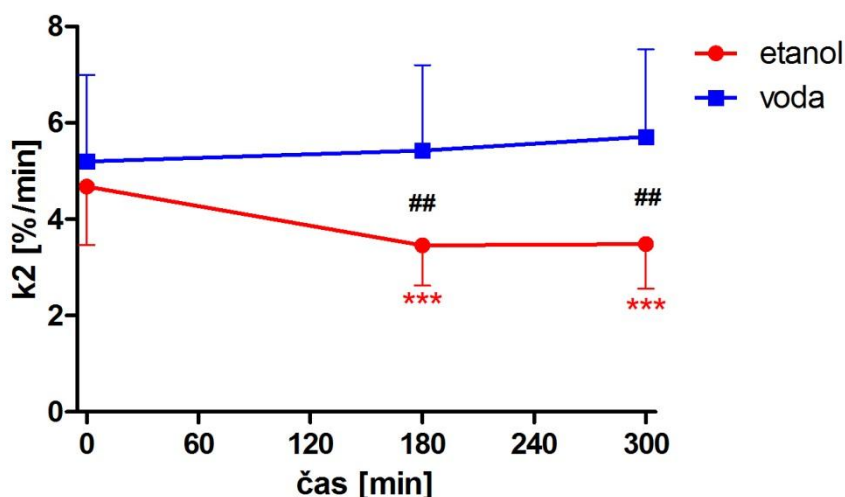
Alkohol byl podán v čase 60 minut.

*** $p < 0,001$ proti času 60 (n = 8).

5.2.2 Vliv podání alkoholu na aktivitu a koncentraci LPL

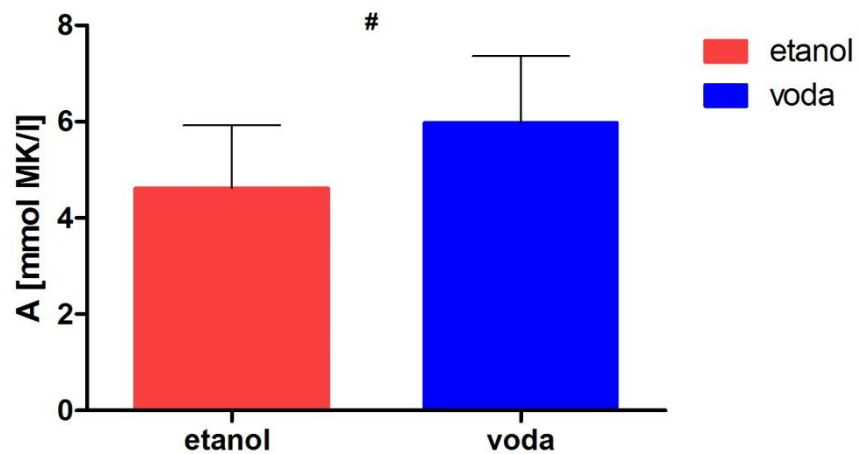
U všech dobrovolníků byly v každém experimentu provedeny tři intravenózní tukové toleranční testy (IVTTT), první před podáním alkoholu (0 minut), druhý dvě hodiny po podání alkoholu (180 minut) a třetí čtyři hodiny po podání alkoholu (300 minut). Hodnota k_2 , zjištěná pomocí IVTTT, významně poklesla po podání alkoholu, a to v průměru o 25%. V kontrolním experimentu, kdy byla dobrovolníkům podána pouze voda se hodnota k_2 významně neměnila. Průběh obou křivek hodnocený dvoufaktorovou analýzou rozptylu pro opakovaná měření se statisticky významně lišil ($p = 0,007$), (Obr. 14).

Heparin pro stanovení aktivity LPL byl dobrovolníkům aplikován 10 minut po ukončení posledního IVTTT (350 minut) a krev pro stanovení aktivity odebrána o 10 minut později. Koncentrace LPL byla stanovena ve vzorku plazmy odebrané v čase před aplikací heparinu (350 minut) a v poheparinové plazmě (360 minut). Aktivita LPL byla signifikantně nižší po podání alkoholu, a to o 23 % (Obr. 15). Koncentrace enzymu významně vzrostla, a to při podání vody téměř 10x a při podání alkoholu téměř 8x. Mezi skupinami nebyl ve vzestupu pozorován statisticky významný rozdíl (Obr. 16). Specifická aktivita enzymu se mezi dvěma experimenty nelišila.



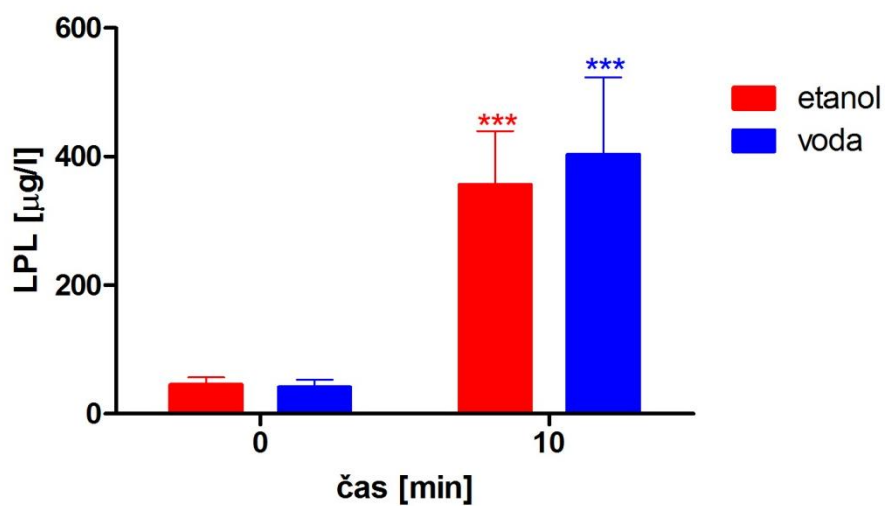
Obr. 14: Hodnota rychlostní konstanty k_2 pro vyřešení *i.v.* podané tukové emulze. Podání alkoholu nebo vody v čase 60 minut.

*** $p < 0,001$ proti času 0, ## $p < 0,01$ porovnání mezi vodou a etanolem ($n = 8$).



Obr. 15: Aktivita LPL.

$p < 0,05$, porovnání mezi etanolem a vodou ($n = 8$).



Obr. 16: Koncentrace LPL.

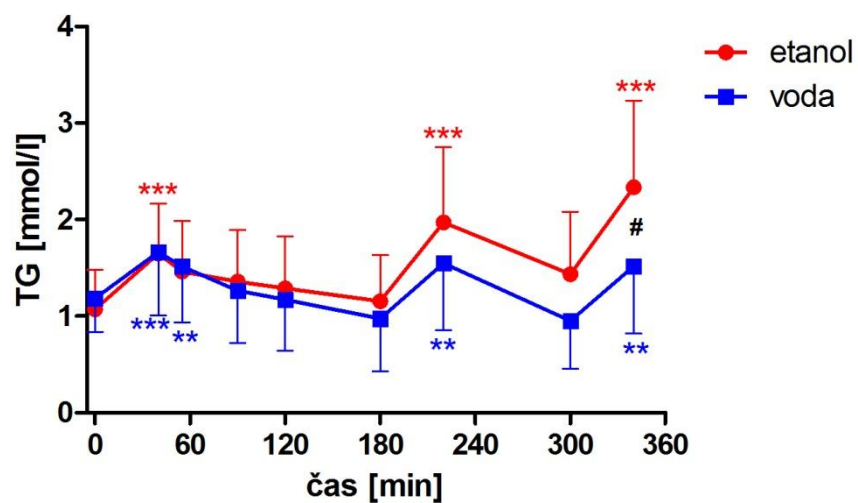
*** $p < 0,001$ oproti času 0, *** $p < 0,01$ oproti času 0 ($n = 8$).

5.2.3 Vliv podání alkoholu na lipidové parametry

Intravenózní aplikace Intralipidu v množství (0,1 g tuku/kg hmotnosti) vedla k vzestupu hladiny TG, která však nebyla v průběhu IVTTT měřena. Zvýšenou hladinu TG lze však pozorovat na konci každého z IVTTT (40, 220 a 340 minut),(Obr. 17). Část vzestupu TG lze přičítat i koncentraci glycerolu, na kterou nebyla v těchto pokusech prováděna korekce. Dvoufaktorovou ANOVA pro opakovaná měření bylo zjištěno, že průběh triglyceridémie se mezi oběma experimenty významně liší ($p = 0,003$) a TG se po konzumaci alkoholu kumulují v plazmě. Rozdíl mezi oběma křivkami dosáhl statistické významnosti až na konci experimentu (hodnoceno následnými t-testy s Bonferroniho korekcí).

Koncentrace NEMK naopak po konzumaci alkoholu poklesla – zhruba o 40 % ve 180. minutě a zhruba o 35 % v 300. minutě. V kontrolním experimentu se koncentrace NEMK neměnila. Průběh obou křivek se statisticky významně lišil ($p = 0,026$, dvoufaktorová ANOVA pro opakovaná měření), (Obr. 18).

Hladina celkového cholesterolu významně poklesla jak při podání alkoholu, tak při podání vody. Pokles v případě alkoholu trval do 180. minuty, poté se vrátil k původním hodnotám. V případě vody byla hladina cholesterolu významně snížena až do ukončení experimentu (Obr. 19). Při podání alkoholu došlo k významnému poklesu hladiny HDL cholesterolu, který se pohyboval mezi 7 - 10 % a přetrvával po celou dobu experimentu. Naopak u vody nedošlo k významným změnám (Obr. 20). Hladina LDL cholesterolu významně poklesla v obou případech (Obr. 21).

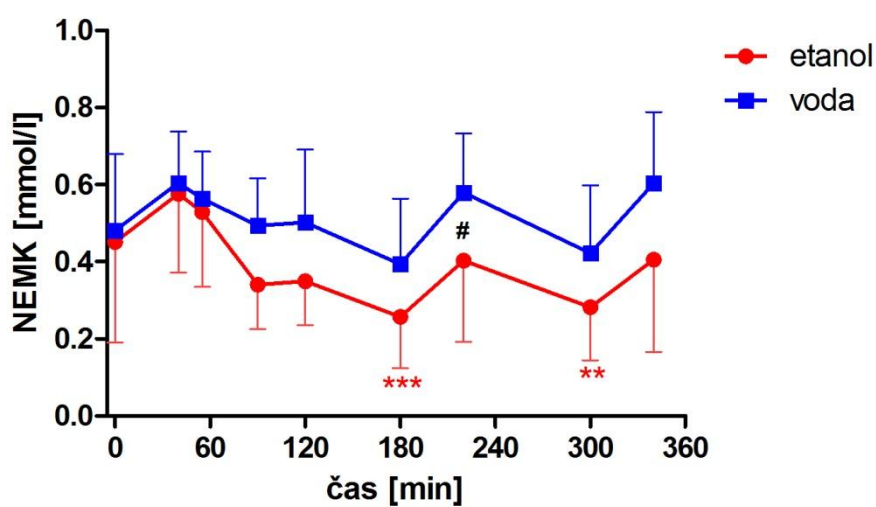


Obr. 17: Koncentrace TG.

Podání alkoholu nebo vody v čase 60 minut.

*** $p < 0,001$ oproti času 0, *** $p < 0,001$ oproti času 0, ** $p < 0,01$ proti času 0,

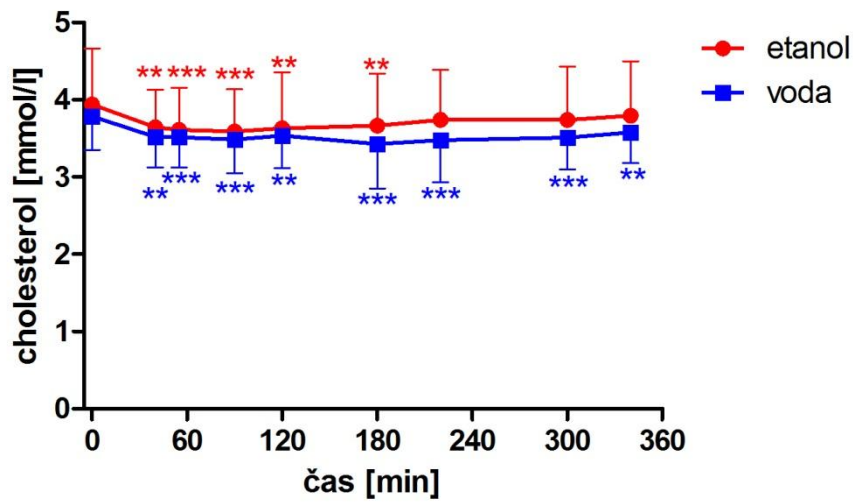
$p < 0,05$ porovnání mezi vodou a etanolem (n = 8).



Obr. 18: Koncentrace NEMK.

Podání alkoholu nebo vody v čase 60 minut.

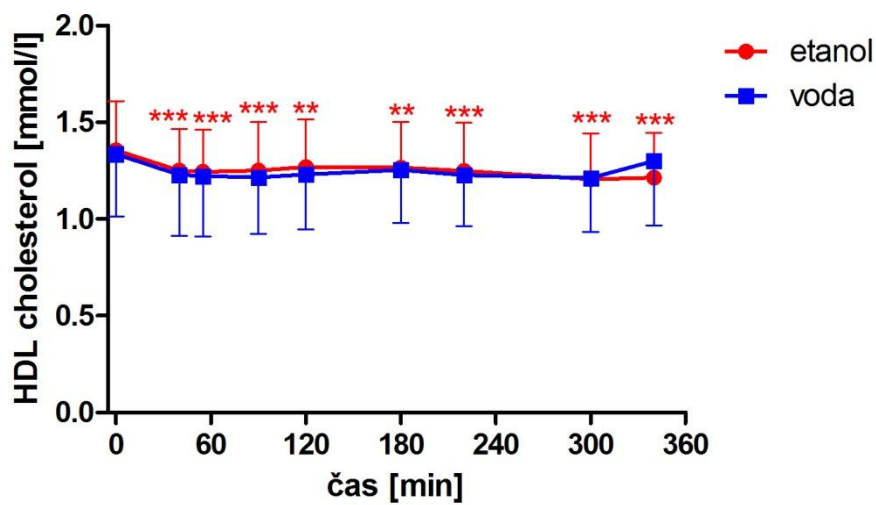
*** $p < 0,001$ oproti času 0, ** $p < 0,01$ oproti času 0, # $p < 0,05$ porovnání mezi vodou a etanolem (n = 8).



Obr. 19: Koncentrace cholesterolu.

Podání alkoholu nebo vody v čase 60 minut.

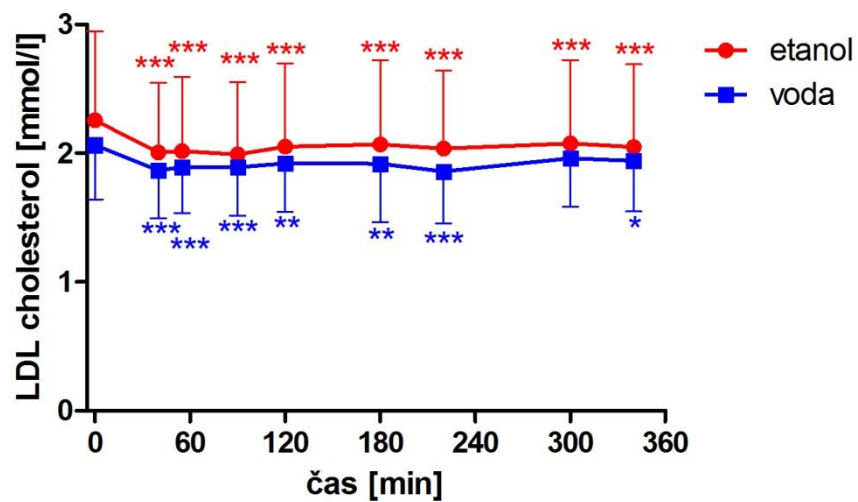
*** $p < 0,001$ oproti času 0, ** $p < 0,01$ oproti času 0, *** $p < 0,001$ oproti času 0, ** $p < 0,01$ oproti času 0 (n = 8).



Obr. 20: Koncentrace HDL cholesterolu.

Podání alkoholu nebo vody v čase 60 minut.

*** $p < 0,001$ oproti času 0, ** $p < 0,01$ oproti času 0 (n = 8).



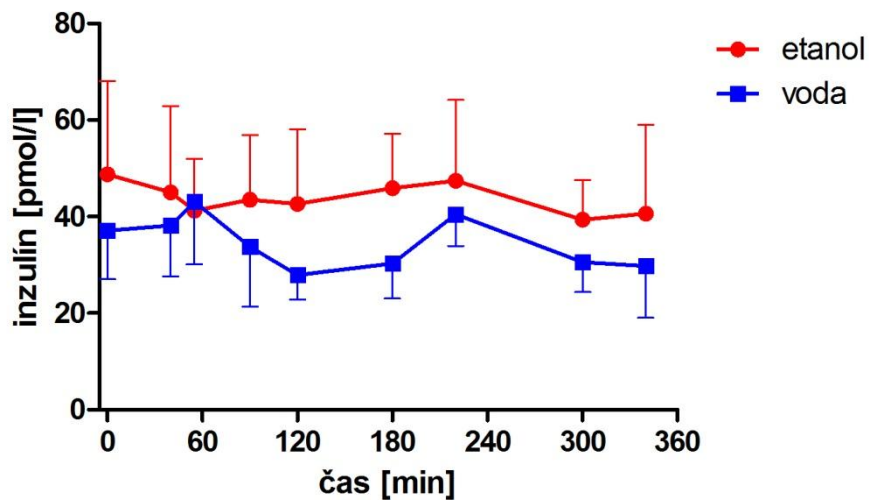
Obr. 21: Koncentrace LDL cholesterolu.

Podání alkoholu nebo vody v čase 60 minut.

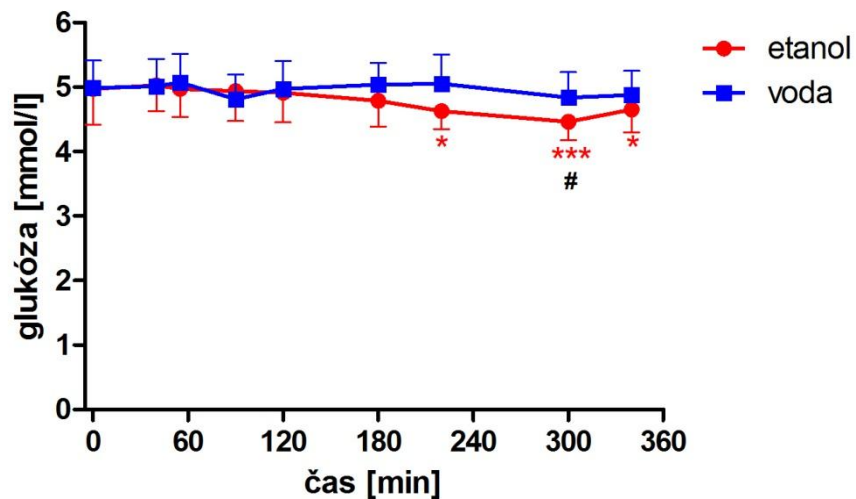
*** $p < 0,001$ oproti času 0, *** $p < 0,001$ oproti času 0, ** $p < 0,01$ oproti času 0 (n = 8).

5.2.4 Vliv podání alkoholu na inzulín a glukózu

Hladina inzulínu se významně nezměnila, a to ani po podání alkoholu ani po podání vody (Obr. 22). Oproti tomu hladina glukózy významně poklesla pouze po podání alkoholu. Průběh křivek glykémie po podání alkoholu a vody se statisticky významně lišil ($p = 0,043$, dvoufaktorová ANOVA pro opakovaná měření), (Obr. 23).



Obr. 22: Koncentrace inzulínu.
Podání alkoholu nebo vody v čase 60 minut ($n = 8$.)



Obr. 23: Koncentrace glukózy.
Podání alkoholu nebo vody v čase 60 minut.
*** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ oproti času 0; # $p < 0,05$ porovnání mezi vodou a etanolem ($n = 8$).

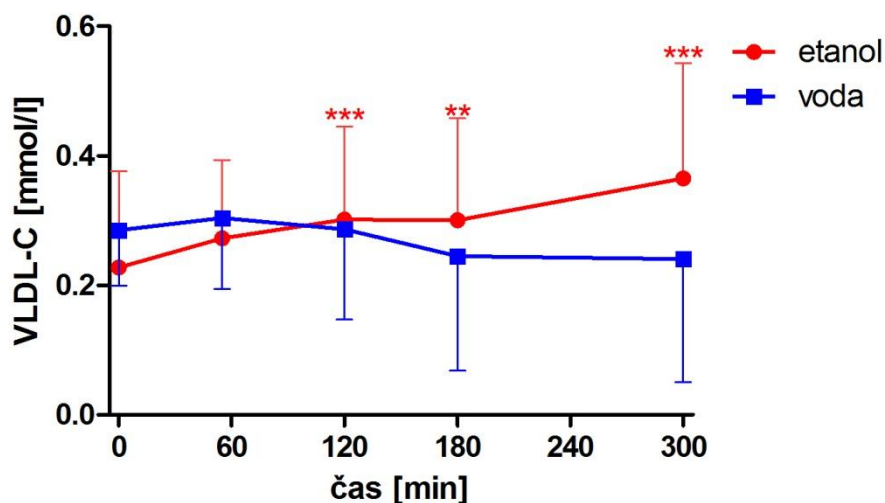
5.2.5 Vliv podání alkoholu na složení VLDL

Frakce obsahující VLDL částice byla získána ultracentrifugací, a to v časech 0, 55, 120, 180 a 300 minut. V získaných vzorcích byl stanoven cholesterol, TG a apo B.

Hladina cholesterolu ve VLDL významně vzrostla po podání alkoholu, a to 1,6x v čase 300 minut oproti času 0. Po podání vody nedošlo k významným změnám (Obr. 24). Průběh obou křivek se statisticky významně lišil ($p = 0,002$, dvoufaktorová ANOVA pro opakovaná měření).

Hladina TG ve VLDL významně vzrostla v časech 60 a 300 minut při podání alkoholu, naopak, při podání vody došlo v těchto časech k významnému poklesu. Průběh obou křivek se statisticky významně lišil ($p = 0,0001$, dvoufaktorová ANOVA pro opakovaná měření), (Obr. 25).

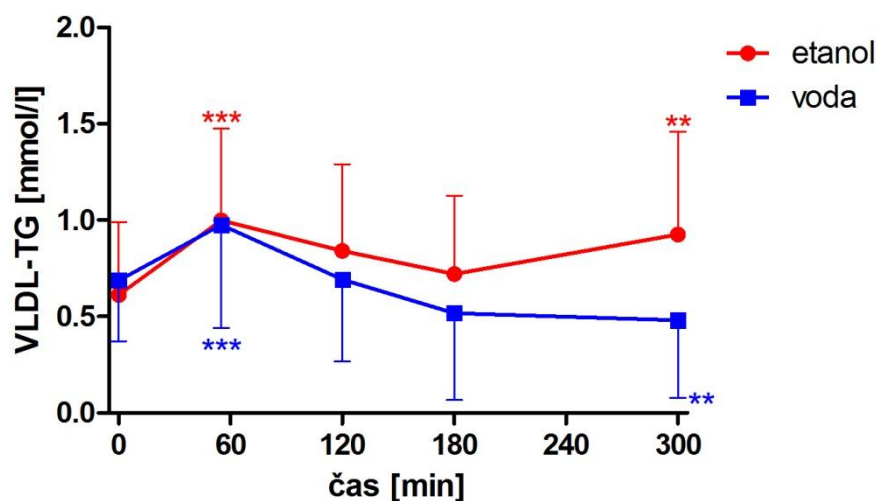
Hladina apo B ve VLDL se významně neměnila, a to ani po podání alkoholu ani po podání vody (Obr. 26).



Obr. 24: Koncentrace VLDL cholesterolu
Podání alkoholu nebo vody v čase 60 minut.

*** $p < 0,001$ oproti času 0, ** $p < 0,01$ oproti času 0 ($n = 8$.)

VLDL-C – cholesterol VLDL



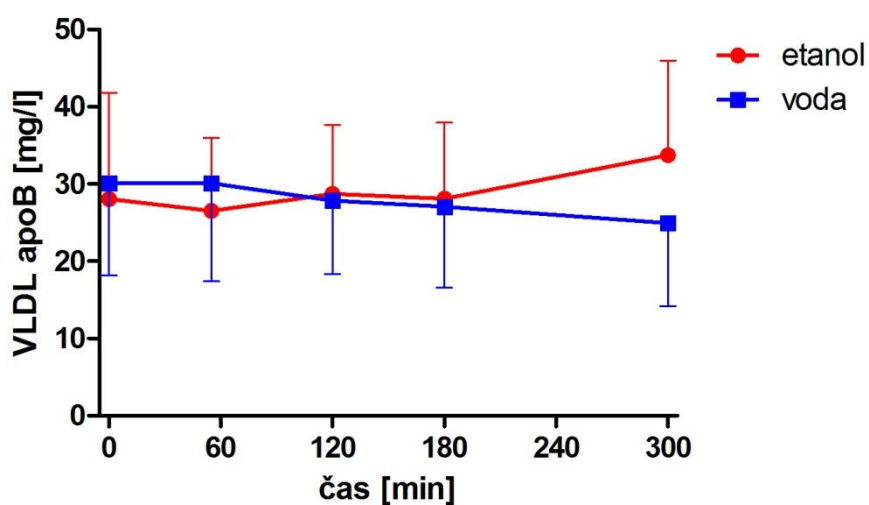
Obr. 25: Koncentrace VLDL-TG.

Podání alkoholu nebo vody v čase 60 minut.

*** $p < 0,001$ oproti času 0, ** $p < 0,01$ oproti času 0, *** $p < 0,001$ oproti času 0,

** $p < 0,01$ oproti času 0 (n = 8).

VLDL-TG – TG ve VLDL.

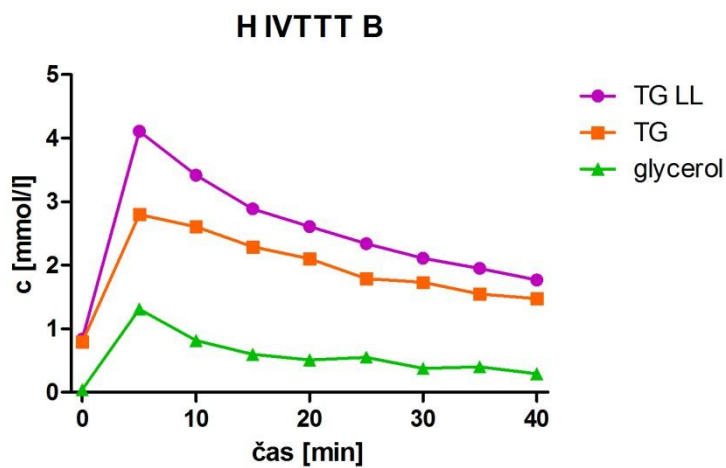
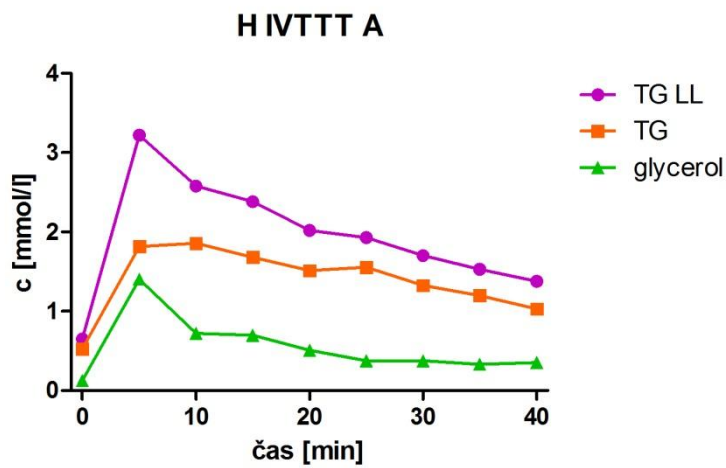
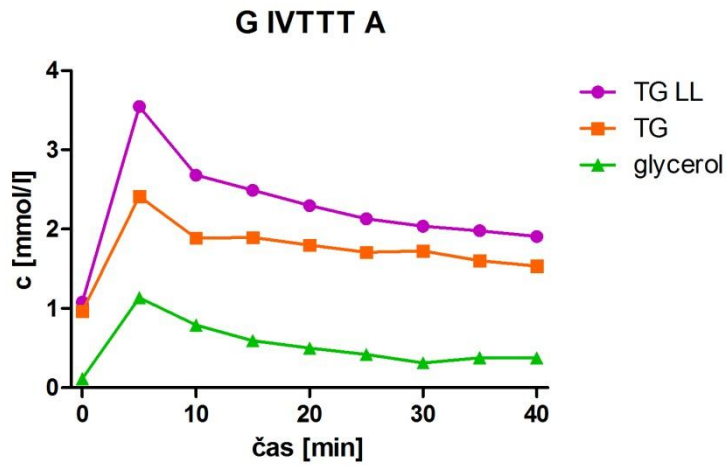


Obr. 26: Koncentrace VLDL apo B.

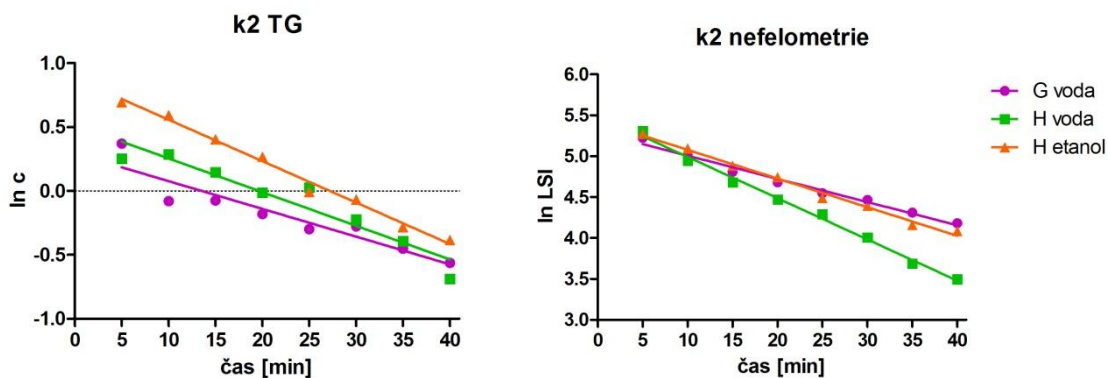
Podání alkoholu nebo vody v čase 60 minut (n = 8).

5.3 Porovnání metod hodnocení výsledků IVTTT

U tří náhodně zvolených křivek získaných v průběhu IVTTT bylo vedle nefelometrického hodnocení popsaného výše provedeno i hodnocení na základě stanovení koncentrace TG. Protože Intralipid obsahuje ekvimolární množství TG a glycerolu bylo nutné na koncentraci glycerolu korigovat. Naměřené koncentrace TG v Lipidové laboratoři (bez korekce na glycerol, TG LL), koncentrace glycerolu a korigovaná koncentrace TG jsou prezentovány na Obr. 27. V souladu s očekáváním koncentrace glycerolu i TG vzrostla po aplikaci Intralipidu a postupně se vracela k původním hodnotám. Ze zjištěných korigovaných hodnot TG byla vypočtena hodnota k_2 stejným způsobem jako v nefelometrickém stanovení (Obr. 28). Hodnoty k_2 zjištěné tímto způsobem byly nižší než hodnoty k_2 zjištěné nefelometricky. Hodnota korelačního koeficientu pro závislost logaritmicky transformované koncentrace TG na čase byla nižší než hodnota korelačního koeficientu pro výsledky nefelometrického hodnocení. Navíc výsledky obou metod jsou v rozporu – nejvyšší hodnota k_2 získaná z nefelometrického vyhodnocení byla zjištěna pro vyšetření H IVTTT A, zatímco na základě stanovení TG byla nejvyšší hodnota k_2 zjištěna pro vyšetření H IVTTT B (Tab. 3).



Obr. 27: Koncentrace TG.
 Koncentrace TG nekorigovaná na přítomnost glycerolu (TG LL), koncentrace glycerolu a skutečná koncentrace TG v průběhu tří náhodně vybraných IVTTT.



Obr. 28: Vynesení logaritmicky transformovaných dat.
 Vynesení logaritmicky transformovaných dat tří náhodně vybraných IVTTT hodnocených na základě stanovení TG nebo nefelometricky.

Tab. 3: Hodnoty k_2 a korelačního koeficientu.
 Hodnoty k_2 a korelačního koeficientu pro 3 náhodně vybrané IVTTT zjištěné na základě stanovení TG nebo nefelometrického stanovení.

	TG		Nefelometrie	
	k_2	r	k_2	r
G IVTTTA	2,170	-0,935	2,832	-0,992
H IVTTTA	2,635	-0,953	5,040	-0,997
H IVTTTB	3,242	-0,995	3,501	-0,996

6. DISKUZE

6.1 Vliv *i.v.* aplikace heparinu na koncentraci apo A-V

Apo A-V byl původně objeven jako nový gen, jehož méně běžné varianty jsou spojeny s extrémní hypertriglyceridémií (Pennacchio *et al.*, 2001), přičemž jeho přesná funkce nebyla známa. První experimenty na transgenních apo A-V a „knock-out“ apo A-V myších ukázaly, že deficit genu vede k vzestupu triglyceridémie a zvýšená exprese genu naopak k hypotriglyceridémii. Tato pozorování byla vysvětlována na úrovni regulace aktivity LPL a byl vysloven předpoklad, že apo A-V je aktivátorem enzymu (Marcais *et al.*, 2005; Merkel and Heeren, 2005). Druhá skupina, která apo A-V nezávisle objevila, zjistila, že jde o gen, jehož exprese v játrech je mnohonásobně zvýšená po 70% resekci jater u potkana. (van der Vliet, 2001). Tito autoři předpokládali, že apo A-V snižuje sekreci VLDL-TG z jater.

Za klasický aktivátor LPL v cirkulaci je považován apo C-II, o kterém je známo, že jeho koncentrace v cirkulaci je cca 5 μM . Koncentrace aktivní LPL v poheparinové plazmě je cca 5 nM. Pokud by tedy byl apo A-V aktivátorem enzymu, mohli bychom očekávat, že jeho koncentrace je srovnatelná s koncentrací apo C-II. Koncentrace apo A-V je pouze ~ 10 nM. Uvážíme-li, že koncentrace VLDL je cca 100nM, pak na jednu částici VLDL připadá několik desítek molekul apo C-II a jedna molekula apo A-V připadá na 10 částic VLDL. To by svědčilo proti úloze apo A-V jako aktivátoru LPL.

Je ovšem také známo, že apo A-V vykazuje výraznou afinitu k heparansulfátu, podobně jako LPL. Je tedy možné, že většina apo A-V je navázána na HSPG kapilárního endotelu podobně jako LPL a lze ho uvolnit do cirkulace *i.v.* aplikací heparinu stejně jako LPL (Lookene *et al.*, 2005; Merkel *et al.*, 2005).

Naše výsledky, že po *i.v.* aplikaci heparinu nedochází ke změně koncentrace apo A-V, jsou v rozporu s představou, že by apo A-V mohlo být fyziologickým aktivátorem enzymu. Je možné, že výsledky autorů, kteří popsali zvýšenou aktivitu LPL v transgenních modelech byly ovlivněny skutečností, že transgenní zvířata vykazovala suprafyziologické koncentrace apo A-V. Rovněž platí, že u všech pacientů, u kterých byl diagnostikován deficit apo C-II se rozvíjí hyperchylomikronémie (Bhatnagar, 1999). Přítomnost apo A-V zřejmě není schopna tento defekt eliminovat. Naproti tomu jsou známy dvě běžné varianty *APOA5*, které u některých osob vedou k rozvoji extrémní

hypertriglyceridémie. Většina homozygotních nositelů těchto variant má ale TG normální nebo jen lehce zvýšené (Hořínek *et al.*, 2003; Vrablík *et al.*, 2003).

6.2 Regulace lipoproteinové lipázy po podání alkoholu

Umírněná konzumace alkoholu odpovídající 1 – 2 panákům denně u mužů a 1 u žen příznivě ovlivňuje kardiovaskulární morbiditu a mortalitu. Tento jev je vysvětlován příznivým účinkem alkoholu na metabolismus lipidů, zvláště na vzestup protektivního HDL cholesterolu. HDL ovšem ovlivňuje i metabolismus TG a jejich koncentraci v cirkulaci. Výsledky v tomto směru nejsou zcela jednoznačné. Bylo ukázáno, že umírněná konzumace alkoholu zvyšuje aktivitu LPL a tedy patrně snižuje koncentraci TG v cirkulaci, na druhé straně metabolismus alkoholu je spojen se zvýšenou lipogenezí v játrech, která by naopak koncentraci TG zvyšovala (Baraona and Lieber, 1979; Lieber, 2003). Proto zřejmě nejsou výsledky studií sledujících vliv konzumace alkoholu na hladinu TG jednoznačné.

Zajímavé je, že akutní podání velkého množství alkoholu vede u některých osob k hypertriglyceridémii (Baraona and Lieber, 1999), která může vést i k ataku akutní pankreatitidy. Tento efekt je vysvětlován inhibicí aktivity LPL po podání alkoholu. Vlivu akutního podání alkoholu na aktivitu enzymu se věnovali pouze dvě práce.

Pokud byl dobrovolníkům podáván alkohol po dobu 10 hodin (1,85 g alkoholu/kg hmotnosti), byla aktivita LPL v poheparinové plazmě snížena proti aktivitě měřené 14 hodin před začátkem pokusu (Schneider *et al.*, 1985). V této studii však nebyl proveden kontrolní pokus bez podání alkoholu a nelze tedy vyloučit, že aktivita LPL měřená po podání alkoholu byla snížena v důsledku aplikace heparinu o 24 hodin dříve. Aplikace heparinu vede k uvolnění enzymu z endoteliálního povrchu a předpokládá se, že většina enzymu je poté vychytána játry. Není známo, jak dlouho trvá návrat do původního stavu. Další práce, která se tímto problémem zabývala, měřila vliv podání alkoholu spolu s pokusnou snídaní na spektrum MK v cirkulaci (Pownall, 1994). Autoři zjistili, že po podání alkoholu klesl příspěvek MK dietního původu, což by svědčilo pro pokles aktivity LPL. Tento důkaz lze však považovat pouze za důkaz nepřímý.

V této práci bylo zjištěno, že akutní podání alkoholu v množství 32 g bylo spojeno s poklesem aktivity LPL hodnocené pomocí IVTTT. Tato metoda je považována za míru aktivity LPL *in vivo* a naše výsledky lze tedy považovat za první přímý důkaz, že LPL je alkoholem skutečně inhibována. Tento náález je v souladu

s nálezem, že aktivita enzymu v poheparinové plazmě je o 23 % nižší přibližně pět hodin po požití alkoholu. Koncentrace enzymu v poheparinové plazmě byla po podání alkoholu snížena o 12 %, ale rozdíl nebyl statisticky významný.

Naše výsledky ukazují, že aktivita LPL byla stále významně snížena i při druhém IVTTT, tj. čtyři hodiny po podání alkoholu. V tomto čase už však koncentrace alkoholu v krvi byla pod mezí detekce. Tyto výsledky naznačují, že alkohol není přímým regulátorem aktivity LPL, ale že alkohol pravděpodobněji ovlivňuje regulaci enzymu. Lze předpokládat, že působení alkoholu neprobíhá na transkripční úrovni, neboť je známo, že aktivita LPL je regulována především posttraslačně. Můžeme spekulovat, že alkohol ovlivňuje například intracelulární maturaci enzymu nebo jeho transport na endoteliální povrch. Protože jsme nepozorovali rozdíly ve specifické aktivitě enzymu, zdá se nepravděpodobné, že by za pokles aktivity enzymu odpovídal rozpad aktivních dimerů LPL na inaktivní monomery.

V souladu s nálezem, že aktivita LPL je snížena, je tedy i skutečnost, že koncentrace NEMK klesá po podání alkoholu významně více než po podání vody. Část MK v plazmě totiž pochází z lipolýzy katalyzované LPL, a po podání alkoholu tedy klesá příspěvek MK z této reakce k celkovému množství NEMK v cirkulaci.

Rovněž pozorování, že koncentrace TG ve VLDL po podání alkoholu významně stoupla, zatímco koncentrace apo B ve VLDL se neměnila, podporují představu, že aktivita LPL je inhibována. Můžeme předpokládat, že TG jsou z částic lipoproteinů odstraňovány pomaleji.

Zajímavý je významný pokles koncentrace glukózy po podání alkoholu. Bylo popsáno, že po podání alkoholu je jako energetického zdroje preferovaně využíván acetát vznikající oxidací etanolu a ostatní energetické substráty jsou šetřeny (Siler *et al.*, 1999). Mohli bychom tedy očekávat, že glykémie po podání alkoholu vzroste - naše výsledky jsou v rozporu s tímto očekáváním. Je ale také známo, že alkohol inhibuje glykogenolýzu a glukoneogenezi (van de Wiel, 2004), což by mohlo být v souladu s našimi pozorováními.

6.3. Porovnání metod hodnocení výsledků IVTTT

Intravenózní tukový toleranční test je jedinou metodou, která umožňuje stanovení aktivity LPL *in vivo*. Aktivita enzymu je hodnocena nefelometricky jako hodnota rychlostní konstanty k_2 pro vyčerení plazmy. Výsledky nefelometrického hodnocení ukazují koncentraci velkých částic tukové emulze (Intralipid), které svou

velikostí odpovídají částicím chylomikronů. Hodnoty k_2 by bylo možné rovněž stanovit na základě stanovení koncentrace TG. Toto stanovení je však komplikováno přítomností glycerolu v Intralipidu. Klasické metody klinické biochemie totiž měří koncentrace TG po jejich hydrolýze na MK a glycerol tak, že se stanoví koncentrace glycerolu. Normální koncentrace glycerolu je 0,1 – 0,3 mmol/l a při stanovení TG se na ni obvykle neprovádí korekce. Z tohoto důvodu jsme ve třech náhodně vybraných křivkách získaných v průběhu IVTTT stanovili koncentraci glycerolu a porovnali hodnoty k_2 zjištěné nefelometricky a hodnoty k_2 zjištěné na základě stanovení koncentrace TG.

Hodnoty k_2 zjištěné ze stanovení TG byly nižší a nekorelovaly s hodnotami k_2 zjištěnými nefelometricky. To je způsobené skutečností, že na odbourávání TG v plazmě se vedle LPL podílí i HL. Jaterní lipáza hydrolyzuje TG v menších částicích lipoproteinů (LDL, HDL), nikoliv ve VLDL a chylomikronech. Aktivita HL tedy neovlivní výsledky nefelometrického stanovení, které hodnotí úbytek koncentrace velkých částic.

Pro hodnocení aktivity LPL nelze tedy stanovení koncentrace TG v průběhu IVTTT použít. Výhodou nefelometrického stanovení je i jeho cena a větší přesnost stanovení hodnoty k_2 – hodnoty korelačního koeficientu r pro vynesení logaritmicky transformovaných dat proti času jsou výrazně vyšší pro nefelometrické stanovení.

7. ZÁVĚR

Bylo zjištěno, že koncentrace apo A-V po intravenózní aplikaci heparinu nestoupá na rozdíl od aktivity LPL. Je tedy nepravděpodobné, že apo A-V slouží jako kofaktor LPL.

Pomocí opakovaného IVTTT jsem prokázala, že bezprostředně po konzumaci alkoholu dochází k inhibici enzymové aktivity LPL *in vivo*. Tento nález je prvním přímým důkazem inhibičního působení alkoholu na aktivitu enzymu. Mechanismus působení alkoholu na LPL na molekulární úrovni bude předmětem dalšího studia.

Dále jsem zjistila, že výsledky IVTTT nelze interpretovat na základě stanovení TG a je nutné provádět hodnocení nefelometricky.

8. SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obr. 1: Příklad triacylglycerolu.	5
Obr. 2: Metabolismus triacylglycerolů.	7
Obr. 3: Struktura lipoproteinu.	8
Obr. 4: Metabolismus lipoproteinů transportujících TG v plazmě.	11
Obr. 5: Lipoproteinová lipáza a faktory ovlivňující její funkci a aktivitu.	15
Obr. 6: Časová osa experimentu.	24
Obr. 7: Odběrový protokol.	25
Obr. 8: Protokol nefelometrického stanovení hodnoty k_2	31
Obr. 9: Koncentrace TG po <i>i.v.</i> podání heparinu.	41
Obr. 10: Koncentrace cholesterolu po <i>i.v.</i> podání heparinu.	41
Obr. 11: Koncentrace apo A-V po <i>i.v.</i> aplikaci heparinu.	42
Obr. 12: Aktivita LPL po <i>i.v.</i> podání heparinu.	43
Obr. 13: Změny koncentrace alkoholu.	43
Obr. 14: Hodnota rychlostní konstanty k_2 pro vyřešení <i>i.v.</i> podané tukové emulze.	44
Obr. 15: Aktivita LPL.	45
Obr. 16: Koncentrace LPL.	45
Obr. 17: Průměrné koncentrace TG.	47
Obr. 18: Koncentrace NEMK.	47
Obr. 19: Koncentrace cholesterolu.	48
Obr. 20: Koncentrace HDL cholesterolu.	48
Obr. 21: Koncentrace LDL cholesterolu.	49
Obr. 22: Koncentrace inzulínu.	50
Obr. 23: Koncentrace glukózy.	50
Obr. 24: Koncentrace VLDL cholesterolu.	51
Obr. 25: Koncentrace VLDL-TG.	52
Obr. 26: Koncentrace VLDL apo B.	52
Obr. 27: Koncentrace TG.	54
Obr. 28: Vynesení logaritmicky transformovaných dat.	55
Tab. 1: Přehled hlavních tříd lipoproteinů.	9
Tab. 2: Základní charakteristiky apolipoproteinů.	9
Tab. 3: Hodnoty k_2 a korelačního koeficientu.	55

9. LITERATURA

- Annema, W. and Tietge, U. J. (2011) Role of hepatic lipase and endothelial lipase in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *Curr Atheroscler Rep* **13**, 257-265.
- Baraona, E. and Lieber, C. S. (1979) Effects of ethanol on lipid metabolism. *J Lipid Res* **20**, 289-315.
- Baraona, E. and Lieber, C. S. (1999) Alcohol. In: *Lipoproteins in health and disease*. pp. 1011-1036. Arnold: London.
- Beigneux, A. P., Davies, B. S., Gin, P., Weinstein, M. M., Farber, E., Qiao, X., Peale, F., Bunting, S., Walzem, R. L., Wong, J. S., Blaner, W. S., Ding, Z. M., Melford, K., Wongsiriroj, N., Shu, X., de Sauvage, F., Ryan, R. O., Fong, L. G., Bensadoun, A. and Young, S. G. (2007) Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metab* **5**, 279-291.
- Bengtsson-Olivecrona, G. and Olivecrona, T. (1992) Assay of lipoprotein lipase and hepatic lipase. In: *Lipoprotein Analysis. A Practical Approach*. pp. 169-185. Eds. C. A. Converse, E. R. Skinner. Oxford University Press: Oxford.
- Bhatnagar, D. (1999) Hypertriglyceridaemia. In: *Lipoproteins in health and disease*. pp. 737-751. Eds. D. J. Betteridge, D. R. Illingworth, J. Shepherd. Arnold: London.
- Braun, J. E. and Severson, D. L. (1992) Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem J* **287** (Pt 2), 337-347.
- Dallinga-Thie, G. M., Franssen, R., Mooij, H. L., Visser, M. E., Hassing, H. C., Peelman, F., Kastelein, J. J., Peterfy, M. and Nieuwdorp, M. (2010) The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight. *Atherosclerosis* **211**, 1-8.
- Das, U. N. (2005) Long-chain polyunsaturated fatty acids, endothelial lipase and atherosclerosis. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* **72**, 173-179.
- Davies, B. S., Beigneux, A. P., Barnes, R. H., 2nd, Tu, Y., Gin, P., Weinstein, M. M., Nobumori, C., Nyren, R., Goldberg, I., Olivecrona, G., Bensadoun, A., Young, S. G. and Fong, L. G. (2010) GPIHBP1 is responsible for the entry of lipoprotein lipase into capillaries. *Cell Metab* **12**, 42-52.
- Davies, B. S., Beigneux, A. P., Fong, L. G. and Young, S. G. (2012) New wrinkles in lipoprotein lipase biology. *Curr Opin Lipidol* **23**, 35-42.
- Farese, R. V., Jr., Yost, T. J. and Eckel, R. H. (1991) Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity by insulin/glucose in normal-weight humans. *Metabolism* **40**, 214-216.
- Fielding, B. A., Reid, G., Grady, M., Humphreys, S. M., Evans, K. and Frayn, K. N. (2000) Ethanol with a mixed meal increases postprandial triacylglycerol but decreases postprandial non-esterified fatty acid concentrations. *Br J Nutr* **83**, 597-604.
- Gotto, A. M., Jr., Pownall, H. (2003) *Manual of Lipid Disorders. Reducing the Risk for Coronary Heart Disease*. Lippincot Williams & Wilkins: Philadelphia.
- Grundy, S. M. (1990) *Atlas of lipid disorders*. Gower Medical Publishing: New York.
- Hahn, P. F. (1943) Abolishment of Alimentary Lipemia Following Injection of Heparin. *Science* **98**, 19-20.
- Havel, R. J., Eder, H. A. and Bragdon, J. H. (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* **34**, 1345-1353.

- Havel, R. J. and Gordon, R. S., Jr. (1960) Idiopathic hyperlipemia: metabolic studies in an affected family. *J Clin Invest* **39**, 1777-1790.
- Hořínek, A., Vrablík, M., Češka, R., Adámková, V., Poledne, R. and Hubáček, J. A. (2003) T-1131-->C polymorphism within the apolipoprotein AV gene in hypertriglyceridemic individuals. *Atherosclerosis* **167**, 369-370.
- Kantor, M. A., Cullinane, E. M., Herbert, P. N. and Thompson, P. D. (1984) Acute increase in lipoprotein lipase following prolonged exercise. *Metabolism* **33**, 454-457.
- Kantor, M. A., Cullinane, E. M., Sady, S. P., Herbert, P. N. and Thompson, P. D. (1987) Exercise acutely increases high density lipoprotein-cholesterol and lipoprotein lipase activity in trained and untrained men. *Metabolism* **36**, 188-192.
- Kei, A. A., Filippatos, T. D., Tsimihodimos, V. and Elisaf, M. S. (2012) A review of the role of apolipoprotein C-II in lipoprotein metabolism and cardiovascular disease. *Metabolism* **61**, 906-921.
- Kiens, B., Lithell, H., Mikines, K. J. and Richter, E. A. (1989) Effects of insulin and exercise on muscle lipoprotein lipase activity in man and its relation to insulin action. *J Clin Invest* **84**, 1124-1129.
- Korn, E. D. (1955a) Clearing factor, a heparin-activated lipoprotein lipase. I. Isolation and characterization of the enzyme from normal rat heart. *The Journal of biological chemistry* **215**, 1-14.
- Korn, E. D. (1955b) Clearing factor, a heparin-activated lipoprotein lipase. II. Substrate specificity and activation of coconut oil. *The Journal of biological chemistry* **215**, 15-26.
- Kovář, J. and Poledne, R. (2004) The effect of moderate alcohol consumption on lipoprotein metabolism. *Cor Vasa* **46**, 110-114.
- Lewis, B., Boberg, L., Mancini, M. and Carlson, L. A. (1972) Determination of the intravenous fat tolerance test with intralipid by nephelometry. *Atherosclerosis* **15**, 83-86.
- Li, W.-H. and Chan, L. C. (1999) Structure and evolution of apolipoprotein genes. In: *Lipoproteins in health and disease*. pp. 163-179. Arnold: London.
- Lieber, C. S. (2003) Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. *Alcohol Res Health* **27**, 220-231.
- Liu, J., Afroza, H., Rader, D. J. and Jin, W. (2010) Angiopoietin-like protein 3 inhibits lipoprotein lipase activity through enhancing its cleavage by proprotein convertases. *The Journal of biological chemistry* **285**, 27561-27570.
- Lookene, A., Beckstead, J. A., Nilsson, S., Olivecrona, G. and Ryan, R. O. (2005) Apolipoprotein A-V-heparin interactions: implications for plasma lipoprotein metabolism. *J Biol Chem* **280**, 25383-25387.
- Marcais, C., Verges, B., Charriere, S., Pruneta, V., Merlin, M., Billon, S., Perrot, L., Drai, J., Sassolas, A., Pennacchio, L. A., Fruchart-Najib, J., Fruchart, J. C., Durlach, V. and Moulin, P. (2005) ApoA5 Q139X truncation predisposes to late-onset hyperchylomicronemia due to lipoprotein lipase impairment. *J Clin Invest* **115**, 2862-2869.
- Mattijssen, F. and Kersten, S. (2012) Regulation of triglyceride metabolism by Angiopoietin-like proteins. *Biochim Biophys Acta* **1821**, 782-789.
- Mead, J. R., Irvine, S. A. and Ramji, D. P. (2002) Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med* **80**, 753-769.
- Merkel, M., Eckel, R. H. and Goldberg, I. J. (2002) Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res* **43**, 1997-2006.

- Merkel, M. and Heeren, J. (2005) Give me A5 for lipoprotein hydrolysis! *J Clin Invest* **115**, 2694-2696.
- Merkel, M., Loeffler, B., Kluger, M., Fabig, N., Geppert, G., Pennacchio, L. A., Laatsch, A. and Heeren, J. (2005) Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J Biol Chem* **280**, 21553-21560.
- Mudráková, E., Poledne, R. and Kovář, J. (2013) Postprandial triglyceridemia after single dose of alcohol in healthy young men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **23**, 183-188.
- Nikkila, E. A., Taskinen, M. R., Rehunen, S. and Harkonen, M. (1978) Lipoprotein lipase activity in adipose tissue and skeletal muscle of runners: relation to serum lipoproteins. *Metabolism* **27**, 1661-1667.
- Nishiwaki, M., Ishikawa, T., Ito, T., Shige, H., Tomiyasu, K., Nakajima, K., Kondo, K., Hashimoto, H., Saitoh, K., Manabe, M. and et al. (1994) Effects of alcohol on lipoprotein lipase, hepatic lipase, cholesteryl ester transfer protein, and lecithin:cholesterol acyltransferase in high-density lipoprotein cholesterol elevation. *Atherosclerosis* **111**, 99-109.
- Olivecrona, G. and Olivecrona, T. (1995) Triglyceride lipases and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **6**, 291-305.
- Pennacchio, L. A., Olivier, M., Hubacek, J. A., Cohen, J. C., Cox, D. R., Fruchart, J. C., Krauss, R. M. and Rubin, E. M. (2001) An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* **294**, 169-173.
- Peterfy, M. (2012) Lipase maturation factor 1: A lipase chaperone involved in lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1821**, 790-794.
- Pownall, H. J. (1994) Dietary ethanol is associated with reduced lipolysis of intestinally derived lipoproteins. *J Lipid Res* **35**, 2105-2113.
- Rosner, S. (1974) Studies on an intravenous fat tolerance test. Methodological, experimental and clinical experiences with Intralipid. *Acta Med Scand Suppl* **564**, 1-24.
- Ruge, T., Svensson, A., Eriksson, J. W., Olivecrona, T. and Olivecrona, G. (2001) Food deprivation increases post-heparin lipoprotein lipase activity in humans. *Eur J Clin Invest* **31**, 1040-1047.
- Ruge, T., Svensson, M., Eriksson, J. W. and Olivecrona, G. (2005) Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase in humans: effects of fasting. *Eur J Clin Invest* **35**, 194-200.
- Sadur, C. N. and Eckel, R. H. (1982) Insulin stimulation of adipose tissue lipoprotein lipase. Use of the euglycemic clamp technique. *J Clin Invest* **69**, 1119-1125.
- Sharma, V., Ryan, R. O. and Forte, T. M. (2012) Apolipoprotein A-V dependent modulation of plasma triacylglycerol: A puzzlement. *Biochim Biophys Acta* **1821**, 795-799.
- Schaap, F. G., Rensen, P. C., Voshol, P. J., Vrins, C., van der Vliet, H. N., Chamuleau, R. A., Havekes, L. M., Groen, A. K. and van Dijk, K. W. (2004) ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. *J Biol Chem* **279**, 27941-27947.
- Schneider, J., Liesenfeld, A., Mordasini, R., Schubotz, R., Zofel, P., Kubel, F., Vandre-Plozzitzka, C. and Kaffarnik, H. (1985) Lipoprotein fractions, lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase during short-term and long-term uptake of ethanol in healthy subjects. *Atherosclerosis* **57**, 281-291.

- Siler, S. Q., Neese, R. A. and Hellerstein, M. K. (1999) De novo lipogenesis, lipid kinetics, and whole-body lipid balances in humans after acute alcohol consumption. *Am J Clin Nutr* **70**, 928-936.
- Sukonina, V., Lookene, A., Olivecrona, T. and Olivecrona, G. (2006) Angiopoietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17450-17455.
- van de Wiel, A. (2004) Diabetes mellitus and alcohol. *Diabetes Metab Res Rev* **20**, 263-267.
- van der Vliet, H. N., Sammels, M. G., Leegwater, A. C., Levels, J. H., Reitsma, P. H., Boers, W. and Chamuleau, R. A. (2001) Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *J Biol Chem* **276**, 44512-44520.
- Voet, D., Voet, J.G. (2004) *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken.
- Vrablik, M., Horinek, A., Ceska, R., Adamkova, V., Poledne, R. and Hubacek, J. A. (2003) Ser19-->Trp polymorphism within the apolipoprotein AV gene in hypertriglyceridaemic people. *J Med Genet* **40**, e105.
- Wilson, D. E., Schreiber, P. H., Brewster, A. C. and Arky, R. A. (1970) The enhancement of alimentary lipemia by ethanol in man. *J Lab Clin Med* **75**, 264-274.
- Wong, H. and Schotz, M. C. (2002) The lipase gene family. *Journal of lipid research* **43**, 993-999.
- Yasuda, T., Ishida, T. and Rader, D. J. (2010) Update on the role of endothelial lipase in high-density lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis. *Circ J* **74**, 2263-2270.