

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2011

Satu Mäkelä

LIPOLYYSIN TUTKIMINEN  
HIIREN ADIPOSYYTEILLÄ  
*in vitro* SPEKTROFOTO-  
METRIAN JA FLUOROMETRIAN  
AVULLA



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

05/2011 | 46 sivua

Ohjaajat: Suvi Ruohonen, FT; Kai Rosenberg, FK

Satu Mäkelä

## Lipolyysin tutkiminen hiiren adiposyyteillä *in vitro* spektrofotometrian ja fluorometrian avulla

Opinnäytetyön tavoitteena oli määrittää glyserolipitoisuudet adiposyytien kasvatusliuksesta. Solunäytteet olivat peräisin villityypin hiiristä sekä transgeenisistä neuropeptidi Y:tä (NPY) yli-ilmentävistä hiiristä. Transgeeniset hiiret olivat lihavampia kuin villityypin hiiret. Tutkittiin, onko näiden hiirityyppien rasvasolujen lipolyysissä eroa toisiinsa verrattuna ja onko transgeenisten hiirten beetavälitteinen lipolyysiaktiivisuus vähentynyt samalla tavoin kuin ylipainoisilla ihmisillä. Näytteet olivat basaaleja eli käsittelemättömiä tai käsiteltyjä NPY:llä tai isoprenaliinin eri pitoisuuksilla. Tutkittiin myös kyseisten lääkeaineiden vaikutusta rasvan vapautumiseen. NPY on keskushermostossa laajalti tuotettu välittäjäaine ja sympaattisen hermoston välittäjäaine, joka vapautuu sympaattisista hermopäätteistä yhdessä noradrenaliinin kanssa.

Lipolyysin tutkimiseksi määritysmenetelmä optimoitiin vertaamalla kolmea kaupallista kittiä spektrofotometrisesti ja/tai fluorometrisesti sekä testaamalla deproteinisaatiokäsittelyä. Valittiin detektioherkkyydeltään tarkin menetelmä, jonka avulla näytteiden glyserolipitoisuudet määritettiin.

Tämän opinnäytetyön toimeksiantaja oli Turun yliopiston Biolääketieteen laitos, jossa pyritään kehittämään uusia NPY-systeemiin vaikuttavia lääkehoitostrategioita tiettyjen tautien, kuten kiihtyneen ateroskleroosin tai diabeettisen retinopatian, ehkäisemiseksi. Tämä opinnäytetyö on osa laajempaa tutkimusta (FM Laura Vähätalon väitöskirja), jossa tutkitaan NPY:n vaikutusta ihmisen metabolisen oireyhtymän syntyyn hiirimallissa.

Työssä käytetyt kaupalliset kitit ja spektrofotometrinen sekä fluorometrinen menetelmä eivät olleet riittävän herkkiä, jotta kaikkien näytteiden glyserolipitoisuudet olisi voitu määrittää. BioVisionin Free Glycerol Assay -kitin ja fluorometrian avulla saatiin näkymään näytteiden isoprenaliiniannosvaste. Tekemieni määritysten perusteella transgeenisten hiirten beetavälitteinen lipolyysiaktiivisuus oli lisääntynyt eli isoprenaliini stimuloi lipolyysiä kummallakin hiirityypillä, mutta transgeenisillä hiirillä vielä vahvemmin.

ASIASANAT:

glyseroli, triasyyliglyseroli, rasvahapot, rasvakudokset, neuropeptidit, reseptorit

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

05/2011 | 46 pages

Supervisors: Suvi Ruohonen, Ph.D; Kai Rosenberg, M.Sc.

Satu Mäkelä

## *In vitro* study of lipolysis with mouse adipocytes by spectrophotometry and fluorometry

The purpose of this thesis was to measure and determine the concentration of glycerol in an adipocyte culture medium. The cell samples came from wildtype mice or transgenic mice overexpressing neuropeptide Y (NPY). The transgenic mice were fatter than the wildtype mice. It was studied if lipolysis of adipocytes differs between these two mouse types and if the beta-mediated lipolysis activity of transgenic mice is reduced as is that of overweight humans. The samples were non-treated or treated with NPY or different concentrations of isoprenaline. Also the influence of said medicinal substances in lipolysis was studied. NPY is a highly produced transmitter in the central and sympathetic nervous system. NPY is released from sympathetic nerve endings together with noradrenaline.

For the study of lipolysis, the method was optimized by comparing three commercial kits spectrophotometrically and/or fluorometrically and by testing deproteinization. The method which was used in the final determinations of glycerol concentration was selected based on the sensitivity of detection.

This thesis was commissioned by the Institute of Biomedicine, University of Turku, where new pharmacotherapeutic strategies are under development, influencing the NPY system to counteract certain diseases, such as atherosclerosis and diabetic retinopathy. This thesis is part of wider research (M.Sc. Laura Vähätalo's doctoral thesis) in which the influence of NPY on the emergence of human metabolic syndrome is studied in a mouse model.

The commercial kits which were tested and the spectrophotometric and fluorometric method were not sensitive enough to determine the glycerol concentration of all samples. It was possible to obtain the isoprenaline dose response with BioVision's Free Glycerol Assay Kit by fluorometry. Based on the results, the  $\beta$ -receptor-mediated lipolysis activity of the transgenic mice was increased, meaning that the isoprenaline stimulated lipolysis in both mouse types but more strongly with transgenic mice.

### KEYWORDS:

glycerol, triacylglycerol, fatty acids, adipose tissues, neuropeptides, receptors

# SISÄLTÖ

<b>SANASTO</b>	<b>5</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>6</b>
<b>2 TEORIAOSUUS</b>	<b>8</b>
2.1 Rasva-aineenvaihdunta	8
2.1.1 Valkoinen rasvakudos	8
2.1.2 Leptiini	9
2.2 Lipogeneesi	10
2.3 Lipolyysi	11
2.4 Glyseroli	15
2.4.1 Glukoneogeneesi ja ketogeneesi	16
2.5 Neuropeptidi Y	18
2.5.1 NPY-hiirimalli	19
2.6 Isoprenaliini	20
2.7 Spektrofotometria	24
2.8 Fluorometria	25
<b>3 KOKEELLINEN OSUUS</b>	<b>27</b>
3.1 Reagenssit ja näytteet	27
3.2 Menetelmän optimointi	28
3.2.1 Free Glycerol Reagent -menetelmä	28
3.2.2 Wako NEFA-HR(2) -menetelmä	29
3.2.3 Deproteinisaatiokäsittely	31
3.2.4 Free Glycerol Assay Kit	31
3.3 Glyserolipitoisuuden määrittäminen näytteistä	32
<b>4 TULOKSET</b>	<b>33</b>
4.1 Menetelmän optimointi	33
4.2 Näytteiden glyserolipitoisuudet	38
<b>5 POHDINTA</b>	<b>42</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>44</b>
<b>KUVAT</b>	
Kuva 1. Ob/Ob-hiirimalli verrattuna villityypin hiireen. (kuva muokattu)	9
Kuva 2. Lipoproteiinien rakenne.	11
Kuva 3. Triasyyliglyserolin molekyylirakenne.	12
Kuva 4. Triasyyliglyserolin aineenvaihdunta.	12

Kuva 5. Triasyyliglyserolin hydrolyysi.	13
Kuva 6. Tyydyttyneen rasvahapon (yläpuolella) ja tyydyttymättömän rasvahapon (alla) molekyyli rakenne.	14
Kuva 7. Glycerolin rakennekaava (vas.) ja kolmiulotteinen molekyyli rakenne (oik.).	15
Kuva 8. Glycerolin aineenvaihdunta.	16
Kuva 9. Insuliinin vaikutukset adiposyytissä.	17
Kuva 10. $\beta$ -agonistin ja NPY:n vaikutus lipolyysiin adiposyytissä.	22
Kuva 11. Emissiovalon intensiteetin absorboituminen näytteeseen.	24
Kuva 12. Jablonskin diagrammi.	25
Kuva 13. Reaktio, johon Free Glycerol Assay –kitin määrittäminen perustuu.	29
Kuva 14. Reaktio, johon NEFA-määrittäminen perustuu.	30

## KUVIOT

Kuvio 1. Sigman Free Glycerol Reagent -kitillä mitattujen näytteiden glyserolipitoisuuksia.	33
Kuvio 2. Wakon NEFA-HR(2)-kitillä mitattuja esteröitymättömien rasvahappojen pitoisuuksia näytteissä.	34
Kuvio 3. BioVisionin kitillä mitattujen näytteiden glyserolipitoisuuksia.	35
Kuvio 4. Deproteinisaation testauksessa saatuja tuloksia.	36
Kuvio 5. Menetelmän optimoinnissa saatujen tulosten yhteenveto.	37
Kuvio 6. BioVisionin kitillä määritettyjen näytteiden glyserolipitoisuuksien vertailu.	38
Kuvio 7. BioVisionin kitillä tehtyjen varsinaisten mittausten standardien vertailu.	39
Kuvio 8. Basaalinäytteiden eli käsittelemättömien näytteiden glyserolipitoisuudet.	40
Kuvio 9. NPY:llä käsiteltyjen näytteiden glyserolipitoisuudet.	40
Kuvio 10. Villityypin hiirten näytteiden ja transgeenisten hiirten näytteiden isoprenaliiniannosvasteikäyrät.	41

## TAULUKOT

Taulukko 1. Adrenergisten reseptorien sijainti kudoksissa. (24)	21
Taulukko 2. Näytetaulukko.	27
Taulukko 3. Standardiliuoksen ja puskuriliuoksen pipetointi kuoppiin.	32

## SANASTO

Adiposyytti	Rasvasolu
Adipogeneesi	Rasvan muodostuminen ja varastoiminen
Apoptoosi	Solukuolema
Ateroskleroosi	Valtimonrasvoittumistauti
Basaali	Käsitlemätön näyte
Diabeettinen retinopatia	Diabeettinen verkkokalvosairaus
Dyslipidemia	Rasva-aineenvaihdunnan häiriöt
Glukoneogeneesi	Prosessi, jossa maksa muodostaa glukoosia jostakin muusta kuin hiilihydraatista, esimerkiksi glyserolista.
Glykolyysi	Glukoosin hajotus, tapahtuu solulimassa.
Ketogeneesi	Prosessi, jossa asetyylikoentsyymi A:sta valmistetaan ketoaineita.
Lipogeneesi	Prosessi, jossa glukoosista muodostuu rasvaa glukoosin hajotessa kahdeksi glyseroliksi ja näiden esteröityessä rasvahappojen kanssa, jolloin muodostuu triglyseridia.
Lipolyysi	Adiposyyttien hajoaminen lipaasien vaikutuksesta ja adiposyyttien varastoiman rasvan vapautuminen verenkiertoon.
Neuropeptidi Y	Sympaattisen hermoston ja keskushermoston välittäjäaine, joka mm. stimuloi ruokahalua.
Sympatomimeetti	Lääkeaine, joka muistuttaa vaikutuksiltaan sympaattisen hermoston välittäjäainetta noradrenaliinia tai adrenaliinia.

# 1 Johdanto

Turun yliopiston biolääketieteen laitoksella farmakologian, lääkekehityksen ja lääkehoidon oppiaineessa toteutetaan tutkimusta, jonka tavoitteena on kehittää uusia neuropeptidi Y (NPY) -systeemiin vaikuttavia lääkehoitostrategioita mm. kiihtyneen ateroskleroosin, diabeettisen retinopatian ja lihavuuden ehkäisemiseksi. Tämä opinnäytetyö on osa laajempaa tutkimusta (FM Laura Vähätalon väitöskirja), jossa tutkitaan NPY:n vaikutusta ihmisen metabolisen oireyhtymän syntyyn hiirimallissa.

Lihavuus on valtava terveysongelma kaikissa teollisuusmaissa. (1) Olemme kokeneet valtavan kasvun lihavuuteen liittyvissä sairastumisissa ja niihin liittyvissä metabolisissa komplikaatioissa, joihin kuuluvat mm. dyslipidemia eli rasva-aineenvaihdunnan häiriöt, sydän- ja verisuonitaudit sekä sokeriaineenvaihdunnan häiriöt, kuten tyypin 2 diabetes. (2) Lihavuuteen liittyy usein myös kohonnut verenpaine, ateroskleroosi eli valtimonrasvoittumistauti, erilaiset syövät, keuhkosairaudet, mahasuolikanavan sairaudet sekä erilaiset nivelsairaudet ja monet muut sairaudet. (1)

Syöminen ja ruokahalun säätely ovat merkittäviä tekijöitä lihomisen hallinnassa. Positiivinen energiatasapaino tuottaa ylimäärin triasyyliglyseroleja varastoon rasvakudoksessa, maksassa ja lihaksessa, mistä seuraa jälkeensä insuliiniresistenssia, yliherkkyyttä glukoosille ja diabetesta. Kun maksa altistuu korkeille vapaiden rasvahappojen (FFA) ja glyserolin pitoisuuksille, se alkaa tuottaa enemmän erittäin harvatiheyksistä lipoproteiinia (VLDL) ja maksan insuliinipuhdistaminen vähenee. Tästä seuraa perifeerinen hyperinsulinemia eli kohonneet insuliiniarvot, mikä aiheuttaa perifeerisen insuliiniresistenssin ja lisääntyneen maksan glukoneogeneesin. Tämän jälkeen insuliiniresistenssi voi kehittyä diabetekseksi. Insuliiniresistenssin taso on voimakkaasti suhteessa kehon rasvamassaan, mutta kehon rasvan koostumus on myös tärkeä tekijä. (3)

Tyypin 2 diabetes on kokenut eksponentiaalisen kasvun valtavana maailmanlaajuisena yleisenä terveysongelmana viime vuosikymmeninä. Maailmassa on tällä hetkellä noin 200 miljoonaa ihmistä, joilla on diagnosoitu tyypin 2 diabetes ja vuoteen 2025 mennessä määrän odotetaan kasvavan 300 miljoonaan. (3) Tämän valtavan kasvun syihin liittyy ikääntyvä väestö, mutta osittain lihaviiden ihmisten määrän räjähdysmäinen kasvu, joka on todettu lähes kaikissa maanosissa viime vuosina. Maailmanlaajuisesti ylipainoisia ihmisiä on yli miljardi ja heistä 300 miljoonalla painoindeksi ylittää arvon  $30 \text{ kg/m}^2$ . Suurempi osa maailman ihmispopulaatiosta kärsii ylipainon seurauksista kuin aliravitsemuksesta, ja ylipaino on ohittanut aliravitsemuksen syynä sairastuvuuteen ja kuolleisuuteen. Länsimaisen elämäntyylin omaksuminen on aiheuttanut väestössä ravinnon muuttumisen tyydyttyneisiin rasvoihin ja sokeriin sekä samaan aikaan dramaattisen liikunnan määrän vähentymisen. (3)



## 2 Teoriaosuus

### 2.1 Rasva-aineenvaihdunta

Aineenvaihdunnallisten sairauksien maailmanlaajuinen kasvu vaatii kehittämään uusia terapeuttisia tekniikoita, joilla manipuloida rasvasoluja eli adiposyyttejä terveyden edistämiseksi. Koko elimistöön vaikuttavan energiatasapainon ja ravinnollisen tasapainotilan säätelyssä adiposyyteillä on tärkeä rooli, ja nämä solut ovat terapeuttisia tavoitteita aineenvaihdunnallisille sairauksille. Ylimääräiset kalorit varastoidaan rasvana adiposyyteissä. Tarvitsemme adiposyyttejä, joten tavoite ei ole estää adipogeneesiä, vaan saavuttaa adiposyyttien apoptoosi tai toisaalta vähentää adiposyyttien määrää tai vähentää lipolyysiä. Lipolyysissä adiposyytit vapauttavat varastoimansa rasvan verenkiertoon. Tautiprosesseihin osallistuvien adiposyyttien käyttäytymisen manipuloinnilla voidaan vaikuttaa esimerkiksi liikalihavuuteen ja tyypin 2 diabetekseen. Yksi tapa saavuttaa tämä tavoite on muuttaa avainasemassa olevia transkriptionaalisia polkuja adiposyyteissä, kuten niitä säätelevää glukosinottoa, rasvankäsittelyä tai adipokiinien erittymistä. (2)

Rasvakudoksen on pitkään mielletty olevan nautitusta ruoasta saatavan liiallisen rasvan varastopaikka. Se ei kuitenkaan ole vain passiivinen varastointipaikka, vaan rasvakudos on välttämätöntä, koska se on optimaalinen paikka varastoida energiaa. Esimerkiksi paaston aikana adiposyytit vapauttavat rasvahappojen muodossa energiaa muiden elinten kulutettavaksi. Eläimillä ja ihmisillä voi seurata lipodystrofia, jos kyky tuottaa adiposyyttejä on vähentynyt. Tällöin he kärsivät epämieluisista vaikutuksista kuten virheellisesti sijaitsevista rasvakertymistä lihaksissa ja maksassa, insuliiniresistenssistä ja kirroosista. (2)

#### 2.1.1 Valkoinen rasvakudos

Rasvakudos koostuu kahdesta selvästi erilaisesta kudostyypistä – ruskeasta ja valkoisesta rasvakudoksesta. Ruskea rasvakudos osallistuu toiminnallisesti termogeneesiin tai adaptiiviseen lämmöntuottoon. Valkoinen rasvakudos on

tärkeässä roolissa elimistön metabolisessa tasapainotilassa. Valkoisen rasvakudoksen kiinnostus biologiassa on noussut merkittävästi viimeaikaisen äkillisen lihavuuden ja sen liitännäissairauksien kasvun takia. Kudosta ei nähdä enää yksinkertaisena välikappaleena rasvan varastoinnille; sen myönnetään olevan valtava endokriininen ja erittävä elin, erityisesti lihavilla. Valkoiset adiposyytit vapauttavat suuren määrän proteiineja: hormoneja, signaaleja ja tekijöitä, joita kutsutaan adipokiineiksi ja niillä on laaja määrä fysiologisia toimintoja. Näistä erilaisista adipokiineista merkittävin on sytokiinin tapainen hormoni, leptiini, joka syntetisoidaan lähinnä valkoisessa rasvassa. (4)

### 2.1.2 Leptiini

Leptiini on 167 aminohapon pituinen peptidi, joka säätelee ravinnonottoa ja aineenvaihduntaa. Plasman leptiinitasot ovat suhteessa kehon rasvan määrään. Näin ollen ylipainoisilla leptiinitasot ovat korkeammat. (5) Leptiini löydettiin ja tunnistettiin vuonna 1994, kun luonnehdittiin Ob-geenissä sijaitsevaa mutaatiota, joka on vastuussa ob/ob-hiirten lihavuudesta. Valkoinen rasvakudos on pääpaikka Ob-geenin ekspressiolle ja leptiinin eritykselle. Ob/ob-hiiret, jotka eivät tuota leptiiniä (kuva 1), ovat eniten käytetty eläinmalli lihavuustutkimuksissa. (4)



Kuva 1. Ob/Ob-hiirimalli verrattuna villityypin hiireen. (kuvaa muokattu) (6)

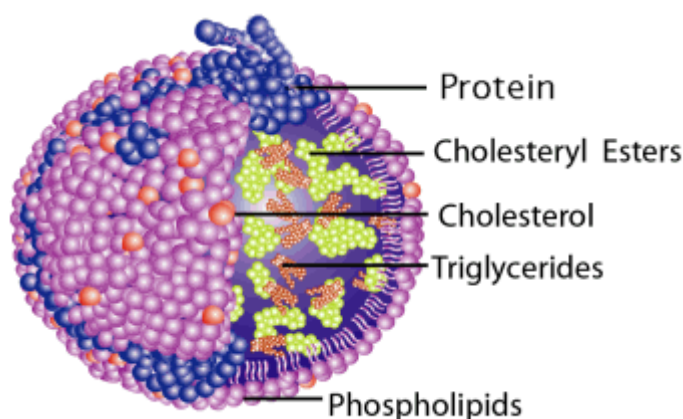
Leptiiniä tuotetaan myös muissa solutyypeissä muissa elimissä, mutta pääasiassa rasvassa. Leptiini on kriittisessä roolissa ruokahalun ja energiatasapainon säätelyssä ja sen puutos aiheuttaa ylipainoa jyrksijöillä ja ihmisillä. Leptiini säätelee ruokahalua ensisijaisesti vuorovaikutuksessa hypothalamuksen neuroendokriinisten reittien kanssa hidastaen peptidejä, kuten NPY:tä ja oreksiini A:ta. Toisaalta leptiini stimuloi anorektisiä peptidejä, kuten pro-opio-melanokorttiinia. Valkoinen rasva erittää myös adipokiinejä, kuten interleukiini-6:ta ja adiponektiinia. Leptiinin ja muiden adipokiinien takia on selvää, että valkoinen rasvakudos kommunikoi läheisesti muiden elinten kanssa ja on tärkeässä roolissa metabolisessa tasapainotilassa. (4)

Ensimmäinen valkoisten adiposyyttien erittämä proteiini, joka tunnistettiin, oli lipoproteiini lipaasi. Lipaasi on vastuussa triasyyliglyserolin hydrolyysistä ja rasvahappojen vapauttamisesta verenkiertoon. (4) Triasyyliglyserolivarastojen ylläpito riippuu pääasiassa kahdesta prosessista: lipolyysistä ja lipogeneesistä, jotka ovat keskeisiä sekä terveydessä että sairaudessa. (3) Lipogeneesi sekoitetaan usein adipogeneesiin eli uusien rasvasolujen muodostumiseen, koska rasvan kertymistä usein käytetään rasvasolujen erilaistumisen merkinä. (2)

## 2.2 Lipogeneesi

Lipogeneesi on prosessi, missä adiposyytit ottavat talteen esteröitymättömät rasvahapot (NEFA) verenkierrosta ja uudelleenesteröivät ne solunsisäisiksi triasyyliglyseroleiksi. Uudelleenesteröityminen tapahtuu solun sytoplasmassa, kun rasvahapot esteröityvät glyseroli-3-fosfaatin kanssa. Rasvakudoksen triasyyliglyserolivarastot ovat suurin energian varastomuoto, noin 10 - 30 % varastoituneesta energiasta kehossa. Esteröitymättömien rasvahappojen saatavuuden ja hapettumisen lisääntyminen on yksi päätekijöistä, jonka seurauksena paino nousee. Kun esteröitymättömät rasvahapot ovat kilpaileva energianlähde glukoosille, hapettuneessa ja hapettamattomassa glukoosin metaboliareitissä saattaa ilmetä virheitä ja puutteita, jotka vaikuttavat lihas- ja rasvakudoksen aineenvaihduntaan. (3)

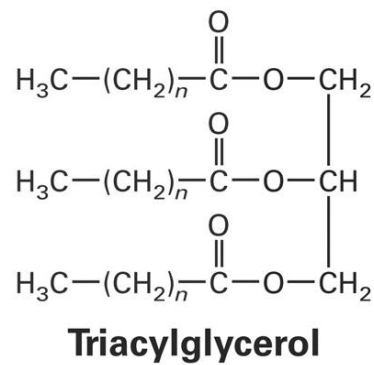
Ihmisillä maksa on anatominen pääkohta lipogeneesille, vain tietty osuus tapahtuu adiposyyteissä. (3) Jyrsijät kuitenkin tuottavat suuremman prosenttiosuuden rasvasta suoraan rasvakudoksessa. Korkea hiilihydraatin saanti ja insuliinin toiminta aktivoivat lipogeneesin adiposyyteissä. (2) Esteröitymättömiä rasvahappoja kuljetetaan sitoutuneena albumiiniin. Kolesterolia, triasyyliglyseroleja ja fosfolipidejä kuljetetaan yhdessä kuudesta lipoproteiini-kompleksimuodosta: yhdessä kolmesta todella harvatiheyksisestä lipoproteiinista (VLDL), harvatiheyksisessä lipoproteiinissa (LDL) tai suuritiheyksisessä lipoproteiinissa (HDL). Lipoproteiinit koostuvat hydrofobisesta triasyyliglyseroli-kolesteryyliesteriytimeistä, jota ympäröi fosfolipidit ja proteiinit. (3) (Kuva 2)



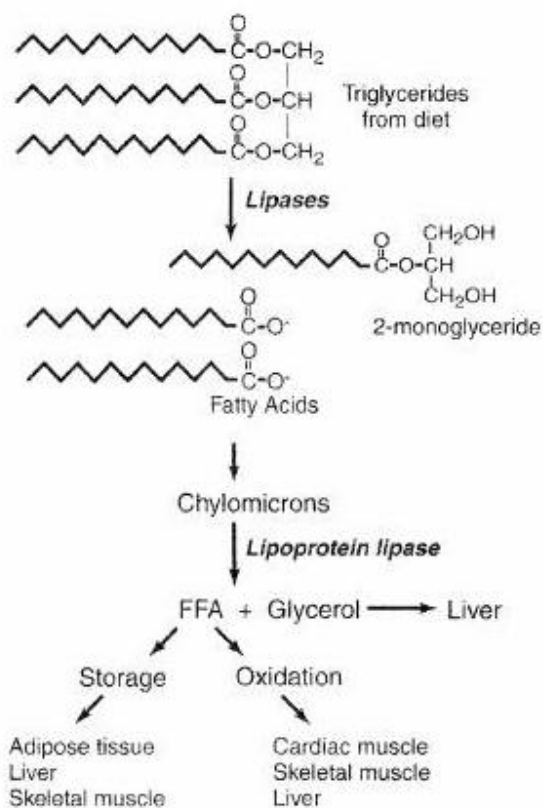
Kuva 2. Lipoproteiinien rakenne. (7)

### 2.3 Lipolyysi

Adiposyyttien tärkein tehtävä on varastoida energiaa. Energia varastoituu triasyyliglyseroliksi, jota hajotetaan solujen käyttöön tarpeen mukaan. Lipolyysillä tarkoitetaan adiposyyttien hajoamista lipaasien vaikutuksesta sekä adiposyyttien varastoiman rasvan vapauttamista verenkiertoon. Triasyyliglyseroli koostuu glyserolista ja siihen esteröityneestä kolmesta rasvahaposta. (8) (Kuva 3, s. 12)



Kuva 3. Triasyyliglyserolin molekyyli rakenne. (9)

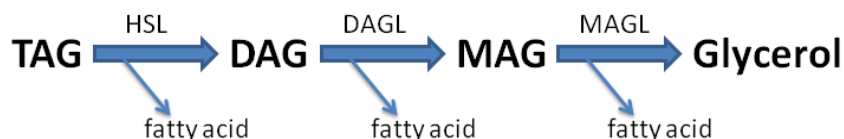


Kuva 4. Triasyyliglyserolin aineenvaihdunta. (10)

Haiman lipaasit hydrolysoivat ravinnosta saadut triasyyliglyserolit vapaiksi rasvahapoiksi ja 2-monoglyseridiksi. Nämä molekyylit absorboituvat suolistoseinämän läpi. Triasyyliglyseroli kootaan uudelleen, pakataan kylomikroneihin kuljetettavaksi verenkierron mukana kohdekudoksiin. Lipaasit pilkkovat pakatut triasyyliglyserolit vapaiksi rasvahapoiksi ja glyseroliksi. Glyseroli kulkeutuu maksaan. Elimistön energiatasapainosta riippuen vapaat

rasvahapot varastoidaan rasvakudokseen, maksaan tai luustolihakseen, tai sydänlihas, luustolihas tai maksa voi hapettaa vapaat rasvahapot. (Kuva 4, s. 12) (10)

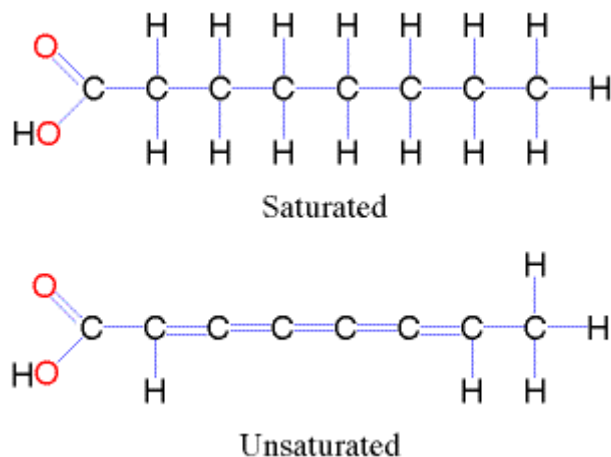
Lipaasit ovat veteenliukenevia entsyymejä, asyylihydrolaaseja, jotka ovat avainasemassa rasva-aineenvaihdunnassa. Vastakkaisen polaarisuuden, hydrofiilisen entsyymin ja hydrofobisen substraatin, välisen vuorovaikutuksen johdosta lipaasireaktio tapahtuu vesiliuoksen ja öljyfaasin rajapinnan kohdalla. Näin ollen rajapinnat ovat avainasemassa lipaasin biokatalyyseille ja sopiva paikka muunnella lipolyysiä. Tämä ryhmä entsyymejä on tehokas työkalu katalysoimaan sekä hydrolyysejä että esteröitymistä ja transesteröitymistä. (8)



Kuva 5. Triasyyliglyserolin hydrolyysi. (11)

Kuvassa 5 hormoniherkkälipaasi (HSL) hydrolysoi triasyyliglyserolin (TAG), jolloin molekyylistä lohkeaa yksi rasvahappo. Diasyyliglyserolilipaasi (DAGL) pilkkoo diasyyliglyserolin (DAG) monoasyyliglyseroliksi (MAG). Monoasyyliglyserolilipaasin (MAGL) pilkottua monoasyyliglyserolin muodostuu glyserolia ja viimeinenkin esteröitynyt rasvahappo vapautuu. (11) Muitakin entsyymejä voi osallistua lipolyysiin rasvasoluissa, kuten karboksiesteraasi-3, joka tunnetaan myös triasyyliglyserolihydrolaasina. (2)

Rasvahapon hiiliatomien väliset kemialliset sidokset vaikuttavat rasvahappojen ominaisuuksiin ja niiden tehtäviin elimistössä. Jos kaikki hiilten väliset sidokset ovat yksinkertaisia, rasvahappo on tyydyttynyt. Jos hiilten välillä on kaksoissidoksia, rasvahappo on tyydyttymätön. (Kuva 6, s. 14) Kertatyydyttymättömillä rasvahapoilla on yksi kaksoissidos ja tällaisia rasvahappoja kertyy pääasiassa varastorasvaksi. Tyydyttyneitä rasvahappoja käytetään energiaksi, mutta ne myös lisäävät veren kolesterolipitoisuutta, mikä puolestaan lisää sepelvaltimotaudin riskiä. (12)



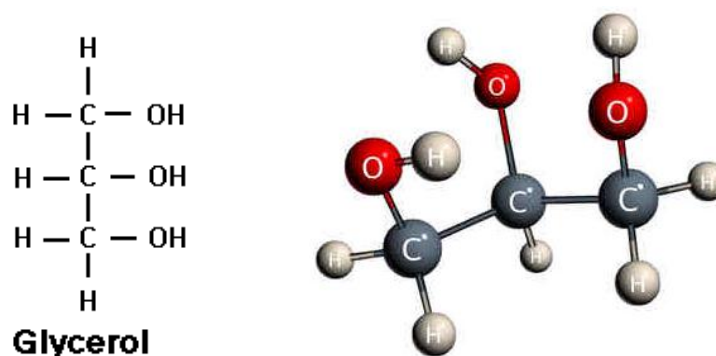
Kuva 6. Tyydyttyneen rasvahapon (yläpuolella) ja tyydyttymättömän rasvahapon (alla) molekyyli rakenne. (13)

Sappihappojen suolojen pinta-aktiivisuuden parempi ymmärrys sallisi psykokeemiallisen ja vuorovaikutusominaisuuksien manipuloinnin, jolloin olisi mahdollista muunnella rasvan pilkkomista, parantaa rasvaisten veteen liukenevien ravintoaineiden biokäytettävyyttä ja vähentää tyydyttyneiden rasvojen, kolesterolin ja transrasvojen imeytymistä. Sappihappojen suolojen tärkeys kontrolloidussa rasvaisten liukenevien ravintoaineiden ja lääkkeiden vapattamisessa ja kuljetuksessa on lähiaikoina kiihdyttänyt tutkijoiden mielenkiintoa näitä fysiologisia yhdisteitä kohtaan. Sappihappojen suolat ovat biopinta-aktiivisia aineita esiintyen vatsa-suoli-alueella, joka on tärkeässä roolissa ravintoaineiden pilkkomisessa ja imeytymisessä. Sappihappojen suolojen molekyyli rakenne on erilainen kuin klassisten pinta-aktiivisten aineiden. Tämä omalaatuinen molekyyli rakenne hyödyntää dynaamisia aggregaatteja muodostumaan kyeten liuottamaan ja kuljettamaan rasvaisia veteenliukenevia yhdisteitä. Sappihappojen suolojen puhdistusluonnetta on tutkittu kirjallisuudessa, keskittyen sappihappojen suolojen itse kokonaiskäyttäytymiseen liuoksessa, mutta myös suhteessa proteiinidenaturaatioon ja sen vaikutuksiin proteolyysin parantamisessa. Toisaalta sappihapposuulojen reaktiokyky hydrofobista faasia kohtaan on saanut vähemmän huomiota ja tutkimukset koskien suoranaista sappihappojen suolojen vuorovaikutuskäyttäytymistä on erittäin rajoittunutta kirjallisuudessa. Sappihappojen suolojen vuorovaikutusaktiivisuus on tärkeässä roolissa

adiposyyttien lipolyysissä eli adiposyyttien vapauttaessa varastoimaansa rasvaa verenkiertoon. Sappihappojen suolat kiinnittyvät rasvapisaroihin ja voivat poistaa muuta materiaalia kuten proteiineja, emulgointiaineita ja lipolyysituotteita rasvan pinnasta. Sappihappojen suolojen epätavallinen pintakäyttäytyminen on suoraan verrannollinen niiden salaperäiseen molekyyliarakenteeseen ja lisätieto voisi tarjota parempaa tietämystä rasvojen hydrolyysistä. Lukemani julkaisun tarkoituksena on yhdistää uudet oivallukset ja saavutetut sappihappojen suolojen pintakäyttäytyminen ja niiden rooli rasvan pilkkomisessa. (14)

## 2.4 Glyseroli

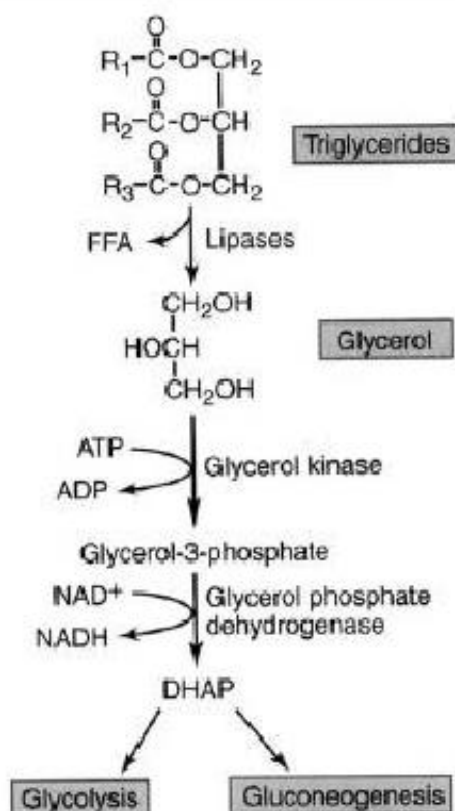
Glyseroli on kolmenarvoinen hydrofiilinen alkoholi, joka koostuu kolmesta hiilimolekyylisestä ja siihen liittyneistä hydroksyyliyhdistelmästä. (Kuva 7)



Kuva 7. Glyserolin rakennekaava (vas.) ja kolmiulotteinen molekyyli rakenne (oik.). (15; 16)

Glyseroli on monien lipidien komponentti, koska sen hydroksyyliyhdistelmät voivat muodostaa esterisidokset jopa kolmen rasvahapon kanssa. Siitä seurauksena olevalla triasyyliglyserolilla ei ole lähes lainkaan polaarisia ominaisuuksia. (17)





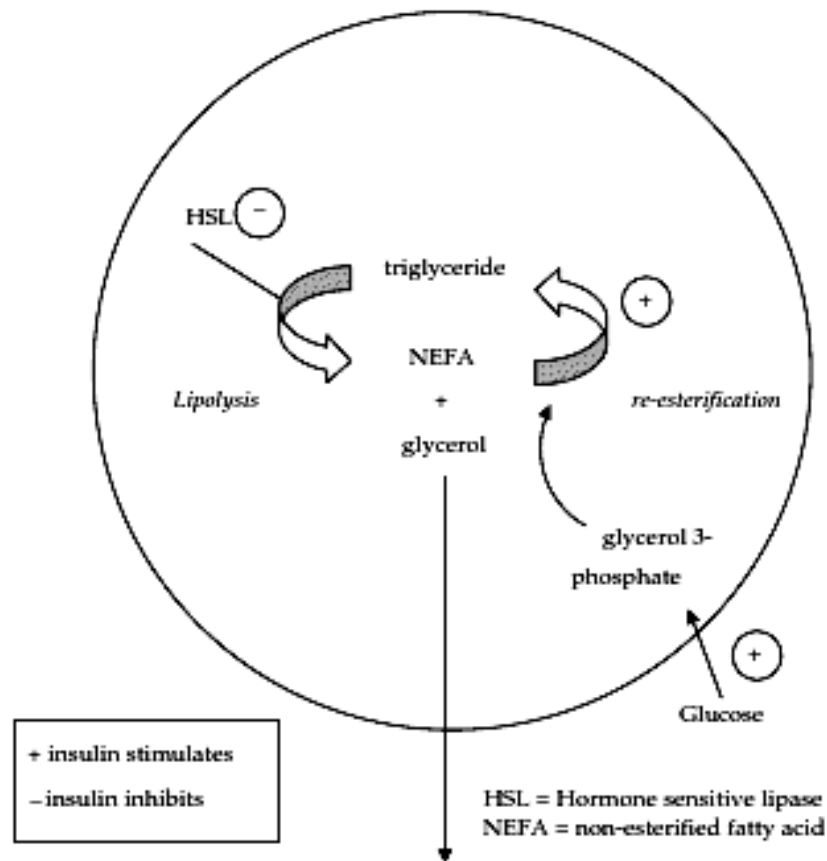
Kuva 8. Glycerolin aineenvaihdunta. (10)

Kuvassa 8 kuvataan glyserolin aineenvaihduntaa. Haiman erittämä entsyymi, lipaasi, pilkkoo triasyyliglyserolit kolmenarvoisiksi rasvahapoiksi ja glyseroliksi. (8) Glycerolikinaasi fosforyloi glyserolin tuottaen glyseroli-3-fosfaattia. Glycerolifosfaattidehydrogenaasi hapettaa glyseroli-3-fosfaatin, jolloin muodostuu dioksiasetonifosfaattia, joka voidaan palauttaa glykolyysi- tai glukoneogeneesireaktioihin. (10)

#### 2.4.1 Glukoneogeneesi ja ketogeneesi

Vapaat rasvahapot ja glyseroli ovat glukoneogeneesin ja ketogeneesin entsyymejä maksassa. (10) Ketoosissa asetyylikoentsyymi A:sta valmistetaan ketoaineita. Glukoneogeneesi on prosessi, missä maksa muodostaa glukosia hiilimonheksoosiesiasteista. (18) Glukoneogeneesin ensisijaiset substraatit ovat pyruvaatti, laktaatti, glyseroli ja aminohapot. Glukoneogeneesin taso nousee vasteessa proteiinipitoiseen dieettiin. Tällöin aterian aikana nautitut ylimääräiset

aminohapot hyödynnetään glukoneogeesissä. Maksassa ja munuaisessa on glyserolikinaasi-entsyymi, joka katalysoi glyserolin fosforylaatiota. Glyserolikinaasi vapautuu triasyyliglyserolien hydrolyysissa. Glyserolikinaasi myös sallii glyseroli-3-fosfaatin palata glykolyyttiseen tiiosifosfaattirenkaaseen. Kun lipolyysi kiihtyy esimerkiksi paaston aikana tai diabeteksessä, glyserolin osuus glukoneogeesissa tulee vielä tärkeemmäksi. (10)



Kuva 9. Insuliinin vaikutukset adiposyytissä. (19)

Kuvassa 9 kuvataan insuliinin vaikutuksia adiposyytissä. Insuliini inhiboi hormoniherkänlipaasin toimintaa. Insuliinivajaus ja katabolisten eli hajottavien hormonien, erityisesti katekolamiinien, ylimäärä edistää adiposyyttien lipolyysiä. Insuliini stimuloi rasvahappojen uudelleenesteröitymistä glyserolin kanssa. Kun triasyyliglyserolin uudelleenmuodostuminen heikentyy, esteröitymättömät rasvahapot ja glyseroli vapautuvat verenkiertoon. Maksan ketogeneesi tehostuu rasvavarastoista vapautettujen vapaiden rasvahappojen lisääntyneellä jakelulla. (19)

## 2.5 Neuropeptidi Y

NPY on laajasti tunnettu keskushermostossa oleva välittäjäaine ja sympaattisen hermoston välittäjäaine. Tämä peptidi säätelee verisuonien supistumista, munuaisten toimintaa, hormonien vapautumista, ruokahalua sekä elimistön neurobiologisia vasteita muunmuassa alkoholille. (20)

Ihmisillä NPY on tehokkain endogeeninen ruokahalua stimuloiva peptidi, joka toimii läpi keskushermostojärjestelmän, mahdollisesti läpi noradrenergisten mekanismien. Kaikkien tutkittujen eläinlajien, kuten hiiren, rotan ja kanin, hypotalamuksesta on löydetty suuret määrät NPY:tä. Rotilla ja ihmisillä nälkä liittyy kohonneisiin NPY-tasoihin, jotka kääntyvät päinvastoin ruokailun jälkeen. (21)

Hypotalamus-aivolisäke-lisämunuais-akseli (HPA-akseli) on merkittävä kokonaissysteemi, joka ylläpitää elimistön tasapainoa säännöstellen neuroendokriinistä eli neurosisäeritteistä ja sympaattista hermojärjestelmää sekä muunnellen immuunitoimintoja. Päivittäinen rytmi ja kortikosteroidien negatiivinen palaute säätelevät HPA-akselia. Keskushermostosysteemi yhdistää monia erilaisten ärsytysten vasteita erittämällä tiettyjä kortikotropiineja vapauttavia hormoneja ja vasopressiinia. Monet hermoston välittäjäaineet ja neuropeptidit ovat vastuussa kortikotropiinia vapauttavien hormonien ja vasopressiineuronien muutoksista. NPY vaikuttaa resistiinin kykyyn lisätä maksan insuliiniresistenssia ja muunnella eri välittäjien määriä maksassa. (22)

Herkästi reagoivia leptiinireseptoreja on löydetty hypotalamuksesta ja leptiini mitä todennäköisimmin toimii läpi hypotalamuksen. Krooninen leptiinihoito lisää energiankulutusta ja vähentää hypotalamista NPY:n synteesiä ja vapautumista. Eläin- ja ihmistutkimusten tulokset osoittavat, että suhteellinen leptiinipuute keskushermostosysteemissä voi olla lihavuuteen johtava mekanismi. NPY on yksi voimakkaimmista ruoanottostimulaattoreista ja suurimmalle osalle lihavuustutkimuksen eläinmalleista, kuten ob/ob hiirelle, jolla on leptiinipuute, on luonteenomaista korkea hypotalaminen NPY:n ilmentäminen. (23) Kehon rasvan menetys johtaa veren leptiinitasojen laskuun ja stimuloi

ruoanetsimiskäyttäytymistä koe-eläimillä. Painonkasvu taas johtaa veren leptiinitasojen nousuun ja ruoankulutuksen vähentymiseen. Siten plasman leptiini toimii ”lipostaattina” tarjoten aivoille tiedon kehon rasvavarastoista. Vaikka leptiini vähentää ruanottoa, sillä on aineenvaihdunnallisia vaikutuksia. (5) Leptiiniresistenssissä lisääntynyt leptiini ei vaikuta rasvakudoksessa niin kuin sen pitäisi. Kaikenkaikkiaan joillakin ylipainoisilla esiintyy leptiinin pienempiä pitoisuuksia, mikä voi johtua leptiinin epänormaalista erittymisestä rasvavarastoista. (23)

Aluksi NPY nähtiin avainasemassa näläntunteelle. Kuitenkin samoja sopeutuvia muutoksia nälälle nähtiin hiirillä, joilla NPY-geeni oli tuhottu. NPY vähentää energian kulutusta ja tutkimusten mukaan leptiini osittain rasittaa energiankulutustoimintaa muunnellen hypotalamista NPY:tä. Moni lääkefirma on kehittänyt NPY-inhibiittoreita, mutta ei ole selvää kuinka perifeerisesti hallitsevat peptidit ylittävät veri-aivo -esteen. (23)

### 2.5.1 NPY-hiirimalli

Lipolyysin tutkimisessa käytetyt näytteet olivat peräisin siirtogeenisistä NPY:tä sympaattisissa hermoissaan yli-ilmentävistä hiiristä ja saman kannan siirtogeenin suhteen negatiivisista villityypin hiiristä. Vuonna 2003 Turun yliopiston biolääketieteen laitoksella tutkimusryhmän toimesta luotiin NPY:tä sympaattisessa hermostossa yli-ilmentävä hiirimalli. Transgeeninen hiirimalli luotiin, koska NPY:n tiedetään vapautuvan noradrenergisita hermoista yhdessä noradrenaliinin kanssa ja täten hiirimalli luotiin noradrenergisille hermoille spesifisen ihmisen dopamiini-beeta-hydroksylaasin (D $\beta$ H) –promootterin avulla. Tämän jälkeen tästä hetero-hiirilinjasta tehtiin homotsygoottinen linja käyttämällä geenikonstruktia, joka mikroinjektoitiin FVB/n-hiirikannan munasoluihin. Näitä yksilöitä risteytettiin 7 kertaa C57BL/6-kannan yksilöiden kanssa ja näin saatiin aikaan NPY:tä yli-ilmentävä C57BL/6-kanta, josta tämän työn transgeeniset solunäytteet ovat peräisin. (20)

## 2.6 Isoprenaliini

Isoprenaliini on hydrokloridi, synteettinen sympatomimeettinen amiini, joka on rakenteellisesti sukua adrenaliinille. Sympatomimeetit ovat lääkeaineita, jotka muistuttavat vaikutuksiltaan sympaattisen hermoston välittäjäainetta noradrenaliinia tai adrenaliinia. Sympaattinen hermosto säätelee rauhasen, sileän lihaksen ja sydämen toimintaa sekä monia aineenvaihduntatoimintoja. (24)

Katekolamiinit, noradrenaliini, adrenaliini sekä näiden synteettinen johdos, isoprenaliini, eroavat merkittävästi toisistaan kahden erilaisen reseptorityypin toiminnoissa. Sympaattisen hermon kohde-elimissä on kahdenlaisia reseptoreita,  $\alpha$ - ja  $\beta$ -reseptoreita. Adrenergiset reseptorit sijaitsevat solukalvossa ja ne jaetaan kolmeen päätyyppiin:  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - ja  $\beta$ -reseptoreihin. (24)

$\alpha_1$ -reseptorit ovat sileälihassolujen ja rauhassolujen  $\alpha$ -reseptoreita ja niitä koodaavia geenejä on löydetty kolme eli  $\alpha_1$ -reseptorilla on kolme alatyyppeä:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  ja  $\alpha_{1C}$ .  $\alpha_2$ -reseptorilla on myös kolme alatyyppeä ja ne sijaitsevat pääasiassa presynaptisesti adrenergisten hermojen päätteissä.  $\alpha_2$ -reseptorit aktivoituvat verenkierron mukana kulkevan adrenaliinin vaikutuksesta ja säätelevät mm. hermoärsytyksen seurauksena tapahtuvaa noradrenaliinin vapautumista.  $\beta$ -reseptorilla on osoitettu myös olevan kolme alatyyppeä.  $\beta_1$ -reseptorit sijaitsevat pääasiassa sydämessä ja  $\beta_2$ -reseptorit sileässä lihaksessa, kuten verisuonissa, keuhkoputkissa ja mm. maksassa.  $\beta_3$ -adrenoseptoreita on erityisesti rasvakudoksessa. Taulukossa 1 (s. 21) on kaikkien adrenergisten reseptorien sijainti elimistössä. (24)

Noradrenaliini ja adrenaliini ovat aktiivisimpia  $\alpha$ -reseptoreilla, kun taas isoprenaliini vaikuttaa tehokkaammin  $\beta$ -reseptoreilla. Noradrenaliinilla ja adrenaliinilla on samanlainen affiniteetti  $\beta_1$ -reseptoriin, mutta pienempi määrä adrenaliinia kuin noradrenaliinia riittää aktivoimaan  $\beta_2$ -reseptorin aktivoitumisen. Noradrenaliini sitoutuu herkemmin  $\beta_3$ -adrenoseptoreihin kuin adrenaliini. Isoprenaliini vaikuttaa voimakkaasti  $\beta_3$ -reseptoreihin. Adrenergiset reseptorit

vastaanottavat viestejä, jotka välittyvät G-proteiinien välityksellä toisioläheteille. (24)

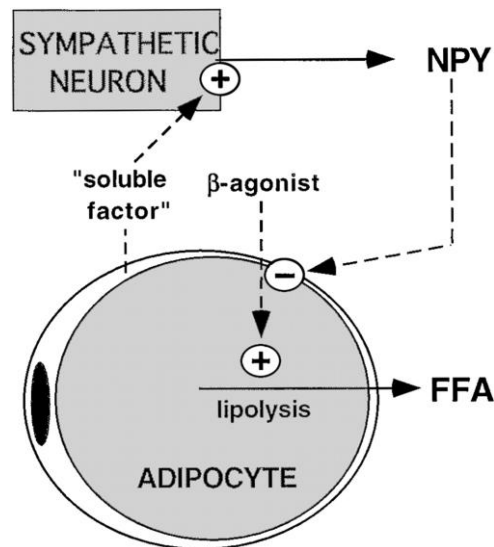
Taulukko 1. Adrenergisten reseptorien sijainti kudoksissa. (24)

Reseptori	Sijainti (kudos)
$\alpha_{1A}$	sileälihas, munuainen, eturauhanen, maksa, sylkirauhaset
$\alpha_{1B}$	perna, maksa, sileälihas, sydän
$\alpha_{1C}$	(verisuonten) sileälihas, aivot
$\alpha_{2A}$	aivot, selkäydin, haima, rasvakudos, munuainen, verihiutaleet, sympaattiset hermopäätteet
$\alpha_{2B}$	verisuonten sileälihas, muu sileälihas, munuainen
$\alpha_{2C}$	aivot, selkäydin
$\beta_1$	sydän, rasvakudos, aivot, käpylisäke, munuaisen
$\beta_2$	verisuonten sileälihas, keuhkoputkien sileälihas, kohtu, maksa, haima, aivot, poikkijuovainen lihas, sydän
$\beta_3$	rasvakudos, suolisto, aivot, poikkijuovainen lihas

$\beta$ -adrenergiset reseptorit toimivat välittäjinä monille katekolamiinien toiminnoille;  $\beta_1$ -reseptorien toimintaan kuuluu sydänlyöntien lihassupistelujen voiman ja vauhdin hallinta, lisääntyvä renniinin erityys munuaisista ja antidiureettisen eli virtsan eritystä vähentävän hormonin erityys etuaivolisäkkeestä.  $\beta_2$ -reseptorit rentouttavat keuhkojen hengitysteitä, mutta supistavat luustolihasia.  $\beta_3$ -reseptorit voivat toimia välittäjinä rasvasolujen lipolyysissa. Kaikki kolme  $\beta$ -reseptorin alatyyppejä stimuloivat adenylaattisyklaasia. (25)

Isoprenaliini on  $\beta$ -reseptoreihin vaikuttavien prototyyppi (25) Isoprenaliini tunnetaan USA:ssa isoproterenolinä. Kun tätä lääkettä annetaan systemaattisesti se laajentaa keuhkoputken sileitä lihaksia ja sitä voidaan siten käyttää esimerkiksi astman hoidossa. Isoprenaliini aiheuttaa myös laajentumia verisuonissa supistaen luustolihasia, minkä seurauksena verenpaine nousee. (26) ja sitä on käytetty aiempina vuosina astman hoitoon. Isoprenaliini kuitenkin kärsi spesifisyyden puutteesta, kun se aktivoi adrenergisiä reseptoreita myös sydän- ja verisuonisysteemissä ja aiheutti epämiellyttäviä sivuvaikutuksia, erityisesti sydämentykytystä ja ajoittaisia sydämen rytmihäiriöitä positiivisen inotrooppisen vaikutusvaiheen aikana. (25) Isoprenaliini ei ole enää lääkehoidollisessa käytössä, vaan sen merkitys on lähinnä tutkimuksen

puolella, koska se on hyvä  $\beta$ -reseptoriagonisti (S. Ruohonen, Turun yliopisto, henk. koht. tiedonanto).  $\beta$ -reseptoriagonistilla stimuloitu lipolyysi adiposyytissä lisää lipolyysiä vapauttaen vapaita rasvahappoja verenkiertoon. Sympaattisista hermoista erittyvällä NPY:llä on lipolyysiä hidastava vaikutus. (Kuva 10) (27)



Kuva 10.  $\beta$ -agonistin ja NPY:n vaikutus lipolyysiin adiposyytissä. (27)

Lihavuutta luonnehditaan kasvaneen triasyyliglyserolin varastoinnilla rasvakudoksessa. *In vitro* -tutkimuksessa eli laboratoriossa tehdyissä tutkimuksissa on saatu näyttöä  $\beta$ -adrenergisvälitteisestä lipolyyttisestä vasteesta vatsan ihonalaisessa rasvakudoksessa ylipainoisilla ja myös näyttöä tähän koko keho -tasolla *in vivo* eli elävässä organismissa tehdyissä tutkimuksissa. Maastrichtin yliopistossa tehdyssä tutkimuksessa hypoteesina oli, että  $\beta$ -adrenergisesti välitetty vaikutus lipolyysissä vähentää vatsan ihonalaisen rasvakudoksen määrää *in vivo* lihavilla miehillä. Tutkimuksessa demonstroitii *in vivo*, kuinka  $\beta$ -adrenergisesti välitetty lipolyyttinen vaste pienentyy systemaattisesti lihaviin vatsan ihonalaisessa rasvakudoksessa verrattuna hoikkiin miehiin. Tämä voi olla tärkeää kasvaneiden triasyyliglyserolivarastojen ja lihavuuden kehittymisessä tai ylläpidossa. (28)

Julkaisussa todettiin, että lihaviin yksilöiden lipolyttisistä resistenssistä katekolamiineihin on vahvaa näyttöä *in vitro* ja *in vivo* -tutkimuksista. Vähentynyt lipolyttinen vaste katekolamiineihin on ominaista lapsuudessa puhkeavassa lihavuudessa ja lihaviin lähisukulaisten adiposyyteissä. Näiden havaintojen perusteella lipolyysin katekolamiiniresistenssi ja heikentynyt lipolyysi  $\beta$ -adrenergisen stimulaation aikana saattavat olla tärkeitä tekijöitä lihavuuden alkuvaiheessa ja mahdollisesti ensisijaisia tekijöitä lihavuuden kehittymisessä tai jatkumisessa. (28)

Maastrichtissa tehdyssä tutkimuksessa ylipainoisilla osallistujilla näytti olevan kohonnut koko kehon  $\beta$ -adrenergisesti välitetty lipolyttinen vaste. Tämä heijastui korkeammilla NEFA- ja glyserolipitoisuuksilla verenkierrossa  $\beta$ -adrenergisen stimulaation aikana. Stimulaatio isoprenaliinilla kasvatti myös valtimon triasyyliglyserolipitoisuuksia. Täten lisääntynyt koko kehon  $\beta$ -adrenergisesti välitetty lipolyttinen vaste liikalihavilla on suoraan linkkinä kasvaneelle rasvakudosmassalle, kuten on aiemmin näytetty ylävartalolihavilla naisilla. (28)

$\beta$ -adrenerginen stimulaatio nosti valtimon esteröitymättömien rasvahappojen ja glyserolin pitoisuuksia sekä hoikilla että lihavilla osallistujilla. Valtimon esteröitymättömien rasvahappojen ja glyserolipitoisuuksien kasvu oli huomattavampi ylipainoisilla osallistujilla. (28) Tämä on ensimmäinen tutkimus, jossa todistetaan *in vivo*, että ylipainoisilla osallistujilla on heikentynyt  $\beta$ -adrenergisesti välitetty lipolyttinen vaste vatsan ihonalaisessa rasvakudoksessa. Kasvanut esteröitymättömien rasvahappojen vapautuminen verenkiertoon lisää näiden rasvahappojen jakelua maksaan. Kasvaneessa maksassa lisääntyy VLDL-triasyyliglyserolituotanto. Ja kuten Maastrichtin tutkimuksen ylipainoisilla osallistujilla, rasvahappojen jakelu kohottaa verenkierron triasyyliglyserolitasot  $\beta$ -adrenergisen stimulaation aikana. Koko kehon rasva-aineenvaihdunnan kontrollointi on riippuvainen tehokkaasta rasva-aineenvaihdunnan säätelystä rasvakudoksessa ja maksassa. Lisäksi maksan VLDL-triasyyliglyseroli on triasyyliglyserolin esiaste varastoituneena rasvakudokseen. Näin ollen VLDL-triasyyliglyserolijakelu rasvakudokseen ja



laajempi lipaasivälitteinen hydrolyysi voi selittää kasvaneen positiivisen triasyyliglyserolivaihtelun läpi vatsan ihonalaisen rasvakudoksen liikalihavilla osallistujilla  $\beta$ -adrenergisen stimulaation aikana. Nämä *in vivo* –tutkimustulokset verrattuna *in vitro* –tutkimuksiin osoittivat, että adrenaliini poistaa lipaasi-proteiinin ilmenemisen ja aktiivisuuden. (28)

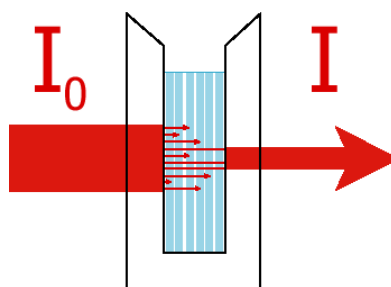
NPY:tä yli-ilmentävät hiiret ovat lihavampia kuin saman kannan villityypit. Näillä transgeenisillä hiirillä on lisääntynyt adipogeneesi. Tässä opinnäytetyössä tutkittiin, onko näiden transgeenisten hiirten  $\beta$ -välitteinen lipolyysiaktiivisuus vähentynyt samalla tavoin kuin ylipainoisilla ihmisillä. (S. Ruohonen, Turun yliopisto, henk. koht. tiedonanto)

## 2.7 Spektrofotometria

Spektrofotometri mittaa valon eri aallonpituuksien voimakkuuksia. Sen avulla voidaan selvittää paljonko tietystä valon aallonpituudesta absorboituu eli imeytyy näytteeseen. (29) Tästä voidaan laskea näytteen pitoisuus. Valon absorbanssi voidaan laskea Lambert-Beerin yhtälön avulla:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \times l \times c$$

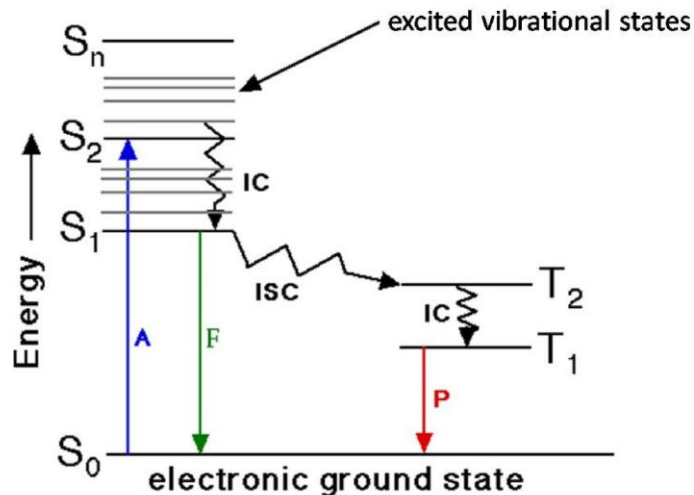
$I_0$  ja  $I$  ovat valon intensiteettejä.  $I_0$  on näytteen läpi emissioidun valon intensiteetti ja  $I$  on valon intensiteetti, joka läpäisee näytteen. (Kuva 11) Näiden avulla voidaan laskea absorbanssi  $A$ . Absorptiokertoimen  $\varepsilon$  ja optisen pituuden  $l$  avulla voidaan laskea näytteen eli absorboituvan aineen pitoisuus  $c$ . (30)



Kuva 11. Emissiovalon intensiteetin absorboituminen näytteeseen. (31)

## 2.8 Fluorometria

Fluorometrisessa mittauksessa näytteeseen emittoidaan tietty valon aallonpituus, joka virittää molekyylin. Tällöin fluoresenssin kehittäminen alkaa eksitaatiolla, jolloin energianlähde siirtää molekyyllissä elektronin alemmalta energiatasolta  $S_0$  viritettyyn korkeampaan energiatasoon  $S_2$ . (Kuva 12) (32) Fluoresenssi on valon säteilyä, joka käsittää molekyyllissä tapahtuvan elektronin singletti-singletti-siirtymän. Kun elektroni palaa alemmalle energiatasolle  $S_0$  eli viritystila purkautuu, elektroni vapauttaa energiaa valon muodossa ja emittoi sille tyypillistä sähkömagneettisen säteilyn aallonpituutta. Jos valon säteily virittyneestä tilasta tuotetaan valon absorboitumisella eli valon imeytymisellä, prosessia kutsutaan fotoluminesenssiksi. Fotoluminesenssia on kahta tyyppiä: lyhytikäinen fluoresenssi ja pitkäikäinen fosforesenssi. (33)



Kuva 12. Jablonskin diagrammi. (32)

Fluoresenssipolarisaatiomittauksessa molekyylit viritetään polarisoidulla valolla. Vain loisteaineet, jotka ovat yhdensuuntaisia valon kanssa, virittäytyvät. Virittymistila kestää tietyn ajan, joka jälkeen valonsäteily tapahtuu. Tämän aikana leimaloisteainamolekyylit kääntyy ja säteilyn valon polarisaatio muuttuu

viritystasosta. Tiettyssä ”pika”fluoresenssimittauksessa (prompt fluorometry) eksitaatiovalo suunnataan valonjohtimen läpi kuoppalevyn alta. Emissiovalo näytteen pohjalta palaa saman valonjohtimen kautta optiselle alueelle, missä on emissiosuodatin, ja sieltä valomonistinputkeen. (33)

Fluoresenssimittauksissa aineen konsentraatio voidaan laskea Parkerin lain mukaan yhtälöllä:

$$I(\lambda_{em}) = k \times I(\lambda_{exc}) \times \psi(\lambda_{exc}) \times \varepsilon(\lambda_{exc}) \times l \times c$$

$I(\lambda_{em})$  ja  $I(\lambda_{exc})$  ovat eksitaatio- ja emissiosäteilyn intensiteetit,  $\psi$  on kvanttisaanto,  $\varepsilon$  on absorptiokerroin,  $l$  on optinen pituus ja  $c$  on näytteen pitoisuus ja  $k$  on muuttumaton, riippuen optisista asetuksista ja koettimen muodosta. (30)

### 3 Kokeellinen osuus

#### 3.1 Reagenssit ja näytteet

Näytteet olivat villityypin tai transgeenisten hiirten kudoksista eristettyjä rasvasoluja. Tutkittiin, onko näiden kahden hiirikannan rasvasolujen lipolyysissä eroa toisiinsa nähden. Näytteet olivat peräisin hiiren viskeraalisesta, suoliston ympäriltä eristetyistä rasvakudoksesta, josta edelleen eristettiin rasvasolut. Tämän jälkeen soluja oli käsitelty joko eri isoprenaliinikonsentraatioilla, NPY:llä tai jätetty käsittelemättä. Näytteiden isoprenaliinipitoisuudet olivat  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M ja  $10^{-7}$  M ja NPY-pitoisuus  $10^{-5}$  M. Tutkittiin myös kyseisten lääkeaineiden vaikutusta rasvan hajoamiseen. Inkubaation jälkeen solumediumit kerättiin ja pakastettiin näitä tekemiäni glyserolimäärytyksiä varten. (S. Ruohonen, Turun yliopisto, henk. koht. tiedonanto)

Taulukko 2. Näytetaulukko.

Villityypin hiiri	Näytteet	Transgeeninen hiiri	Näytteet
WT1	A1,A2,A3, B1,B2,B3, C1,C2,C3	TG5	A1,A2,A3, B1,B2,B3, C1,C2,C3
WT2	A1,A2,A3, B1,B2,B3, C1,C2,C3	TG6	A1,A2,A3, B1,B2,B3, C1,C2,C3
WT3	A1,A2,A3, B1,B2,B3, C1,C2,C3	TG7	A1,A2,A3, B1,B2,B3, C1,C2,C3
WT4	A1,A2,A3, B1,B2,B3, C1,C2,C3	TG8	A1,A2,A3, B1,B2,B3, C1,C2,C3
		TG9	A1,A2,A3, B1,B2,B3, C1,C2,C3

Taulukossa 2 (s. 27) on lista näytteistä. Näytteet olivat peräisin yhdeksästä eri hiirestä ja esimerkiksi villityypin hiirestä WT1 oli A-, B- ja C-solumentäytteenä, joista kaikista oli kolme rinnakkaista (1 - 3).

### 3.2 Menetelmän optimointi

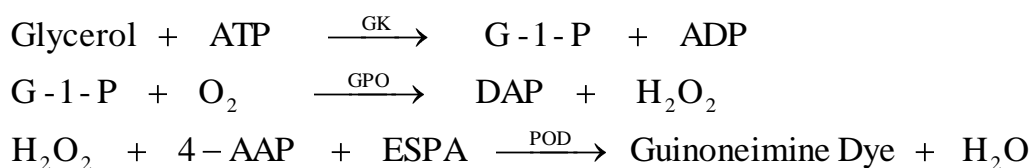
Lipolyysin tutkimiseksi testattiin kolmea kaupallista kittiä ja lisäksi deproteinisatiokäsittelyä. Glyceroli- tai rasvahappopitoisuudet mitattiin joko spektrofotometrisesti tai fluorometrisesti. Optimoinnissa keskityttiin basaalinäytteisiin ja isoprenaliinin suurimmalla konsentraatiolla käsiteltyihin näytteisiin.

#### 3.2.1 Free Glycerol Reagent -menetelmä

Sigman Free Glycerol Reagent -kitti on tarkoitettu kvantitatiiviseen entsyymattiseen glyserolin määrittämiseen seerumista tai plasmasta. Triasyyliglyserolit eli glyserolin rasvahappoesterit eivät esiinny plasmassa vapaana, vaan ovat sidoksissa proteiineihin ja niitä kuljetetaan makromolekyylikomplekseina eli lipoproteiineina. Triasyyliglyserolien määrittäminen yleisesti käsittävät entsyymattisen tai alkaalisen triasyyliglyserolien hydrolyysin glyseroliksi ja vapaiksi rasvahapoiksi, jonka jälkeen seuraa kemiallinen tai entsyymattinen vapautuneen glyserolin pitoisuuden mittaaminen. (34)

Free Glycerol Reagent -kitti mittaa vapaan, endogeenisen glyserolin käyttäen samaa parientsyymireaktiota ilman alkulipaasihydrolyysia. Glyceroli fosforyloidaan adenosini-5'-trifosfaatilla (ATP), jolloin muodostuu glyseroli-1-fosfaatti (G-1-P) ja adenosini-5'-difosfaatti (ADP). Tätä reaktiota (kuva 13, s. 29) katalysoi glyserolikinaasi (GK). G-1-P hapetetaan glyserolifosfaattioksidaasilla (GPO) dihydroksiasetonifosfaatiksi (DAP) ja vetyperoksidiksi ( $H_2O_2$ ). Peroksidaasi (POD) katalysoi vetyperoksidin, 4-aminoantipyriinin (4-AAP) ja natrium-N-etyyli-N-(3-sulfopropyyli)-m-anisidiinin (ESPA) yhdistelmän tuottaen kinonimiiniväriä, jonka absorbanssin voi lukea

aallonpituudella 540 nm. Absorbanssin kasvu on suoraan suhteessa vapaan glyserolin pitoisuuteen näytteessä. (34)



Kuva 13. Reaktio, johon Free Glycerol Assay –kitin määrittäminen perustuu. (34)

Ensin testasin spektrofotometrillä menetelmää, jossa näytteitä ja reagensseja pipetoitiin kyvetteihin. Käytössä oli Free Glycerol Reagent -kitti ja Glycerol Standard Solution -standardiliuos. Inkubointi +37 °C:ssa 5 minuuttia. Pitoisuudet mitattiin Perkin Elmer Lambda-20 -spektrofotometrillä aallonpituudella 540 nm.

Samoilla reagensseilla testattiin mittausta 96-kuoppalevyillä. Näytteitä pipetoitiin kuoppalevyille eri laimennoksilla, jotta pitoisuudet osuisivat standardisuoralle. Mittaukset tehtiin Wallac Victor<sup>2</sup> V 1420 Multilabel HTS Counter-spektrofotometrillä aallonpituudella 560 nm.

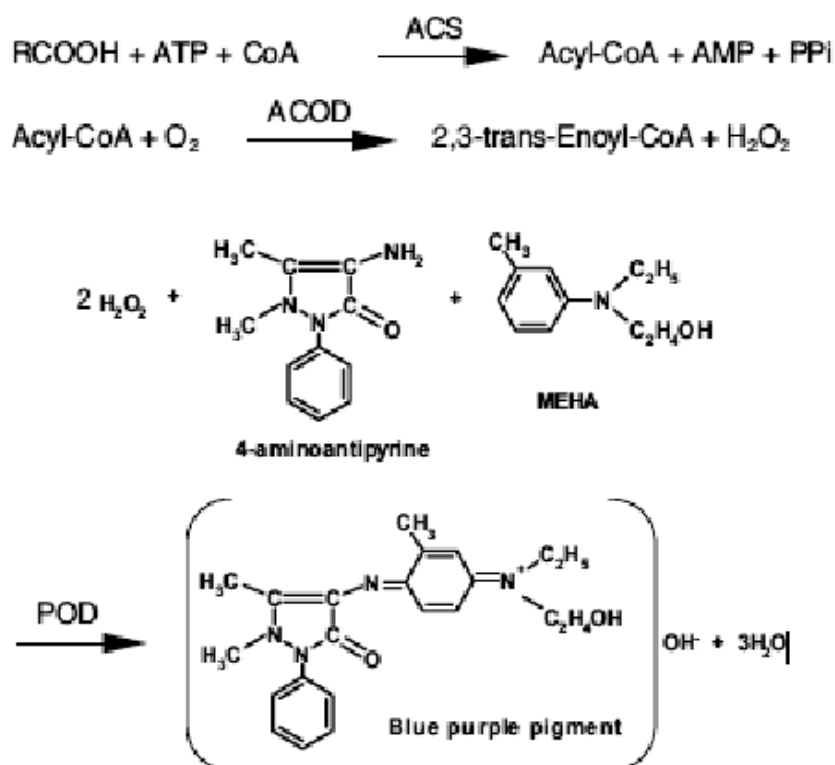
### 3.2.2 Wako NEFA-HR(2) -menetelmä

Wako NEFA-HR(2) on entsyymattinen koeputkessa tehtävä kolorimetrinen määrittäminen menetelmä, jolla voidaan määrittää kvantitatiivisesti esteröitymättömät rasvahapot seerumissa. (35)

Uuttamismenetelmiä on käytetty laajalti kolorimetrin mittausten yhteydessä luotettavien tulosten aikaansaamiseksi esteröitymättömien rasvahappojen kolorimetrisessä eli spektrofotometrisessä määrittämisessä. Esteröitymättömät rasvahapot on muunnettu kuparisuolaksi, joka on uutettu orgaaniseen liuottimeen. Suolat on integroitu väriaineen kanssa, joka soveltuu kolorimetrisen määrittämisessä. Vaihtoehtoisesti uutettu esteröitymättömä rasvahappo on titrattu standardialkalin kanssa happo-emäs-indikaattorin päätekohtaan. Nämä menetelmät ovat aikaavieviä, riskialttiita ja vaikeita

automatisoida. Tämä entsymaattinen menetelmä, Wako NEFA-HR(2), on nopea, tarkka, yksinkertainen ja helppo kvantitatiivisiin määrittäisiin. Uttovaihe on eliminoitu ja menetelmä on helppo automatisoidakin. (35)

Entsymaattinen Wako-menetelmässä rasvahapot asyloivat koentsyymi A:ta. Siten tuotettu asylylkoentsyymi A hapetetaan lisätyllä asylylkoentsyymi A – oksidaasilla, jolloin syntyy myös vetyperoksidia. Peroksidaasin (POD) mukanaolo reaktiossa mahdollistaa 3-mety-N-etyyli-N(beetahydroksietyyli)-aniliinin (MEHA) oksidatiivisen kondensaation eli hapettavan tiivistymisen 4-aminoantipyriinin kanssa. (Kuva 14) Tämän seurauksena muodostuu purppuranvärinen lisätuote, joka voidaan mitata kolorimetrisesti aallonpituudella 550 nm. (35)



Kuva 14. Reaktio, johon NEFA-määrittäminen perustuu. (35)

Color Reagent A ja B valmistettiin Wakon kittiohjeen mukaisesti. Pipetoitiin 96-kuoppalevyille 5 µl näytettä, jonka joukkoon lisättiin 200 µl Color Reagent A:ta.

Inkuboitiin +37 °C:ssa 5 minuuttia. Mitattiin absorbanssi blank-arvon määrittämiseksi aallonpituudella 560 nm. Kaikkiin kuoppiin lisättiin 100 µl Color Reagent B:tä ja toistettiin 5 minuutin inkubaatio +37 °C:ssa. Kummatkin mittaukset suoritettiin Wallac Victor<sup>2</sup> V 1420 Multilabel HTS Counter -spektrofotometrillä aallonpituudella 560 nm.

### 3.2.3 Deproteinisaatiokäsittely

Deproteinisaation avulla pyrittiin saostamaan proteiinit ja poistamaan ne liuksesta, jotta ne eivät vaikuttaisi lopullisiin glyserolin pitoisuuksiin näytteissä ja kittien herkkyudet paranisivat. Deproteinisaatiossa perkloorihappo laimennettiin 30 %:seksi. Tätä liuosta lisättiin 20 µl näytteiden joukkoon, jonka jälkeen niiden annettiin olla jäissä 10 minuuttia. Sentrifugoinnin (4000 rpm) jälkeen supernatantit siirrettiin uusiin eppendorf-putkiin ja joukkoon lisättiin pieni määrä natriumbikarbonaattia. Inkuboitiin 30 minuuttia jäissä, jonka jälkeen sentrifugoitiin 10 minuuttia, 4000 rpm. Toistettiin sentrifugointi. Supernatantti otettiin talteen. (36)

Deproteinisaatiokäsittely tehtiin satunnaisesti valituille neljälle näytteelle. Käsittelyn jälkeen 96-kuoppalevyllä mitattiin käsitellyt näytteet ja näistä näytteistä käsittelemättömät versiot vertailun vuoksi. Tehtiin spektrofotometrinen määrittäminen sekä Wakon NEFA-HR(2)-kitillä että Sigman Free Glycerol Reagent -kitillä aallonpituudella 560 nm.

### 3.2.4 Free Glycerol Assay Kit

BioVisionin Free Glycerol Assay Kit on herkkä ja helppo menetelmä määrittää näytteistä vapaan glyserolin pitoisuus. Määrittämisessä glyseroli hapetetaan entsyymaattisesti saaden aikaan tuotteen, joka reagoi koettimen kanssa tuottaen valoa aallonpituudella 570 nm ja fluoresenssia aallonpituuksilla 535 nm ja 587 nm. Kitti pystyy havaitsemaan 50 pmol – 10 nmol glyserolia näytteissä. (37)

Optimointivaiheessa standardiliuos laimennettiin ensin 0,1 mM:ksi ja näytteitä laimennettiin puskuriliuoksella. Reagenssit valmistettiin kittiohjeen mukaisesti ja



Reaction Mix-liuosta tarvittava määrä. Pipetoitiin 96-kuoppalevyllä standardit ja näytteet. Standardeja pipetoitiin kuoppiin taulukon 3 mukaisesti:

Taulukko 3. Standardiliuoksen ja puskuriliuoksen pipetointi kuoppiin.

Kuopat (A-rivi)	1 - 2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12
Standardiliuos (µl)	0	2	4	6	8	10
Puskuriliuos (µl)	50	48	46	44	42	40

Näytteitä pipetoitiin kuoppiin 6 µl ja puskuriliuosta joukkoon 44 µl. Liian pienten pitoisuuksien johdosta seuraavalla kerralla näytteitä ei laimennettu lainkaan. Näytteiden glyserolipitoisuudet eivät osuneet standardisuoralle, joten seuraavalla kerralla standardiliuos laimennettiin 0,01 mM:ksi. Jokaisella kerralla Reaction Mix -liuosta pipetoitiin standardien ja näytteiden joukkoon 50 µl.

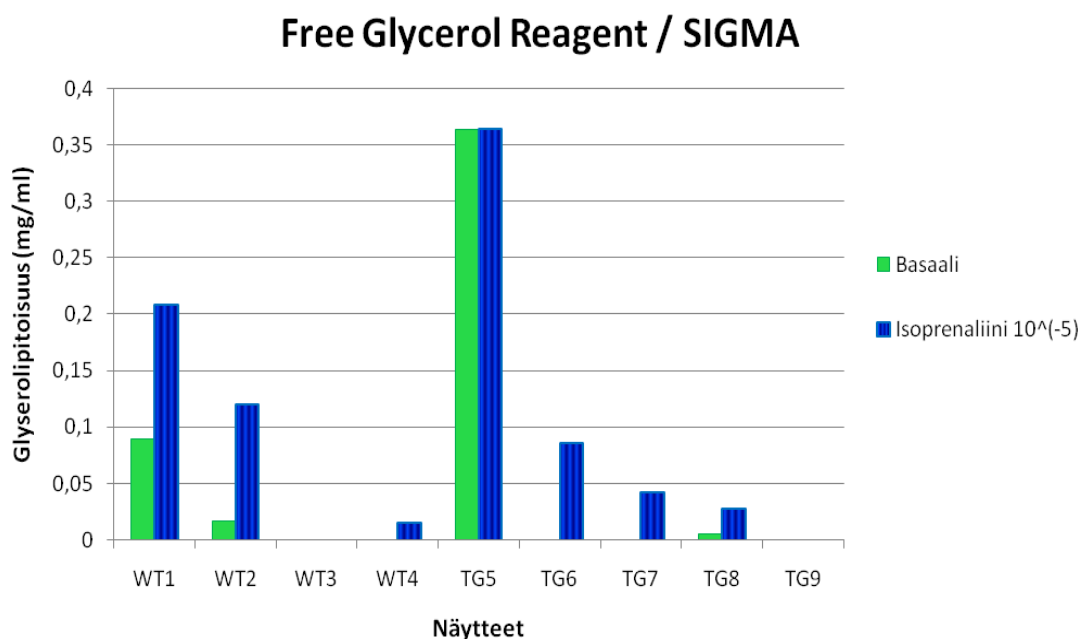
### 3.3 Glyserolipitoisuuden määrittäminen näytteistä

Varsinaiset glyserolipitoisuuksien mittaukset suoritettiin fluorometrisesti BioVisionin kitillä. Standardiliuos laimennettiin kahden vahvemman isoprenaliinilla käsitellyn näytteen kohdalla 0,05 mM:ksi ja sitä sekä puskuriliuosta pipetoitiin taulukon 3 mukaisesti 96-kuoppalevyllä. Muiden näytteiden kohdalla standardiliuos laimennettiin 0,01 mM:ksi. Näytteitä pipetoitiin kuoppiin 50 µl. Valmistettiin Reaction Mix -liuosta 96-kuoppalevyllä tarvittava määrä, ja sitä lisättiin joka kuoppaan 50 µl. Inkuboitettiin huoneenlämmössä 30 minuuttia valolta suojattuna. Mittaukset suoritettiin fluorometrisesti eksitaatioaallonpituudella 531 nm ja emissioaallonpituudella 579 nm.

## 4 Tulokset

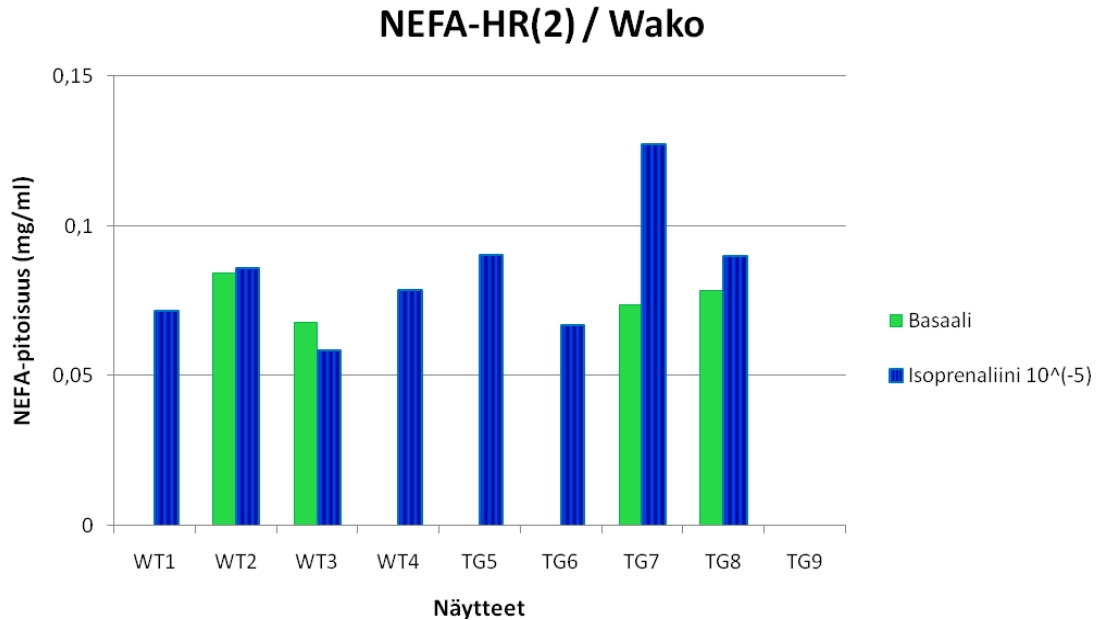
### 4.1 Menetelmän optimointi

Tarpeeksi herkkää menetelmää ei löytynyt, jolla olisi voitu määrittää kaikkien näytteiden glyserolipitoisuudet. Toisaalta pitoisuudet olivat erittäin alhaisia, ja suurin osa näytteistä pystyttiin määrittämään. Sigman Free Glycerol Reagent -kitillä spektrofotometrisesti määritettyjen näytteiden glyserolipitoisuuksissa ei ollut eroa basaalinäytteiden ja isoprenaliinilla käsiteltyjen näytteiden välillä. Tulokset olivat epämääräisiä kauttaaltaan. (Kuvio 1) Toisaalta isoprenaliinilla käsiteltyjen näytteiden glyserolipitoisuudet vaihtelivat epäsystemaattisesti riippumatta oliko näyte villityypin hiirestä vai transgeenisestä hiirestä.



Kuvio 1. Sigman Free Glycerol Reagent -kitillä mitattujen näytteiden glyserolipitoisuuksia.

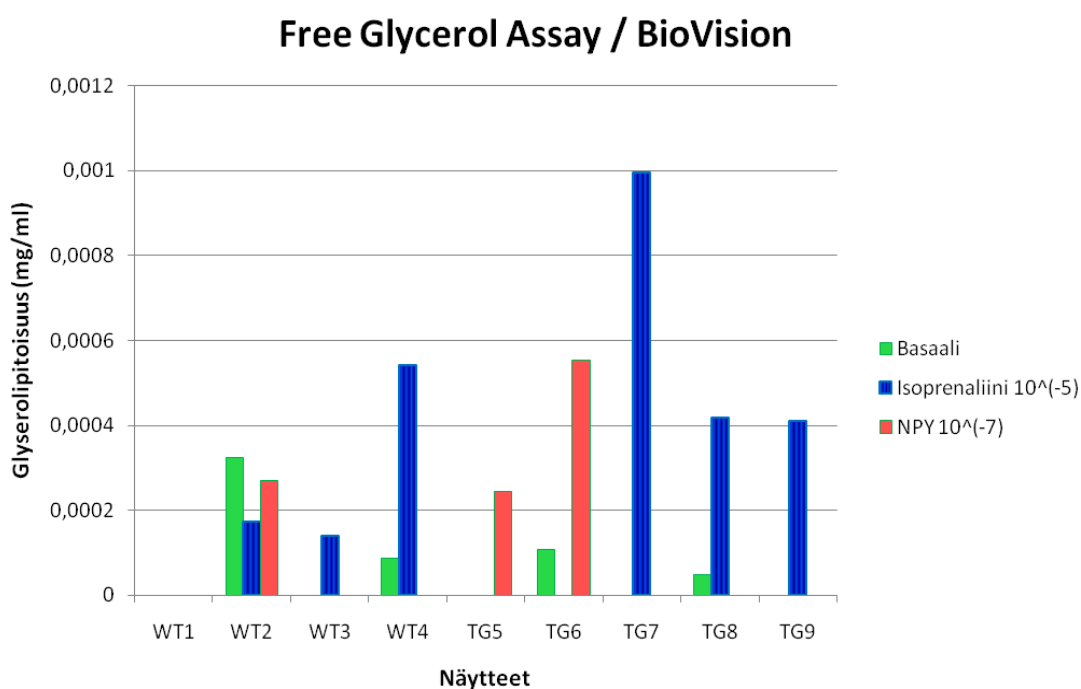
Wakon valmistamalla NEFA-HR(2)-kitillä mitattiin näytteistä esteröitymättömien rasvahappojen (NEFA) määriä.



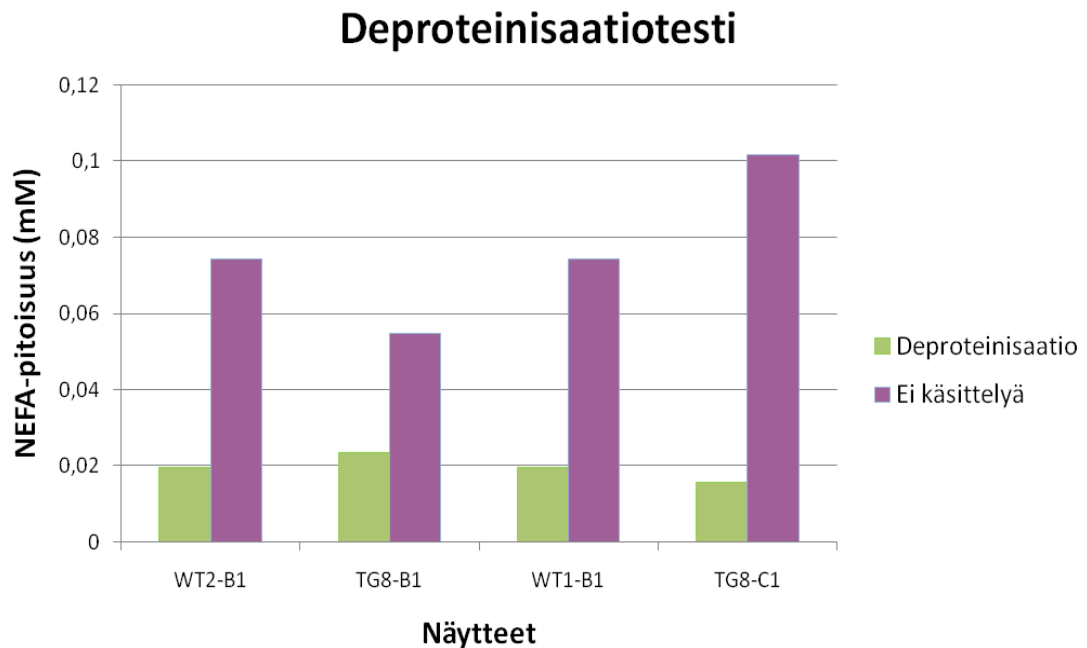
Kuvio 2. Wakon NEFA-HR(2)-kitillä mitattuja esteröitymättömien rasvahappojen pitoisuuksia näytteissä.

Näytteistä valittiin satunnaisesti muutamia villityypin hiirten näytteitä sekä transgeenisten hiirten näytteitä. Näistä mitattiin isoprenaliinin suurimmalla konsentraatiolla käsiteltyjä näytteitä sekä basaalinäytteitä. Kuvion 2 mukaisesti NEFA-pitoisuudet olivat samaa luokkaa basaalinäytteissä sekä isoprenaliinin suurimmalla konsentraatiolla käsitellyissä näytteissä. Näytteiden rasvahappomäärissä ei ollut myöskään eroa villityypin ja transgeenisen hiiren välillä.

BioVisionin kitillä mitattiin fluorometrisesti basaalinäytteitä, isoprenaliinilla käsiteltyjä näytteitä sekä NPY:llä käsiteltyjä näytteitä. Basaalinäytteissä villityypin hiirillä oli hieman korkeammat glyserolipitoisuudet kuin transgeenisten hiirten näytteissä. Isoprenaliinilla käsitellyissä näytteissä glyserolipitoisuudet olivat transgeenisillä hiirillä korkeammat kuin villityypeillä. Tämän kitin herkkyys mahdollisti näkemään pitoisuuksissa vertailukelpoisia eroja villityypin ja transgeenisten hiirten näytteissä ja toisaalta myös käsittelyjen vaikutuksia. (Kuvio 3)



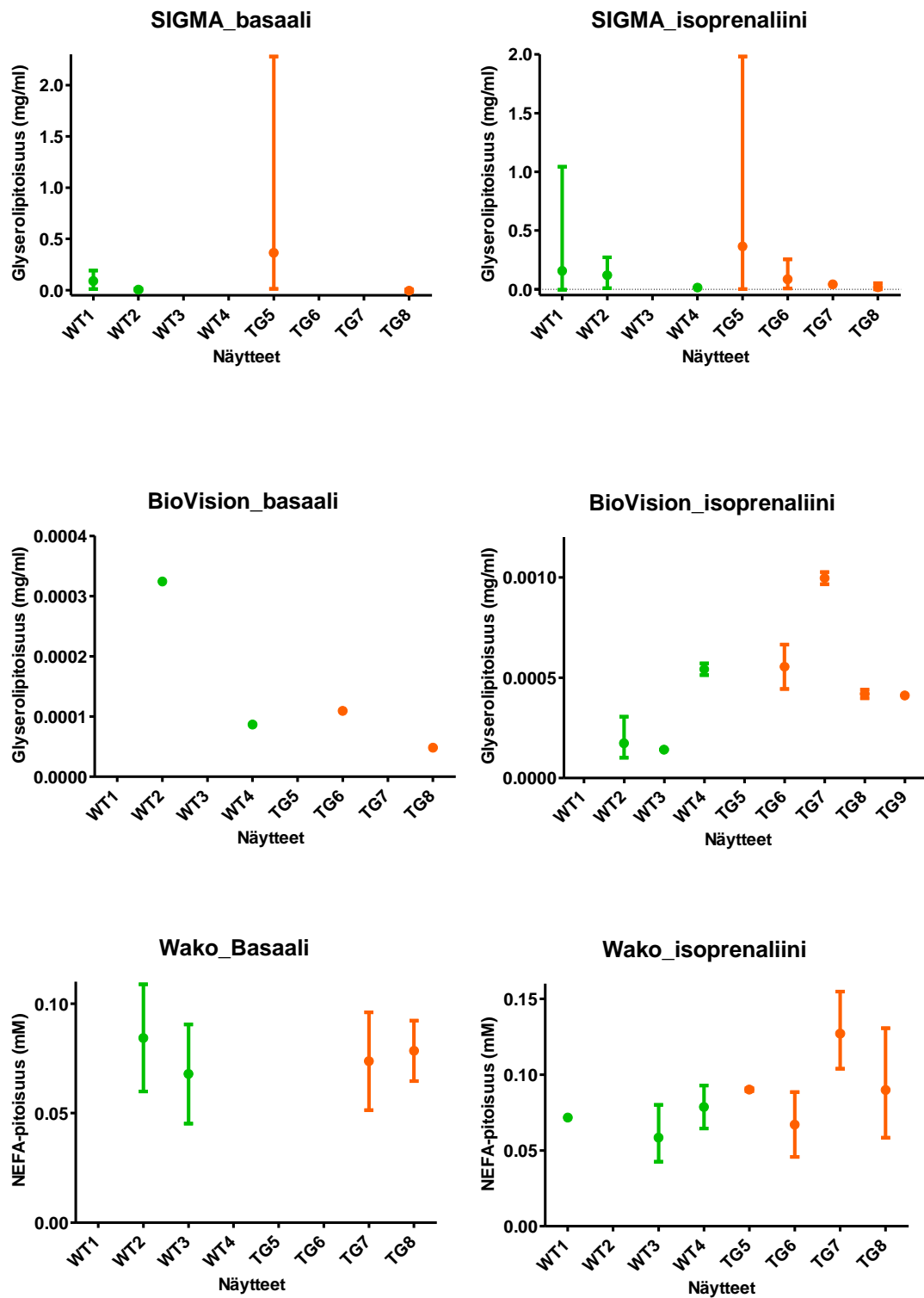
Kuvio 3. BioVisionin kitillä mitattujen näytteiden glyserolipitoisuuksia.



Kuvio 4. Deproteinisaation testauksessa saatuja tuloksia.

Deproteinisaatiolla ei päästy haluttuihin tavoitteisiin. Deproteinisaatiokäsittelyn jälkeen kaikkien neljän satunnaisesti valitun näytteen NEFA-pitoisuudet olivat paljon alhaisemmat kuin samojen näytteiden NEFA-pitoisuudet ilman deproteinisaatiokäsittelyä. (Kuvio 4) Deproteinisaatiokäsitteltyt näytteet mitattiin myös Sigman Free Glycerol Reagent –kitillä, mutta tulokset olivat negatiivisia.

Sivulla 37 kuviossa 5 on yhteenvedona kolmen kaupallisen kitin avulla saatuja tuloksia. Varsinkin Sigman ja Wakon kiteillä saaduissa pitoisuuksissa on kohtalaisen paljon hajontaa ja epäsystemaattisuutta.

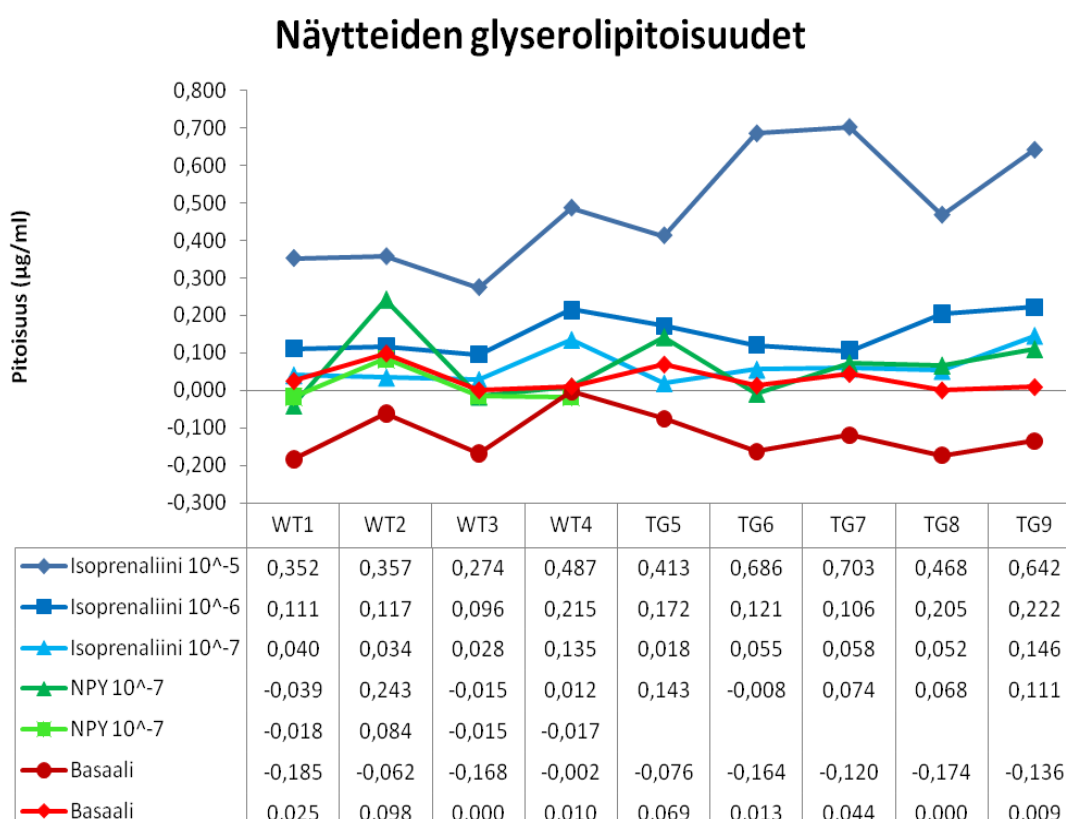


Kuvio 5. Menetelmän optimoinnissa saatujen tulosten yhteenveto.

## 4.2 Näytteiden glyserolipitoisuudet

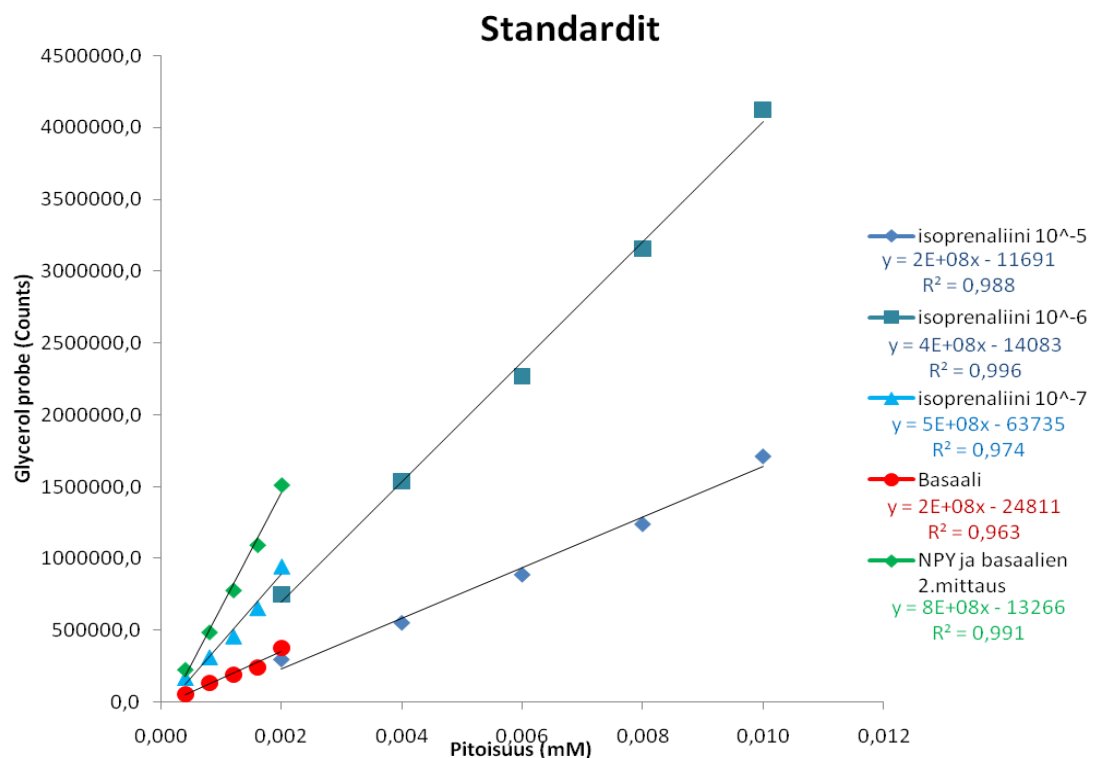
Glyserolin pitoisuudet näytteissä, erityisesti basaaleissa, olivat erittäin alhaiset, joten näistä kolmesta kaupallisesta kitistä mikään ei ollut tarpeeksi herkkä määrittämenetelmä. Näytteiden isoprenaliinivaste saatiin kuitenkin näkymään.

Kuviossa 6 on koottuna kaikkien näytteiden pitoisuuksien keskiarvot ja niistä piirretyt käyrät. Näytteet on mitattu fluorometrisesti BioVisionin Free Glycerol Assay -kitillä. Basaalinäytteissä glyserolipitoisuus on matalin. Suurin osa basaalinäytteiden pitoisuuksista on negatiivisia, joten fluorometrinen määrittämenetelmä ei riittänyt näiden basaalinäytteiden glyserolipitoisuuksien mittaamiseen. Basaalituloksissa villityypin hiirten  $n = 2$  ja transgeenisten hiirten  $n = 4$ , joten näistä ei saatu luotettavia tuloksia. (Kuvio 8, s. 40)



Kuvio 6. BioVisionin kitillä määritettyjen näytteiden glyserolipitoisuuksien vertailu.

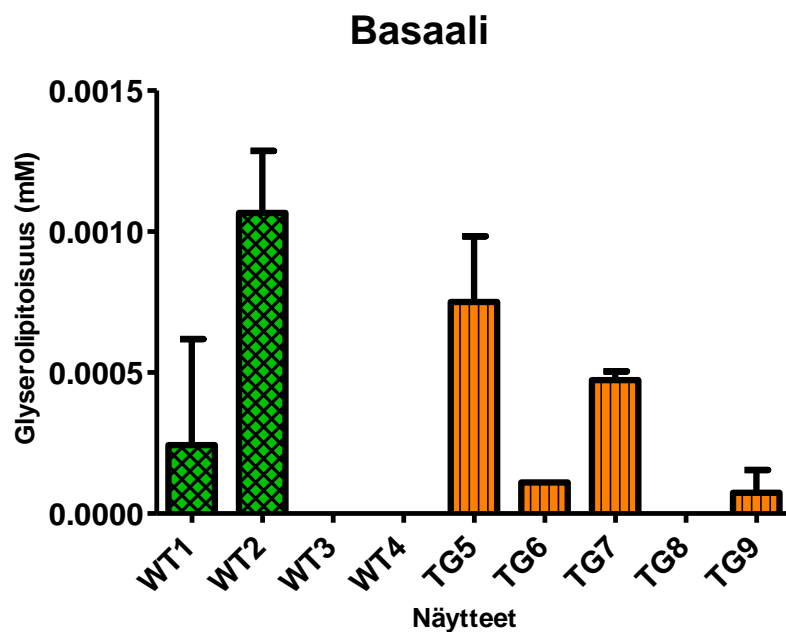
Määritykset tehtiin siten, että määritettiin aina yhdellä mittauskerralla tietyn käsittelyn saaneet näytteet. Joka kerralla laimennettiin uusi standardiliuos kyseistä määritystä varten. Standardisuorat poikkeavat jonkin verran toisistaan. Kuviossa 7 on yhdistetty BioVisionin kitillä mitattujen lopullisten määritysten standardisuorat. Basaalinäytteiden ensimmäisen mittauksen ja isoprenaliinin suurimmalla pitoisuudella käsiteltyjen näytteiden standardisuorat ovat toistensa kanssa yhtenevät. Myös isoprenaliinin toiseksi ja kolmanneksi suurimpien pitoisuuksien omaavien näytteiden standardisuorat ovat toistensa kanssa lähes yhdensuuntaiset.



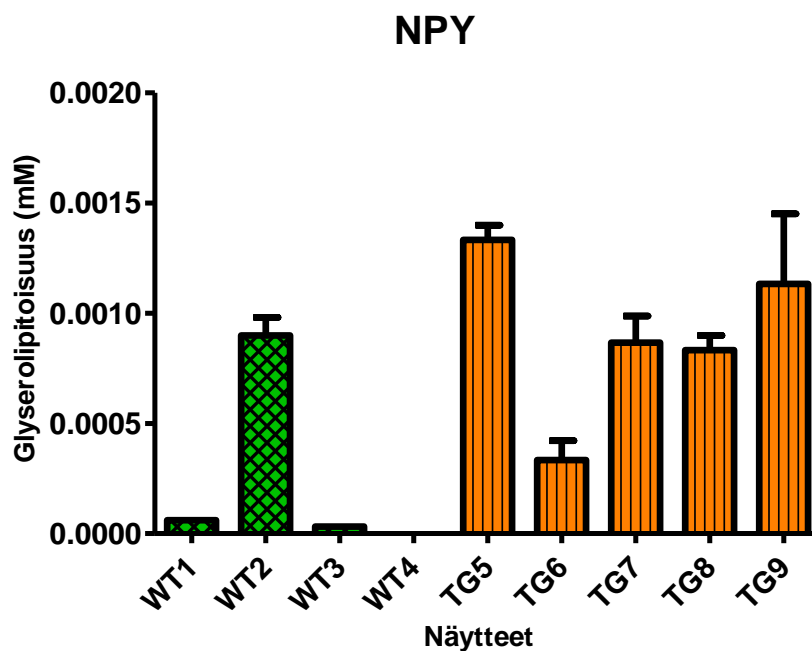
Kuvio 7. BioVisionin kitillä tehtyjen varsinaisten mittausten standardien vertailu.

Villityypin hiirten basaalinäytteistä WT1 - WT4, vain näytteissä WT1 ja WT2 oli tapahtunut lipolyysiä. Viidestä transgeenisten hiirten näytteistä neljässä oli glyserolia eli lipaasin vaikutuksesta lipolyysiä oli tapahtunut. (Kuvio 8, s. 40)



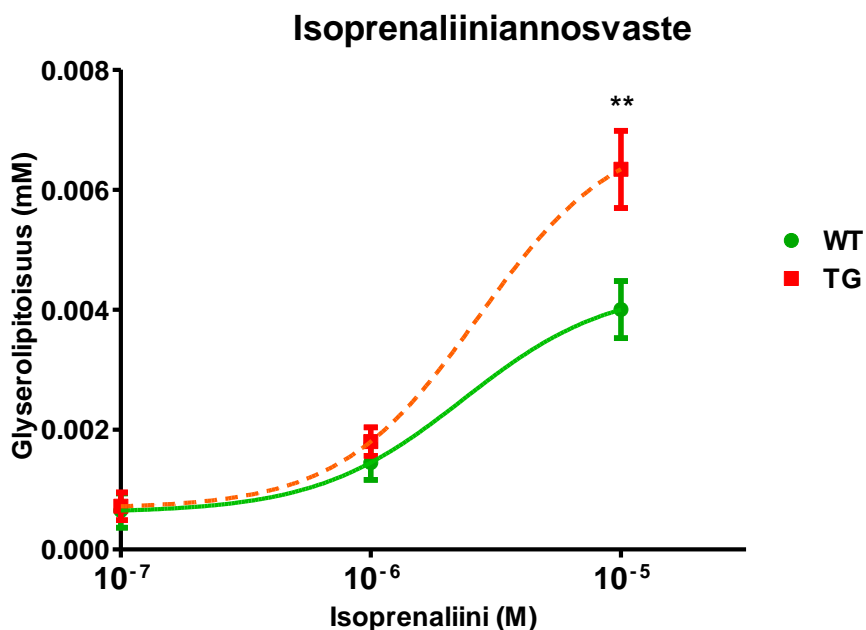


Kuvio 8. Basaalinäytteiden eli käsittelemättömien näytteiden glyserolipitoisuudet.



Kuvio 9. NPY:llä käsiteltyjen näytteiden glyserolipitoisuudet.

Villityypin NPY-käsitellyistä näytteistä vain osassa oli glyserolia. Vain WT2-näytteessä oli selkeästi pieni määrä glyserolia, muissa WT-näytteissä ainakin toinen tulosten rinnakkaisista tai kummatkin olivat negatiivisia. Transgeenisten hiirten NPY-käsitellyissä näytteissä oli glyserolia, kuten kuvio 9 (s. 40) nähdään.



Kuvio 10. Villityypin hiirten näytteiden ja transgeenisten hiirten näytteiden isoprenaliiniannosvastekäyrät.

Fluorometrisen määrittämissä menetelmän avulla saatiin sekä villityypin hiirten että transgeenisten hiirten isoprenaliiniannosvaste näkymään. Näille tuloksille tehtiin 2-suuntainen ANOVA -analyysi tilastollista vertailua varten. Kahdella tähdellä on merkitty kuvioon 10 merkittävin ero tuloksissa. Villityypin hiirten ja transgeenisten hiirten  $\beta$ -välitteisten lipolyysiaktiivisuuksien välillä on merkittävä ero ( $P < 0,01$ ).

## 5 Pohdinta

Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia villityypin hiirten ja transgeenisten hiirten lipolyysiä mittaamalla basaaleista ja NPY:llä tai isoprenaliinin eri pitoisuuksilla käsitellyistä näytteistä glyserolipitoisuuksia. Verrattiin eri valmistajien kaupallisia kittejä määrittäen glyseroli- sekä rasvahappopitoisuuksia näytteissä spektrofotometrisesti ja fluorometrisesti. Parhaimpiin tuloksiin päästiin BioVisionin kitin ja fluorometriin avulla. Fluorometrinen määritysmenetelmä on huomattavasti herkempi menetelmä, jonka avulla voidaan mitata näytteiden alhaisiakin pitoisuuksia. Jotta kaikista näytteistä olisi saatu luotettavia tuloksia, olisi tarvittu vieläkin herkempi kitti ja/tai määritysmenetelmä. Tällaisia kittejä on kaupallisesti saatavilla, mutta usein se on myös kustannuskysymys.

Tässä opinnäytetyössä tutkittiin, onko näiden transgeenisten hiirten  $\beta$ -välitteinen lipolyysiaktiivisuus vähentynyt samalla tavoin kuin ylipainoisilla ihmisillä. Näytteiden isoprenaliiniannosvaste saatiin näkymään. Vaste oli kasvanut transgeenisillä hiirillä eli  $\beta$ -välitteinen lipolyysiaktiivisuus oli suurempi näillä lihavammissa hiirillä kuten ylipainoisilla ihmisilläkin. Tätä ilmensi lipolyysin seurauksena kohonneet glyserolipitoisuudet näytteissä.

Vallitsevan hypoteesin mukaan NPY estää tai hidastaa lipolyysiä eli vähentää glyserolin vapautumista adiposyyteistä. Etenkin transgeenisten hiirten NPY-käsitellyissä näytteissä oli glyserolia. Tämä saattaa johtua transgeenisten hiirten alentuneesta katekoliamiiniinutuotannosta, jolloin solut reagoivat ulkoiseen katekoliamiiniannosteluun rajummin kuin villityypin hiirten solut.  $\beta$ -reseptoreita on mahdollisesti enemmän solujen pinnalla, koska elimistö ei tuota ylipainoisilla tarpeeksi katekolamiineja solujen tarpeisiin. NPY-käsiteltyjen näytteiden glyserolipitoisuudet olivat hieman korkeammat kuin basaalinäytteiden pitoisuudet. NPY-käsitellyt näytteet olisivat saattaneet tarvita mukaan lipolyysin indusoijan, jota se inhiboisi, jotta NPY:n vaikutus lipolyysiin olisi voitu havainnoida.

Menetelmän optimointivaiheessa deproteinsaatiokäsittelyllä ei päästy haluttuihin tavoitteisiin. Tähän oli monia syitä. Varsinkin Sigman Free Glycerol Reagent -kitin kanssa ei saatu lainkaan positiivisia tuloksia ja Wakon kitin kanssa rasvahappopitoisuudet olivat deproteinsaatiokäsitellyillä näytteillä huomattavasti matalammat kuin samoilla näytteillä, joille ei ollut tehty deproteinsaatiokäsittelyä. Tähän oli mahdollisesti syynä deproteinsaatiokäsittelyssä käytetyt vääränlaiset reagenssit. Ohjeessa, jonka mukaan deproteinsaatio toteutettiin, oli natriumbikarbonaatin sijasta kaliumkarbonaatti. Tämän reagenssin tarkoituksena oli neutralisoida liuos, mutta vääränlaisen suolan läsnäollessa tämä mahdollisesti epäonnistui.

## LÄHTEET

1. Abrams, S. A. ja Wong, W. W. (2003) *Stable Isotopes in Human Nutrition : Laboratory Methods and Research Applications*. ss. 107. CABI Publishing, Cambridge, MA, USA.
2. Rosen, E.; Eguchi, J. ja Xu, Z. (2009) Transcriptional targets in adipocyte biology. *Expert Opin Ther Targets*. **13**: 975-986. Beth Israel Deaconess Medical Center, Division of Endocrinology/CLS743, Boston, USA.
3. Barnett, A. H. ja Kumar, S. (2005) *Obesity and Diabetes*. ss. xii, 1-9, 33-36, 58-60. Wiley, Hoboken, NJ, USA.
4. Trayhurn, P. ja Bing, C. (2006) Appetite and Energy Balance Signalf from Adipocytes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **361**: 1237-1249. Obesity Biology Unit (Liverpool Centre for Nutritional Genomics and Liverpool Obesity Research Network), School of Clinical Sciences, University of Liverpool, UK.
5. Silverstone, T. (2005). *Eating Disorders and Obesity: How Drugs Can Help*. ss. 10\_. IOS Press, Amsterdam, NLD.
6. University of Colorado. (2008) Internet-lähteisiin viittaaminen [online, viitattu 2.5.2011]. saatavilla www-muodossa: <http://www.colorado.edu/intphys/Class/IPHY3730/image/figure13-5.jpg>.
7. Zamora, A. (2007) Internet-lähteisiin viittaaminen [online, viitattu 8.5.2011]. saatavilla www-muodossa: <http://www.scientificpsychic.com/health/lipoproteins-LDL-HDL.html>.
8. Reis, P.; Holmberg, K.; Watzke, H.; Leser, M. E. ja Miller, R. (2009) Lipases at Interfaces : A Review. *Abstract. Adv Colloid Interface Sci*. **147-148**: 237-250. Nestlé Research Center, Lausanne 26, Switzerland.
9. Vikivil (2010). Internet-lähteisiin viittaaminen [online, viitattu 18.4.2011]. saatavilla www-muodossa: <http://flashcarddb.com/cardset/90391-fatty-acids-complex-lipid-chem-flashcards>.
10. Storey, K. B. (2005). *Functional Metabolism : Regulation and Adaptation*. ss. 251-252. Wiley, Hoboken, NJ, USA.
11. Grisby, B. (2010). Internet-lähteisiin viittaaminen [online, viitattu 29.4.2011]. saatavilla www-muodossa: [http://dolly.biochem.arizona.edu/Bioc462b\\_Honors\\_Spring\\_2010/brianna1/background3.html](http://dolly.biochem.arizona.edu/Bioc462b_Honors_Spring_2010/brianna1/background3.html).
12. Aro, A. (2008). Internet-lähteisiin viittaaminen [online, viitattu 8.5.2011]. saatavilla www-muodossa: [http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=skr00003](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=skr00003).
13. Louisiana State University (2008). Internet-lähteisiin viittaaminen [online, viitattu 10.5.2011]. saatavilla www-muodossa: <http://www.biology.lsu.edu/introbio/Link2/fatty%20acids.gif>.
14. Maldonado-Valderrama, J.; Wilde, P.; Macierzanka, A. ja Mackie, A. (2011) The role of bile salts in digestion. *Abstract. Adv Colloid Interface Sci*. **165(1)**: 36-46. University of Granada, Department of Applied Physics, Campus de Fuentenueva, Granada, Spain.
15. Jonsson, R. (2011). Internet-lähteisiin viittaaminen [online, viitattu 29.4.2011]. saatavilla www-muodossa: [http://www.raw-milk-facts.com/fat\\_primer\\_T3.html](http://www.raw-milk-facts.com/fat_primer_T3.html).
16. Dunn, K. M. (2005). Internet-lähteisiin viittaaminen [online, viitattu 11.5.2011]. saatavilla www-muodossa: <http://www.cavemanchemistry.com>.

17. Frayn, K. (2009). *Metabolic Regulation : A Human Perspective*. 3. painos. ss. 10-12. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, USA.
18. Tuc, J.; Dunlop, B. ja Proietto, M. (2000) *Diabetes Research : A Guide for Postgraduates*. ss. 15. CRC Press, London, GBR.
19. Krentz, A. (2004). *Emergencies in Diabetes : Diagnosis, Management and Prevention*. ss. 9-10. Wiley, Hoboken, NJ, USA.
20. Toukola, L. (2009). NPY:tä yli-ilmentävä hiiri metabolisen oireyhtymän eläinmallissa. Pro gradu –tutkielma. Turun yliopisto, Biolääketieteen laitos.
21. Mela, D. (2005). *Food, Diet and Obesity*. ss. 475-477. Woodhead Publishing, Cambridge, GBR.
22. Loche, S. ja Cappa, M. (2009) *Endocrine Development, Volume 17 : Pediatric Neuroendocrinology*. ss. 108-113, 175-181. Karger Publishers, Basel, CHE.
23. Burniat, T. J.; Lissau, W. ja Cole, I. (2002) *Child and Adolescent Obesity : Causes and Consequences, Prevention and Management*. ss. 204-206. Cambridge University Press, West Nyack, NY, USA.
24. Koulou, M. ja Tuomisto, J. (toim.) (2007). *Farmakologia ja toksikologia*, 6. painos. Medicina Oy, Turku, Suomi.
25. Coulson, C. J. (1993). *Molecular Mechanisms of Drug Action*. ss. 159-166. Taylor & Francis, London, GBR.
26. Gard, P. R. (2000). *Human Pharmacology*. ss. 27-31. CRC Press, New York, NY, USA.
27. Turtzo, L. C.; Marx, R.; ja Lane, M. D. (2001) Cross-talk between sympathetic neurons and adipocytes in coculture. *PNAS*. **98**. 12385-12390. Departments of Biological Chemistry and Neuroscience, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD.
28. Jocken, J. W. E.; Goossens, G. H.; van Hees, A. M. J.; Frayn, K. N.; van Baak, M.; Stegen, J.; Pakbiers, M. T. W.; Saris, W. H. M. & Blaak, E. E. (2008) Effect of beta-adrenergic stimulation on whole-body and abdominal subcutaneous adipose tissue lipolysis in lean and obese men. *Diabetologia*. **51**. Number 2. 320-327.
29. Albani, J. R. (2008). *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*. ss. 4-6. Wiley, Chichester, GBR.
30. Martellucci, S.; Chester, A. N. ja Mignani, A. G. (2000) *Optical Sensors and Microsystems: New Concepts, Materials, Technologies*. ss. 160-162. Kluwer Academic Publishers, Hingham, MA, USA.
31. Arizona State University (2000). Internet-lähteisiin viittaaminen [online, viitattu 30.4.2011]. saatavilla [www.muodossa: http://www.public.asu.edu/~laserweb/woodbury/classes/chm467/bioanalytical/spectroscopy/absf1r.html](http://www.muodossa: http://www.public.asu.edu/~laserweb/woodbury/classes/chm467/bioanalytical/spectroscopy/absf1r.html).
32. Barron, A. R. (2010) Internet-lähteisiin viittaaminen [online, viitattu 30.4.2011]. saatavilla [www.muodossa: http://cnx.org/content/m34680/latest/](http://www.muodossa: http://cnx.org/content/m34680/latest/).
33. Perkin Elmer. (2000) Instrument manual. Wallac 1420 Multilabel Counter.
34. Technical Bulletin. Product Information. Free Glycerol Reagent. Cat. F6428.
35. Wako Diagnostics. Instructions. HR Series NEFA-HR(2). [online, viitattu 12.4.2011]. saatavilla [www.muodossa: http://www.wakodiagnostics.com/r\\_nefa.html](http://www.muodossa: http://www.wakodiagnostics.com/r_nefa.html).

36. Zapf, J.; Schoenle, E.; Waldvogel, M.; Sand, I. ja Froesch, R. (1981) Effect of Trypsin Treatment of Rat Adipocytes on Biological Effects and Binding of Insulin and Insulin-Like Growth Factors. *Eur. J. Biochem.* **113**. 605 – 609.

37. BioVision. Free Glycerol Assa Kit. Cat. #K630-100. Rev. 09/09.