

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Lipázy v mléce a jejich funkce

Bakalářská práce

Autor práce: Petra Šťastná

Vedoucí práce: prof. Ing. Mgr. Markéta Sedmíková, Ph.D.;
RNDr. Jan Kovář, CSc.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Lipázy v mléce a jejich funkce" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 6.dubna 2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala RNDr. Janu Kovářovi, CSc. za poskytnutí zázemí pro vlastní metodiku a též za věnovaný čas a konstruktivní připomínky k vlastní práci, paní profesorce Ing. Mgr. Markétě Sedmíkové, PhD. za možnost volby tématu, který souvisí s mým dosavadním vzděláním a mohl by dopomoci k rozšíření experimentů v oblasti chovu zvířat. A v neposlední řadě mé rodině, jež mi umožnila věnovat se studiu.

Lipázy v mléce a jejich funkce

Souhrn

Cílem bakalářské práce bylo shrnout současné vědecké poznatky o lipázách, které jsou přítomny v mléce a jejich funkci v produkci a utilizaci mléčného tuku. Součástí práce bylo i zavedení metod na stanovení aktivity těchto lipáz.

V mléce všech savců je přítomna lipoproteinová lipáza (LPL). Tento enzym hydrolyzuje v mléčné žláze triacylglyceroly pocházející z cirkulace. Uvolněné mastné kyseliny jsou posléze buňkami mléčné žlázy vycytány a inkorporovány do triacylglycerolů mléčného tuku. V samotném mléce není enzym funkční a patrně funguje pouze jako zdroj proteinů pro mládě. Druhou z lipáz přítomných v mléce je žlučovými kyselinami stimulovaná lipáza (BSSL). Tento enzym je exprimován v pankreatu všech savců a u některých druhů (člověk, pes, myš aj.) i v mléčné žláze. U těchto druhů významně přispívá k hydrolyze triacylglycerolů mateřského mléka a umožňuje tak jejich účinnější vstřebávání. Enzym však chybí například v kravském mléce. U člověka bylo demonstrováno, že suplementace umělé výživy na bázi kravského mléka rekombinantní BSSL výrazně zlepšuje prospívání předčasně narozených dětí. Úloha tohoto enzymu byla poměrně intenzivně studována u myši a u člověka, pro řadu druhů nejsou ovšem o tomto enzymu dostupné prakticky žádné informace. Ty by mohly zásadně přispět například ke správnému výběru náhradní mléčné stravy pro mláďata, která jsou po porodu matkou odmítnuta.

Byla zavedena metoda pro stanovení LPL a BSSL a – aktivita byla orientačně stanovena ve vzorcích mléka tří druhů (člověk, pes, kráva) a byla sledována linearita reakce v závislosti na čase. Obě metody vyžadují další optimalizaci.

Klíčová slova: mléko, mléčná žláza, triacylglyceroly, lipoproteinová lipáza, žlučovými kyselinami stimulovaná lipáza

Lipases in milk and their function

Summary

The aim of the thesis is to summarize current state of the art on lipases present in milk and their function in the production and utilization of milk fat. Methods for determination of the activity of these lipases will be implemented in the laboratory.

Lipoprotein lipase (LPL) is present in milk of all mammals. In the mammary gland LPL hydrolyses triglycerides from the circulation and the released fatty acids are then taken up by the cells of the mammary gland and incorporated into triglycerides of milk fat. The enzyme is not functional in milk and likely serves only as a protein source for the young. The second of the lipases present in the milk is bile salt-stimulated lipase (BSSL). This enzyme is expressed in the pancreas of all the mammals and in some species (man, dog, mouse, etc.) also in the mammary gland. In these species the enzyme contributes significantly to hydrolysis of milk triglycerides and, in this way, facilitates their effective absorption. The enzyme is missing in cow's milk. It has been demonstrated that supplementation of formula on the basis of cow's milk with recombinant BSSL improves the growth of preterm infants. The role of this enzyme was quite extensively studied in mice and humans, however, for a number of species there is virtually no information on BSSL. Such an information could substantially contribute to the finding of the correct replacement for maternal milk food for young that are postpartum refused by mothers.

The methods for determination of LPL and BSSL were introduced – the activity of both enzymes was determined in samples of milk of three species (man, dog, cow) and the linearity of reaction versus time was studied. Both methods should be optimized in the future.

Keywords: milk, mammary gland, triglyceride, lipoprotein lipase, bile salt-stimulated lipase

Obsah

1 Úvod	7
2 Cíl práce	8
3 Literární přehled	8
3.1 Mléčná žláza a její anatomie	8
Laktogeneze	10
Buněčné mechanismy pro tvorbu a sekreci mléka.....	11
3.2 Triacylglyceroly	13
3.3 Lipoproteiny	13
Metabolismus lipoproteinů	15
3.4 Lipázy.....	16
Klasifikace lipáz	17
Lipoproteinová lipáza (LPL)	19
Funkce lipoproteinové lipázy v mléčné žláze a v mléce	21
Žlučovými kyselinami stimulovaná lipáza (BSSL)	22
Význam žlučovými kyselinami stimulované lipázy (BSSL) v mléce	23
4 Materiál a metody	24
4.1 Princip stanovení aktivity lipáz přítomných v mléce (LPL, BSSL).....	24
4.2 Použité chemikálie	25
4.3 Odběr a příprava vzorků.....	25
4.4 Příprava reagensů pro stanovení LPL	26
4.5 Příprava reagensů pro stanovení BSSL	27
4.6 Reagencie společné pro obě lipázy	27
4.7 Postup stanovení.....	28
5 Výsledky	31
Stanovení aktivity LPL	31
Stanovení aktivity BSSL	32
Vliv délky inkubace na aktivitu LPL	33
Vliv délky inkubace na aktivitu BSSL.....	34
6 Diskuze	35
6.1 Aktivita LPL v mléce	35
6.2 Aktivita BSSL v mléce.....	36
7 Závěr	37

1 Úvod

Mléko savců je komplexní směs živin, nezbytná pro výživu potomstva. Živiny, tedy cukry, tuky, bílkoviny, vitamíny, minerální prvky, ale i prvky stopové, jsou v mléce zastoupeny v optimálním poměru i množství přesně dle potřeb potomka pro zajištění jeho správného růstu a vývoje. Dominantní složkou mléka jsou proteiny, jako je kasein a syrovátkové proteiny. Jejich poměrné množství, stejně jako kompletní složení mléka je velmi variabilní v závislosti na druhu a požadavku mláďat. Prioritní potřebou mláďat v prvních dnech či týdnech života je dostatečný příjem energie, kterou získávají především hydrolýzou tukových kapének obsažených v mléce. Mléko různých živočišných druhů obsahuje od 2 % až po 50 % lipidů u rypouše sloního (Crocker et al., 2014). K tomu, aby mohl být tuk secernován do mléka je v buňkách mléčné žlázy důležitá přítomnost enzymu s lipázovou aktivitou – lipoproteinové lipázy. Ta potom uniká do mléka, kde ale zřejmě nemá žádný funkční význam. U některých druhů zvířat byl však v mléce prokázán ještě jeden enzym s lipázovou aktivitou – žlučovými kyselinami stimulovaná lipáza (Bile Salt-Stimulated Lipase, BSSL). Tento enzym patrně přispívá k trávení tuků v trávicím traktu mláďat. Enzymu byla v poslední době věnována pozornost především u člověka, neboť přidavek rekombinantní žlučovými kyselinami stimulované lipázy k náhradní umělé výživě předčasně narozených dětí významně přispívá k přírůstku na váze (Casper et al., 2014). Tyto děti v důsledku vlastní nízké lipázové aktivity mají nedostatečné využití lipidů. O úloze žlučovými kyselinami stimulované lipázy v mléce u jiných živočišných druhů je známo jen velmi málo.

2 Cíl práce

Cílem práce bylo shrnout dosavadní poznatky o lipázách přítomných v mléce savců a jejich funkci v produkci a utilizaci mléčného tuku.

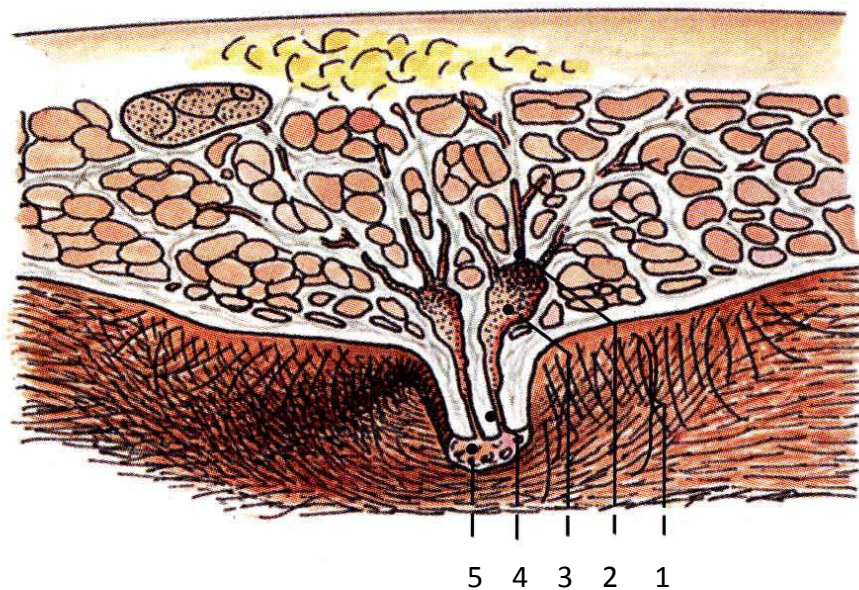
Součástí práce bylo i zavedení metod na stanovení aktivity lipoproteinové lipázy a žlučovými kyselinami stimulované lipázy v mléce.

3 Literární přehled

3.1 Mléčná žláza a její anatomie

Mléčná žláza je párový orgán všech samic savců. Vyvinula se i u některých samců, včetně člověka. Je to ve skutečnosti modifikovaná kožní žláza a jejím sekretem je mléko, které je základní výživou všech savčích mládřat.

Parenchym mléčné žlázy je složen z tubuloalveolárních žláz, které jsou oddělené hustým kolagenním vazivem a tukovou tkání, skrz kterou procházejí. Lze je rozdělit na dvě části, sekreční a vývodnou část, kterou je struk nebo bradavka. Základem sekreční části, tvořící a secernující mléko, je sekreční alveolus. Je to dutinka vystlaná sekrečními buňkami, obklopená hustou sítí cévního zásobení a kontraktilními myoepitelovými buňkami, které se podílejí na vypuzení mléka (ejekci). Alveoly vytvářejí lalůčky spojující se díky vazivovým přepážkám ve větší laloky (lobusy). Lobusy ústí v jednotlivé vývody, které se spojují v mlékovody. Ty nakonec vyústí do mlékojemu, který má dvě části. Žlázovou a strukovou. Celý kanálový systém má schopnost rozšířit se a tím je, vedle mlékojemu, navýšen prostor ke skladování mléka (Obr. 1).



Obr. 1: Schéma mléčné žlázy feny (Převzato z Budras et al., 2007)

1. vemínko feny (*papilla mammae*)
2. mlékovod (*lactiferous duct*)
3. mléčná cisterna (*lactiferous sinus*)
4. strukový kanálek (*papillary duct*)
5. strukový otvor (*papillary ostium*)

Vývodnou část tvoří struk nebo bradavka a slouží jako konečný bod mléčných vývodů. Celým strukem prochází strukový kanálek spojující strukovou část mlékojemu s vnějším otvorem. Aby bylo zabráněno výtoku mléka, je ve stěně struku okolo kanálku kruhový svěrač z hladké svaloviny. Ve stěnách strukové části jsou žilní pleteně, které se podílejí na udržení teploty struku. Vývodná část je obklopena oblastí kůže, která obsahuje mazové a potní žlázy. Je zde též koncový bod pro čtvrtý mezižeberní nerv, který nese smyslové informace o mláděti do míchy a mozku. To je velmi důležité v regulaci sekrece oxytocinu ze zadního laloku hypofýzy a prolaktinu z předního laloku hypofýzy. Rozmístění a počet struků či bradavek je u savců rozdílný (Tab. 1).

druhy	Anterior hrud' (thoracic)	Intermediate břicho (abdominal)	Posterior slabiny (Inguinal)	celkem
pes	4	2	2 nebo 4	8 nebo 10
skot	0	0	4	4
kočka	2	2	2	6
koza, ovce, kůň	0	0	2	2
myš	6	0	4	10
krysa	6	2	4	12
prase	6	6	4	16
slon, primáti	2	0	0	2

Tab. 1: Umístění a počet bradavek na tělech savců podle druhu (Převzato z Cunningham et al., 2005)

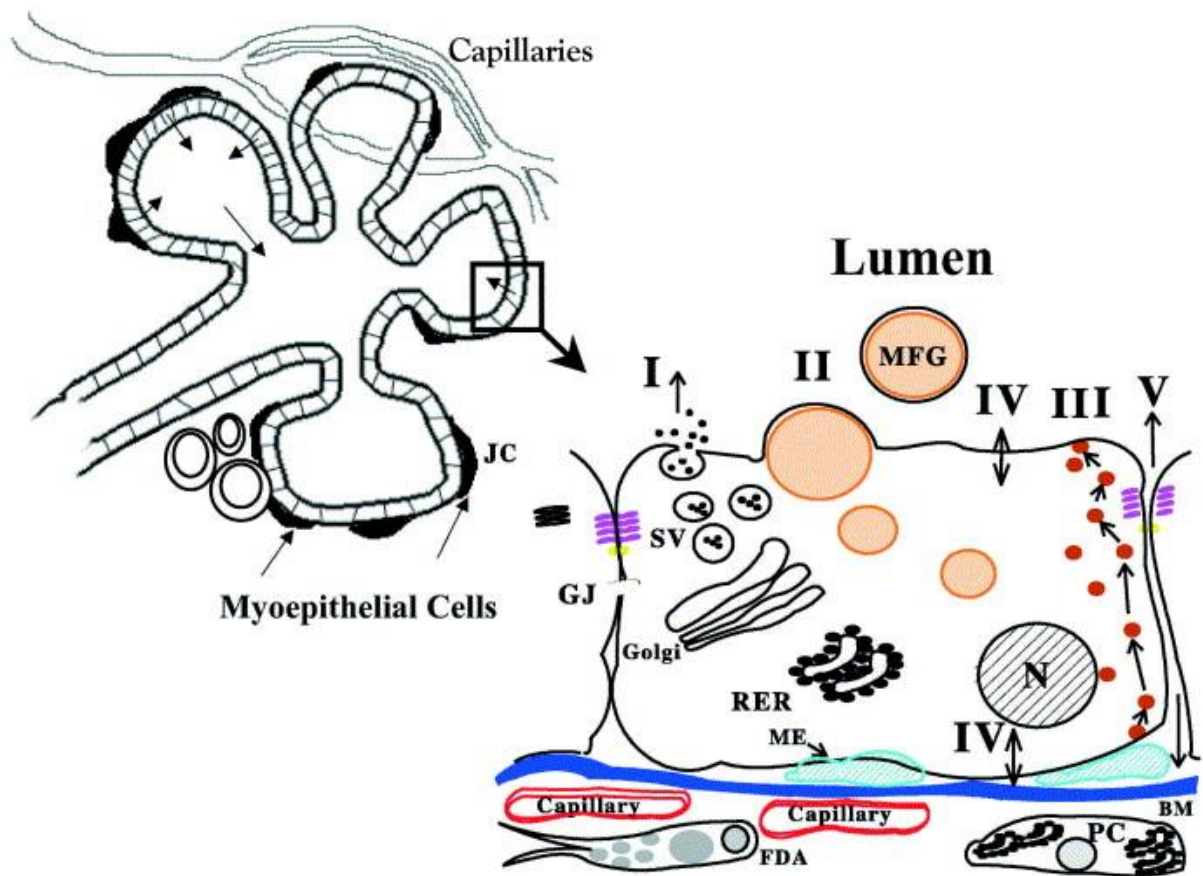
Laktogeneze

Laktogeneze jsou změny v mléčné žláze během březosti, kdy se zvýší počet a složitost alveolárních komplexů. Každý alveolus má rozvinuté cévní zásobení a obklopuje ho vrstva sekrečních alveolárních buněk, pod kterými se nachází adipocyty, fibroblasty a myoepiteliální buňky (Obr. 2). Kontrakcí myoepiteliálních buněk stimulovaných oxytocinem uvolněným z laloku hypofýzy kojícím neuroendokrinním reflexem dochází k vypuzování mléka z alveolů. Na konci březosti vstupuje mléčná žláza do první fáze laktogeneze, kdy začíná produkce první mléčné tekutiny nažloutlé barvy a husté konzistence – mleziva. Mlezivo neboli kolostrum, odpovídá za humorální imunitu potomka v časném poporodním období díky přítomnosti imunoglobulinů. Přítomnost sekrečních IgA, laktoferinu a vysoké koncentrace oligosacharidů je důležitá pro ochranu povrchů sliznic před infekcí. Sekrece mléka je v této fázi brzděna vysokou koncentrací cirkulujících pohlavních hormonů a vysokými hladinami progesteronu. Po vypuzení placenty v poporodní době dochází k náhlému poklesu hladin progesteronu a estrogenů, kdežto prolaktin zůstává stále zvýšený. Tato kombinace nastartuje řadu naprogramovaných změn a transformuje buňky do plně sekrečního stavu, stimuluje se tvorba mléka v alveolech a laktogeneze přechází do druhé fáze. Připojují se i další hormony a to inzulin, kortizol a thyroxin. V poslední, třetí fázi laktogeneze je řízení laktace endokrinním hormonálním systémem přesunuto na řízení hormony vznikajícími v místě laktace, tedy řízení autokrinní, což v praxi znamená, že se tvoří tolik mléka, kolik je odebíráno. Po ukončení laktace dochází k degeneraci alveolů, avšak jsou zachovány myoepiteliální buňky pro další březost.

Buněčné mechanismy pro tvorbu a sekreci mléka

Při vstupu všech složek do mléka se uplatňuje několik transportních mechanismů. Mléčné bílkoviny, laktóza, citrát a vápník se do mléka dostávají exocytózou (Obr. 2, dráha I). Lipidy, především triacylglyceroly, využívají specifický transportní mechanismus. Během laktace obsahují alveolární buňky, jako všechny vysoce aktivní sekreční buňky, četné mitochondrie, rozsáhlé hladké endoplazmatické retikulum a výrazně vyvinutý Golgiho aparát. Aby byla zajištěna produkce mléčného tuku, je v nich velice aktivní syntéza lipidů. Z prekurzorových mastných kyselin a glycerolu jsou syntetizovány především triacylglyceroly a fosfolipidy. Z nově syntetizovaných molekul lipidů se za účasti specifických proteinů vytváří v cytoplazmě malé lipidové kapénky (CLDs = „cytoplasmic lipid droplets“), které později splývají za vzniku větších částic. Ty jsou transportovány k apikální plazmatické membráně, kde jsou vylučovány (Obr. 2, dráha II) (Mather and Keenan, 1998). Kapénka je přitom obalena plazmatickou membránou a „vypučí“ do alveolárního lumen. V této fázi se kapénka obohacuje především o fosfolipidy, které brání dalšímu splývání tukových kapének v lumen alveolu, což by ztížilo jejich vylučování během laktace (McManaman and Neville, 2003). Vznikající částice jsou označovány jako kapénky mléčného tuku (MFG = „milk fat globules“). Při splývání membrány a tukové kapénky může být do vznikající částice inkorporováno i malé množství cytoplazmy, což umožňuje vstup všech látek obsažených v cytoplazmě do mléka (Huston and Patton, 1990). Kapénky mléčného tuku jsou hlavním zdrojem energie mláděte u většiny, ne-li u všech druhů savců. Řada makromolekulárních látek, jako jsou imunoglobuliny, albumin a transferin, je z plazmy do mléka transportována transcytózou (Obr. 2, dráha III) (Hunziker and Kraehenbuhl, 1998; Ollivier-Bousquet, 1998; Monks and Neville, 2001). Tento transportní mechanismus využívají i hormony - inzulín, prolaktin a estrogen (Koldovský, 1995) – a cytokiny (Goldman et al., 1996). Některé ionty a malé molekuly, jako glukóza a aminokyseliny, využívají specifické iontové kanály nebo transportní proteiny, které jsou lokalizovány v bazální a apikální membráně buněk alveolárního epitelu (Obr. 2, dráha IV) (Shennan and Peaker, 2000). Pro výměnu látek mezi intersticiálním prostorem a alveolem může být využita i paracelulární transportní cesta (Obr. 2, dráha V) skrze těsné spoje („tight junctions“) mezi buňkami. Tato cesta je však otevřena pouze během březosti, v době atrofie mléčné žlázy po odstavu a při zánětlivých stavech, jako jsou mastitidy. V době laktace je tato dráha zcela uzavřena.

Transport prostřednictvím těchto drah je ovlivněn funkčním stavem mléčné žlázy a regulován přímo i nepřímo vlivem hormonů a růstových faktorů.



Obr. 2: Schéma alveolu mléčné žlázy a alveolárních epitelových buněk se znázorněním jednotlivých metabolických transportních drah využívaných při produkci mléka.

(Převzato z McManaman and Neville, 2003)

Schéma mléčného alveolu a alveolárních epitelových buněk zobrazující cesty pro sekreci mléka. Mléko je vylučováno z alveolárních epitelových buněk do vnitřního prostoru - lumen (šípky). To je pak vypuzeno přes kanály kontrakcí myoepiteliálních buněk, které alveoly obklopují. Samotný alveolus je obklopen dobře rozvinutou sítí cév a stromatu, obsahujícího komponenty extracelulární matrix, fibroblasty a adipocyty. Rozšířená oblast pak ukazuje hlavní strukturální a transportní vlastnosti alveolárních buněk. I ... exocytotická sekrece mléčných bílkovin, laktózy, vápníku a dalších složek vodné fáze mléka; II ... sekrece mléčného tuku – tvorba lipidových kapének v cytoplasmě (CLDs), jejich transport k apikální membráně a sekrece do mléka ve formě kapének mléčného tuku (MFG); III ... vezikulární transcytóza proteinů, například imunoglobulinů z intersticiálního prostoru; IV ... transportéry

zprostředkovaný přenos jednomocných iontů, vody a glukózy přes apikální a bazální membránu buňky; V ... paracelulární transport (leukocyty a komponenty plazmy). Tato cesta je však otevřena pouze během březosti, v době atrofie mléčné žlázy po odstavu a při zánětlivých stavech, jako jsou mastitidy.

Zkratky: SV, sekreční váčky; RER, hrubé endoplazmatické retikulum; BM, bazální membrána; N, jádro; PC, plazmatická buňka; FDA, adipocyt; JC, junkční komplex obsahující těsné a adhezní spoje; GJ, mezera; ME, myoepitel.

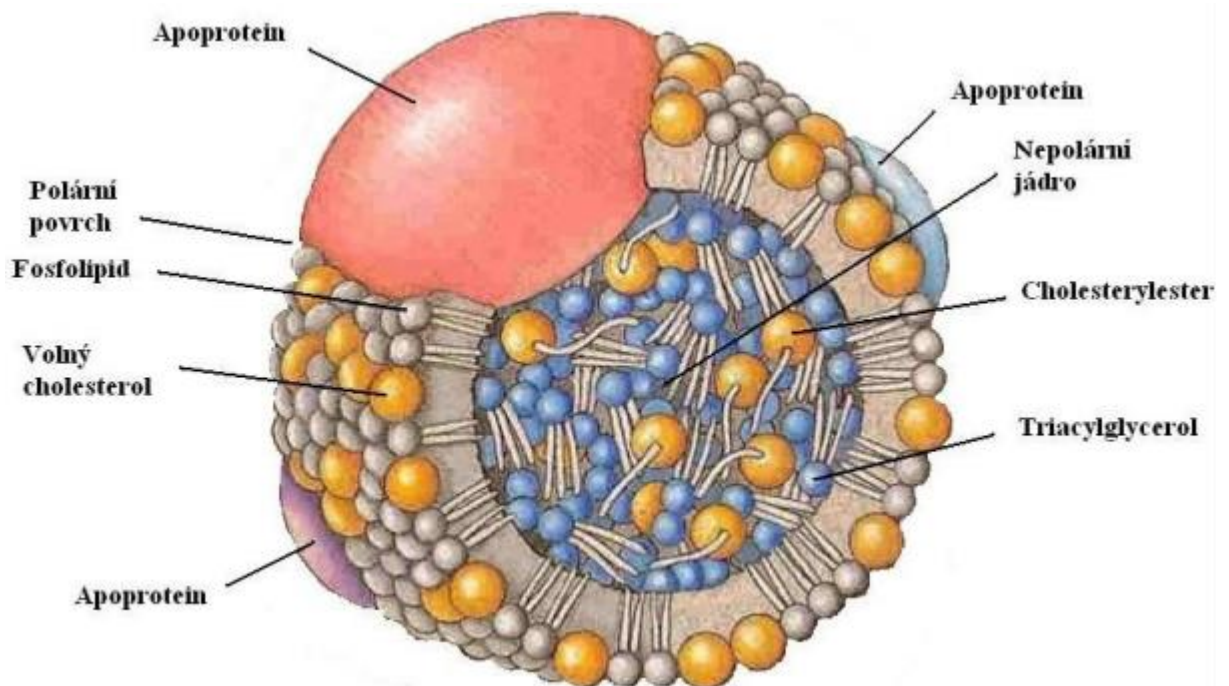
3.2 Triacylglyceroly

Lipidy jsou jednou ze základních skupin biologických sloučenin, které jsou nezbytnou komponentou všech živých organismů. Mezi nimi hrají významnou úlohu triacylglyceroly, které organismy využívají k ukládání energie. Chemicky jsou triacylglyceroly estery trojsytného alkoholu glycerolu a vyšších mastných kyselin. Mastné kyseliny mohou buňky použít jako zdroj energie, nicméně jejich příliš vysoká koncentrace uvnitř buňky může být toxická a proto jsou triacylglyceroly velmi vhodnou formou k jejich skladování, neboť jsou chemicky inertní a na rozdíl od glykogenu neváží vodu. Mastné kyseliny se obvykle dělí na nasycené, které nemají žádnou dvojnou vazbu ve svém řetězci, mononenasycené, které ve svém řetězci mají jednu dvojnou vazbu a polynenasycené mastné kyseliny s větším počtem dvojných vazeb. Řada z těchto polynenasycených mastných kyselin je pro člověka i některé živočichy nenahraditelná, protože si je tělo nedokáže vyrobit a musí je tedy přijímat pouze potravou. V tučích savců je nejčastěji zastoupena mononenasycená kyselina olejová, která tvoří až 45 % obsahu veškerých mastných kyselin (Pacák, 1982).

3.3 Lipoproteiny

Lipoproteiny jsou makromolekulární komplexy lipidů a proteinů, které transportují lipidy krevní plazmou. Uvnitř částic lipoproteinů jsou uloženy hydrofobní triacylglyceroly a estery cholesterolu (Obr. 3). Na svém vnějším polárním kulovitém povrchu mají fosfolipidy a cholesterol. Ty jsou uspořádány tak, že do vnějšího prostředí směřuje jejich hydrofilní část a hydrofobní část je orientována dovnitř částice. Na povrchu těchto částic se nachází i proteiny označované jako apolipoproteiny. Některé z apolipoproteinů jsou nezbytné

pro vlastní syntézu částic (apoB), jiné fungují jako ligandy pro buněčné receptory (apoA-1, apoB, apoE) nebo kofaktory enzymů, které na lipoproteiny působí (apoA-1, apoC-II).



Obr. 3: Lipoproteinová částice (Převzato z Grundy, 1990)

Lipoproteiny můžeme dělit do pěti tříd vycházejících z jejich velikosti a hustoty, které lze oddělit ultracentrifugací (Tab. 2).

- Chylomikrony – částice tvořené v buňkách střevní sliznice (v enterocytech) z lipidů přijatých potravou.
- VLDL - lipoproteiny o velmi nízké hustotě (very low density lipoproteins) vznikají v játrech. Zde se uvolňují z hepatocytů do krevního oběhu.
- IDL - lipoproteiny o střední hustotě (intermediate density lipoproteins) - vznikají v krevním oběhu z VLDL působením lipoproteinové lipázy.
- LDL - lipoproteiny o nízké hustotě (low density lipoproteins). Mezi laickou veřejností jsou známy jako „špatný“ či „zlý“ cholesterol. Vznikají z IDL po odstranění podstatné části triacylglycerolů a představují hlavní přenašeč cholesterolu plazmou. Ten je jimi transportován do jater, ale v případě potřeby jej mohou využít i extrahepatální buňky.
- HDL - lipoproteiny o vysoké hustotě (high density lipoproteins). Jsou naopak známy jako „hodný“ cholesterol. HDL mohou vychytávat buněčný cholesterol a transportovat

jej do jater, která jej mohou z těla odstranit v procesu označovaném jako reverzní transport.

Lipoprotein	Hlavní lipidová složka	% Podíl lipidů	% Podíl proteinů
Chylomikrony	TG	98-99	1-2
VLDL	TG	90-93	7-10
IDL	cholesterol, TG	90	10
LDL	cholesterol	80	20
HDL	cholesterol	50-55	45-50

Tab. 2: Přehled hlavních tříd lipoproteinů (Upraveno dle Gotto and Pownall, 2003)

Metabolismus lipoproteinů

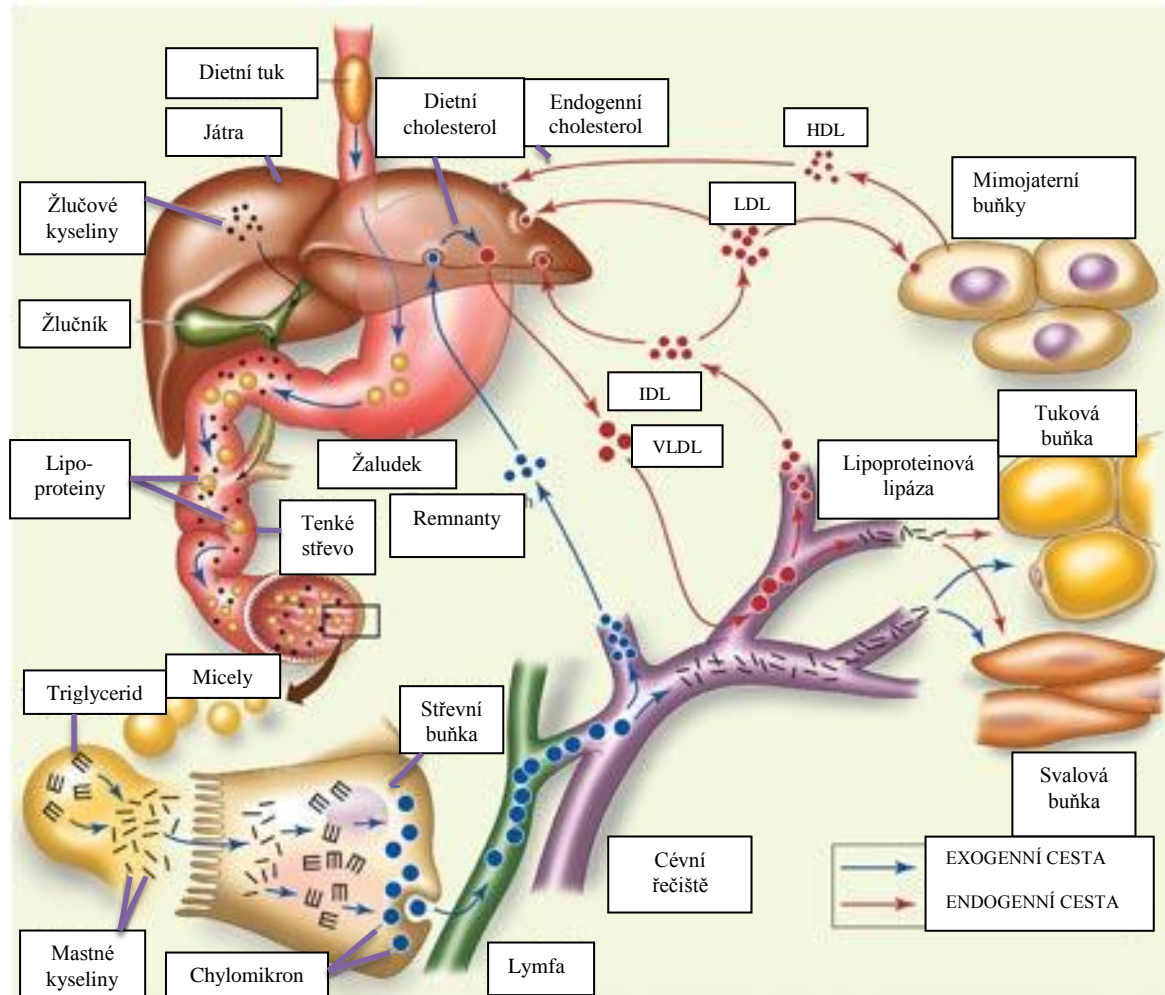
Denně je plazmou člověka transportováno cca 150 – 200 g triacylglycerolů. Z metabolického hlediska rozlišujeme dvě transportní dráhy pro triacylglyceroly (TG) – exogenní pro transport TG dietního původu a endogenní pro transport TG z jater.

Tuky přijaté potravou jsou nejprve působením solí žlučových kyselin a lecitinu v tenkém střevě emulgovány na kapénky s velkým povrchem a tím je zajištěna jejich lepší hydrolyza enzymy. Triacylglyceroly (TG) jsou hydrolyzovány na 2-monoacylglyceroly (MG) a neesterifikované mastné kyseliny (NMK). Ty jsou poté vychytány enterocyty, ve kterých jsou transportovány do endoplazmatického retikula (ER), kde se opět resyntetizují na TG. Tyto resyntetizované TG jsou vestavěny (inkorporovány) do chylomikronů, pomocí transportních váčků přeneseny do Golgiho aparátu a secernovány do lymfatického systému. Cestou ductus thoracicus se dostávají do krevního řečiště. Na kapilárním endotelu mimojaterních tkání je navázána lipoproteinová lipáza (LPL), která hydrolyzuje TG v chylomikronech na volné mastné kyseliny (MK) a glycerol. Tkáně následně vychytávají uvolněné MK a využívají je jako zdroj energie po oxidaci v mitochondriích (sval) nebo je ukládají jako reesterifikované TG (tuková tkáň). Z částic chylomikronů vznikají po odstranění podstatné části TG částice, které označujeme jako remnanty. Remnanty jsou z cirkulace rychle vychytávány v játrech. MK s krátkým řetězcem vstupují z enterocytů přímo do krve a portálním řečištěm jsou transportovány přímo do jater.

Z TG syntetizovaných v játrech vznikají lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL), které transportují TG z jater do ostatních tkání, kde jsou opět za pomoci LPL hydrolyzovány podobně jako TG chylomikronů. Po odevzdání MK do buněk z částic VLDL vznikají jejich

remnanty v podobě IDL. Ty jsou z části vychytány jaterními buňkami a z části přeměněny na částice LDL, jež mohou poskytnout cholesterol pro buňky mimojaterních tkání (Obr. 4).

Zvláštní cestou při transportu cholesterolu je tzv. reverzní transport cholesterolu. Při něm dochází k přenosu neesterifikovaného cholesterolu z extrahepatálních tkání na částice HDL a jeho transportu do jater, která ho mohou z těla odstranit.



Obr. 4: Metabolismus lipoproteinů [online]. Dostupné z <https://www.google.com.au/search?q=transport+lipid%C5%AF&biw=1920&bih=958&tbm=isch&tbid=0=uvqcAOyMWEjSM%3A%3B-uvqcAOyMWEjSM%3A%3BkkTQq1XSWdVP6M%3A&imgre=-uvqcAOyMWEjSM%3A> [cit. 2015-07-21]

3.4 Lipázy

Lipázy (EC 3.1.1) patří do velké skupiny esteráz, což jsou katalytické enzymy štěpící esterické vazby. Nachází se v celé řadě tkání a orgánů savců, jako například v srdci, mozku, svazech, tepnách, ledvinách, slezině, plicích, játrech, tukové tkáni a séru (Vulfson, 1994).

Klasifikace lipáz

Z hlediska funkce bychom mohli lipázy rozdělit do tří skupin:

1. intracelulární lipázy – působí při katabolismu triacylglycerolů jednak v tukové tkáni a jednak ve všech orgánech, příkladem může být hormon senzitivní lipáza. V této práci se jim blíže věnovat nebudeme.

2. extracelulární lipázy trávicího traktu – účastní se procesu trávení všech lipidů přijatých potravou. Do této skupiny zahrnujeme lipázu:

- lingvální
- žaludeční
- pankreatickou
- lipázu stimulovanou žlučovými kyselinami (BSSL = bile salt-stimulated lipase)

3. extracelulární lipázy vnitřního prostředí – jejich úkolem je lipolýza triacylglycerolů a fosfolipidů v cirkulaci. Mezi ně zařazujeme lipázu:

- endotelovou
- jaterní
- lipoproteinovou

Lingvální lipáza je členem rodiny trávicích enzymů (ES 3.1.1.3), které hydrolyzují triacylglyceroly s dlouhými řetězci na diacylglyceroly a volné mastné kyseliny. Enzym se uvolňuje do úst společně se slinami, jakmile se potravou aktivují serózní žlázy na povrchu jazyka a autonomní nervový systém vyšle signál. Jako první tím katalyzuje reakci při trávení dietních lipidů za vzniku diacylglycerolů (Hamosh and Scow, 1973). Jeho pH optimum je 4,5 – 5,4 a lipolytická aktivita se tedy může uplatnit i v žaludku.

Žaludeční lipáza neboli gastrická lipáza, je kyselou lipázou vylučovanou buňkami sliznice žaludku. Její pH optimum je v oblasti pH 3-6 a podobně jako lingvální lipáza nevyžaduje žádné kofaktory pro svoji optimální aktivitu.

Pankreatická lipáza, někdy uváděná jako pankreatická lipáza triacylglycerolů, je primárním enzymem, který hydrolyzuje molekuly triacylglycerolů v trávicím traktu. Triacylglycerolový substrát lipáza štěpí na monoacylglyceroly a volné mastné kyseliny.



Játry vylučované a ve žlučníku uložené žlučové soli jsou uvolňovány do dvanácterníku, kde emulgují velké tukové kapénky na menší, aby se zvýšil jejich povrch a tím je mohla lipáza efektivněji štěpit. Vzniklé monomery (2 volné mastné kyseliny a 2-monoacylglycerol) jsou peristalticky přesunuty do lumen tenkého střeva, kde jsou absorbovány enterocyty.

Na rozdíl od některých pankreatických enzymů, které musí být aktivovány proteolytickým štěpením, je tato lipáza z pankreatu vylučována jako aktivní enzym. Pro její aktivaci je ovšem nezbytný kofaktor – kolipáza rovněž secernovaná z pankreatu.

Lipáza stimulovaná žlučovými kyselinami (BSSL; „bile salt-stimulated lipase“) je lipáza s širokou substrátovou specifitou štěpící triacylglyceroly, monoacylglyceroly, fosfolipidy, estery vitamínů rozpustných v tucích a estery cholesterolu. Je rovněž označována jako BSDL („bile salt-dependent lipase“) nebo nově jako CEL („carboxyl esterase lipase“). Tato lipáza je exprimována a produkována ve slinivce břišní u všech druhů savců a byla rovněž zjištěna v mateřském mléce člověka a některých dalších savců.

Výše uvedené lipázy patří do funkční skupiny extracelulárních lipáz trávicího traktu. Nyní k extracelulárním lipázám vnitřního prostředí. Jde o enzymy exprimované v parenchymálních buňkách řady tkání odkud jsou transportovány na endotel, kde hydrolyzují lipidy přenášené plazmatickými lipoproteiny.

Endotelová lipáza byla poprvé popsána v roce 1999. Jde o lipázu, kterou syntetizují a sekretují endotelové buňky. V cirkulaci zůstává vázána na endoteliální povrch a štěpí fosfolipidy HDL částic a tím snižuje jejich obsah v plazmě. Dokáže být aktivní ale ve všech lipoproteinových podtřídách. Tato lipáza má převážně fosfolipázovou aktivitu a prakticky neštěpí triacylglyceroly (Annema and Tietge, 2011; Das 2005).

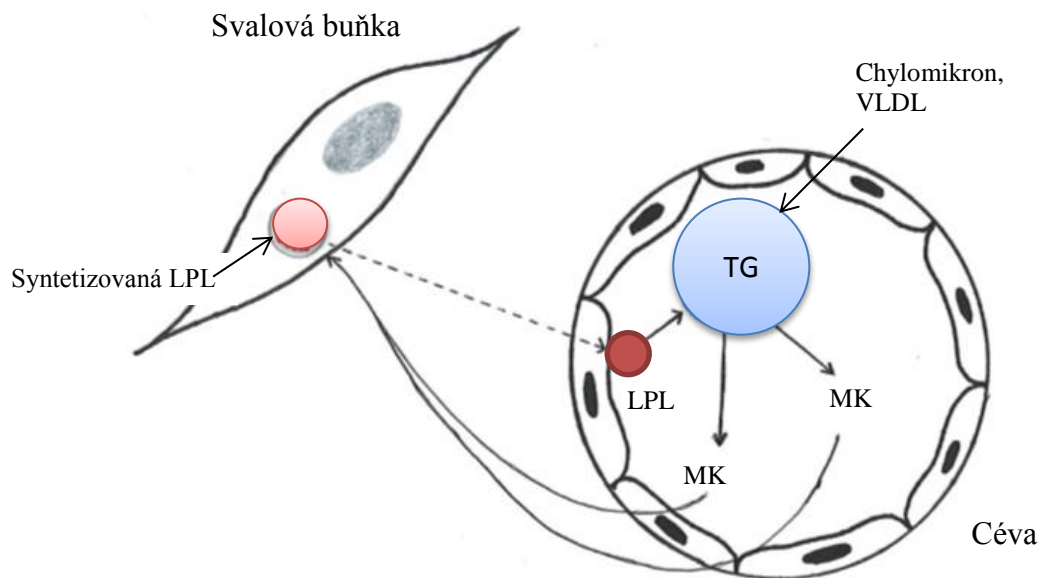
Jaterní lipáza je exprimována v játrech, ale také v nadledvinkách. Štěpí fosfolipidy a triacylglyceroly v částicích IDL, LDL a HDL a tím se účastní jejich metabolismu.

Lipoproteinová lipáza je společně s jaterní, pankreatickou a endoteliální lipázou členem jedné genové rodiny, označované EC 3.1.1.34. Je to enzym, který si syntetizují buňky různých tkání s výjimkou jaterních buněk. Blíže bude popsána v samostatné části.

Lipoproteinová lipáza (LPL)

Gen kódující lidskou LPL se nachází na 8. chromozomu. Gen kóduje protein o 475 aminokyselinách a molekulové hmotnosti 55 kDa. Lipoproteinová lipáza je enzym, který je exprimován v parenchymálních buňkách mimojaterních tkání (např. svalové – myocyty - či tukové – adipocyty). Aby mohl být funkční, musí být glykosylován, enzymaticky aktivní je homodimer. Z parenchymálních buněk je přes extracelulární matrix a přes endotelové buňky transportován do lumen kapilár (Obr. 5). Pro tento přesun je nezbytný protein označovaný jako GPIHBP1 („glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein 1“, zvaný též glykosylfosfatidylinositol HDL vázající protein 1), který pravděpodobně přispívá i k ukotvení LPL na endoteliálních buňkách (Goulbourne, 2014). V důsledku této pevné vazby na endotel nelze stanovit jeho enzymatickou aktivitu v cirkulaci. Aby mohl být stanoven, musí být nejprve uvolněn do cirkulace po intravenózní aplikaci heparinu.

Funkcí tohoto enzymu je hydrolýza triacylglycerolů chylomikronů a částic VLDL, při které jsou uvolněny dvě molekuly mastných kyselin a 2-monoacylglycerol. Vzniklé mastné kyseliny jsou transportovány přes endotel a vychytávány parenchymálními buňkami tkání jako zdroj energie (hlavně buňky srdce a kosterního svalstva) nebo je buňky ukládají ve formě triacylglycerolů do zásob (buňky tukové tkáně). Enzym pro svou funkci vyžaduje kofaktor, kterým je apolipoprotein C-II. Je to protein o hmotnosti 8800 daltonů nacházející se v chylomikronech, částicích VLDL a HDL (Havel et al., 1973). Aktivita enzymu je inhibována apolipoproteinem C-III, apolipoproteinem A-V a proteiny podobnými angiopoetinu 3,4 a 8 (Angptl 3, 4, 8, „angiopoietin-like proteins“), které hrají zásadní úlohu v regulaci aktivity enzymu v jednotlivých tkáních (Kersten, 2014). Například Angptl 4 rozkládá aktivní dimer na neaktivní monomery (Sukonina et al., 2006), které jsou uvolněny do cirkulace a vychytány v játrech. Bylo zjištěno, že LPL může fungovat i jako ligand jaterních receptorů označovaných jako LRP (protein podobající se LDL receptoru, „LDL-receptor related protein“), které z cirkulace odstraňují remnanty chylomikronů a VLDL (Beisiegel et al., 1991). Aktivita LPL je regulována tkáňově diferencovaně – např. inzulin stimuluje aktivitu LPL v tukové tkáni a inhibuje ve svalu, a mastné kyseliny z potravy jsou směřovány do tukové tkáně a ukládány v době, kdy je k dispozici dostatek glukózy pro oxidaci. Stresové hormony naopak aktivují LPL ve svalu a inhibují v tukové tkáni a tok mastných kyselin jako zdroje energie je směřován do svalů. Z tohoto důvodu bývá LPL označována jako „gatekeeper enzyme“ (vrátný) (Goldberg et al., 2009).



Obr. 5: Úloha LPL ve vychytávání mastných kyselin tkáněmi

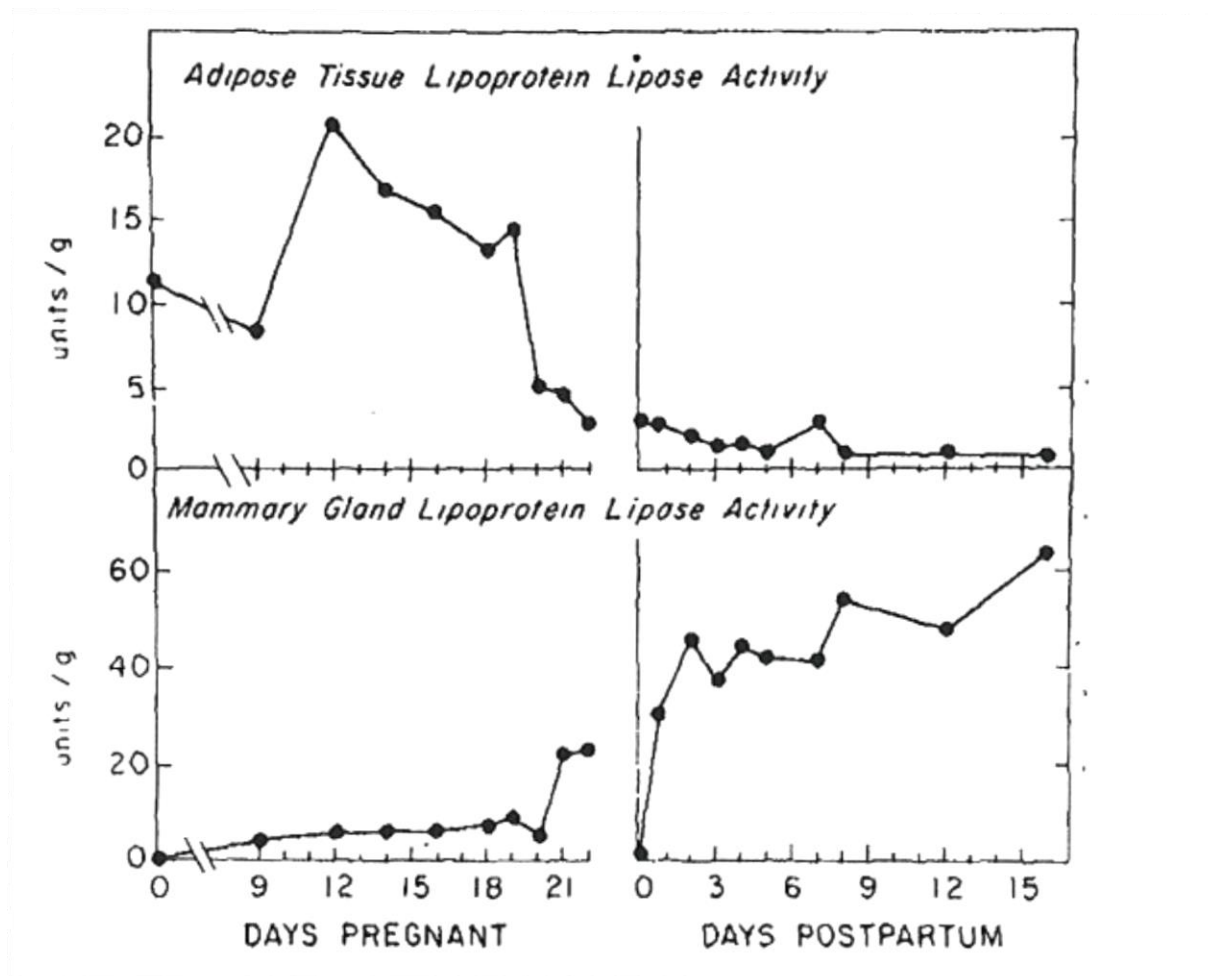
Lipoproteinová lipáza (LPL) je syntetizována parenchymálními buňkami tkání (tuková tkáň, sval, mléčná žláza), secernována a transportována extracelulárním prostorem a přes kapilární endotel na vnitřní povrch kapilárního endotelu. Zde zůstává navázána na heparansulfát proteoglykany a GPIHBP1. Na povrchu kapilárního endotelu LPL hydrolyzuje triacylglyceroly chylomikronů a VLDL, uvolněné mastné kyseliny jsou pak z převážné části transportovány přes endotel k parenchymálním buňkám dané tkáně.

Zkratky: LPL, lipoproteinová lipáza; MK, mastné kyseliny; TG, triacylglycerol; VLDL, lipoprotein o velmi nízké hustotě (very low density lipoprotein); GPIHBP1, („glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein 1“)

Funkce lipoproteinové lipázy v mléčné žláze a v mléce

Mléko většiny savců obsahuje značné množství lipoproteinové lipázy (Jensen and Pitas, 1976).

Primární funkcí LPL přítomné v mléčné žláze je zajistit hydrolýzu TG transportovaných chylomikrony a VLDL v cirkulaci a vychytání uvolněných MK mléčnou žlázou, ve které jsou využity pro syntézu TG mléka. Podobně jako v jiných tkáních je LPL exprimována v alveolárních epitelových buňkách a z nich transportována na kapilární endotel, kde vykonává svou katalytickou aktivitu. Je pravděpodobné, že enzym přítomný v mléce unikl z této standardní transportní cesty. Enzym ale v mléce nevykazuje žádnou nebo jen velmi malou aktivitu, neboť v mléce není přítomen apoC-II, který je nezbytný pro jeho aktivaci. Na rozdíl od lipázy stimulované žlučovými kyselinami (BSSL) není stabilní při průchodu kyselým pH žaludku a dochází tak k jeho destrukci. Mimoto je i inhibován žlučovými kyselinami ve střevě. Aktivita LPL v tkáni odráží schopnost tkáně odstraňovat triacylglyceroly z krve. Skutečnost, že LPL v mléčné žláze je nezbytná pro tvorbu TG mléka bylo dokumentováno zjištěním, že aktivita enzymu u potkanů stoupá v mléčné žláze dramaticky před porodem a zůstává na vysoké úrovni po celou dobu laktace, zatímco aktivita v tukové tkáni rychle klesá směrem ke konci březosti (Obr. 6) (Hamosh et al., 1970).



Obr. 6: Vliv březosti a laktace na aktivitu lipoproteinové lipázy v tukové tkáni a v mléčné žláze u potkana (Převzato z Hamosh et al., 1970).

K porodu došlo 22. nebo 23. den březosti a všechna mláďata po porodu sála mléko.

Žlučovými kyselinami stimulovaná lipáza (BSSL)

Vedle LPL obsahuje mléko některých savců i lipázu, která je závislá na aktivaci žlučovými solemi. Byla tedy nazvána jako žlučovými kyselinami stimulovaná lipáza (Hernell and Olivecrona, 1974). Enzym je u všech dosud studovaných druhů savců exprimován v pankreatu a secernován do tenkého střeva. Enzym byl prokázán u některých druhů v mléce (člověk, gorila, kočka, pes, fretka, myš), u jiných druhů v mléce chybí (skot, koza, prase, kůň, makak rhesus, krysa, morče) (Hernell and Bläckberg, 1991; Li et al., 2007). U člověka se gen pro BSSL nachází na 9. chromozómu a kóduje protein o 742 aminokyselinách, ze kterého po odstřižení signálního peptidu vzniká maturovaný protein mající 422 aminokyselin (Baba et al., 1991). Bylo zjištěno, že BSSL je vysoce glykosylována, přičemž glykosylace je tkáňově

specifická a pravděpodobně vysvětluje dříve zjištěné rozdíly mezi BSSL secernovanou ze slinivky a BSSL syntetizovanou v mléčné žláze (Bläckberg et al., 1981).

Význam žlučovými kyselinami stimulované lipázy (BSSL) v mléce

Pro vstřebání triacylglycerolů obsažených v mléce je nezbytná jejich účinná hydrolýza v tenkém střevě. U dospělých jedinců je hydrolýza triacylglycerolů zajišťována pankreatickou lipázou a také BSSL secernovanou z pankreatu. U myši je nástup aktivity těchto lipáz pankreatického původu v postnatálním období zpomalen a účinná hydrolýza triacylglycerolů je tedy zajištěna přítomností lipázy přímo v mateřském mléce (Li et al., 2007). O významu BSSL pro vstřebávání lipidů svědčí, že inhibice BSSL u myši nebo deficit enzymu u *Bssl*^{-/-} myši jsou spojeny s malabsorpcí lipidů a s výskytem střevních lézí (Howles et al., 1999). U psa je aktivita pankreatické lipázy v prvních sedmi týdnech života velice nízká (Buddington et al., 2003) a musí být tedy kompenzována BSSL (Iverson et al., 1991). Největší pozornost byla v tomto směru věnována člověku. Podobně jako pro jiné savce, i pro kojené děti představují hlavní zdroj energie triacylglyceroly. Triacylglyceroly přítomné v mléce jsou nejprve částečně hydrolyzovány gastrickou lipázou v žaludku. Podstatná část hydrolýzy triacylglycerolů probíhá v tenkém střevě působením pankreatické lipázy, která vyžaduje kolipázu jako svůj kofaktor, a BSSL. U novorozenců je podstatná část BSSL syntetizována v mléčné žláze matky a menší část pochází ze slinivky břišní – sekrece pankreatické BSSL je u novorozenců významně snížena. Samotná BSSL nehydrolyzuje mléčné TG, dokud se mléko nesmísí se žlučovými kyselinami ve dvanáctníku. Enzym je aktivován primárními žlučovými kyselinami obsahujícími 7 β -hydroxy skupinu (kys. cholová a chenodeoxycholová) i jejich konjugáty s taurinem a glycinem, nikoli sekundárními žlučovými kyselinami (kys. deoxycholová) (Hernell, 1975). Na rozdíl od klasické pankreatické lipázy vykazuje BSSL výrazně širší substrátovou specifitu a podílí se na hydrolýze triacylglycerolů, monoacylglycerolů, fosfolipidů, esterů vitamínů rozpustných v tucích a esterů cholesterolu. Účinněji než pankreatická lipáza štěpí estery esenciálních polynenasycených mastných kyselin a přispívá tak k jejich lepšímu vstřebávání.

Důležitost BSSL pro trávení lipidů byla potvrzena zjištěním, že pasterizace mléka, která BSSL inaktivuje, snižuje vstřebávání tuků a růst u předčasně narozených dětí (děti s váhou 825-1325g narozené před 31. týdnem těhotenství). Bylo ukázáno, že absorpce tuků je v průměru o 17 % vyšší při přirozeném kojení ve srovnání s krmením pasterizovaným mlékem (Anderson et al., 2007). Autoři proto navrhli přidávat rekombinantní BSSL k umělé výživě na bázi kravského mléka, které BSSL neobsahuje. V roce 2014 bylo skutečně

prokázáno, že tento postup výrazně zlepšil prospívání nedonošených dětí. Děti, které dostávaly pasterizované mateřské mléko nebo kravské mléko s přídatkem rekombinantní BSSL vykazovaly vyšší váhový přírůstek a lépe vstřebávaly polynenasycené mastné kyseliny než děti, u kterých nebyl rekombinantní enzym suplementován (Casper et al., 2014). Zajímavé je, že celková absorpce tuků se mezi oběma skupinami významně nelišila.

4 Materiál a metody

4.1 Princip stanovení aktivity lipáz přítomných v mléce (LPL, BSSL)

Při stanovení aktivity lipáz přítomných v mléce se využívá toho, že substrátem LPL i BSSL jsou triacylglyceroly. Emulze triacylglycerolů stabilizovaná fosfolipidy nebo arabskou gumou značená ^3H -trioleoylglycerolem se inkubuje se vzorkem mléka a stanoví se množství uvolněných mastných kyselin při lipolýze trioleoylglycerolu. Použití radioaktivně značeného substrátu zvyšuje citlivost metody, neboť přímé stanovení koncentrace uvolněných mastných kyselin není dostatečně senzitivní. Pro odlišení obou enzymů se využívá toho, že oba vyžadují přítomnost jiného aktivátoru.

Aktivátorem lipoproteinové lipázy je apolipoprotein C-II, který je v dostatečné koncentraci přítomen v plazmě, nikoli však v mléce. Jako zdroj apo C-II je používáno lidské sérum, ve kterém byly přítomné enzymy tepelně inaktivovány. Reakce se provádí při pH 8,5, které odpovídá pH optimu enzymu. Inkubace se provádí při 25°C, neboť bylo demonstrováno, že při teplotě 37°C dochází ve vzorcích plazmy k degradaci enzymu (Bengtsson-Olivecrona and Olivecrona, 1992).

Pro stanovení žlučovými kyselinami stimulované lipázy jsou aktivátorem žlučové kyseliny. Reakce se provádí při pH 9,0. Inkubace se provádí při 37°C. (Bläckberg and Hernell, 1981).

V reakční směsi musí být vedle substrátu a aktivátoru přítomen i BSA (bovinní sérový albumin), na který se váží uvolněné mastné kyseliny. Tyto uvolněné mastné kyseliny se z reakční směsi extrahují podle Belfrage a Vaughan (1969). Ve vodní alkalické fázi obsahující extrahované MK se stanoví aktivita ^3H . Aktivita enzymu se vyjadřuje v mmol mastných kyselin uvolněných enzymem za jednu hodinu obsaženou v jednom litru mléka (mmol/hod/l).

4.2 Použité chemikálie

Intralipid ®20% (Fresenius Kabi Austria GmbH, Graz, Rakousko)

Glycerol tri[9,10-³H(n)]oleát v toluen-ethanolu 1:1 (American Radiolabeled Chemicals Inc., ART 0199; aktivita 37MBq/ml)

TRIS (Hydroxymethyl)-Aminomethan p.a. (C₄H₁₁NO₃; Carl Roth GmbH; Německo)

Chlorid sodný (NaCl; Penta; ČR)

BSA (Fatty Acid Free) (GE Healthcare, USA)

Kyselina chlorovodíková (HCl, Penta)

Methanol p.a. (CH₃OH; Fagron a.s.; ČR)

Chloroform p.a. (CHCl₃; Penta; ČR)

Heptan p.a. (C₇H₁₆; Penta; ČR)

Uhličitan sodný (Na₂CO₃; Penta; ČR)

Rotiszcint (Carl Roth GmbH, Německo)

Hydroxid sodný (NaOH; Penta; ČR)

Heparin (Léčiva, 5000 IU/ml, ČR)

Taurocholát sodný (Sigma-Aldrich Co.; USA)

4.3 Odběr a příprava vzorků

Čerstvé mléko

1. Odběr 5 ml čerstvého mléka (odstřík)
2. Bezprostředně po odběru zchlazení uložením do lázně voda-led
3. Rozdělení do alikvotů po minimálně 0,2 ml a skladování při -80°C

V našich experimentech bylo použito mateřské mléko získané ve spolupráci s Laktační ligou pod Ústavem mateřství Thomayerovy nemocnice, kdy byl odebrán 5ml vzorek mateřského mléka od pacientky (29 let; 6 dní po porodu). Dále jsme použili mléko feny plemene Zlatý retrívr (6 let; 4 týdny po porodu 9 štěňat). Posledním použitým vzorkem byl vzorek odstředěného kravského mléka, které je na pracovišti používáno jako kontrolní vzorek pro stanovení aktivity LPL v poheparinové plazmě u pacientů. Vzorky jsou v alikvotech uchovávány při -80°C.

4.4 Příprava reagensí pro stanovení LPL

Aktivační sérum

Samotná lipoproteinová lipáza v mléce není funkční, neboť v mléce chybí její kofaktor – apolipoprotein C-II. Jako zdroje apoC-II se používá tepelně inaktivované sérum, připravené zahřátím na teplotu při které denaturují enzymy lipoproteinového metabolismu, funkce apoC-II není za těchto podmínek ovlivněna. Vzhledem k rozdílné koncentraci apoC-II v plazmě dárců je vhodné odebrat více vzorků, ze kterých se připraví směsný vzorek.

1. Dárcům se na lačno odebere 10 ml krve
2. Vzorky se nechají stát při laboratorní teplotě 2 hodiny
3. Centrifugace (3000 g, 15 minut), oddělení séra
4. Inkubace séra ve vodní lázni při 56°C po dobu 30 minut
5. Rozpipetování do alikvotů po minimálním množství 300 μ l a skladování při -20°C

Inkubační pufr

[0,3M Tris; 0,2M NaCl; 0,02% heparin, (w/v); 12% BSA (fatty acid free); pH 8,5]

- 1,8165 g Tris
- 0,584 g NaCl
- 0,3 ml heparinu
- 6 g BSA (fatty acid free)

Rozpusťte v redestilované vodě do cca 45 ml, pH upravte na 8,5 pomocí 0,1M HCl. Doplnit do celkového objemu 50 ml. Rozdělené do alikvotů po 5 ml se může skladovat při -20°C.

inkubační médium A

[médium obsahující apoC-II]

V závislosti na potřebném množství inkubačního média pro pokus je třeba smísit inkubační pufr, tepelně inaktivované sérum a značenou emulzi Intralipidu v poměru 10:1:1, při teplotě místnosti.

inkubační médium B

[médium bez aktivátoru]

Smísí se inkubační pufr, redestilovaná voda a značená emulze Intralipidu v poměru 10:1:1, při teplotě místnosti.

4.5 Příprava reagensí pro stanovení BSSL

Inkubační pufr

[0,15M Tris; 0,25M NaCl; 5% BSA (fatty acid free); pH 9,0]

- 0,908 g Tris

- 0,73 g NaCl

- 2,5 g BSA

Rozpustit v redestilované vodě do cca 45 ml, pH upravit na 9,0 pomocí 0,1M HCl. Doplnit do celkového objemu 50 ml. Rozdělené do alikvotů po 5 ml se může skladovat při -20°C.

Taurocholát sodný (příprava v den vlastního stanovení)

[5,4%] 54 mg/1 ml redestilované vody

Emulze značeného Intralipidu bude připravována stejným způsobem jako pro stanovení LPL.

Inkubační médium A

[médium obsahující žlučové kyseliny]

V závislosti na potřebném množství inkubačního média pro pokus je třeba smísit inkubační pufr, taurocholát sodný a značenou emulzi Intralipidu v poměru 12:2:1, při teplotě místnosti.

inkubační médium B

[médium bez aktivátoru]

V závislosti na potřebném množství inkubačního média pro pokus ses mísí inkubační pufr, redestilovaná voda a značená emulze Intralipidu v poměru 12:2:1, při teplotě místnosti.

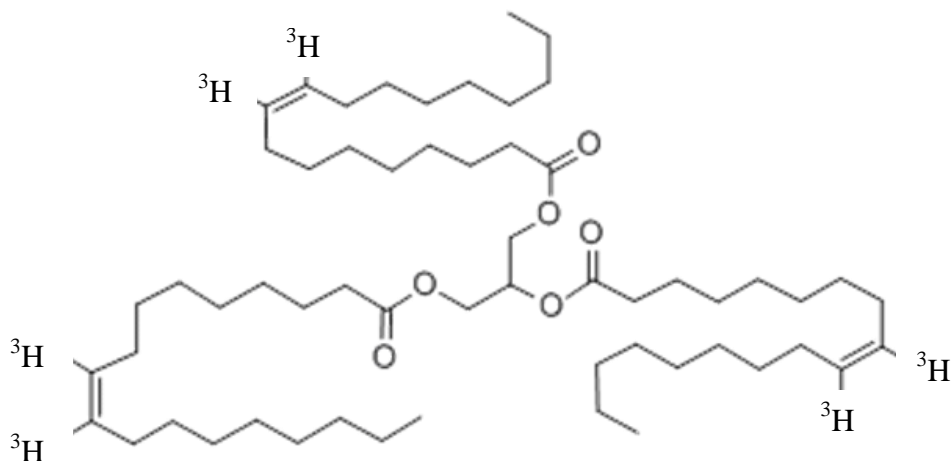
4.6 Reagencie společné pro obě lipázy

³H značený Intralipid® (příprava v den vlastního stanovení)

Intralipid® 20 % je emulze purifikovaného sójového oleje v množství 200 g, který je emulgován přečištěným vaječným lecithinem v množství 12 g a který obsahuje glycerol 22,0 g, to vše v celkovém objemu 1000 ml, pH 8. Triacylglyceroly sójového oleje se skládají převážně z esenciálních mastných kyselin s velkým množstvím nenasycených dvojných vazeb. Částice Intralipidu jsou v krevním řečišti metabolizovány podobně jako chylomikrony, jejich triacylglyceroly jsou hydrolyzovány LPL.

1. Do skleněné zkumavky se přenes 740 kBq ^3H – Glycerol tri[9,10- $^3\text{H}(\text{n})$]oleátu (Obr.7) v toluen-ethanolu 1:1 a odpaří rozpouštědla pod N_2 .

2. Přidat 1,0 ml Intralipidu a 1,0 ml redestilované vody. Zkumavku uložit do ledové vodní lázně, ve které se sonikuje 10 minut (MSE UP 200S Hielscher, při nastavení: cycle 0,6; amplitude 35%), čímž je docíleno inkorporace značky do tukových částic.



Obr. 7: Glycerol tri[9,10- $^3\text{H}(\text{n})$]oleát

Na₂CO₃

[0,1M Na₂CO₃ pH 10,5; MW 105,99]

- 5,3 g Na₂CO₃ rozpustit s redestilovanou vodou do celkového objemu 500 ml. pH na hodnotu 10,5 upravit pomocí 0,1M HCl.

Směs rozpouštědel MCH

Ve skleněné lahvi smístit methanol, chloroform a heptan v poměru (1,41: 1,25: 1 v / v / v).

4.7 Postup stanovení

1. Do předem připravených zkumavek napipetovat po 120 μl (LPL)/150 μl (BSSL) inkubačního média A nebo B dle předem připraveného rozpisu.

2. Dle rozpisu (Tab. 3) do zkumavek doplnit redestilovanou vodu tak, aby výsledný objem po přidání vzorku činil 200 μ l.

3. Zkumavky se dají inkubovat na třepačku do vodní lázně (25°C pro LPL/ 37°C pro BSSL) po dobu 5 minut před přidáním vzorků.

4. V intervalech definovaných rozpisem zahájit reakci přidáním vzorku. Zkumavky přetáhnout parafilmem, aby se zabránilo odpařování, a inkubovat přesně 1 hodinu (LPL)/ 15 minut (BSSL) ve vodní lázni za stálého třepání.

5. Každý vzorek analyzovat v triplicátech. Pro každou sérii připravit slepou kontrolu, což je inkubační médium a fyziologický roztok.

6. Reakce se zastaví přidáním 3,25 ml MCH.

7. Vzorky nechat stát alespoň 5 min a následně přidat 1,05 ml 0,1M Na₂CO₃, pH 10,5. Krátce promíchat na vortexu.

8. Centrifugace (3000g, 15minut). Do scintilačních vialek přenést 0,8 ml horní alkalické fáze (metanol-voda) obsahující volné mastné kyseliny V dolní chloroform- heptanové fázi zůstávají triacylglyceroly, diacylglyceroly a monoacylglyceroly.

9. Do scintilačních vialek přidat 8 ml scintilačního roztoku Rotiszcint. Promíchat.

10. Radioaktivita se měří na přístroji Tri-Carb 2900 TR (Liquid Scintillation Analyzer, Canberra Packard). Z naměřených hodnot aktivity v dpm (počet přeměn za minutu) se stanoví aktivitu enzymu dle následující rovnice:

$$\text{LPL [mmol/hod/l]} = ((\text{dpm}_A - \text{dpm}_B) / \text{dpm}_{CA}) \times (10^6/V) \times (3/885000) \times (2,45/08) \times 1,399$$

dpm_A ... radioaktivita vzorku v inkubačním médiu obsahujícím apoC-II

dpm_B... radioaktivita vzorku v inkubačním médiu bez aktivátoru

dpm_{CA} ... celková radioaktivita

(10⁶/V) ... korekce na objem 1 l mléka; kdy V je objem vzorku v μ l

(3/885000) ... počet mmol mastných kyselin vázaných v triacylglycerolech v reakční směsi (1 mg), korigováno na MW glycerol trioleátu (885)

(2,45/08) ... korekce na objem horní fáze (2,45 ml; stanovení radioaktivity se provádí v 0,8ml)

1,399 ... korekce na účinnost extrakce MK (71,5 %) (Belfrage a Vaughan, 1969)

$$\text{BSSL [mmol/hod/l]} = ((\text{dpm}_A - \text{dpm}_B) / \text{dpm}_{CA}) \times 4 \times (10^6/V) \times (3/885000) \times (2,45/08) \times 1,399$$

dpm_A ... radioaktivita vzorku v inkubačním médiu obsahujícím taurocholát sodný

dpm_B... radioaktivita vzorku v inkubačním médiu bez aktivátoru

dpm_{CA} ... celková radioaktivita

(10⁶/V) ... korekce na objem 1 l mléka; kdy V je objem vzorku v μl

(3/885000) ... počet mmol MK vázaných v triacylglycerolech v reakční směsi (1 mg), korigováno na MW glycerol trioleátu (885)

(2,45/08) ... korekce na objem horní fáze (2,45 ml; stanovení radioaktivity se provádí v 0,8 ml)

1,399 ... korekce na účinnost extrakce MK (71,5 %) (Belfrage a Vaughan, 1969)

4 ... korekce na délku inkubace 15'

		voda	i.m. A	i.m. B	vzorek	Start	Stop	Start	Stop	Start	Stop
		[μl]	[μl]	[μl]	[μl]						
1-3	Neg. ko	60	120	-	20	0:00	60:00	0:30	60:30	1:00	61:00
4-6	Neg. ko	60	-	120	20	2:00	62:00	2:30	62:30	3:00	63:00
7-9	Mléko 15'	60	120	-	20	4:00	19:00	4:30	19:30	5:00	20:00
10-12	Mléko 15'	60	-	120	20	6:00	21:00	6:30	21:30	7:00	22:00
13-15	Mléko 30'	60	120	-	20	8:00	38:00	8:30	38:30	9:00	39:00
16-18	Mléko 30'	60	-	120	20	10:00	40:00	10:30	40:30	11:00	41:00
19-21	Mléko 45'	60	120	-	20	12:00	57:00	12:30	57:30	13:00	58:00
22-24	Mléko 45'	60	-	120	20	14:00	59:00	14:30	59:30	15:00	60:00
25-27	Mléko 60'	60	120	-	20	16:00	76:00	16:30	76:30	17:00	77:00
28-30	Mléko 60'	60	-	120	20	18:00	78:00	18:30	78:30	19:00	79:00
31-33	Slepá kontrola	80	120	-	-						
34-36	Slepá kontrola	80	-	120	-						
- pouze pro měření aktivity – pipetovat přímo do scintilačních vialek											
37-39	CA – i. m.	-	120	-	-						
40-42	CA – i. m.	-	-	120	-						

Tab. 3: Rozpis pro stanovení závislosti aktivity LPL na délce inkubace (příklad)

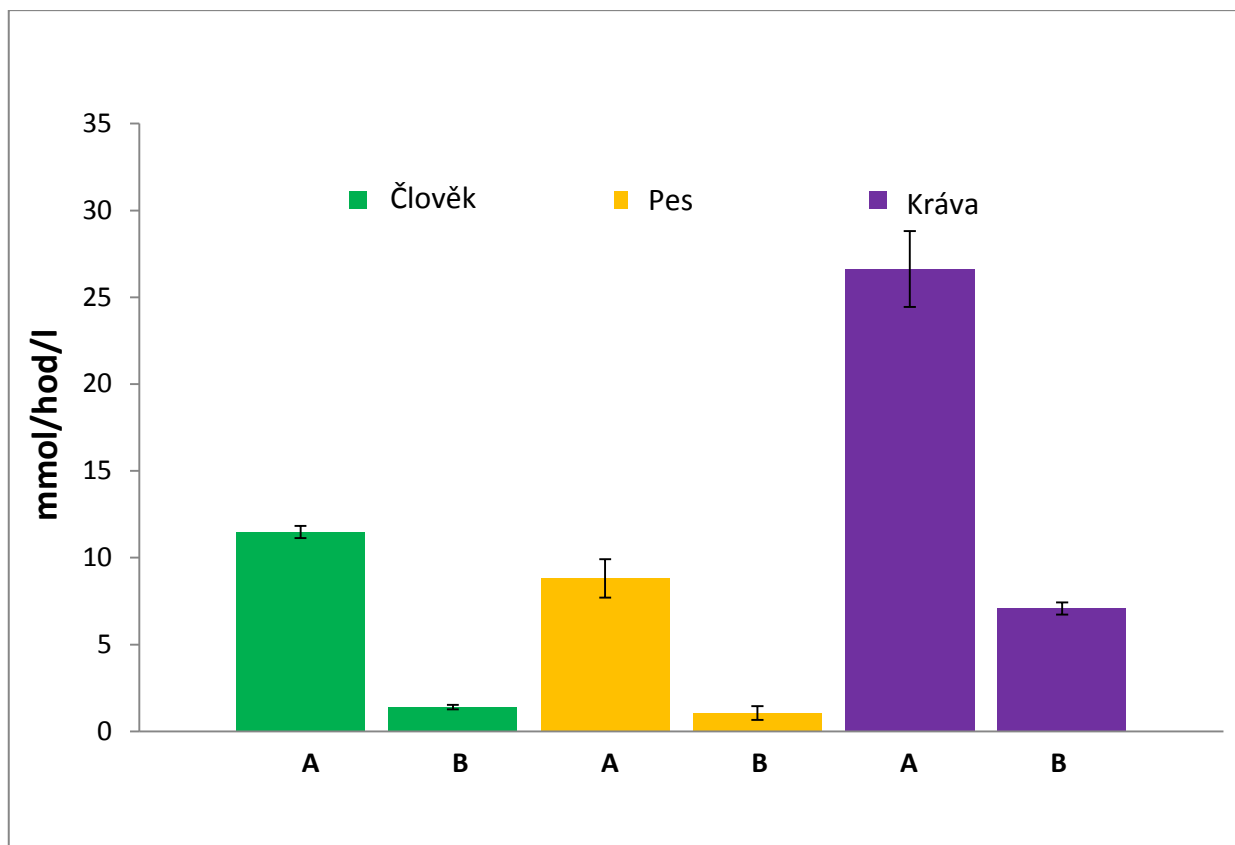
5 Výsledky

V rámci předkládané bakalářské práce byly na pracovišti zavedeny metody na stanovení aktivity LPL a BSSL. Dříve publikované postupy byly modifikovány pro podmínky našeho pracoviště. Proti metodě publikované pro stanovení jsme použili ³H-trioleoylglycerolem značený substrát, který svým složením lépe odpovídá složení mléčného tuku, je stabilní a lze jej použít pro stanovení obou lipáz. Celkem byly provedeny celkem čtyři experimenty:

- stanovení aktivity LPL ve vzorcích mléka tří druhů
- stanovení aktivity BSSL ve vzorcích mléka tří druhů
- stanovení závislosti rychlosti reakce katalyzované LPL na čase ve vzorku lidského mléka
- stanovení závislosti rychlosti reakce katalyzované BSSL na čase ve vzorku lidského mléka

Stanovení aktivity LPL

Aktivita LPL byla stanovena ve vzorku lidského mléka, mléka plemene zlatý retrievr a kontrolním vzorku odstředěného kravského mléka. Stanovení bylo provedeno v přítomnosti aktivátoru (tepelně inaktivované lidské sérum obsahující apoC-II) a ve stejném médiu, které aktivátor neobsahovalo (Graf 1). Stanovení bylo provedeno v triplikátech v souladu s metodikou popsanou výše. Objem přidávaného vzorku byl 20 µl. Jako slepý vzorek byla použita voda a naměřené hodnoty aktivity byly na tento slepý vzorek korigovány.



Graf 1: Aktivita LPL v mléce

A ... stanovení v přítomnosti aktivátoru (tepelně inaktivované lidské sérum)

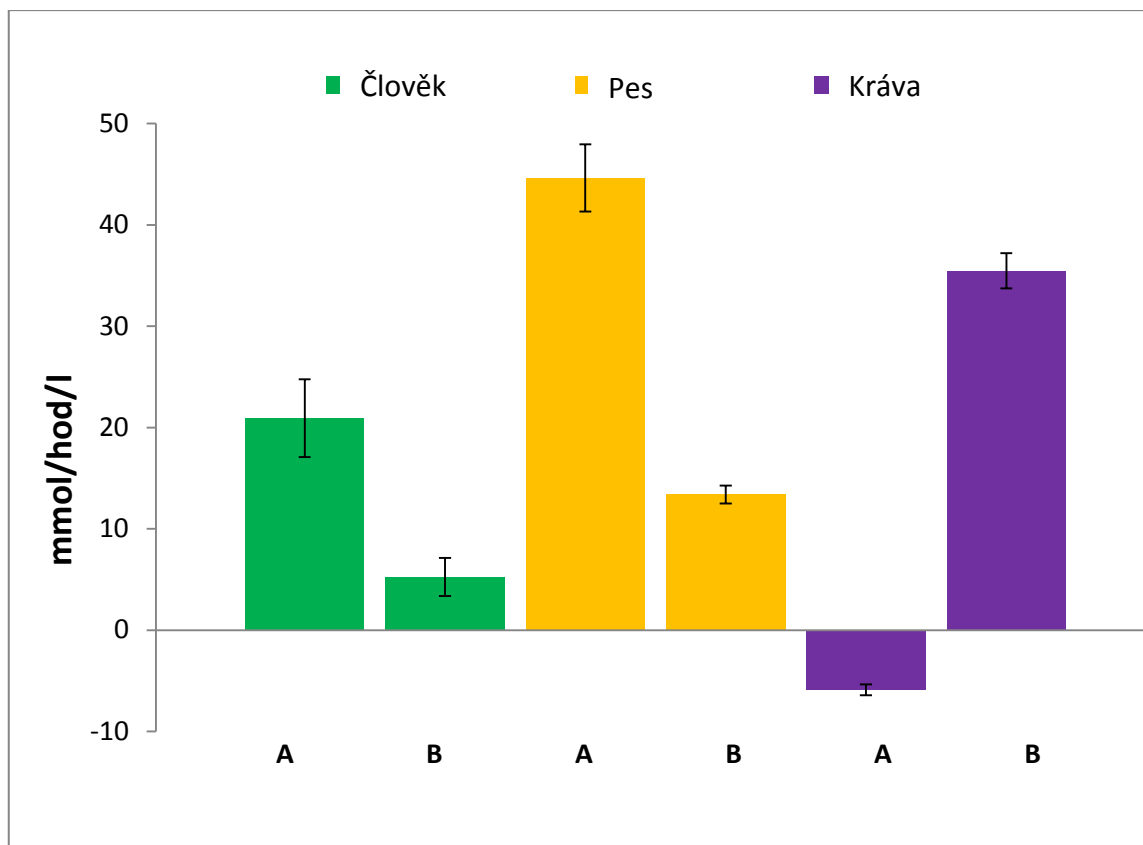
B ... stanovení v nepřítomnosti aktivátoru

Výsledky aktivity jsou prezentovány jako průměr \pm směrodatná odchylka (stanovení prováděno v triplikátech).

Přídavek aktivačního séra k médiu vedl ve všech vzorcích k mnohonásobnému nárůstu měřené aktivity, které odpovídají aktivitě LPL. Z rozdílu mezi aktivitou vzorku v médiích A a B jsme zjistili, že aktivita LPL byla 10,1 mmol/hod/l u člověka; 7,7 mmol/hod/l u psa a 19,5 mmol/hod/l u krávy.

Stanovení aktivity BSSL

Aktivita BSSL byla stanovena ve vzorku lidského mléka, mléka plemene zlatý retrivr a kontrolním vzorku odstředěného kravského mléka. Stanovení bylo provedeno v médiu obsahujícím žlučové kyseliny a ve stejném médiu, ve kterém žlučové kyseliny nebyly přítomny (Graf 2). Stanovení bylo rovněž provedeno v triplikátech a objem přidávaného vzorku byl 20 μ l.



Graf 2: Aktivita BSSL v mléce

A ... stanovení v přítomnosti 0,54% taurocholátu sodného

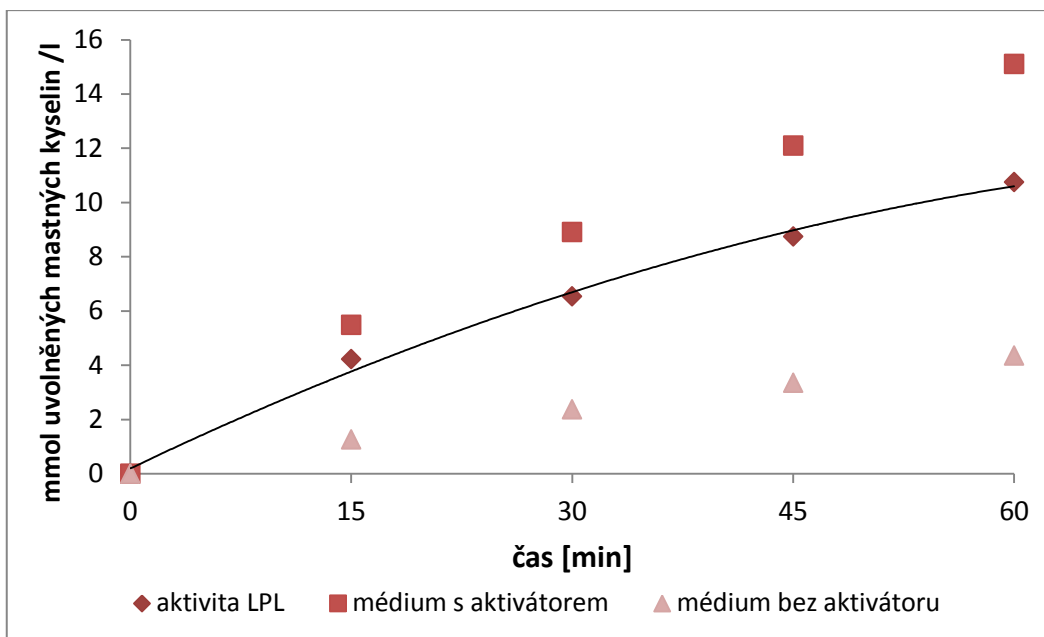
B ... stanovení v nepřítomnosti taurocholátu sodného

Výsledky aktivity jsou prezentovány jako průměr \pm směrodatná odchylka (stanovení prováděno v triplicátech).

Přídavek taurocholátu vedl k nárůstu měřené aktivity ve vzorku mléka člověka a psa a paradoxnímu poklesu aktivity ve vzorku odstředěného kravského mléka. Změřená aktivita BSSL byla 20,9 mmol/hod/l u člověka a 44,6 mmol/hod/l u psa.

Vliv délky inkubace na aktivitu LPL

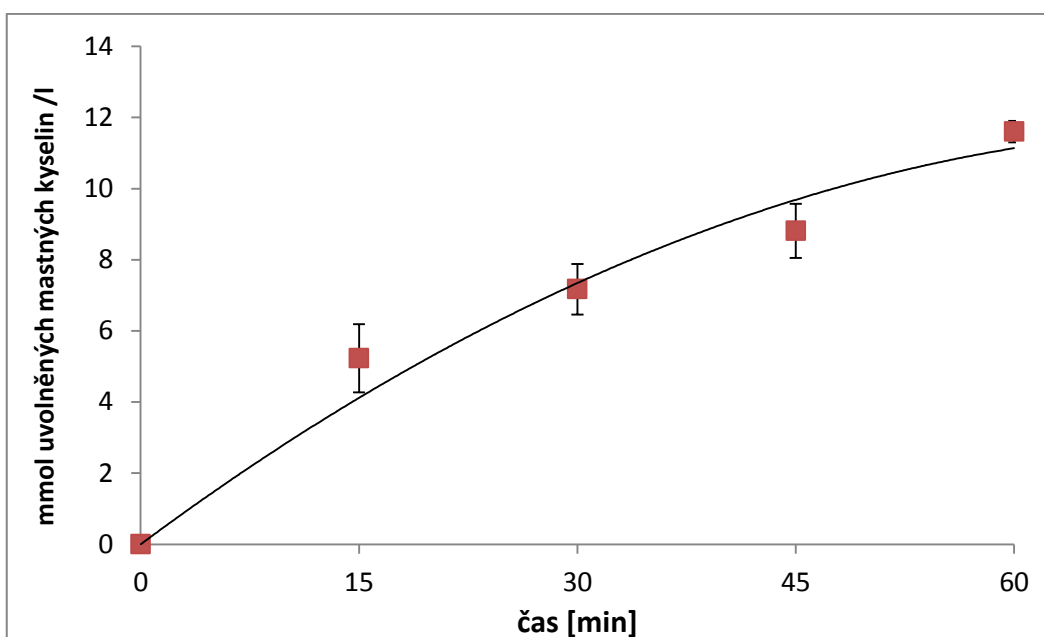
Cílem pokusu bylo zjistit linearitu reakce v závislosti na délce inkubace. V tomto pokusu bylo použito lidské mléko o objemu vzorku 20 μ l. Vzorky byly inkubovány v 15minutových intervalech po dobu 1 hodiny. Aktivita enzymu byla zjištěna z rozdílu mezi aktivitou vzorku v médiích A a B. Aktivita LPL ve vzorku lidského mléka nevykazovala lineární závislost na délce inkubace (Graf 3).



Graf 3: Vliv délky inkubace na aktivitu LPL lidského mléka

Vliv délky inkubace na aktivitu BSSL

V rámci pokusu jsme zjišťovali linearitu reakce katalyzované BSSL v závislosti na délce inkubace. V tomto pokusu bylo použito lidské mléko o objemu vzorku 20 μ l. Vzorky byly inkubovány v 15minutových intervalech po dobu 1 hodiny. Aktivita BSSL ve vzorku lidského mléka nevykazovala v průběhu 60 minut lineární závislost na délce inkubace (Graf 4).



Graf 4: Vliv délky inkubace na aktivitu BSSL lidského mléka

6 Diskuze

6.1 Aktivita LPL v mléce

V rámci práce byla zavedena metoda na stanovení aktivity lipoproteinové lipázy v mléce savců. V souladu s očekáváním po přidavku aktivačního séra (zdroje apolipoproteinu C-II) dochází k výraznému nárůstu množství uvolněných mastných kyselin, což svědčí o tom, že prokazatelně měříme aktivitu LPL ve všech vzorcích mléka (Graf 1).

V našich stávajících výpočtech jsme zanedbávali skutečnost, že i v mléce používaném jako vzorek pro stanovení aktivity enzymu je přítomno poměrně velké množství triacylglycerolů. To nepředstavuje problém při stanovení aktivity enzymu v lidské plazmě, která obsahuje cca 0,1 – 0,2 % triacylglycerolů. Mléko psa ale obsahuje 9,5 % triacylglycerolů (Reece, 2010), což znamená, že ve 20 μ l vzorku je přítomno 1,9 mg triacylglycerolů. V médiu používaném pro inkubaci je přítom pouze 1 mg ^3H -značených triacylglycerolů. Je tedy možné, že výsledky stanovení by měly být korigovány na endogenní triacylglyceroly přítomné v mléce. To bude prověřeno dalšími experimenty.

Pro stanovení linearitu jsme použili vzorek lidského mateřského mléka, který byl odebrán za lépe definovaných podmínek než mléko psa. V experimentu sledujícím závislost rychlosti reakce na čase (Graf 3) jsme zjistili, že průběh reakce není lineární. Při stanovení aktivity enzymu v lidské poheparinové plazmě je standardně používána 60minutová inkubace (Olivecrona and Bengtsson, 1984), aktivita enzymu v poheparinové plazmě je ovšem nižší (~5 mmol/hod/l) (Zemánková et al., 2015). Metodu bude nutné ještě optimalizovat a to buď zkrácením doby inkubace, nebo použitím menšího množství vzorku pro stanovení. V obou případech bude patrně nutné zvýšit specifickou aktivitu značeného substrátu – v experimentech byl používán substrát o specifické aktivitě cca 1,9 kBq/ μ mol triacylglycerolů.

Z toho, že množství uvolněných mastných kyselin stoupá v průběhu inkubace i v nepřítomnosti aktivátoru lze usuzovat, že ve vzorku je přítomna blíže neurčená lipolytická aktivita. Pravděpodobně se jedná o „bazální“ aktivitu LPL, resp. BSSL nebo o nespecifikovanou hydrolázu.

Jak již bylo uvedeno v úvodní části, LPL přítomná v mléce patrně nemá žádnou funkci z hlediska lipolýzy. Lze předpokládat, že její aktivita v mléce koreluje s její produkcí v buňkách mléčné žlázy a tedy schopností buněk mléčné žlázy vychytávat tuk z cirkulace

a inkorporovat ho do mléka. Z prostudovaných pramenů není dosud známo, jak se vyvíjí schopnost mléčné žlázy vychytávat tuk z cirkulace v průběhu laktace.

6.2 Aktivita BSSL v mléce

V rámci práce byla zavedena metoda na stanovení aktivity žlučovými kyselinami stimulované lipázy v mléce savců. Podobně jako při stanovení LPL vedl přídavek aktivátoru, tedy taurocholátu sodného, k výraznému vzestupu množství uvolněných mastných kyselin v mléce člověka i psa. Naproti tomu v mléce krávy, u které není BSSL v mléce přítomna se množství uvolněných mastných kyselin v přítomnosti žlučových kyselin paradoxně dramaticky snížilo (Graf 2). Je pravděpodobné, že v médiu, ve kterém nejsou žlučové kyseliny přítomny, je funkční lipoproteinová lipáza a přídavek taurocholátu sodného její aktivitu zřejmě plně inhibuje v souladu s literárními údaji (Olivecrona and Bengtsson, 1984). Z tohoto důvodu zřejmě LPL neinterferuje se stanovením BSSL a při stanovení není nutné korigovat na aktivitu měřenou v nepřítomnosti žlučových kyselin. Taková korekce by „falešně“ snižovala aktivitu BSSL.

V experimentu sledujícím závislost rychlosti reakce na čase (Graf 4) jsme zjistili, že průběh reakce není po dobu 60 minut lineární. To je patrně ve shodě s původní metodikou (Bläckberg and Hernell, 1981), která používá pouze 15minutovou inkubaci. Proto tedy nemá význam používat delší časy inkubace. Pro zjištění rozsahu, ve kterém je průběh reakce lineární, bychom tedy měli použít kratší časy inkubace – např. 5, 10, 15, 20 minut.

Podobně jako při stanovení LPL bude i při stanovení BSSL důležité zjistit, zda bude zapotřebí korigovat výsledky na koncentraci triacylglycerolů přítomných v použitém vzorku mléka.

Na závěr je třeba zdůraznit, že pro stanovení BSSL jsme zvolili metodu, která využívá stejný substrát jako metoda pro stanovení aktivity LPL – ^3H -trioleoylglycerolem značený komerčně dostupný Intralipid. Tento substrát – emulze sojového oleje stabilizovaná vaječným lecithinem – se svým složením podobá mléčnému tuku více než emulze ^3H -trioleoylglycerolem značeného olivového oleje stabilizovaného arabskou gumou použitého v původní práci (Bläckberg and Hernell, 1981). Její výhodou je větší stabilita – emulzi je možné po označení ^3H -trioleoylglycerolem používat po dobu 1 týdne, zatímco emulzi stabilizovanou arabskou gumou je nutno zpracovat okamžitě.

7 Závěr

V mléce člověka a některých dalších savců byly prokázány dvě lipázy, lipoproteinová lipáza, jež hraje zásadní úlohu v transportu triacylglycerolů z cirkulace do mléčné žlázy, avšak v mléce nemá žádnou fyziologickou úlohu. Naproti tomu žlučovými kyselinami stimulovaná lipáza zřejmě významně přispívá k trávení tuků u novorozenců, kde ještě nejsou zcela vyvinuty exokrinní pankreatické funkce a aktivita na kolipáze závislé pankreatické lipázy je mnohem nižší než u dospělých. O aktivitě BSSL u řady živočišných druhů nemáme dosud žádné informace. Ty by mohly významně přispět k rozhodování jaké mléko, respektive jaké náhražky mléka podávat mláďatům, která nemohou být kojena přirozeným mlékem matky.

V rámci práce byla zavedena metodika na stanovení obou lipáz přítomných v mléce. Bylo by však třeba zdokonalit postupy a podmínky odběrů mléka od různých druhů a metodiku lépe rozpracovat.

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

Obr. 1: Schéma mléčné žlázy feny	9
Obr. 2: Schéma prsního alveolu a alveolárních epitelových buněk se znázorněním jednotlivých metabolických transportních drah využívaných při produkci mléka	12
Obr. 3: Lipoproteinová částice.....	14
Obr. 4: Metabolismus lipoproteinů.....	16
Obr. 5: Úloha LPL ve vychytávání mastných kyselin tkáněmi	20
Obr. 6: Vliv březosti a laktace na aktivitu lipoproteinové lipázy v tukové tkáni a mléčné žláze u potkana	22
Obr. 7: Glycerol tri[9,10- ³ H(n)]oleát	28
Tab. 1: Umístění a počet bradavek na tělech savců podle druhu	10
Tab. 2: Přehled hlavních tříd lipoproteinů	15
Tab. 3: Rozpis pro stanovení závislosti aktivity LPL na délce inkubace	30
Graf 1: Aktivita LPL v mléce	31
Graf 2: Aktivita BSSL v mléce	32
Graf 3: Vliv délky inkubace na aktivitu LPL lidského mléka	33
Graf 4: Vliv délky inkubace na aktivitu BSSL lidského mléka	34

SEZNAM ZKRATEK

Apo	Apolipoprotein
BSA	Bovinní sérový albumin
BSSL	„Bile salt-stimulated lipase“
BSDL	„Bile salt-dependent lipase“
CEL	„Carboxyl esterase lipase“
CLDs	„Cytoplasmic lipid droplets“
ER	Endoplazmatické retikulum
GPIHBP1	Glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein
HDL	High density lipoproteins
IDL	Intermediate density lipoproteins
IgA	Imunoglobulin A
LDL	Low density lipoproteins
LPL	Lipoproteinová lipáza
LRP	„LDL-receptor related protein“
MG	2-monoacylglycerol
MFG	Milk fat globules
MK	Mastné kyseliny
NMK	Neesterifikované mastné kyseliny
TG	Triacylglyceroly
VLDL	Very low density lipoproteins

PŘEHLED LITERATURY

Andersson, Y., Sävman, K., Bläckberg, L. and Hernell, O. 2007. Pasteurization of mother's own milk reduces fat absorption and growth in preterm infants. *Acta Pædiatrica*. 96. 1445–1449.

Annema, W., Tietge, U. J. 2011. Role of hepatic lipase and endothelial lipase in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *Current Atherosclerosis Reports*. 13 (3). 257-265.

Baba, T., Downs, D., Jackson, K. W., Tang, J., Wang, C. S. 1991. Structure of human milk bile salt activated lipase. *Biochemistry*. 30 (2). 500-510.

Beisiegel, U., Weber, W., Bengtsson-Olivecrona, G. 1991. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88 (19). 8342-8346.

Belfrage, P., Vaughan, M. 1969. Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid from mixtures with glycerides. *Journal of Lipid Research*. 10. 341-344.

Bengtsson-Olivecrona, G., Olivecrona, T. 1992. Assay of lipoprotein lipase and hepatic lipase. 169-185. In: Converse, C.A., Skinner, E.R. 1992. *Lipoprotein analysis: a practical approach*. Oxford University Press. New York. p. 251.

ISBN: 0199631921

Bläckberg, L., Hernell, O. 1981. The Bile-Salt-Stimulated Lipase in human Milk. Purification and Characterization. *European Journal of Biochemistry* 116. 221-225

Bläckberg, L., Lombardo, D., Hernell, O., Guy, O., Olivecrona, T. 1981. Bile salt-stimulated lipase in human milk and carboxyl ester hydrolase in pancreatic juice. Are they identical enzymes? *FEBS Letters*. 136 (2). 284-288.

Buddington, R. K., Elnif, J., Malo, C., Bonahoo, J. B. 2003. Activities of gastric, pancreatic, and intestinal brush-border membrane enzymes during postnatal development of dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 64 (5). 627-634

Budras, K.D., McCarthy, P.H., Fricke, W., Richter, R., Horowitz, A., Berg, R. 2007. *Anatomy of the Dog*. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH&Co. KG, Hans-Böckler-Allee 7, 30173 Hannover, Germany. p. 224
ISBN: 3899930185

Casper, C., Carnielli, V. P., Hascoet, J.-M., Lapillonne, A., Maggio, L., Timdahl, K., Olsson, B., Vågerö, M., Hernell, O. 2014. rhBSSL improves growth and LCPUFA absorption in preterm infants fed formula or pasteurized breast milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 59 (1). 61-69.

Crocker, D. E., Champagne, C. D., Folwer, M. A., Houser, D. S. 2014. Adiposity and Fat Metabolism in Lactating and Fasting Northern Elephant Seals. *Advances in Nutrition*. 5. 57-64

Cunningham, M., Latour, M. A., Acker, D. 2005. *Animal Science and Industry*. Upper Saddle River, N.J: Pearson Prentice Hall. p.760. ISBN: 013046256

Das, U. N. 2005. Long-chain polyunsaturated fatty acids, endothelial lipase and atherosclerosis. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*. 72 (3). 173-179.

Goldberg, I. J., Eckel, R. H. and Abumrad, N. A. 2009. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase - and CD36-mediated pathways. *Journal of Lipid Research*. 50 (Suppl). 86-90.

Goldman, A. S., Chheda, S., Garofalo, R., Schmalstieg, F. C. 1996. Cytokines in human milk: properties and potential effects upon the mammary gland and the neonate. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 1 (3). 251-258.

Gotto, A. M., Pownall, H. 2003. *Manual of Lipid Disorders. Reducing the Risk for Coronary Heart Disease*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. p. 482.

Goulbourne, C. N., Gin, P., Tatar, A., Nobumori, C., Hoenger, A., Jiang, H., Grovenor, C. R. M., Adeyo, O., Esko, J. D., Goldberg, I. J., Reue, K., Tontonoz, P., Bensadoun, A., Beigneux, A. P., Young, S. G., Fong, L.G. 2014. The GPIHBP1-LPL Complex Is Responsible for the Margination of Triglyceride-Rich Lipoproteins in Capillaries. *Cell Metabolism*. 19. 849-859.

Grundy, S.M. 1990. *Atlas of Lipid Disorders*. Gower Medical Publishing. New York. p. 38.

Hamosh, M., Clary, T. R., Chernick, S. S., Scow, R. O. 1970. Lipoprotein lipase activity of adipose and mammary tissue and plasma triglyceride in pregnant and lactating rats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Lipids and Lipid Metabolism*. 210 (3). 473-482.

Hamosh, M., Scow, R. O. 1973. Lingual Lipase and Its Role in the Digestion of Dietary Lipid. *The Journal of Clinical Investigation*. 52 (1). 88-95.

Havel, R. J., Kane, J. P., Kashyap, M. L. 1973. Interchange of Apolipoproteins between Chylomicrons and High Density Lipoproteins during Alimentary Lipemia in Man. *The Journal of Clinical Investigation*. 52 (1). 32-38.

Hernell, O., Olivecrona, T. 1974. Human milk lipases II. Bile salt-stimulated lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 369. 234-240.

Hernell, O. 1975. Human milk lipases III. Physiological implications of the bile salt-stimulated lipase. *European Journal of Clinical Investigation*. 5. 269-273.

Hernell, O., Bläckberg, L. 1991. Digestion and absorption of human milk lipids. In: Dulbecco, R. ed. *Encyclopedia of human biology*. New York: Academic Press. 3. 47-56.

Howles, P. N., Stemmerman, G. N., Fenoglio-Preiser, C. M., Hui, D. Y. 1999. Carboxyl ester lipase activity in milk prevents fat-derived intestinal injury in neonatal mice. *American Journal of Physiology*. 227 (3 Pt 1). G653-G661

Hunziker, W., Kraehenbuhl, J. P. 1998. Epithelial transcytosis of immunoglobulins. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 3 (3). 287-302.

- Huston, G. E., Patton, S. 1990. Factors related to the formation of cytoplasmic crescents on milk fat globules. *Journal of Dairy Science*. 73 (8). 2061-2066.
- Iverson, S. J., Kirk, C. L., Hamosh, M., Newsome, J. 1991. Milk lipid digestion in the neonatal dog: the combined actions of gastric and bile salt stimulated lipases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1083. 109-119.
- Jensen, P. G., Pitas, R. E. 1976. Milk lipoprotein lipases: a review. *Journal of Dairy Science*. 59 (7). 1203-1214.
- Kersten, S. 2014. Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1841 (7). 919-933.
- Koldovský, O. 1995. Hormones in milk. *Vitamins and hormones*. 50. 77-149.
- Li, X., Lindquist, S., Lowe, M., Noppa, L., Hernell, O. 2007. Bile Salt-Stimulated Lipase and Pancreatic Lipase-Related Protein 2 Are the Dominating Lipases in Neonatal Fat Digestion in Mice and Rats. *Pediatric Research*. 62 (5) 537-541.
- Mather, I. H., Keenan, T. W. 1998. Origin and secretion of milk lipids. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 3 (3). 259-273.
- McManaman, J. L., Neville, M. C. 2003. Mammary physiology and milk secretion. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 55 (5). 629-641.
- Monks, J., Neville, M. C. 2001. Transcytosis of proteins across the mammary epithelium into milk. *Journal of Women's Cancer*. 2. 193-200.
- Olivecrona, T., Bengtsson, G. (1984). Lipases in milk. 205-261. In: Borgström, B., Brockman, H. L. 1984. *Lipases*. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. p. 542 ISBN: 0444805265
- Ollivier-Bousquet, M. 1998. Transferrin and Prolactin Transcytosis in the Lactating Mammary Epithelial Cell. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 3 (3). 303-313.

Pacák, J. 1982. Úvod do studia organické chemie. SNTL – Nakladatelství technické literatury, n. p. Praha. 272 s. ISBN: 0460282.

Reece, W.O. 2010. Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat. Grada Publishing. 480 s. ISBN: 9788024732824.

Shennan, D. B., Peaker, M. 2000. Transport of milk constituents by the mammary gland. *Physiological Reviews*. 80 (3). 925-951.

Sukonina, V., Lookene, A., Olivecrona, T., Olivecrona, G. 2006. Angiopoietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103 (46). 17450-17455.

Vulfson, E. N. 1994. Industrial applications of lipases In: Wolley, P., Petersen, S. B. (eds.) *Lipases: their structure, Biochemistry and Application*. Cambridge University Press. United Kingdom. p. 393. ISBN: 0521445269

Zemánková, K., Makoveichuk, E., Vlasáková, Z., Olivecrona, G., Kovář, J. 2015. Acute alcohol consumption downregulates lipoprotein lipase activity in vivo. *Metabolism*. 64 (11). 1592-6.