

5 Zusammenfassung

Die enzymatischen Grundlagen des Lipidstoffwechsels der Equiden sind bislang wenig erforscht. Nach definierten Hungerphasen zeigte das Pony (Shetland Pony) im Vergleich mit dem Großpferd (Warmblut) höhere Plasmalipidgehalte (FFS und Triglyceride). Bei längerer Inanition wurden Werte erreicht, die unter diesen Umständen beim Großpferd nicht auftreten. Ein Vergleich der Aktivitäten der triglyceridspaltenden Schaltenzyme bei Pony und Pferd fehlt bislang. Er ist aber zur Erkennung der Lokalisation der Störung angezeigt und veranlaßte die Durchführung der vorliegenden Studie. Die Resultate sind von besonderem Interesse im Hinblick auf die Ätiologie des Hyperlipämie-Syndroms der Ponies.

Gegenstand der Untersuchung war die vergleichende Aktivitätsmessung der Hormonsensitiven Lipase (HSL), der Lipoprotein Lipase (LPL) und der Hepatischen Triglyceridlipase (HTGL) *ex vivo in vitro*. Voraussetzung war die Entwicklung (HSL) bzw. Adaptation (LPL, HTGL) von Methoden. Zur Stimulation der Aktivität der HSL wurden Noradrenalin und Adenosin Desaminase, zur Inhibition wurde Insulin den Inkubationsmedien isolierter Adipozyten zugesetzt. Die Aktivität der LPL im Gewebe wurde mit Insulin und Heparin stimuliert. Es wurden Fettgewebe, Muskulatur und Plasma von einer Ponygruppe (n = 6) und einer Großpferdgruppe (Fettgewebe, n = 8; Muskulatur, n = 13; Plasma, n = 6) gewonnen. Die Aktivität der HSL wurde in Adipozytensuspensionen (mit Stimulator bzw. Stimulator und Inhibitor) durch Zugabe eines pH-sensitiven Fluorochroms (Seminaphthofluorescein, SNAFL-1™) fluorophotometrisch über 120 Minuten bestimmt. Zur Messung der Lipaseaktivität im Blut (LPL, HTGL) wurden nach intravenöser Injektion von Heparin Plasmaproben gezogen. Die Aktivität der LPL wurde in Fettgewebs- und Muskelbiopsien bestimmt. Die Inkubation der Gewebe zur Messung der LPL-Aktivität erfolgte mit und ohne Stimulatoren (Kontrolle, Insulin, Heparin und Insulin + Heparin). Die Aktivität der postheparinen Plasmalipasen wurde durch einen selektiven Assay bestimmt (LPL: Vorinkubation mit SDS; HTGL: hohe NaCl-Konzentration). Nach der Inkubation (60 Minuten) wurden die aus dem künstlichen ¹⁴C-markierten Triglyceridsubstrat freigesetzten Fettsäuren extrahiert und im Flüssigszintillator gemessen.

Noradrenalin führte in den Adipozyten der Ponies zu einem linearen Anstieg der Freisetzung der Fettsäuren ($4,57 \pm 2,09$ nmol FS/10⁵ Zellen/min), nicht jedoch bei den Großpferden. Wurde zusätzlich zum Noradrenalin Adenosin Desaminase

zugefügt, so zeigten die Adipozyten der Ponies eine etwa 7fach höhere Aktivität als die Zellen der Pferde ($12,71 \pm 3,12$ nmol FS/ 10^5 Zellen/min bzw. $1,84 \pm 1,22$ nmol FS/ 10^5 Zellen/min). Die Steigungen der Freisetzungsraten waren in allen Fällen signifikant unterschiedlich zwischen Pony und Pferd. Durch Addition von Insulin konnte die Lipolyse beim Pony auf $1,83 \pm 1,02$ nmol FS/ 10^5 Zellen/min und beim Großpferd auf eine Freisetzungsrate von $0,29 \pm 0,61$ nmol FS/ 10^5 Zellen/min reduziert werden.

Die Aktivitäten der postheparinen Plasmalipasen (LPL, HTGL.) waren nicht signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Tiergruppen. Die Aktivität der LPL im Fettgewebe zeigte große individuelle Schwankungen. Ein Unterschied zwischen Pferd und Pony ließ sich nicht zeigen. Die LPL in der Muskulatur wies neben großen individuellen Streuungen eine niedrigere Aktivität verglichen mit den Ergebnissen im Fettgewebe auf, die bei manchen Versuchstieren unter der Nachweisgrenze lag.

Mit Blick auf die Ätiologie des Hyperlipämie-Syndroms ist die unterschiedliche Lipolyserate der Adipozyten von Pony und Pferd von großer Bedeutung, im besonderen, da die Aktivitäten der lipoproteinspaltenden Enzyme (LPL, HTGL.) keine rassespezifischen Differenzen aufwiesen. Die erhöhte Empfindlichkeit der Adipozyten gegenüber Noradrenalin und die unvollständige Inhibition der Lipolyse durch Insulin könnte in Beziehung zum gehäuftem Auftreten dieses Syndroms bei den Ponies stehen. Zur Absicherung dieser *ex vivo in vitro* gewonnenen Daten sind Fluxmessungen der FFS *in vivo* mit ^{13}C -markierten Fettsäuren angezeigt.

6 Summary

Alexander Breidenbach

Triglyceride-cleaving plasma and tissue lipases of horse and pony with regard to the hyperlipemia syndrome

The enzymatic fundamentals of the lipid metabolism of equine are not thoroughly investigated to this point of time. After defined periods of starvation ponies (Shetland Ponies) developed higher contents of plasma lipids (FFA and triglycerides) than horses (standardbreds). By prolonged fasting values reached levels not seen in horses (except when a history of azotemia was seen). A comparison of the activities of the triglyceride-cleaving rate-limiting enzymes of pony and large bred horse is still missing. This investigation is indicated to reveal the location of the disorder and gave rise to the submitted study. The results are of particular interest considering the etiology of the hyperlipemia-syndrome in ponies.

The objective of the study was to measure the activities of hormone-sensitive lipase (HSL), lipoprotein lipase (LPL) and hepatic triglyceride lipase (HTGL) in ponies in comparison with horses in *ex vivo in vitro* assays. Methods were developed (HSL) and adapted (LPL and HTGL). In isolated adipocytes HSL-activity was stimulated by norepinephrine and adenosine deaminase or inhibited by insulin. In tissue explants LPL-activity was stimulated by insulin and heparin. Adipose tissue, muscle tissue and plasma were obtained from ponies (n = 6) and large bred horses (adipose tissue, n = 8; muscle, n = 13; plasma, n = 6). In suspensions of adipocytes HSL-activity was determined (in presence of stimulating or stimulating and inhibiting agents) fluorophotometrically by addition of a pH-sensitive fluorochrome (SNAFL-1™, Seminaphthofluorescein) during two hours. The plasma lipase was obtained by administration of heparin i.v. and by taking blood samples ten minutes later. To determine the activity of LPL in tissues biopsies of adipose tissue and muscle were taken. The incubation of tissues to measure LPL-activity was performed with stimulators present or absent (control, insulin, heparin and insulin + heparin). In postheparin plasma the activity of LPL and HTGL was selectively measured (LPL: preincubation with SDS; HTGL: incubation with high salt concentration). After the incubation (60 minutes) the released radioactive-labeled fatty acids were extracted and measured by liquid scintillation counting.

Norepinephrine increased the release of FFA in adipocytes in a linear fashion in ponies ($4,57 \pm 2,09$ nmol FA/ 10^5 cells/min) but not in horses. Lipolysis was 7 times higher in fat cells of ponies ($12,71 \pm 3,12$ nmol FA/ 10^5 cells/min) than in horses ($1,84 \pm 1,22$ nmol FA/ 10^5 cells/min) when adenosine deaminase and norepinephrine were added. The rates of FFA-release were significantly different between ponies and horses.

Lipolysis was reduced in ponies ($1,83 \pm 1,02$ nmol FA/ 10^5 cells/min) and in horses ($0,29 \pm 0,61$ nmol FA/ 10^5 cells/min) when insulin and the stimulating agents were added to the medium.

There was no difference considering the activities of the postheparin plasmalipases in ponies and horses. In adipose tissue there were great individual variations of LPL-activity. No difference could be demonstrated in this respect between the groups of animals. In muscle tissue the LPL-activity was considerably lower than in adipose tissue and showed also great individual variations. The activity was in some cases below the sensitivity of the assay.

As to the etiology of the hyperlipemia-syndrome the different lipolytic response in adipocytes of ponies and horses is of considerable interest since there was no difference of lipoprotein-cleaving enzyme-activity (LPL, HTGL) between ponies and horses. The enhanced sensitivity of fat cells towards stimulation by norepinephrine and the incomplete inhibition by insulin could relate to the increased incidence of the syndrome in ponies. To prove these data obtained in *ex vivo in vitro* experiments it is indicated to measure fluxes of ^{13}C -labeled FFA *in vivo*.