

Optimizacija analiznega postopka merjenja aktivnosti lipoproteinske lipaze v rakavem tkivu

Optimization of an analytical procedure of lipoprotein lipase activity measurement in cancer tissue

Mojca Bilač Krašnja, Darko Černe

Povzetek: Raziskave kažejo na povezavo med aktivnostjo lipoproteinske lipaze (LPL; EC 3.1.1.34) in rastjo rakavega tkiva. Zaradi odsotnosti enostavnih metod za merjenje njene aktivnosti je intenzivnejše proučevanje vloge LPL v razvoju raka omejeno. V raziskavi smo želeli ugotoviti, ali je postopek temelječ na izluževanju LPL iz tkiva z raztopino heparina in albumina ter merjenju aktivnosti encima v eluatu s komercialnim postopkom LPL Activity Kit (Roar Biomedical, New York, ZDA) primeren za merjenje aktivnosti LPL v rakavem tkivu. Ugotovili smo, da je postopek zanesljiv le ob upoštevanju dodatnih, v naši raziskavi ugotovljenih priporočil glede stabilnosti izluževalne raztopine in substratne emulzije, merjenja v encimski reakciji nastalega fluorescenčnega produkta vsakih pet minut, individualne ocene ustreznosti poteka encimske reakcije in standardizacije aktivnosti encima na maso tkiva (nkat/kg). Z vpeljanim postopkom smo ugotovili, da je aktivnost LPL v rakavem pljučnem tkivu v povprečju 1,94-krat višja kot v sosednjem, navidezno neprizadetem pljučnem tkivu istega bolnika ($p < 0,001$; 10 bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom brez metastaz). Zaključujemo lahko, da je vpeljan postopek primeren za merjenje aktivnosti LPL v tkivih in za nadaljnje proučevanje vloge encima pri preskrbi rakavega tkiva z maščobami, nujnimi za rast tkiva.

Ključne besede: lipoproteinska lipaza, rakavo tkivo, encimska aktivnost

Abstract: Several studies demonstrated that there is a connection between lipoprotein lipase activity (LPL; EC 3.1.1.34) and cancer tissue growth. An intensive investigation of the role of LPL in cancer progress is limited because of the lack of simple methods for LPL activity measurements. Our aim was to optimize the method which is based on the release of LPL from tissue with the solution containing heparin and albumin, and which is based on enzyme activity measurement with commercially available LPL Activity Kit (Roar Biomedical, New York, ZDA). We also wanted to find out if this method is suitable for LPL activity measurement in cancer tissue. We came to the conclusion that the method is reliable only by considering additional – in our study established recommendations regarding the stability of all solutions we used, measurement fluorescent product in 5 minutes intervals, individual estimation of the appropriateness of enzyme reaction as well as standardization enzyme activity on weight of tissue (nkat/kg). Using this method we found out that LPL activity was higher in cancer tissue (1.9-fold median difference) than when compared to adjacent, apparently healthy lung tissue of the same patient ($p < 0,001$; 10 patients with non-small cell lung cancer without metastases). We conclude that this method is suitable for LPL activity measurement in tissues as well as for further, better understanding of the role of LPL in possible mechanisms for increasing the supply of lipid nutrients to the tumour, necessary for tumour growth.

Key words: lipoprotein lipase, cancer tissue, enzyme activity

1 Uvod

Lipoproteinska lipaza (LPL; EC 3.1.1.34) je poglavitni encim znotrajžilne presnove trigliceridov. Sintetizira se v parenhimskih celicah mnogih tkiv, od koder se prenese na površino endotelija (1). Tkivno specifično uravnavanje sinteze in s tem aktivnosti LPL v tkivu omogoča tkivom z velikimi presnovnimi potrebami učinkovito črpanje maščob iz krvi (1).

Nekatere raziskave nakazujejo povezavo med LPL in rastjo rakavega tkiva. Na primer, pri ljudeh in živalih s tumorjem je aktivnost LPL v

netumorskem tkivu znižana (2, 3, 4, 5), znižanje pa se stopnjuje s stadijem bolezni oziroma z napredovanjem in rastjo tumorja (5) ter se v primeru odstranitve tumorja normalizira (6). Zvišano aktivnost v tumorju glede na okolno tkivo so opisali pri sarkomu in rektalnem raku (7). Stimuliranje aktivnosti LPL v netumorskem tkivu z bezafibratom (8) zmanjša hipertrigliceridemijo in zavre rast tumorja. Aktivnost LPL v humanih tumorjih dobro korelira z mitotično aktivnostjo in stopnjo rasti tumorja, z izjemo nekrotičnega dela tumorja, kjer je aktivnost znižana (7).

Postopki merjenja aktivnosti LPL so večinoma zahtevni in zamudni, kar omejuje njihovo pogostejšo uporabo v raziskovalne in diagnostične namene. Starejše radioizotopne metode (9) so izpodrinile fluorimetrične metode (10) in metode tekočinske kromatografije, ki so enostavnejše in hitreje (11). Zaradi nizke substratne specifičnosti encima LPL in nestabilnosti naravnih substratov, je metode težko standardizirati, reagenti so večinoma lastne proizvodnje in nestabilni (10, 11, 12, 13). Komercialno dostopne emulzije so sicer bolj stabilne, vendar manj specifične. V zadnjem času se z uporabo monoklonskih protiteles v encimsko imunskih testih dosega večje specifičnosti (12), vendar se tudi te metoda v praksi ne uporabljajo. Vsi omenjeni postopki se običajno uporabljajo za merjenje aktivnosti LPL v postheparinski plazmi (13). Merjenje aktivnosti LPL v tkivih zahteva dodatno predhodno izluževanje encima iz tkiva (14, 15) z izluževalno raztopino, kateri je dodan heparin, saj so dobljene aktivnosti v mediju brez heparina zelo majhne (16, 17, 18, 19).

Zaradi nedostopnosti enostavnih metod za merjenje aktivnosti LPL v plazmi in tkivih je proučevanje njene vloge v razvoju raka omejeno. V raziskavi smo želeli ugotoviti, ali je postopek temelječ na izluževanju LPL iz tkiva z raztopino heparina in albumina (16) ter merjenju njene aktivnosti v eluatu s komercialnim postopkom LPL Activity Kit (Roar Biomedical, New York, ZDA) primeren za merjenje aktivnosti LPL v rakavem tkivu, ter ga v primeru potrebe dodatno optimizirati.

2 Materiali in metode

Zbiranje tkivnih vzorcev

V raziskavo smo vključili 42 bolnikov s pljučnim rakom. Vključitveni kriterij je bil tumor pljuč brez metastaz, ki se ni vraščal v okolno tkivo. Vsakemu bolniku smo odvzeli dva tkivna vzorca in sicer prvega iz periferije tumorja (območje najhitreje rasti) in drugega iz zdravega (nerakavega) pljučnega tkiva. Mesto odvzema zdravega, nerakavega pljučnega tkiva je bilo od tumorja oddaljeno vsaj 10 cm, tkivo pa je bilo organoleptično neprizadeto. Tkivne vzorce smo najkasneje v 15 minutah po resekciji pljuč potopili v tekoči dušik, kjer smo jih hranili do nadaljnje analize.

Merjenje aktivnosti lipoproteinske lipaze v tkivu

V osnovi smo uporabili postopek Yamazakija in sod. (16), ki temelji na izluževanju LPL iz tkiva z raztopino heparina in albumina in merjenju aktivnosti encima v eluatu z encimskim fluorimetričnim analiznim postopkom ob uporabi komercialnega reagenčnega kompleta LPL Activity Kit (Roar Biomedical, New York, ZDA). Petstopenjski postopek opisuje Preglednica I. Za potrebe naše raziskave smo postopek optimizirali. Pogoji optimiziranega postopka so prikazani v drugem delu Preglednice I. Od zamrznjenega tkiva smo manjši košček (15-30 mg) oddelili z nožem konico in ga prenesli v mikroepreveto (Eppendorf). Na vsakih 5 mg tkiva smo dodali 100 µL izluževalne raztopine, modificiranega Krebs-Ringerjevega pufru v sestavi 100 mM Tris, 150 mM NaCl, 4 mM KCl, 3 mM CaCl₂ · 2H₂O, 2 mM MgSO₄ · 7H₂O, 10 g/L albumina (Merck, Darmstadt, Nemčija) in 10.000 IU/L heparina (Krka, Novo Mesto, Slovenija) uravnane s HCl na pH 7,4. Zmes smo homogenizirali z ultrazvokom 2 minuti 30 sekund pri amplitudi 38 %, pulz 1 sekunda, prekinitev 2 sekundi (Cole-Parmer Ultrasonic Processor Instrument, Vernon Hills, Illinois, ZDA), jo inkubirali eno uro

na sobni temperaturi in nato centrifugirali v Eppendorf mikrocentrifugi 5 minut pri relativni centrifugalni sili 4400 x g. 20 µL supernatanta (izlužnine z izluženim encimom) smo napipetirali skupaj z 200 µL reakcijske raztopine (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA) in 1 µL LPL substratne emulzije (LPL Activity Kit) v mikrotitersko ploščo (Microplate White, Greiner Bio-one, Frickenhausen, Nemčija). Zmes smo inkubirali na 37 °C v predhodno segretem fluorimetru (Genois, Tecan, Avstrija) in merili v encimski reakciji nastali fluorescenčni produkt vsakih pet minut, 1 uro in pol, pri ekscitaciji 360 nm in emisiji 465 nm. Narisali smo krivuljo naraščanja fluorescence v odvisnosti od časa in odčitali porast fluorescence v eni uri. Količino v encimski reakciji nastalega fluorescenčnega produkta v eni uri smo odčitali iz umeritvene krivulje, ki smo jo naredili v vsaki seriji meritev s pomočjo raztopin z znanimi koncentracijami fluorescenčnega produkta priloženimi reagenčnemu kompletu. Fluorescence standardnih raztopin smo prav tako izmerili 1 uro po pričetku spremljanja fluorescence v merilnem postopku. Ob predpostavki, da je regresijski koeficient večji kot 0,999, smo umeritveni krivulji določili regresijski koeficient (B) in regresijsko konstanto (A), ki smo ju upoštevali pri izračunu aktivnosti encima v tkivu (enačba 1). Vse meritve smo naredili v dvojniku in za vsakega pacienta v tumorskem in kontrolnem tkivu v isti seriji meritev. Rezultate meritev smo standardizirali glede na količino tkiva in volumna izluževalne raztopine in jih izrazili kot katalitično aktivnost LPL na kg tkiva (enačba 1).

Enačba 1: Izračun aktivnosti LPL v tkivu

Equation 1: Calculation LPL activity in tissue

$$\text{Aktivnost LPL v tkivu} = \frac{Y - A}{B} \cdot V \text{ reakcijske zmesi} \cdot V \text{ pufra} \cdot 1000$$

$$(\text{nkat/kg}) \quad \text{zatehta tkiva} \cdot V \text{ supernatanta} \cdot 3600$$

Y – porast fluorescenčnega signala reakcijske zmesi v 1 uri (relativna fluorescenčna enota, RFU);

A – regresijska konstanta umeritvene krivulje standardov (RFU);

B – regresijski koeficient umeritvene krivulje standardov (RFU · µL/pmol);

V reakcijske zmesi – končni volumen reakcijske zmesi (µL; v našem primeru 221);

V pufru – volumen izluževalne raztopine, v katerem smo homogenizirali tkivo (µL);

1000 – za preračun mg v g;

zatehta tkiva – masa zatehtanega vzorca (mg);

V supernatanta – (µL; v našem primeru 20);

3600 – za izračun encimske aktivnosti v sekundi.

Preglednica I: Opis postopka merjenja aktivnosti LPL v tkivu (po priporočilih Yamazakija in sod. (16) in proizvajalca Roar Biomedical) ter priporočila glede optimizacije postopka, postavljena na osnovi naše raziskave

Table I: Procedure of LPL activity measurement in tissue (according recommendations of Yamazaki and co. and producer Roar Biomedical) and recommendations for optimization, established in our study

Stopnja	Priporočilo Yamazakija in sod. (16) in proizvajalca reagenta (LPL Activity kit, Roar Biomedical, NY, ZDA)	Naša priporočila glede optimiziranega postopka
1. (oddelitev manjšega koščka tkiva od zamrznjenega tkiva)	ni podatka	- lomljenje tkiva z nožem konico (pri -70 °C) - tehtanje oddeljenih delčkov tkiva v predhodno stehanih plastičnih mikroeprevetah
2. (izluževanje encima iz tkiva)	200 µl izluževalne raztopine na 3-10 mg tkiva - inkubacija: nežno stresanje na 28 °C 40 min - centrifugiranje 5 min - stabilnost izluževalne raztopine – ni podatka	100 µl izluževalne raztopine na 5 mg tkiva - homogenizacija tkiva v izluževalni raztopini z ultrazvokom (2 min 30 sek, amplituda 38 %, pulz 1 sek, prekinitev 2 sek) - inkubacija z občasnim stresanjem: 1 uro pri sobni T - centrifugiranje 5 min (4400 x g) - stabilnost izluževalne raztopine 6 dni
3. (priprava umeritvene krivulje za izračun aktivnosti encima v izlužnini)	- LPL standardno raztopino (75,7 mmol/L) redčimo do ustreznih koncentracij, kjer pričakujemo rezultate meritev analiznih vzorcev - ni zahteve za pripravo nove umeritvene krivulje za vsako serijo meritev	- LPL standardno raztopino (75,7 mmol/L) redčimo do ustreznih koncentracij, kjer pričakujemo rezultate meritev analiznih vzorcev - za vsako serijo meritev naredimo novo umeritveno krivuljo - fluorescence standardnih raztopin izmerimo 1 uro po pričetku spremljanja fluorescence v meritvenem postopku
4. (merjenje aktivnosti encima v izlužnini)	- izlužnini z izluženim encimom (volumen ni definiran) dodamo 200 µl reakcijske raztopine in 1 µl substratne emulzije - inkubacija na 25 °C – 37 °C - merjenje fluorescence reakcijske zmesi pri ekscitaciji 370 nm in emisiji 450 nm - ni podatka o frekvenci merjenja fluorescence - ni podatkov o stabilnosti LPL substratne emulzije po njeni prvi uporabi - ni priporočila o spremljanju poteka reakcij	20 µl izlužnine z izluženim encimom dodamo 200 µl reakcijske raztopine in 1 µl substratne emulzije (reakcijsko raztopino in LPL substratno emulzijo zmešamo za vse vzorce hkrati) - inkubacija 37 °C eno uro in pol - merjenje fluorescence reakcijske zmesi pri ekscitaciji 360 nm in emisiji 465 nm - fluorescenco merimo vsakih 5 min - stabilnost LPL substratne emulzije en mesec po njeni prvi uporabi - priporočljiva je individualna ocena ustreznosti encimske reakcije
5. (izračun rezultatov)	- pri vrednotenju se upošteva končna absolutna vrednost fluorescenčnega signala reakcijske zmesi - ocena aktivnosti LPL relativno na vsebnost izluženih proteinov (končna vrednost fluorescence relativno glede na koncentracijo izluženih proteinov).	- pri vrednotenju se upošteva porast fluorescenčnega signala reakcijske zmesi v 1 uri od začetka merjenja - izražanje katalitične aktivnosti LPL glede na maso tkiva (nkat/kg tkiva)

S krepkim tiskom so poudarjene stopnje in postopki, ki jih priporočamo glede na izsledke naše raziskave.

3 Rezultati

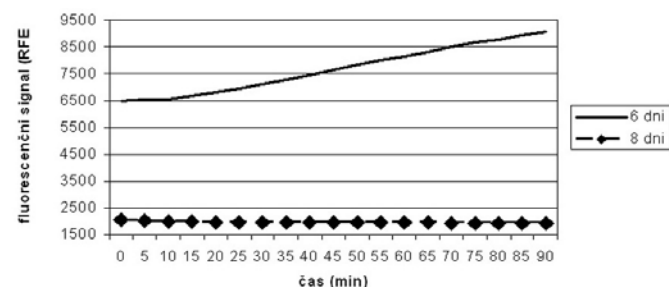
Uvodno preizkušanje postopka je pokazalo, da je originalni postopek potreben obsežne optimizacije. Vpeljane spremembe prikazuje preglednica I. Košček tkiva smo z nožev konico oddelili od tkiva, potopljenega v suhi led. Tako smo preostanek tkiva ohranili zamrznjenega za morebitne kasnejše ponovitve meritev. Odlomljen košček tkiva smo homogenizirali v izluževalni raztopini z ultrazvokom. S takšnim postopkom smo iz tkiva izlužili več encima kot z maceriranjem tkiva na sobni temperaturi v izluževalni raztopini s pomočjo plastične palčke (rezultati niso prikazani). Za zanesljive rezultate je izjemnega pomena uporaba svežih raztopin. Preglednica II prikazuje ugotovitve o njihovi stabilnosti.

Uporaba raztopin s pretečenim rokom pomembno zmanjša izmerjene aktivnosti LPL v tkivu, kar prikazuje slika 1.

Med spremljanjem encimske reakcije s fluorimetrom v 1 uri v povprečju razpade 18 % fluorescenčnega produkta encimske reakcije (rezultati podrobneje niso prikazani), zato smo za izračun aktivnosti LPL v vzorcih uporabili umeritveno krivuljo, dobljeno iz fluorescenc standardnih raztopin, izmerjenih eno uro po začetku spremljanja fluorescence v meritvenem postopku. Umeritveno krivuljo smo naredili v vsaki seriji meritev in s tem dosegli primerljivost rezultatov med serijami. Prostor za mikrotitrsko ploščico v fluorimetru smo pred postopkom merjenja segreli na 37 °C in tako dosegli običajni potek encimske reakcije (slika 2). Kinetiko nastajanja fluorescenčnega produkta smo merili v pet minutnih intervalih in individualno ocenili potek encimske reakcije. S tem smo preverili kinetiko reakcij in zaznali morebitna odstopanja. V primeru nepravilnega poteka encimske reakcije je potrebno meritve ponoviti. Slika 2 prikazuje običajni in nepravilni potek encimske reakcije.

Rezultate smo standardizirali kot aktivnost LPL na maso tkiva (nkat/kg tkiva). V izračunu smo upoštevali vse spremenljivke, ki vplivajo na rezultat aktivnosti: volumne pufra, reakcijske zmesi, supernatanta, zatehto tkiva, čas merjenja encimske aktivnosti kot tudi regresijski koeficient in regresijsko konstanto, ki smo jo določili iz umeritvene krivulje standardnih raztopin (enačba 1). Z natančno izračunano aktivnostjo smo lahko naredili absolutno primerjavo med tkivi.

Z vpeljanim postopkom smo zanesljivo izmerili aktivnost LPL v rakavem pljučnem tkivu in jo primerjali z aktivnostjo v sosednjem, navidezno

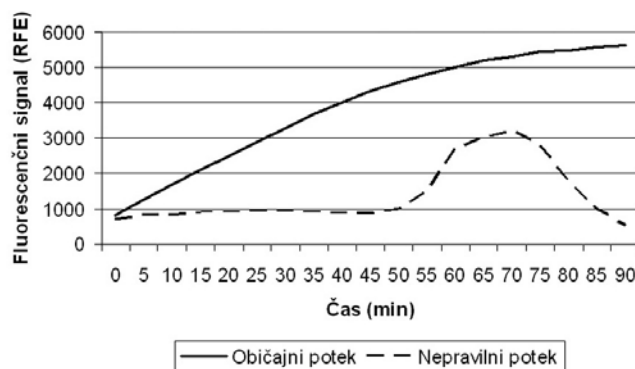


Slika 1: Kinetika encimske reakcije v odvisnosti od uporabe izluževalne raztopine stare 6 ali 8 dni.

Figure 1: Dependence enzyme reaction kinetic and usage 6 or 8 days old extraction solution.

Preglednica II: Stabilnost v analiznem postopku uporabljenih raztopin.
Table II: Stability of solutions, used in analytical procedure.

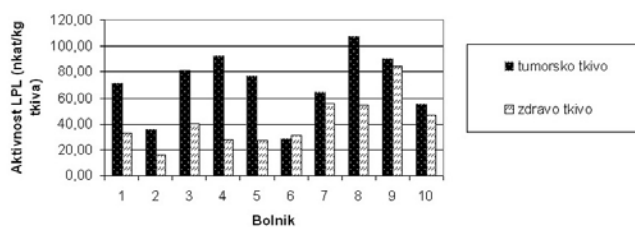
Raztopina	Stabilnost
Izluževalna raztopina	6 dni
Krebs-Ringerjev pufar	10 dni
LPL substratna emulzija	2 meseca in pol



Slika 2: Običajni in nepravilni potek encimske reakcije.

Figure 2: Regular and irregular course of enzyme reaction.

neprizadetem pljučnem tkivu istega bolnika. Aktivnost LPL v rakavem pljučnem tkivu je bila v povprečju 1,94-krat višja kot v sosednjem, navidezno neprizadetem pljučnem tkivu ($p < 0,001$; 10 bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom brez metastaz). Razlike v aktivnosti LPL med tumorskim in zdravim tkivom bolnikov prikazuje slika 3.



Slika 3: Aktivnosti lipoproteinske lipaze (LPL) v tumorskem pljučnem tkivu in v sosednjem, organoleptično zdravem pljučnem tkivu istega bolnika.

Figure 3: Lipoprotein lipase (LPL) activity in cancer lung tissue compared to adjacent, apparently healthy lung tissue of the same patient.

4 Razprava

V naši raziskavi smo ugotovili, da je postopek LPL Aktiviti Kit primeren za merjenje aktivnosti LPL v rakavem pljučnem tkivu, vendar je zanesljiv le ob upoštevanju dodatnih, v naši raziskavi ugotovljenih priporočil. Z vpeljanim postopkom smo dokazali 1,94-krat višjo aktivnost LPL v rakavem pljučnem tkivu kot v sosednjem, navidezno zdravem pljučnem tkivu istega bolnika.

Uporabljen izhodiščni postopek je v literaturi omenjen le enkrat (16), tako v izhodiščnem članku kot v navodilih proizvajalca reagenta LPL

Activity Kit pa je postopek uporabe zelo skopo opisan. Ni omenjeno, kako so hranili tkivo in manjši košček oddelili za analizo. Na podlagi preizkušanja smo se odločili za oddelitev manjšega koščka tkiva iz viala z nožev konico, pri tem pa je bila viala ves čas potopljena v suhi led. Postopek je tehnično zahtevnejši in zamudnejši od odtajanja celotnega vzorca, vendar smo želeli del tkiva ohraniti v zamrznjenem stanju za morebitne kasnejše ponovitve.

Prav tako ni podrobneje opisan način izluževanja encima iz tkiva. V naši raziskavi smo manjše koščke tkiva najprej razbili in razkrojili s pomočjo ultrazvoka, ki hitro razbije tudi trdnejše strukture na drobne koščke, kar bistveno poveča učinkovitost izluževanja encima iz tkiva v izluževalno raztopino. Menimo, da je omenjeni postopek enostavnejši in primernejši od maceriranja tkiva s plastično palčko (20), saj pri vseh vzorcih uporabljamo enake pogoje (amplituda, pulz, prekinitev), česar pri maceriranju s plastično palčko ne moremo zagotoviti. Čas inkubacije tkiva v izluževalni raztopini je bil v izhodiščnem članku 40 minut (16), podrobnejši pregled ostalih literaturnih virov pa kaže na zelo raznolike čase inkubacije, ki se gibljejo med 30 in 90 minut (9, 14, 15, 17). Glede na podatke, da se največji del encima sprosti iz tkiva v prvih desetih minutah inkubacije, naslednjih 40 minut pa je izluževanje bistveno počasnejše ter da ni bistvene razlike v izluževanju encima iz tkiva na sobni temperaturi ali pri 37 °C (17), smo se odločili za enourno inkubacijo na sobni temperaturi.

Za zanesljive rezultate je izjemnega pomena stabilnost uporabljenih raztopin, tako komercialno dosegljivih kot pripravljenih v laboratoriju. Kinetika encimske reakcije je močno odvisna od starosti izluževalne raztopine, ki je stabilna največ šest dni. Možen vzrok nestabilnosti izluževalne raztopine je prisotnost govejega serumskega albumina in heparina. Podrobnejši organoleptični pregled raztopine s pretečenim rokom uporabe je pokazal prisotnost drobnih delčkov (kosmičev), ki pa jih nismo natančneje proučevali. Vzrokov nestabilnosti izluževalne raztopine nismo podrobneje raziskovali, smo pa pri nadaljnjem delu dosledno upoštevali ugotovitve o njeni šest dnevni stabilnosti in se tako izognili posledičnemu nepravilnemu poteku encimske reakcije in nezanesljivemu rezultatu analize.

Poleg nestabilnosti v laboratoriju pripravljene izluževalne raztopine smo opazili tudi nestabilnost komercialne substratne emulzije reagenčnega kompleta. Ugotovitev je bila neskladna s pričakovanji, saj proizvajalec ne navaja podatkov o njeni nestabilnosti po prvi uporabi, pa tudi sicer je zaprta v temni viali in zaščitena pred svetlobo. Proizvajalec navaja le rok uporabe celotnega kompleta nenačetih reagentov, ki smo ga dosledno upoštevali. Domnevamo, da je razpad LPL substratne emulzije posledica večkratnega odpiranja viala in pogoste izpostavljenosti svetlobi. Pri uporabi substratne emulzije smo namreč opazili, da je bila po dveh mesecih in pol bistveno zmanjšanja hitrost nastajanja fluorescenčnega produkta (kljub sveže pripravljenim ostalim raztopinam), kar je bilo vidno kot neobičajen potek encimske reakcije. LPL substratna emulzija je tudi izredno viskozna in nehomogena, kar še dodatno povzroča težave pri njenem mešanju in pipetiranju. Da bi preprečili naštetе možne vzroke za nestabilnost LPL substratne emulzije, smo dosledno upoštevali naslednje lastne ugotovitve: 1.) vialo smo odpirali v temnem prostoru in čim manjkrat; 2.) pred in po uporabi smo jo zavili v za svetlobo nepropustno folijo; 3.) pred pipetiranjem smo vialo dobro premešali na mešalcu (vortex); 4.) po prvem odprtju viala smo dosledno upoštevali ugotovljen rok uporabe; in 5.) reakcijsko

raztopino in LPL substratno emulzijo smo zmešali za vse vzorce v seriji naenkrat in se tako izognili napaki zaradi pipetiranja netočne količine viskozne substratne emulzije (1 µL za en analizni vzorec).

Kljub temu, da tako avtorji izhodiščnega članka kot proizvajalec reagenčnega kompleta ne omenjajo, smo za vsako serijo meritev pripravili novo umeritveno krivuljo. S tem smo dosegli boljšo ponovljivost med serijami meritev. Sicer pa je tudi naše priporočilo, da je koeficient korelacije najmanj 0,999, kar pa ob natančnem delu ni težko dosegljivo.

Prav tako v izhodiščnem članku ni omenjena nestabilnost fluorescenčnega produkta encimske reakcije. Napaki zaradi njegovega razpadanja oziroma nestabilnosti smo se izognili z merjenjem fluorescence standardnih raztopin eno uro po začetku merjenja fluorescence v meritvenem postopku. Ugotovili smo, da moramo vsako reakcijo posebej oceniti in sicer tako, da spremljamo potek reakcije na pet minut. Glede na to, da v izhodiščnem članku to ni omenjeno, bi lahko spregledali mnogo napačnih meritev (v našem primeru 17 %).

V izhodiščnem članku (16) so pri izračunu aktivnosti LPL upoštevali končne absolutne vrednosti fluorescenčnega signala. Prepričani smo, da je primerneje upoštevati porast fluorescence v eni uri od začetka merjenja. S tem se tudi izognemo morebitnemu vplivu nehomogenosti vzorcev na velikost nastalega fluorescenčnega signala (7). V izhodiščnem članku (16) so aktivnost LPL izrazili relativno na vsebnost izluženih proteinov v vzorcu tkiva. Takšno podajanje koncentracije katalitične aktivnosti encima je neprimerno, saj koncentracije proteinov v izlužnini zaradi dodanega albumina (20) s postopkom po Lowryju ne moremo zanesljivo izmeriti (meritev zahteva preveliko redčitev vzorca). Alternativen pristop merjenja koncentracije proteinov z biuretnim postopkom se je prav tako izkazal za neprimerne zaradi premajhne občutljivosti postopka in previsoke meje detekcije (20). Pri izračunu aktivnosti encima je nujno upoštevati tudi zatehto tkiva, ki ga z nožev konico pridobimo iz viala, volumen izluževalne raztopine, v kateri homogeniziramo tkivo ter volumen izlužnine upravljen v reakcijski zmesi. Poleg tega smo želeli aktivnost LPL podati v standardiziranih enotah (katalih) in ne kot razmerje med različnimi tkivi. Standardna raztopina, priložena reagenčnemu kompletu, nam je omogočala pripravo umeritvene krivulje in natančno določitev v reakciji nastalega produkta, s tem pa določitev aktivnosti encima v standardiziranih enotah izraženih na zatehto tkiva.

Prav tako ni v izhodiščnem članku (16) nobenega opozorila, da je potrebno fluorimeter oz. merilno komoro pred pričetkom merjenja segreti na 37 °C. Opazili smo, da v primeru odsotnosti predhodnega segretja merilne komore na temperaturo reakcije, dobimo nezaželen potek encimske reakcije, ki onemogoča pravičen izračun porasta fluorescence v eni uri. Vzrok je najverjetneje v prepočasnem segrevanju reakcijske mešanice.

Z vpeljanim postopkom smo dokazali statistično značilno ($p < 0,001$) zvečano aktivnost LPL v tumorskem tkivu v primerjavi z navidezno zdravim pljučnim tkivom. Glede na to, da ima zvišana aktivnost LPL v tkivu pomembno fiziološko vlogo pri prerazporeditvi maščob in preskrbi teh tkiv z lipidi (1), lahko razmišljamo o pomembnem prispevku tega dejavnika pri preskrbi maščob tudi rakavega tkiva in posledično vpliva na rast tumorja.

5 Sklep

Zaključimo lahko, da je ob doslednem upoštevanju naših priporočil encimski fluorimetrični postopek LPL Activity Kit proizvajalca Roar Biomedical primeren za merjenje aktivnosti LPL v tkivu. V primerjavi z drugimi objavljenimi postopki je hiter in enostaven, kar je njegova velika prednost.

Ugotovitve meritev na bolnikih predstavljajo pomembno osnovo nadaljnjega proučevanja vloge LPL v rasti in razvoju pljučnega raka. Za potrditev dejanske vloge LPL ter njeno morebitno diagnostično in terapevtsko delovanje, pa bi bile potrebne obsežnejše raziskave.

6 Literatura

1. Preiss-Landl K, Zimmermann R, Hämmerle G, Zechner R. Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13: 471-481.
2. Vlassara H, Spiegel RJ, San Doval D, Cerami A. Reduced plasma lipoprotein lipase activity in patients with malignancy-associated weight loss. *Horm metabol Res* 1986; 18: 698-703.
3. Nomura K, Noguchi Y, Yoshikawa T, Kondo J. Plasma interleukin-6 is not a mediator of changes in lipoprotein lipase activity in cancer patients. *Hepatogastroenterology* 1997; 44: 1519 - 1526.
4. Lanza-Jacoby S, Lansey SC, Miller EE, Cleary MP. Sequential changes in the activities of lipoprotein lipase and lipogenic enzymes during tumor growth in rats. *Cancer Res* 1984; 44: 5062-5067.
5. Obeid OA, Wmery PW. Lipid metabolism in cachectic tumor-bearing rats at different stages of tumor growth. *Nutr Cancer* 1993; 19: 87-98.
6. Noguchi Y, Vydellingum NA, Younes RN, Fried SK, Brennan MF. Tumor-induced alterations in tissue lipoprotein lipase activity and mRNA levels. *Cancer Res* 1991; 51: 863-869.
7. Sakayama K, Masuno H, Miyazaki T, Okumura H, Shibata T, Okuda H. Existence of lipoprotein lipase in human sarcomas and carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 515-521.
8. Nomura K, Noguchi Y, Matsumoto A. Stimulation of decreased lipoprotein lipase activity in the tumor-bearing state by the anti-hyperlipemic drug bezafibrate. *Surg Today* 1996; 26: 89-94.
9. Nilsson-Ehle P, Schotz MC. A stable radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 1976; 17: 536-541.
10. Del Prado M, Hernandez-Montes H, Villapando S. Characterization of a Fluorometric Method for Lipoprotein Lipase. *Arc Med Res* 1994; 25: 331-335.
11. Eguchi Y. Analysis of lipoprotein lipase activity using high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 2002; 16: 500-503.
12. Ikeda Y, Takagi A, Ohkaru Y, Nogi K, Iwanaga T, Kurooka S, Yamamoto A. A sandwich-enzyme immunoassay for the quantification of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in human postheparin plasma using monoclonal antibodies to the corresponding enzymes. *J Lipid Res* 1990; 31: 1911-1924.
13. Baginsky ML, Brown WV. A new method for the measurement of lipoprotein lipase in postheparin plasma using sodium dodecyl sulfate for the inactivation of hepatic triglyceride lipase. *J Lipid Res* 1979; 20: 548-556.
14. Persson B, Smith U, Larsson B. A study of different methods for the assay of lipoprotein lipase activity in human adipose tissue. *Atherosclerosis* 1975; 22: 425-430.
15. Lithell H, Boberg J. A method of determining lipoprotein-lipase activity in human adipose tissue. *Scand J Clin Lab Invest* 1977; 37: 551-561.
16. Yamazaki H, Arai M, Matsumura S, Inoue K, Fushiki T. Intracranial administration of transforming growth factor – beta3 increases fat oxidation in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283: E536-E544.
17. Taskinen MR, Nikkila EA, Huttunen JK, and Hilden H. A micromethod for assay of lipoprotein lipase activity in needle biopsy samples of human adipose tissue and skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 1980; 104: 107-117.
18. Spooner PM, Garrison MM, Scow RO. Regulation of Mammary and Adipose Tissue Lipoprotein Lipase and Blood Triacylglycerol in Rats during Late Pregnancy. *J Clin Invest* 1977; 60: 702-708.
19. Karpe F, Olivercrona T, Walldius G, Hamsten A. Lipoprotein lipase in plasma after an oral fat load: relation to free fatty acids. *J Lipid Res* 1992; 33: 975-984.
20. Nagode K. Ocena analiznega postopka merjenja aktivnosti lipoproteinske lipaze v rakastem tkivu. Diplomsko naloga. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2005.