

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VERONIKA JANKOVEC

DIPLOMSKA NALOGA

RAZVOJ POSTOPKA MERJENJA AKTIVNOSTI SINTAZE  
VIŠJIH MAŠČOBNIH KISLIN V RAKAVEM TKIVU

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VERONIKA JANKOVEC

RAZVOJ POSTOPKA MERJENJA AKTIVNOSTI SINTAZE  
VIŠJIH MAŠČOBNIH KISLIN V RAKAVEM TKIVU

METHOD DEVELOPMENT FOR MEASURING FATTY  
ACID SYNTHASE ACTIVITY IN CANCER TISSUE

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo (Katedra za klinično biokemijo) pod mentorstvom izr. prof. dr. Darka Černeta in somentorstvom asist. dr. Irene Prodan Žitnik. Vse meritve sem opravila v laboratorijih Fakultete za farmacijo.

#### ZAHVALA

Rada bi se zahvalila svojemu mentorju izr. prof. dr. Darku Černetu in somentorici asist. dr. Ireni Prodan Žitnik za vse strokovne nasvete, potrpežljivost in velikodušno vsestransko pomoč pri izdelavi diplomskega dela. Prav tako se želim zahvaliti preostalim zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo za prijaznost in pomoč pri delu v laboratoriju.

#### IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Darka Černeta in somentorstvom asist. dr. Irene Prodan Žitnik.

Veronika Jankovec

Ljubljana, april 2010

# KAZALO

KAZALO.....	4
POVZETEK .....	7
ABSTRACT .....	8
SEZNAM OKRAJŠAV .....	9
1 UVOD.....	10
1.1 Pljučni rak.....	10
1.1.1 Epidemiologija pljučnega raka .....	10
1.1.2 Etiologija .....	10
1.1.3 Histološki tipi pljučnega raka .....	10
1.1.4 TNM klasifikacija.....	11
1.2 Pregled prehranjevalnih poti rakavega tkiva .....	12
1.2.1 Eksogeni mehanizmi preskrbe z višjimi maščobnimi kislinami .....	13
1.2.1.1 Lipoproteinska lipaza .....	13
1.2.1.2 Apolipoprotein E .....	14
1.2.1.3 LDL receptor .....	14
1.2.1.4 Receptorji čistilci.....	14
1.2.2 Endogeni mehanizmi preskrbe z višjimi maščobnimi kislinami .....	15
1.2.2.1 ATP:citrat-liaza .....	15
1.2.2.2 Acil-CoA-sintaza .....	15
1.2.2.3 Spot 14.....	15
1.2.2.4 Sintaza višjih maščobnih kislin .....	15
1.3 Sintaza višjih maščobnih kislin .....	16
1.3.1 FAS kot tarča protitumornih učinkovin.....	17
1.3.1.1 Inhibitorji FAS.....	17
1.3.1.2 Mehanizem delovanja inhibitorjev FAS.....	18
1.4 Metode merjenja aktivnosti FAS.....	19
2 NAMEN DELA .....	21
3 MATERIALI IN METODE .....	22
3.1 Zbiranje bolnikov .....	22
3.2 Reagenti in raztopine .....	22
3.2.1 Reagenti .....	22

3.2.2	Sestava in priprava raztopin .....	23
3.3	Materiali in aparature.....	26
3.4	Metoda merjenja aktivnosti FAS.....	27
3.4.1	Princip metode.....	27
3.4.2	Priprava ekstrakta .....	27
3.4.3	Merjenje fluorescence .....	27
3.4.3.1.	Priprava vzorca.....	27
3.4.3.2.	Priprava slepe vzorca.....	28
3.5	Merjenje koncentracije proteinov po Bradfordu .....	28
3.5.1	Princip metode.....	28
3.5.2	Priprava vzorca in merjenje absorbance.....	29
3.6	Priporočila in opozorila .....	29
3.7	Uporabljene statistične analize .....	30
4	REZULTATI IN RAZPRAVA .....	31
4.1	Razvoj metode merjenja aktivnosti FAS.....	31
4.1.1	Območje linearnosti.....	31
4.1.2	Encimska kinetika.....	32
4.1.3	Ekstrakcija encima: UZ vs. liza.....	33
4.1.4	Stabilnost reagentov in pripravljenih raztopin.....	35
4.1.5	CPM in fluorescenca .....	36
4.1.6	Ponovljivost meritev.....	36
4.1.7	Izbor valovnih dolžin emisije in ekscitacije .....	37
4.1.8	Različna pufru A za vzorec in slepo vzorca .....	38
4.1.9	Izračuni in standardizacija rezultatov .....	39
4.1.10	Pomen razvite metode merjenja aktivnosti FAS .....	39
4.2	Merjenje aktivnosti FAS pri bolnikih.....	40
4.2.1	Klinični podatki o bolnikih.....	40
4.2.2	Rezultati meritev aktivnosti FAS .....	41
4.2.2.1	Aktivnost FAS v tumorskem in kontrolnem tkivu .....	41
4.2.2.2	Korelacije .....	42
4.2.2.3	Histološki tipi .....	43
4.2.2.4	Preživetje .....	44
4.2.2.5	Prognostičen pomen .....	45

4.2.2.6	Aktivnost FAS in aktivnost lipoproteinske lipaze.....	47
5	SKLEP .....	48
6	LITERATURA.....	49

## POVZETEK

Raziskovali smo pomen in vlogo sintaze višjih mašobnih kislin (FAS) pri 42 bolnikih z nedrobnoceličnim pljučnim rakom. Zanimala nas je predvsem primerjava aktivnosti FAS v tumorskem pljučnem tkivu in v sosednjem zdravem tkivu istega bolnika in morebitne korelacije s kliničnimi podatki. Razvili smo postopek merjenja aktivnosti citosolnega encima v tkivu, sproščenega v ekstrakt s pomočjo celične lize. Z razvito metodo smo detektirali CoA, ki je nastal pri FAS katalizirani reakciji in je tvoril fluorescentni produkt z derivatom kumarina 7-dietilamino-3-(4'-maleimidil-fenil)-4-metilkuamarinom (CPM).

Razvili smo enostavno, hitro in varno metodo merjenja aktivnosti FAS *in vivo* brez predhodne priprave čistega sistema. Izognili smo se zamudni in zahtevni izolaciji encima, kar je močno poenostavilo pripravo vzorcev, skrajšalo čas dela in zmanjšalo stroške. Dodatna prednost je bila komercialna dostopnost reagentov. Pri delu nam za razliko od ostalih metod ni bilo potrebno uporabljati izotopov ali drugih radioaktivno označenih snovi, zaradi česar je metoda povsem varna. Ker do nedavnega ni bilo na voljo enostavnih metod merjenja aktivnosti, so se raziskovalci zatekali k merjenju proteina FAS ali izražanja gena zanj, kar pa ni bilo isto kot merjenje aktivnosti. Sedaj bo raziskovanje in preučevanje aktivnosti FAS v tumorju in njegove vloge pri tumorski rasti mnogo enostavnejše.

Z razvito metodo smo izmerili za 28 % večjo aktivnost FAS v tumorskem tkivu bolnikov kot v kontrolnem tkivu, vendar razlika ni bila statistično značilna ( $p = 0,402$ ). Bolniki z adenokarcinomom so imeli za 1,61-krat višjo aktivnost FAS kot tisti s skvamoznim tipom pljučnega raka ( $p = 0,0309$ ). Višja aktivnost FAS v rakavem tkivu je bila obratno sorazmerno povezana z nižjim indeksom telesne teže ( $p = 0,0146$ ) in nižjo koncentracijo trigliceridov v serumu ( $p = 0,0489$ ). Nasprotno je bila višja aktivnost FAS v kontrolnem tkivu povezana s pitjem alkohola ( $p = 0,0048$ ). V univariantni analizi so bili kazalci krajšega preživetja izguba telesne teže ( $p = 0,032$ ), višji stadij bolezni ( $p = 0,009$ ) in nižja aktivnost FAS v kontrolnem tkivu ( $p = 0,038$ ). Zanimivo povezavo smo našli med višjim razmerjem aktivnosti lipoproteinske lipaze (LPL) v rakavem glede na kontrolno tkivo in višjo aktivnostjo FAS v rakavem tkivu ( $p = 0,0035$ ).

FAS ima pomembno vlogo pri interni preskrbi z višjimi maščobnimi kislinami tako rakavih kot zdravih celicah. Za natančnejše razumevanje vloge FAS pri preskrbi rakavih celic s hranili bi bilo potrebno še nadaljnje proučevanje.

## ABSTRACT

We explored the activity of fatty acid synthase (FAS) in lung carcinomas and its association with clinico-pathological features and prognosis. FAS is an important enzyme in *de novo* synthesis of fatty acids for energy supply of normal cells. We developed a method for measuring FAS activity in lung tissues, where we detect CoA, a product of the FAS-catalyzed reaction, that reacts with a profluorescent coumarin 7-diethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin (CPM). CoA released in the FAS reaction forms a fluorescence adduct with CPM. We measured the FAS activity in cancer and healthy non-cancer control tissue from forty two patients with non-small cell lung carcinoma.

We developed a simple, fast and safe method for measuring FAS activity *in vivo* without isolating enzyme into a pure system. That made the procedure very simple, it reduced time and costs for preparing samples. Extra advantages were commercial available reagents and no radioactive substances to work with. Because of the absence of simple methods for measuring activity, the researches measured protein FAS or FAS expression, witch is not the same as FAS activity.

With new method we measured 28 % higher FAS activity in cancer than in control tissue, but there was no significant difference ( $p = 0,402$ ). FAS activity in the adenocarcinoma patients was significantly higher than that of squamous patients ( $p = 0,0309$ ). Higher FAS activity in cancer tissue was detected in patients who had lower body mass index ( $p = 0,0146$ ) and lower concentration of triglycerides in serum ( $p = 0,0489$ ). Higher FAS activity in control tissue was detected in patients who were drinking alcohol ( $p = 0,0048$ ). We found no significant difference between FAS and other clinical factors such as age, sex, smoking index, weight loss and stage of disease. Predictors of shorter survival in patients with re-sectable non-small cell lung cancer were weight loss ( $p = 0,032$ ), higher stage of disease ( $p = 0,009$ ) and lower FAS activity in control tissue ( $p = 0,038$ ). Interesting correlation was found between higher ratio of LPL activity in cancer vs. control tissue and higher FAS activity in cancer tissue ( $p = 0,0035$ ).

Our study shows that FAS activity has an important role in energy supply of normal and cancer cells. Better understanding of the role of FAS in supplying tumour with nutrients is necessary.



## **SEZNAM OKRAJŠAV**

ACC – acetil-CoA-karboksilaza  
AMP – adenzin monofosfat  
Apo E – apolipoprotein E  
ATP – adenzin trifosfat  
BMI – indeks telesne mase  
CoA – koencim A  
CPM – 7-dietilamino-3-(4'-maleimidil-fenil)-4-metilkumarin  
CTP-1 – karnitin palmitoiltransferaza-1  
DMSO – dimetil sulfoksid  
DNA – deoksiribonukleinska kislina  
DTT – ditionitritol  
EDTA – etilendiaminotetraocetna kislina  
FAS – sintaza višjih maščobnih kislin  
Hb – hemoglobin  
HEPES – N-2-hidroksietilpiperazin-N`-2-etansulfonska kislina  
LDL – lipoprotein nizke gostote  
LPL – lipoproteinska lipaza  
MM – molekulska masa  
NADPH – nikotinamid-adenin dinukleotid fosfat, reduciran  
NSCLC – nedrobnocelični pljučni rak  
pufer Avz – pufer A za vzorec  
pufer Asl – pufer A za slepo vzorca  
RFU – relativna fluorescenčna enota  
TNM – T-tumor, N-bezgavke, M-metastaze  
UČ – ultra čisto  
UZ – ultrazvok  
WHO – Svetovna zdravstvena organizacija

# 1 UVOD

## 1.1 Pljučni rak

### 1.1.1 Epidemiologija pljučnega raka

Pljučni rak je primaren ali sekundaren maligni tumor bronhijev ali pljučnega parenhima. Zaradi pljučnega raka letno umre na svetu več kot milijon ljudi. V Evropi diagnosticirajo preko 150.000 novih primerov bolezni na leto, v svetovnem merilu pa pljučni rak predstavlja 18 % vseh rakavih bolezni (1). Leta 2002 je bilo v Sloveniji odkritih 1046 ljudi obolelih za pljučnim rakom, relativno 5-letno preživetje je le okrog 10 % (2).

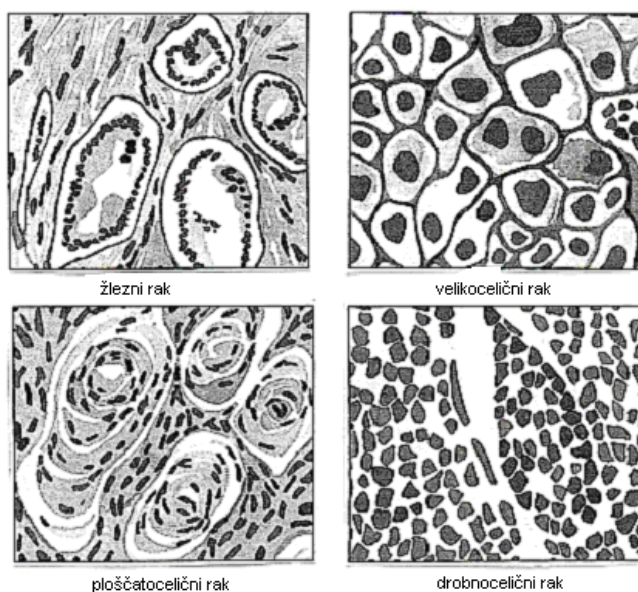
### 1.1.2 Etiologija

Kajenje je najpomembnejši sprožilni dejavnik za nastanek pljučnega raka. Približno 90 % moških bolnikov in 80 % bolnic s pljučnim rakom je kadilcev ali bivših kadilcev. Bolj ogroženi so ljudje, ki so kadili več let ali pa so začeli kaditi zgodaj v mladosti in pokadili večje število cigaret. Tudi pasivno kajenje je nevarno, saj podvoji tveganje za razvoj pljučnega raka. Sestavine tobačnega dima (radikali, kancerogeni kot benzpiren) stalno okvarjajo respiratorni epitel, povzročajo mutacije in tako sprožijo kancerogenezo (3). Na kancerogenezo vplivajo genski vzorec posameznika, izpostavljenost in metabolizem karcinogenov, aktivnost popravljanja DNA, ekspresija onkogenov in tumorskih supresorjev ter prehranski status. Genski polimorfizmi, ki kodirajo encime za detoksifikacijo, encime za popravljanje napak DNA ter tumor supresorske proteine so dejavniki tveganja za razvoj pljučnega raka zaradi izpostavljenosti karcinogenom v okolju. Ostali dejavniki okolja, ki tudi vplivajo na nastanek pljučnega raka, so azbest, radon, ionizirajoče sevanje, arzen, berilij, nikelj, živo srebro, krom... (3, 4, 5).

### 1.1.3 Histološki tipi pljučnega raka

Pljučni rak razdelimo na podlagi biopsije po histoloških tipih na drobnoceličnega in nedrobnoceličnega (3). Drobnocelični rak je najbolj agresiven in najhitreje rastoč pljučni rak. Močno je povezan s kajenjem. Hitro metastazira in se ga pogosto odkrije, ko je že močno razširjen (6). Nedrobnocelični rak je najpogostejši tip in zavzema okrog 80 % pljučnih rakov. Deli se na 3 histološke podtipе: adenokarcinom ali žlezni rak, karcinom

skvamoznih celic ali ploščatocelični rak ter velikocelični rak (slika 1, preglednica I) (3). Adenokarcinomi največkrat rastejo na zunanjem ali perifernem območju pljuč, karcinom skvamoznih celic pa začne pogosto rasti v bronhijih (7).



Slika 1: Histološki tipi pljučnega raka (8).

Preglednica I: Pojavnost, preživetje, operabilnost pljučnih rakov (8).

histološki tip pljučnega raka	drobnocelični rak	ploščatocelični rak	žlezni rak	velikocelični rak
ocena incidence	20–25 %	25–30 %	30–35 %	15–20 %
5-letno preživetje	1 %	25 %	12 %	13 %
operabilnost	redko	43–50 %	35 %	35–43 %
verjetnost metastaziranja	visoka	nizka do zmerna	zmerna	zmerna
odziv na sistemsko zdravljenje	zmeren	nizek	nizek	nizek

#### 1.1.4 TNM klasifikacija

Zamejitev raka določamo s TNM sistemom, kjer 'T' določa velikost tumorja, 'N' prizadetost bezgavk, 'M' pa prisotnost oddaljenih metastaz, kot lahko vidimo v preglednici II. Ta sistem določa prognozo bolezni, možne načine zdravljenja in deli bolnike v različne stadije bolezni. Ločimo klinično (slike, endoskopije), kirurško (makroskopski izgled

tumorja in bezgavk med operacijo) in patološko (histološki pregled) zamejitev bolezni. Stadiji so od okultnega raka do I, II, III A in B ter IV. Stadij II je operabilen, IV pa ne (3).

*Preglednica II: TNM sistem zamejitve pljučnega raka (9).*

TX	Primarnega tumorja z bronhoskopijo ali slikovnimi metodami ne moremo dokazati, rakave celice so prisotne v izpljunku ali bronhialnem izpirku.
T0	Ni primarnega tumorja.
Tis	Karcinom in situ.
T1	Tumor, manjši kot 3 cm, omejen na lobarni bronhij.
T2	Tumor, večji kot 3 cm, raste v glavnem bronhiju več kot 2 cm od glavne karine, vrašča v visceralno plevro, pridružena je atelektaza režnja ali pnevmonitis.
T3	Tumor vrašča v: prsno steno, prepono, perikard, plevro medpljučja. Nahaja se manj kot 2 cm od glavne karine, atelektaza celega pljučnega krila.
T4	Tumor vrašča v medpljučje, srce, velike žile, sapnik, požiralnik, karino, vretenca, sočasno nastane karcinoma plevre, perikarda ali satelitski nodus v istem režnju.
NX	Ocena lokalnih bezgavk ni možna.
N0	Ni zasevkov v lokalnih bezgavkah.
N1	Zasevki so v peribronhialnih in/ali hilusnih bezgavkah iste strani.
N2	Zasevki so v subkarinalnih in/ali medpljučničnih bezgavkah iste strani.
N3	Zasevki so v medpljučničnih, hilusnih bezgavkah nasprotne strani, nadključničnih bezgavkah iste/nasprotne strani.
MX	Oddaljenih zasevkov ne moremo opredeliti.
M0	Oddaljenih zasevkov ni.
M1	Oddaljeni zasevki so prisotni.

## 1.2 Pregled prehranjevalnih poti rakavega tkiva

Pri razvoju tumorskega tkiva je poleg neoangiogeneze pomembna tudi preskrba rakavega tkiva z molekulami, ki so lahko gradniki celičnih struktur, prekursorji v sintezi pomembnih spojin, obvezne sestavine encimskih in številnih drugih biokemičnih procesov ali pa so le pomemben energetski vir metabolno izjemno aktivnih tumorskih celic. Tumorske celice za preživetje nujno potrebujejo višje maščobne kisline, ki jih lahko

pridobijo na dva načina: ali jih pridobivajo eksogeno (torej iz krvi ali okoliškega netumorskega tkiva) ali endogeno (jih sintetizirajo same). Načini, s katerimi tumorske celice pridobivajo višje maščobne kisline, so v večini primerov enaki mehanizmom netumorskih celic: s sintezo v kateri so udeleženi različni encimi (sintaza višjih maščobnih kislin, lipoproteinska lipaza) ali s pomočjo membranskih receptorjev (LDL receptor, receptorji čistilci itd.). Različne pa so poti in mehanizmi, ki vodijo do izboljšane preskrbe z višjimi maščobnimi kislinami. Povečano izražanje genov, zvišane aktivnosti encimov in večje število membranskih receptorjev so nekateri izmed dejavnikov, ki ločujejo tumorske celice od netumorskih, in jih izkoriščamo v diagnostiki, prognozi in tudi terapiji rakavih obolenj (10).

Za tumorske celice je značilen aktivnejši metabolizem od netumorskih celic. Predvsem je povečana anaerobna glikoliza. Katabolizem glukoze vodi v nastanek piruvata, ki se skoraj ves metabolizira do laktata. Nekaj slednjega se pretvori v acetil-CoA, ki vstopa v *de novo* sintezo višjih maščobnih kislin.

Večina normalnih človeških tkiv prednostno koristi eksogene lipide, dobljene s hrano, za sintezo novih strukturnih lipidov. *De novo* sinteza endogenih lipidov je navadno zavrta, izražanje gena za sintazo višjih maščobnih kislin pa nizko. Nasprotno pa je v tumorskih celicah *de novo* sinteza zvečana, saj je preskrba z višjimi maščobnimi kislinami v precejšnji meri odvisna od nje. To je razlog za pomembno vlogo sintaze višjih maščobnih kislin in sorodnih lipogenih encimov v preživetju tumorskih celic (11).

## 1.2.1 Eksogeni mehanizmi preskrbe z višjimi maščobnimi kislinami

### 1.2.1.1 Lipoproteinska lipaza

Lipoproteinska lipaza (LPL) nastaja v adipocitih, srčnih in skeletnih mišičnih celicah, v diferenciranih makrofagih, možganih, placenti, pljučih in  $\beta$ -celicah pankreasa ter je s proteoglikani pripeta na površino endotelijskih celic kapilar. Kot homodimer hidrolizira trigliceride do prostih maščobnih kislin in glicerola, ki prehajajo v celice. Njeno aktivnost v maščobnem tkivu povečuje inzulin, ki se sprošča po obroku, medtem ko je aktivnost zavrta v času stradanja. Prav obratno regulacijo ima lipoproteinska lipaza, ki se nahaja v srcu in skeletnih mišicah. LPL ima dve funkciji: trigliceridne hidrolaze in ligandnega faktorja za receptorsko posredovano endocitozo lipoproteinov.

Aktivnost LPL je pri nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu zvišana, medtem ko je v okoliškem nerakavem tkivu zmanjšana. Tumor torej uravnava aktivnost LPL v obtumorskem tkivu – jo zmanjša, in tako omogoči mobilizacijo lipidov, prostih maščobnih kislin v samem tumorskem tkivu, ki na tak način preživi in raste (12).

#### 1.2.1.2 Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (apo E) je bistvenega pomena za normalno presnovo lipoproteinov bogatih s trigliceridi. Je protein, sestavljen iz 299 aminokislin, ki prenaša lipoproteine, maščobotopne vitamine in holesterol v kri in limfni sistem. Sintetiziran apo E se sprošča v krvni obtok, kjer obogati lipoproteine (LDL, VLDL, IDL), ki se nato lažje vežejo na različne receptorje (LDL receptor, VLDL receptor) v jetrih in perifernih celicah. Povečano ekspresijo gena za apo E najdemo pri raku na pljučih, jajčnikih, prostati, debelem črevesu, dojki in pankreasu.

#### 1.2.1.3 LDL receptor

LDL receptor je membranski glikoprotein, ki nase veže LDL ter sproži njegovo endocitozo. Ekspresija LDL receptorja je v normalnih tkivih regulirana preko negativne povratne zanke z LDL. Pri tumorskih celicah (rak na prostati, kolorektalni rak) pa je ta zanka okvarjena. Okvarjena regulacija omogoča tumorskim celicam privzem velikih količin lipoproteinov in s tem višjih maščobnih kislin, kar omogoči preskrbo celic z dodatnim virom energije ter s strukturnimi molekulami za pospeševanje nekontrolirane rasti tumorjev.

#### 1.2.1.4 Receptorji čistilci

Reaktivne kisikove spojine povzročajo *in vivo* oksidacijo lipidov, proteinov in DNA. Radikali in lipidni peroksidi, ki pri tem nastanejo, pomembno sodelujejo v kancerogenezi. Nastali oksidirani LDL se z veliko afiniteto vežejo na tako imenovane receptorje čistilce (SR-A1). Rakava tkiva imajo zvečano izražanje genov za omenjene receptorje, kar lahko zveča endocitozo oksidiranih LDL, s tem pa pomembno izboljša preskrbo tkiva z lipidi.

## 1.2.2 Endogeni mehanizmi preskrbe z višjimi maščobnimi kislinami

### 1.2.2.1 ATP:citrat-liaza

ATP:citrat-liaza je glikolitični encim, ki katalizira pretvorbo citrata v acetil-CoA. Inhibicija tega encima vodi v prizadetost od glukoze odvisne lipogeneze. Posledica je zavrta rast in propad rakavih celic. Mehanizem delovanja še ni povsem jasen.

### 1.2.2.2 Acil-CoA-sintaza

Encim katalizira pretvorbo dolgoveržnih maščobnih kislin v acil-CoA. Reakcija je ključna v številnih lipidnih presnovnih poteh, kot so biosinteza fosfolipidov in triacilglicerola, beta oksidacije in lipidne modifikacije celičnih proteinov. Inhibicija tega encima povzroči apoptozo tumorske celice (11).

### 1.2.2.3 Spot 14

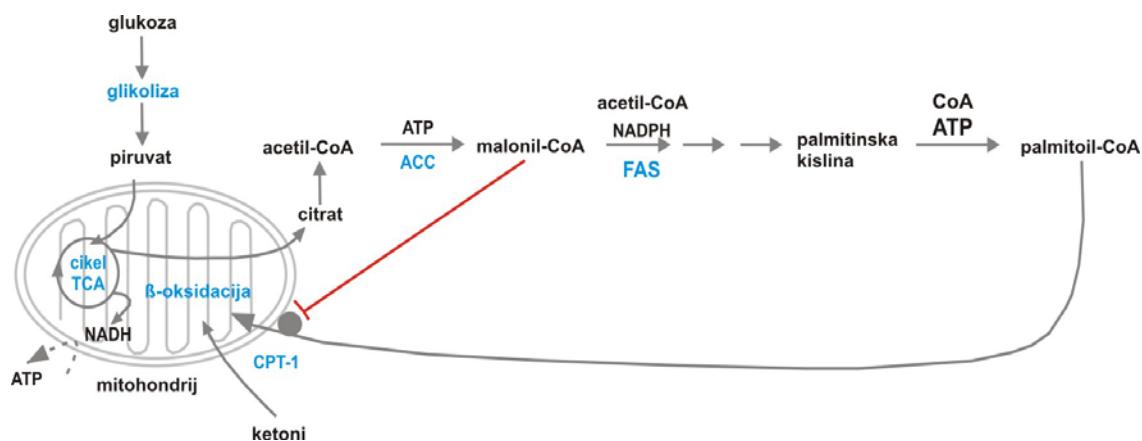
Je jedrni protein, ki se nahaja v tkivih, kjer se sintetizirajo višje maščobne kisline (adipozno tkivo, jetra, mlečne žleze med laktacijo). V mlečnih žlezah je odgovoren za proliferacijo epitelija in produkcijo mleka. Ekspresija gena za spot 14 je močno povečana pri večini oblik raka na dojki. Spot 14 sodeluje pri indukciji lipogeneze s progestinom v rakavih celicah in pospešuje njihovo rast. V rakavih celicah dojke ni ekspresije LPL, kar pomeni, da te celice ne morejo do višjih maščobnih kislin po eksogeni poti, ampak so odvisne le od endogenih poti.

### 1.2.2.4 Sintaza višjih maščobnih kislin

Visoko proliferativne rakave celice morajo konstantno sintetizirati višje maščobne kisline po *de novo* poti, da si s tem zagotovijo dovolj lipidov za produkcijo membran. Nekaj sintetiziranih maščobnih kislin se porabi tudi za tvorbo energije preko beta oksidacije. V *de novo* sintezi maščobnih kislin sodelujeta dva ključna encima: acetil-CoA-karboksilaza (ACC) in sintaza višjih maščobnih kislin (FAS). ACC karboksilira acetil-CoA v malonil-CoA. Ta se nadalje s FAS, ob ponavljajočem dodajanju vedno novih acetilnih skupin, pretvori v višje maščobne kisline.

### 1.3 Sintaza višjih maščobnih kislin

FAS je citosolni encim, ki je sposoben *de novo* sinteze višjih maščobnih kislin. Katalizira NADPH odvisno kondenzacijo acetil-CoA in malonil-CoA, pri čemer nastane palmitinska kislina (slika 2). Gre za ključni encim v sintezni poti višjih maščobnih kislin, kljub temu pa je ACC tista, ki narekuje hitrost sinteze maščobnih kislin.



Slika 2: Sinteza višjih maščobnih kislin.

Zvečano aktivnost FAS najdemo v tumorskih celicah, kjer poteka sinteza palmitinske kisline (tako kot tudi v jetrih in ostalih lipogenih tkivih).

V normalnih tkivih se sinteza višjih maščobnih kislin začne, ko je energija v obliki ogljikovih hidratov v presežku, zato se ta skladišči v obliki trigliceridov. Pri sintezi višjih maščobnih kislin je pomembno, da visok nivo malonil-CoA inhibira karnitin-palmitoiltransferazo-1 (CTP-1), ki omejuje nivo  $\beta$ -oksidacije višjih maščobnih kislin v mitohondrijih. Posledica je zvečano skladiščenje trigliceridov. Med stradanjem je ekspresija in aktivnost FAS navzdol regulirana, nivo malonil-CoA se zniža, kar vodi v oksidacijo višjih maščobnih kislin in omogoči preživetje organizma (10).

V nasprotju z lipogenimi tkivi pa tumorske celice ne skladiščijo trigliceridov v veliki meri. Višje maščobne kisline, ki so endogeno sintetizirane v tumorskih celicah, se esterificirajo v fosfolipide (npr. fosfatidilholin) in ne v trigliceride. Sinteza višjih maščobnih kislin je transkripcijsko regulirana s hormoni ali preko onkogenov (kinazne signalne poti) in ne z vnosom hranil kot pri normalnih lipogenih tkivih. Poleg teh razlik pa se razlikujejo tudi posledice inhibicije FAS v normalnih in rakavih celicah. Inhibicija v



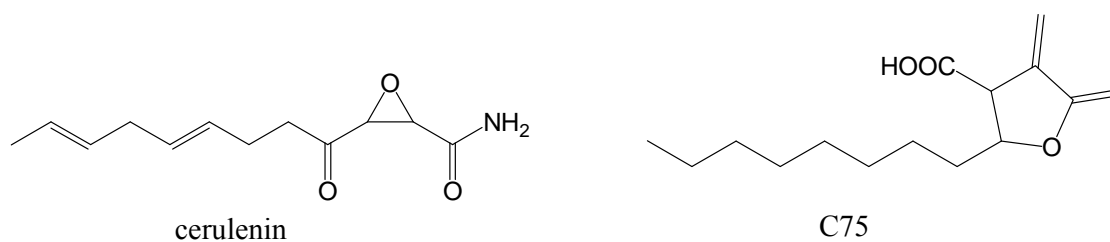
človeških rakavih celicah inducira apoptotično smrt teh celic, kar nakazuje na povezavo med preživetjem rakavih celic in aktivnostjo FAS.

### 1.3.1 FAS kot tarča protitumornih učinkovin

#### 1.3.1.1 Inhibitorji FAS

Rakave celice zahtevajo večje količine višjih maščobnih kislin, kot jih lahko dobijo iz krvnega obtoka, zato predstavlja encim FAS njihovo metabolično prednost pred drugimi nerakavimi celicami. Zvišana ekspresija gena za FAS in povezanost encima z agresivnostjo raka je zato vodila v raziskave tarčnega zdravljenja v terapiji tumorjev.

Cerulenin je naravni antibiotik, ki inhibira FAS in deluje citotoksično na mnogo človeških tumorskih celičnih linij *in vitro* (slika 3). Ker je zaradi prisotne epoksidne skupine v strukturi kemično reaktiven in je zato njegova uporabnost *in vivo* majhna, je bil razvit sintezni, kemično stabilnejši inhibitor sesalske FAS – C75 (slika 3) (10, 13).



Slika 3: Kemijski strukturi naravnega cerulenina in sinteznega C75 (13).

C75 je sintezni inhibitor FAS prve generacije (mimetik malonil-CoA) in ima signifikanten protitumorski učinek na ksentograftih rakov na dojki, prostati in jajčnikih. C75 inducira celično smrt z inhibicijo sinteze maščobnih kislin in povišanjem nivoja malonil-CoA. Poleg tega pa C75 hkrati zviša oksidacijo višjih maščobnih kislin, ker direktno stimulira aktivnost CPT-1. Delovanje na CPT-1 ima za posledico zmanjšano produkcijo hipotalamičnega neuropeptida Y, kar vodi v nastanek glavnega stranskega učinka te molekule – znižanje telesne mase.

Visoko učinkovitost in specifičnost pri celicah nedrobnoceličnega raka na pljučih kaže inhibitor FAS druge generacije, C93, ki ima višjo specifičnost za FAS, vendar brez

signifikantnega učinka na oksidacijo višjih maščobnih kislin. Pri odmerkih, ki imajo protitumorski učinek, C93 ne povzroča anoreksije oz. izgube telesne mase.

#### 1.3.1.2 Mehanizem delovanja inhibitorjev FAS

Natančen vzrok zakaj inhibicija FAS sproži apoptozo tumorske celice še ni poznan. Možnih mehanizmov je več. Prvotna ideja je temeljila na izčrpanosti rakavih celic z višjimi maščobnimi kislinami. Vendar se je izkazalo, da inhibitorji ACC, ki prav tako zaustavijo sintezo maščobnih kislin, ne povzročijo celične smrti, ampak celo zaščitijo tumorske celice pred inhibitorji FAS. Glavna razlika med omenjenimi inhibitorji encima FAS in ACC je v učinku na nivo malonil-CoA. Prvi nivo zvišajo, drugi ga znižajo. ACC inhibitorji torej z znižanjem nivoja malonil-CoA rešijo rakave celice pred apoptozo povzročeno z inhibitorji FAS. Tako naj bi kopičenje substrata malonil-CoA sprožilo smrt tumorske celice in ne znižanje koncentracije končnih maščobnih kislin (10, 13).

Naslednji možen mehanizem poteka preko aktivacije AMP protein kinaze. Normalno se ta encim aktivira, ko primanjkuje celične energije. Pri tem zavre biosintezne encime, ki porabljajo ATP, in aktivira katabolne procese z namenom znižanja razmerja AMP/ATP. Rakave celice kljub inhibiciji FAS, ki povzroči zmanjšano sintezo višjih maščobnih kislin, in povečani oksidaciji glukoze ne morejo uravnati razmerja AMP/ATP in s tem ohraniti pozitivno redoks ravnotežje. Dodatno naj bi zaviralci AMP protein kinaze zmanjšali citotoksičnost zaviralcev FAS, kar nakazuje na pomembno vlogo aktivacije tega encima v procesu apoptoze.

Ker je FAS pomemben encim pri sintezi fosfolipidov v endoplazmatskem retikulumu, bi lahko zaviralci FAS sprožili stres v omenjenem celičnem organelu, kar bi vodilo v propad rakave celice (11).

Naslednja možna razlaga citotoksičnosti je povezana s serin-treonin kinazo Akt, ki jo s fosforilacijo aktivira fosfoinozitol-3 kinaza. Povečana aktivnost Akt se v rakavi celici po terapiji s FAS zaviralci zmanjša, sledi ji apoptoza.

Obstajajo še nekatere druge razlage, vendar je bolj verjetno, da je razlog za citotoksičnost inhibitorjev FAS kombinacija vseh teh mehanizmov.

Prepoznavni znak rakavih celic je postala povečana *de novo* sinteza, kjer imajo lipogeni encimi pomembno vlogo pri preživetju teh celic. Z nadaljnjimi raziskavami na

tem področju bi prispevali k boljšemu razumevanju nedrobnoceličnega pljučnega raka in kancerogeneze na sploh, ponudile bi se tudi nove strategije za tumorsko terapijo.

## 1.4 Metode merjenja aktivnosti FAS

Poznane so štiri metode, ki se uporabljajo za merjenje aktivnosti FAS, in jih lahko razdelimo v dve skupini glede na to, ali merimo produkcijo ali porabo FAS reakcijskih intermediatov ter ali merimo končni produkt reakcije FAS, to so višje maščobne kisline.

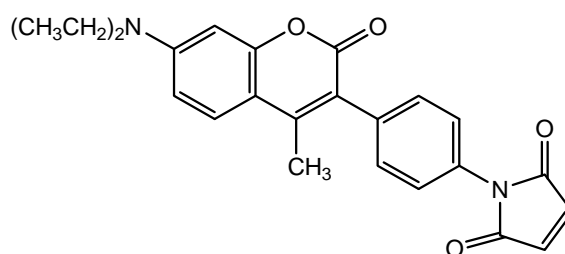
Uporaba bicikličnih dionov kot substratov za merjenje aktivnosti FAS je bila predlagana pred 25 leti. Ta fotometrična, homogena metoda temelji na NADPH sklopljeni redukciji sinteznega substrata, bicikličnega diona, z  $\beta$ -ketoacil-ACP reduktazno aktivnostjo FAS. Gre za indirektno merjenje aktivnosti FAS preko upada koncentracije NADPH, ki se porablja v reakciji, ali preko porasta  $\text{NADP}^+$ , ki nastaja tekom redukcije. Reakcija se spremlja spektrofotometrično pri 340 nm ali fluorometrično pri 460 nm. Največ se metoda uporablja za kinetične analize, ker ni potrebna predhodna separacija komponent za detekcijo, in omogoča spremljanje reakcije. Možna je tudi avtomatizacija metode z uporabo mikrotiterskih ploščic in kvantitativno določevanje NADPH. Metoda ima nizko specifičnost in je zato manj primerna za določevanje učinka inhibitorjev encima, saj so pogoste interference drugih spojin, ki fluorescirajo in absorbirajo pri isti valovni dolžini.

Visoko občutljiva metoda za detekcijo aktivnosti FAS je klasična radiometrija, kjer nastopata kot substrata acetyl-CoA in malonil-CoA. Ta metoda omogoča direktno merjenje sinteze brez interferenc zaradi fluorescence. Vendar postopek zahteva časovno potratno izsesavanje, izpiranje in organsko ekstrakcijo z izotopom označene palmitinske kisline, kar onemogoča njegovo hitro izvedbo in širšo uporabo.

Naslednja je neseparacijska, visoko občutljiva metoda, ki izkorišča tehniko scintilacijske proksimacije. Na scintilacijski mikrotiterski ploščici prevlečeni s fosfolipidi poteče reakcija med radioaktivno označenim acetyl-CoA in malonil-CoA s FAS, pri čemer kofaktor NADPH preide v  $\text{NADP}^+$ . Nastali produkt, radioaktivna palmitinska kislina, se veže na hidrofobno površino mikrotiterske ploščice. Rezultat je emisija fotonov. Princip metode temelji na razlikovanju radioaktivnega substrata od radioaktivnega produkta. Ker je acetilna skupina acetyl-CoA manj lipofilna kot dolga nepolarna veriga radioaktivne

palmitinske kisline, se slednja selektivno veže na fosfolipide mikrotiterske ploščice (14, 16).

Najnovejše metode za merjenje aktivnosti encima, temeljijo na merjenju fluorescence s kumarinskimi derivati. FAS v reakciji kondenzacije malonil-CoA in acetil-CoA tvori produkt palmitinsko kislino, pri tem pa se sprosti CoA. CoA ima v svoji strukturi prosto tiolno skupino, s katero reagira kumarin CPM (7-dietilamino-3-(4'-maleimidil-fenil)-4-metilkumarin) (slika 4).



*Slika 4: Struktura CPM (15).*

Poveča se fluorescenčna emisija svetlobe CPM pri 530 nm, ko je ekscitiran s svetlobo valovne dolžine 405 nm. Ker CPM pred reakcijo s sulfhidrilnimi skupinami ni fluorescenten, omogoča direktno merjenje aktivnosti FAS preko merjenja intenzitete fluorescence in sicer brez predhodne separacije sistema. CPM ima dvojno vlogo. Z vezavo na aktivno sulfhidrilno mesto encima ustavi reakcijo, ki jo ta katalizira, prav tako pa služi za detekcijo količine nastalega CoA. Slabost te metode je nespecifičnost CPM za CoA, saj lahko CPM reagira tudi z drugimi spojinami, ki vsebujejo v svoji strukturi tiolno skupino. Lažno pozitivnemu rezultatu se izognemo tako, da vrednosti fluorescence, ki jo dobimo pri merjenju vzorca, odštejemo fluorescenco izmerjeni v slepi vzorca. Rezultat se poda v obliki relativnih fluorescenčnih enot (RFU) (15, 16).

## 2 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela bo ugotoviti potencialni pomen FAS pri preskrbi tumorja z maščobnimi kislinami. Rakave celice imajo namreč povečano *de novo* sintezo višjih maščobnih kislin, saj je preskrba z njimi v precejšnji meri odvisna od nje. To je razlog za pomembno vlogo FAS pri tumorski rasti in preživetju.

Razviti želimo postopek merjenja aktivnosti FAS, izmeriti aktivnost v posameznih pljučnih tkivih in ugotoviti, ali ima tumorsko tkivo večjo aktivnost FAS kot sorodno, navidez zdravo pljučno tkivo istega bolnika. Želimo tudi ugotoviti, ali je aktivnost FAS morda povezana s kliničnimi podatki bolnikov: stadij bolezni, število let kajenja, starost, spol, teža bolnikov, histološki tip tumorja, 4-letno preživetje in korelacija z lipoproteinsko lipazo. Glede na že izvedene raziskave in dobljene podatke predvidevamo:

1. da je aktivnost sintaze višjih maščobnih kislin možno izmeriti;
2. da je v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu aktivnost FAS višja kot v sosednjem navidezno zdravem pljučnem tkivu istega bolnika;
3. da je višja aktivnost povezana vsaj s katerim od opazovanih kliničnih podatkov.

Da bi hipoteze dokazali, bomo vsakemu od 42 bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom v stadiju I, II in III odvzeli vzorec tumorskega tkiva na periferiji tumorja, kjer je rast največja, ter vzorec netumorskega tkiva na periferiji pljuč, proč od tumorja. Po pregledu literaturnih virov glede metod merjenja aktivnosti FAS, bomo izbrali najprimernejšo metodo in jo evalvirali. Izmerili bomo aktivnost FAS v zdravem in tumorskem tkivu, koncentracijo proteinov po Bradfordu ter rezultate statistično ovrednotili.

Pričakujemo, da bomo hipoteze dokazali, saj ima FAS pomembno vlogo pri preskrbi tumorja z višjimi maščobnimi kislinami, ki so nujno potrebne za njegovo rast in razvoj. Verjamemo v povezavo med aktivnostjo FAS in kliničnimi podatki bolnikov, saj naj bi višja aktivnost FAS pomenila boljšo preskrbo tumorja s hranilnimi snovmi, obenem pa naj bi vodila v napredovanje bolezni, agresivnejši histološki tip raka ter nižje 4-letno preživetje.

Potrjene hipoteze bi pomenile, da je aktivnost FAS možno izmeriti in če je ta res višja od aktivnosti FAS v kontrolnem tkivu, je smiselno iskanje inhibitorjev. Z inhibicijo encima bi onemogočili rakavim celicam interno preskrbo z višjimi maščobnimi kislinami. S tem bi zavrli hitro rast tumorja in povzročili propad rakavih celic.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 Zbiranje bolnikov

V študiji je sodelovalo 42 bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom v stadiju I, II in III. Vključitveni kriterij je bil pljučni tumor brez metastaz. Vsakemu bolniku so odvzeli dva vzorca tkiva, in sicer vzorec pljučnega rakavega tkiva in vzorec sosednjega, navidez zdravega tkiva. Odvzeli so jih najkasneje v 15 minutah po resekciji pljuč. Tumorsko tkivo so odvzeli vsakemu bolniku iz periferije tumorja, torej v območju največje rasti. Zdravo, organoleptično neprizadeto kontrolno tkivo je bilo odvzeto na periferiji pljuč, najmanj 10 centimetrov proč od tumorja. Vzorce tkiv so do analize shranili najprej v tekočem dušiku, nato pa v zamrzovalniku na  $-80^{\circ}\text{C}$ . Stadiji so bili določeni po TNM klasifikaciji (17). Histološke analize tumorskih tkivnih vzorcev so izvedli z dovoljenjem WHO histološke klasifikacije (18). Študijo je odobrila nacionalna etična komisija, dovoljenje so dobili tudi od vseh študijskih udeležencev.

Bolnike so opazovali 4 leta. Prvi 2 leti so jih pregledovali vsake 3 mesece, ostali dve leti pa vsakih 6 mesecev. Klinični status in rezultati rentgenskega slikanja so bili podani v času preiskave. V primeru suma na napredovanje bolezni so opravili bronhoskopijo in računalniško tomografijo. Bolniki v stadiju III so bili postoperativno zdravljeni tudi s kemoterapijo.

Vsem 42 bolnikom smo izmerili aktivnost FAS in koncentracijo proteinov po Bradfordovi metodi v ekstraktih pripravljenih iz kontrolnih in tumorskih pljučnih tkiv (skupaj 84 vzorcev).

### 3.2 Reagenti in raztopine

#### 3.2.1 Reagenti

Pri našem delu smo uporabljali naslednje reagente: natrijev askorbat, EDTA, NADPH, acetyl-CoA, malonil-CoA, CoA, DMSO, saharoza, DTT, reagent za merjenje koncentracije proteinov (Brilliant Blue Protein Reagent), proteinski standard 0,3 mg/mL (od proizvajalca Sigma), HEPES (proizvajalec Promega), natrijev hidroksid (proizvajalec

Baker J.T), CPM (proizvajalec Invitrogen), Complete tableta s proteaznimi inhibitorji (proizvajalec Roche) in ultra čisto (UČ) vodo s prevodnostjo 0,055  $\mu\text{S}/\text{cm}$  in upornostjo 18,2  $\text{M}\Omega\text{cm}$ ;

### 3.2.2 Sestava in priprava raztopin

Raztopine smo pripravili tako, da smo natehtali spodaj navedene količine spojin, jih raztopili v ustrezni količini UČ vode ali DMSO, premešali na mešalniku ter s pipetiranjem razdelili potrebne volumne v Eppendorf epruvete (preglednica III). Te smo shranili v hladilniku na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ :

1. 20  $\mu\text{L}$  raztopine natrijevega askorbata: 49,5 mg natrijevega askorbata, 1 mL UČ vode;
2. 250  $\mu\text{L}$  raztopine EDTA: 44 mg EDTA, 11 mL UČ vode;
3. 240  $\mu\text{L}$  raztopine NADPH: 25 mg NADPH, 3 mL UČ vode;
4. 240  $\mu\text{L}$  raztopine acetil-CoA: 10 mg acetil-CoA, 4940  $\mu\text{L}$  UČ vode;
5. 108  $\mu\text{L}$  raztopine malonil-CoA: 10 mg malonil-CoA, 1180  $\mu\text{L}$  UČ vode;
6. 20  $\mu\text{L}$  raztopine CoA: 10 mg CoA, 1,3 mL UČ vode;
7. 5  $\mu\text{L}$  raztopine CPM: 25 mg CPM, 3 mL DMSO;
8. 1100  $\mu\text{L}$  raztopine saharoze: 7,5 g saharoze, 15 mL UČ vode;
9. 250  $\mu\text{L}$  raztopine DTT: 30,8 mg DTT, 10 mL UČ vode;
10. 200  $\mu\text{L}$  raztopine Complete: 1 tableta Complete, 2 mL UČ vode.

*Preglednica III: Pripravljeni raztopljeni reagenti v mikroeprevetah.*

reagenti	V ( $\mu\text{L}$ )	konc. v mikroepreveti (M)	MM (g/mol)
Ac-CoA	240	0,0025	809,57
Ma-CoA	108	0,00993	853,582
NADPH	240	0,011195	744,413
askorbat	20	0,281	176,12
EDTA	250	0,0137	292,24

Pripravili smo dva različna HEPES pufra:

1. HEPES pufer; 50 mM, pH = 7,4: 3 g HEPES, 250 mL UČ vode, NaOH;
2. HEPES pufer; 10 mM, pH = 7,4: 0,6 g HEPES, 250 mL UČ vode, NaOH.

Natehtali smo ustrezne količine HEPES, dodali 200 mL UČ vode in spremljali pH s pH-metrom. Izmerjeni pH smo uravnali na 7,4 z raztopino NaOH, ki smo jo v ustrezni količini dodali pufru. Na koncu smo dopolnili z UČ vodo do volumna 250 mL. Pufer smo shranili v hladilniku na 5 °C.

Pufer za ekstrakcijo in dva različna pufra A (za vzorec in slepo vzorca) smo pripravili vsakič tik pred meritvijo, in sicer smo odpipetirali potrebne količine raztopin, dodali ustrezen HEPES pufer ter premešali (preglednica IV):

1. pufer za ekstrakcijo: 1100 µL raztopine saharoze, 250 µL raztopine DTT, 200 µL raztopine Complete, 3450 µL pufra HEPES (10 mM, pH = 7,4);
2. pufer A za vzorec (oznaka Avz): 20 µL raztopine Na askorbata, 250 µL raztopine EDTA, 240 µL raztopine NADPH, 240 µL raztopine acetil-CoA, 108 µL raztopine malonil-CoA, 4600 µL HEPES pufra (50 mM, pH = 7,4);
3. pufer A za slepo vzorca (oznaka Asl): 20 µL raztopine Na askorbata, 250 µL raztopine EDTA, 240 µL raztopine NADPH, 108 µL raztopine malonil-CoA, 4600 µL HEPES pufra (50 mM, pH = 7,4).

*Preglednica IV: Priprava in sestava pufra A za vzorec in za slepo vzorca.*

pufer A za VZOREC		
reagenti	V(µL)	konc v pufru A (µM)
HEPES 50mM	4600	
EDTA	250	627,5
askorbat	20	1029,7
Ac-CoA	240	109,9
NADPH	240	492,3
Ma-CoA	108	196,5
	5458	
100 µL pufra odpipetiramo na mikrotitersko ploščico:		n (µmol)
	Ac-CoA	0,0110
	NADPH	0,0492
	Ma-CoA	0,0196



pufer A za SLEPO VZORCA		
reagenti	V( $\mu$ L)	konc v pufru A ( $\mu$ M)
HEPES 50mM	4600	
EDTA	250	656,4
askorbat	20	1077
NADPH	240	514,9
Ma-CoA	108	205,5
	5218	
95,6 $\mu$ L pufru odpipetiramo na mikrotitersko ploščico:		n ( $\mu$ mol)
	NADPH	0,0492
	Ma-CoA	0,0196
+		
4,4 $\mu$ L Ac-CoA c = 0,0025M		

Za merjenje koncentracije proteinov v vzorcih po Bradfordu smo pripravili:

1. razredčen reagent za merjenje koncentracije proteinov smo pripravili s petkratnim redčenjem reagenta za merjenje koncentracije proteinov (Brilliant Blue Protein reagenta) z UČ vodo;
2. razredčen supernatant vzorca: 2  $\mu$ L supernatana smo dodali 98  $\mu$ L pufru za ekstrakcijo;
3. standardne raztopine proteinov (preglednica V): 0,0 mg/mL (reagenčna slepa), 0,025 mg/mL, 0,050 mg/mL, 0,075 mg/mL, 0,150 mg/mL, 0,300 mg/mL.

*Preglednica V: Priprava standardnih raztopin proteinov.*

oznaka protein. standarda	koncentracija proteinov (mg/mL)	volumen standarda ( $\mu$ L)	volumen pufru za ekstrakcijo ( $\mu$ L)
st1	0,0	0	24
st2	0,025	2	22
st3	0,050	4	20
st4	0,075	6	18
st5	0,150	12	12
st6	0,300	24	0

### 3.3 Materiali in aparature

Pri delu smo uporabljali naslednje materiale in aparature:

1. Eppendorf mikropruvete, pipete in pipetne nastavke, bele mikrotiterske ploščice (LUMITRAC 200 Greiner) ter prozorne mikrotiterske ploščice (TPP 92096);

2. Avtoklav

Za pripravo UČ vode smo uporabili vodo s prevodnostjo  $0,055 \mu\text{S}/\text{cm}$  in upornostjo  $18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}$ , pripravljeno s PURELAB Classic PL5243, ki smo jo sterilizirali z nasičeno vodno paro pri  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  20 minut. Ustrezno delovanje avtoklava smo preverjali s termičnimi trakovi, ki so se obarvali, če so bili zahtevani pogoji doseženi;

3. Homogenizator z ultrazvokom

Uporabili smo homogenizator 4710 Series Ultrasonic Homogenizer z amplitudo 40 %, 3-sekundni pulz, prekinitev 3 sekunde na ledu;

4. Eppendorf mikrocentrifugirka

Centrifugirali smo z mikrocentrifugirko centrifuge 5840R 2 minuti pri relativni centrifugalni sili  $4400 \times g$  in sobni temperaturi ali 15 minut pri relativni centrifugalni sili  $8000 \times g$  in  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ;

5. Tecan

Fluorescenco smo merili s fluorimetrom Genois, Tecan, Avstrija. Nastavitve programa SAFIRE II za merjenje fluorescence: valovna dolžina ekscitacije  $405 \text{ nm}$ , valovna dolžina emisije  $530 \text{ nm}$  ali  $500 \text{ nm}$ , ekscitacijska širina  $20.0 \text{ nm}$ , emisijska širina  $20.0 \text{ nm}$ , število meritev 10, čas stresanja 5 sekund, enote AFU (absolute fluorescence units), jakost ekscitirane svetlobe 33.

Z napravo Tecan smo merili tudi absorbanco proteinov. Nastavitve programa SAFIRE II za merjenje absorbance: merjena valovna dolžina  $595 \text{ nm}$ , število meritev 30, enote OD, temperatura merjenja  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ;

6. Hladilniki

Vse pripravljene vzorce, reagente in raztopine smo shranjevali celoten čas uporabe v hladilnikih pri  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  ali pri  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 3.4 Metoda merjenja aktivnosti FAS

### 3.4.1 Princip metode

Po pregledu literaturnih virov smo se odločili za fluorescenčno metodo merjenja aktivnosti FAS. V osnovi smo uporabili postopek Chungove in sod. (15), ki temelji na detekciji CoA, produkta FAS katalizirane kondenzacije med malonil-CoA in acetyl-CoA. CoA, sproščen v reakciji, tvori s prefluorescentnim kumarinom CPM fluorescentni produkt, ki emitira svetlobo pri 530 nm, ko je ekscitiran pri 405 nm. Produkt nastane zaradi vezave CPM na prosto tiolno skupino CoA.

### 3.4.2 Priprava ekstrakta

Od zamrznjenega vzorca, predhodno shranjenega na  $-80^{\circ}\text{C}$ , smo z dletom odlomili približno 20–50 mg tkiva in ga prenesli v terilnico s tekočim dušikom. S pestilom smo strli zamrznjeno tkivo in ga zdrobili v prah. Zdrobljeno tkivo smo postrgali iz terilnice s spatulo, ga prenesli v predhodno starirano 1,5 mL mikroepruveto in stehali. Za vsak miligram tkiva smo dodali 10  $\mu\text{L}$  hipotoničnega pufru za ekstrakcijo. Mikroepruveto z vzorcem smo nato centrifugirali v Eppendorf mikrocentrifugirki 3 minute pri sobni temperaturi in relativni centrifugalni sili 4400 x g, da je celotno tkivo prešlo s sten mikroepruvete v pufer. Sledila je homogenizacija vzorca z ultrazvokom 2 krat po 3 sekunde pri amplitudi 40 % z vmesno 3-sekundno prekinitvijo na ledu. Zmes smo nato inkubirali še 20 minut na sobni temperaturi, da je potekla liza celic in zopet centrifugirali, tokrat 15 minut pri relativni centrifugalni sili 8000 x g in  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatant smo odpipetirali v novo mikroepruveto, ostalo smo zavrgli. 80  $\mu\text{L}$  supernatanta smo takoj porabili za meritve aktivnosti FAS (vzorec in slepo vzorca v dvojniku), 2  $\mu\text{L}$  pa smo zamrznili na  $-80^{\circ}\text{C}$  za kasnejše meritve koncentracij proteinov po Bradfordu.

### 3.4.3 Merjenje fluorescence

#### 3.4.3.1 Priprava vzorca

Na mikrotitersko ploščico smo napipetirali po 100  $\mu\text{L}$  pufru Avz in 20  $\mu\text{L}$  dobljenega supernatanta. Zmes smo inkubirali 10 minut na sobni temperaturi. Po

pretečenem času smo dodali 100  $\mu\text{L}$  redčene raztopine CPM, ki smo jo pripravili s predhodnim redčenjem CPM 1 : 200 (5  $\mu\text{L}$  raztopine CPM smo dodali 995  $\mu\text{L}$  DMSO in premešali). Po 15 minutah inkubacije CPM v raztopini smo opravili meritve fluorescence fluorescenčnega produkta s fluorimetrom pri valovni dolžini ekscitacije 405 nm in emisije 530 nm.

#### 3.4.3.2. Priprava slepe vzorca

Slepo vzorca smo pripravili tako, da smo na mikrotitersko ploščico odpipetirali najprej 95,6  $\mu\text{L}$  pufra Asl, ki ne vsebuje enega od substratov (Ac-CoA) potrebnih za potek reakcije sinteze višjih maščobnih kislin. Dodali smo 20  $\mu\text{L}$  ekstrakta. Zmes smo inkubirali enak čas kot vzorec (10 minut). Po preteklem času smo dodali 100  $\mu\text{L}$  redčene raztopine CPM in 4,4  $\mu\text{L}$  AcCoA, inkubirali še 15 minut na sobni temperaturi ter izvedli meritev fluorescence nastalega adukta med CoA in CPM s fluorimetrom pri valovnih dolžinah ekscitacije 405 nm in emisije 530 nm.

Od fluorescence izmerjene v vzorcu (kjer je reakcija FAS potekala) smo odšteli fluorescenco izmerjeno v slepi vzorca (kjer reakcije FAS ni bilo). Dobili smo razliko v relativnih fluorescenčnih enotah, ki je bila sorazmerna porastu sintetiziranega CoA oz. aktivnosti FAS. Vse meritve smo izvedli v dvojniku, poleg tega pa smo vedno analizirali tumorsko in kontrolno tkivo istega bolnika v isti seriji meritev.

## 3.5 Merjenje koncentracije proteinov po Bradfordu

### 3.5.1 Princip metode

Bradfordova kolorimetrična metoda temelji na merjenju absorbance coomassie barvila, ki po vezavi na proteine spremeni barvo iz rdeče na modro. Pri tvorbi kompleksa med proteinom in barvilom pride do vzpostavitve dveh tipov interakcij: rdeča nevezana oblika coomassie barvila donira proste elektrone ionizirajočim skupinam proteinov, kar povzroči spremembo terciarne strukture proteina. Razgalijo se hidrofobni žepki, v katere se nekovalentno z Van der Waalsovimi vezmi vežejo nepolarne regije barvila. Pride do usmeritve pozitivno nabitih amino skupin proteina v bližino negativnega naboja barvila. Povezava med proteini in barvilom se tako še dodatno okrepi z nastalimi ionskimi

interakcijami. Na ta način je stabilizirana modra oblika coomassie barvila. Količina kompleksa, ki nastane v raztopini, je merilo koncentracije proteinov.

Vezana oblika proteina ima absorpcijski maksimum pri 595 nm. Kationska nevezana oblika je rdeče obarvana, po vezavi na proteine se stabilizira modra anionska oblika. Porast absorbance pri 595 nm je proporcionalna količini vezanega barvila in zatorej količini oz. koncentraciji proteinov v vzorcu.

Metoda ima ozko linearno območje (od 2 µg/ml–120 µg/ml), zaradi česar je največkrat potrebno predhodno redčenje vzorcev. Mi smo redčili supernatante 1 : 50.

### 3.5.2 Priprava vzorca in merjenje absorbance

V mikroeprovete smo si pripravili standardne raztopine proteinov (sestava in koncentracija sta opisani v preglednici V): proteinskemu standardu s koncentracijo 0,3mg/mL smo dodajali različne volumne pufru za ekstrakcijo, da smo dobili različne koncentracije standardov proteinov.

Redčili smo tudi supernatant, kateremu smo predhodno izmerili aktivnost FAS, in sicer 2 µL smo dodali 98 µL pufru za ekstrakcijo. Nato smo na prozorno mikrotitersko ploščico odpipetirali po 10 µL proteinskega standarda v dvojniku in po 10 µL razredčenega supernatanta v trojniku. Vsakemu vzorcu in standardu smo dodali po 200 µL redčenega reagenta za merjenje koncentracije proteinov in inkubirali 5 minut. Absorbance proteinov smo izmerili pri 595 nm s fluorimetrom. Vsem vzorcem smo odšteli vrednost absorbance reagenčne slepe, ki je vsebovala 0,0mg/mL proteinov.

## 3.6 Priporočila in opozorila

Vse meritve fluorescence smo izvedli v dvojniku, poleg tega pa smo vedno analizirali tumorsko in kontrolno tkivo istega bolnika v isti seriji meritev. S tem smo se izognili napakam, ki bi lahko nastale zaradi pipetiranja pri pripravi posameznih pufrov ali slabše ponovljivosti meritev med dnevi. Pomembno je namreč razmerje relativnih fluorescenc med tumorskim in kontrolnim tkivom in ne njihove absolutne vrednosti.

Zračni mehurčki, ki so nastali med pipetiranjem in mešanjem raztopine na mikrotiterski ploščici, so močno motili merjenje fluorescence, zato niso smeli biti prisotni.

Stabilnost pripravljenih pufrov za ekstrakcijo in pufrov Avz in Asl je bila znotraj enega dne, zato smo vedno pripravili sveža pufra tik pred meritvijo.

Stabilnost NADPH v vodni raztopini s pH = 7,4 je bila vprašljiva, zato smo izvedli meritve vedno s sveže pripravljeno raztopino NADPH.

### 3.7 Uporabljene statistične analize

Rezultati so predstavljeni kot mediana s 25 in 75 percentilom in povprečnimi vrednostmi. Primerjave parametrov med tumorskimi in kontrolnimi tkivi smo naredili z Wilcoxonovim testom. Mann-Whitneyjev, Kruskal-Wallisov, Fisherjev ali Pearsonov  $\chi^2$  test smo uporabili za primerjave enakih parametrov med skupinami. Povezave med variabilnostmi smo ocenili s Spearmanovim redom ali regresijsko analizo. Uni- ali multivariantna Coxovo regresijsko analizo smo uporabili za oceno prognostičnega pomena opazovanih parametrov. Statistično analizo smo izvedli s SPSS v.15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL);  $p < 0,05$  smo obravnavali kot statistično pomembnega.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 Razvoj metode merjenja aktivnosti FAS

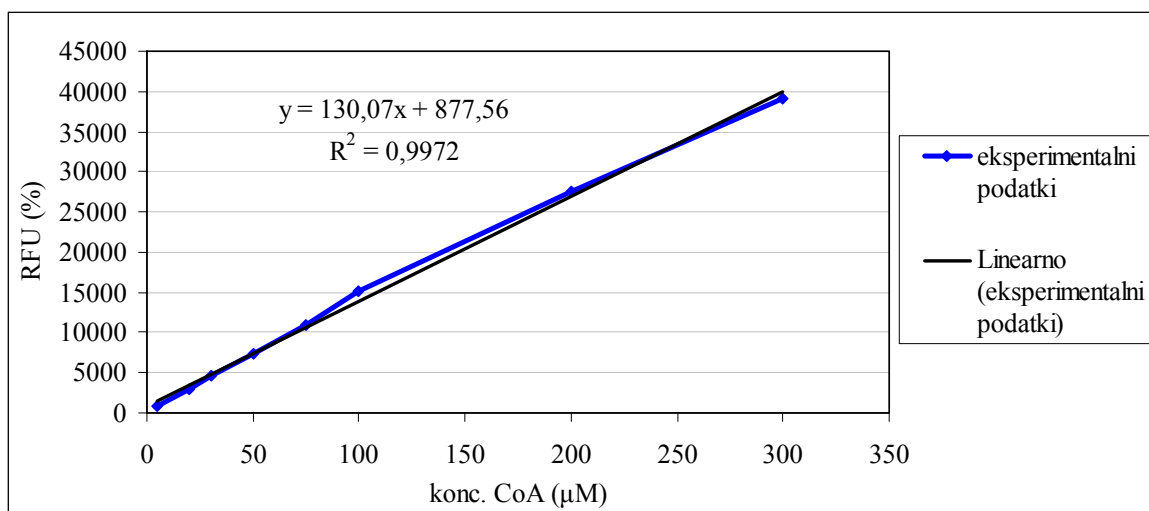
Ni podatka, da bi kdo že izmeril aktivnost FAS v pljučnem rakavem tkivu, prav tako ni še nihče izmeril aktivnosti FAS v zdravem kontrolnem pljučnem tkivu in med sabo primerjal dobljene rezultate. FAS aktivnost je bila izmerjena le v kolorektalnem raku, a so bile meritve narejene z izotopsko metodo na histoloških rezinah tkiva. V isti raziskavi je bila narejena tudi primerjava s sosednjim zdravim tkivom, kjer je bila FAS aktivnost nižja kot v rakavem tkivu (19).

Večina dosedanjih raziskovalnih skupin se je ukvarjala z imunohistokemičnim določanjem FAS (torej z merjenjem proteina) ali pa so merili izražanje gena.

Pri razvoju metode smo si pomagali z izsledki članka Chungove in sod. (15), ki so na izoliranem FAS testirali inhibitorje encima s pomočjo merjenja aktivnosti FAS. Protein FAS so izolirali iz podganjih jeter in človeške celične linije, za kar je bila potrebna dolgotrajna in zahtevna izolacija ter uporaba ionsko izmenjevalne kromatografije. Pri našem delu encima nismo izolirali, saj smo želeli razviti metodo, ki bi nam omogočila merjenje aktivnosti FAS v ekstraktu dobljenem iz tkiva. Verjamemo, da je tako izmerjena aktivnost FAS odraz aktivnosti encima *in vivo*.

#### 4.1.1 Območje linearnosti

Najprej smo proučili območje linearnosti fluorescence v odvisnosti od koncentracije CoA oz. nastalega fluorescenčnega produkta CPM-CoA. Naredili smo raztopine z različnimi koncentracijami CoA, jim dodali 100  $\mu\text{L}$  CPM ter izmerili fluorescenco (slika 5).



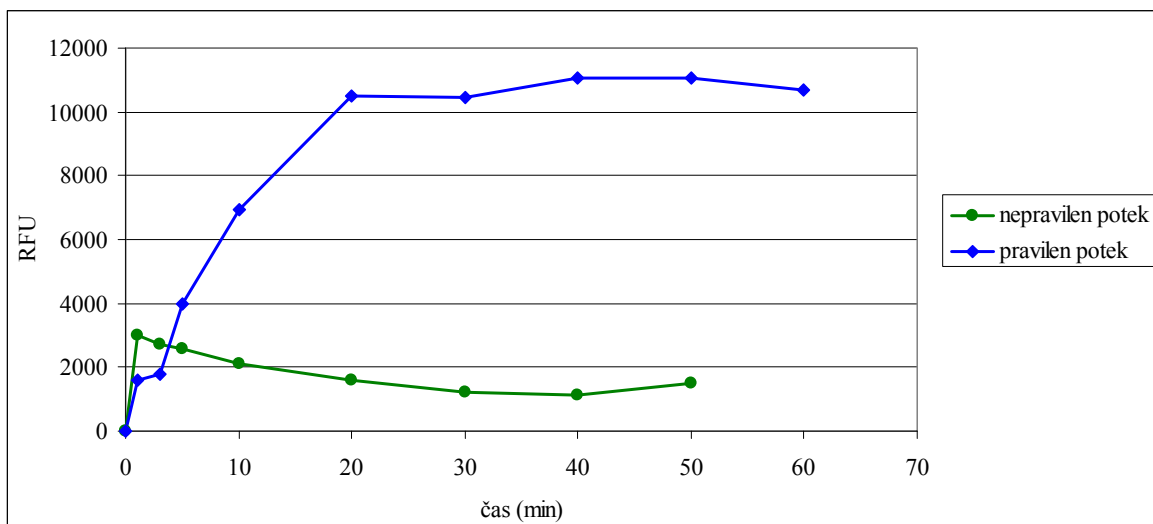
Slika 5: Graf odvisnosti fluorescence od koncentracije CoA – linearno območje.

Iz dobljenega grafa smo določili območje linearnosti RFU v odvisnosti od koncentracije CoA: 0–300 μM CoA. Pri višjih koncentracijah so odstopanja od linearnosti. Pri merjenju vzorcev je bila intenziteta fluorescence nekje od 500 do 30.000, kar je bilo znotraj linearnega območja odvisnosti fluorescence od koncentracije fluorofora oz. koncentracije produkta CoA-CPM.

#### 4.1.2 Encimska kinetika

Pomanjkljivost naše metode je bila odsotnost pozitivne kontrole, ki bi nam potrdila, da je postopek merjenja aktivnosti zagotovo ustrezen. Pri razvoju postopka ekstrakcije in merjenja aktivnosti encima smo si zato pomagali s spremljanjem encimske kinetike. Ker nam CPM z vezavo na produkt reakcije posredno preko merjenja fluorescence omogoča spremljanje aktivnosti encima, hkrati pa nam inhibira tudi FAS, kinetike nastajanja fluorescenčnega produkta nismo mogli spremljati kontinuirano. Problem smo rešili tako, da smo pripravili ekstrakt encima, ki smo ga razdelili na 20 μL alikvote, te pa smo različno dolgo inkubirali v pufri A. Reakcijo smo pustili teči 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50 in 60 minut ter jo z dodatkom CPM prekinili. Po 15 minutah smo s fluorimetrom izmerili nastalo fluorescenco, narisali graf odvisnosti fluorescence od koncentracije tekom reakcije nastalega CoA in individualno ocenili potek encimske kinetike. V primeru nepravilnega poteka encimske reakcije smo meritve ponovili, pri tem pa smo spreminjali pogoje ekstrakcije in inkubacije encima s substrati. Na sliki 6 je prikazan primer pravilnega in nepravilnega poteka encimske reakcije.





Slika 6: Graf odvisnosti fluorescence od časa – pravilen in nepravilen potek encimske reakcije.

#### 4.1.3 Ekstrakcija encima: UZ vs. liza

Preučili smo vpliv UZ na obseg ekstrakcije FAS iz citosola celic. Pripravili smo supernatant, ki smo ga razdelili na 3 alikvote in jih izpostavili UZ: 5 pulzov, 10 pulzov in 15 pulzov po 3 sekunde s 3-sekundnimi vmesnimi prekinitvami na ledu.

Vzorec s petimi pulzi UZ smo izmerili najvišjo fluorescenco, sledil je vzorec z 10 in nazadnje s 15 pulzi. S 5 pulzi UZ smo torej razbili večino celic in z nadaljnjimi pulzi nismo dosegli večjega sproščanja FAS iz citosola. Še več, z dodatnimi pulzi UZ smo lahko denaturirali proteine in s tem zmanjšali količino aktivnega encima, kar so nakazovale nižje izmerjene vrednosti fluorescence pri 10 ali 15 pulzih.

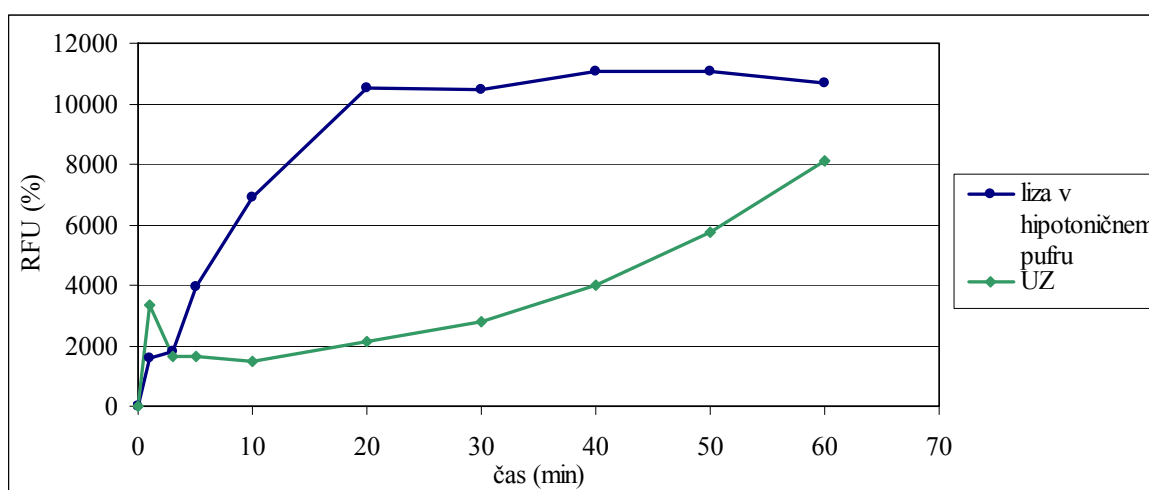
Primerjali smo UZ in lizo celic v hipotoničnem pufru kot dva med sabo različna postopka za sproščanje FAS iz celic. Uporabili smo homogenizator z ultrazvokom 4710 Series Ultrasonic Homogenizer: pulzi petkrat po 3 sekunde pri amplitudi 40 % s 3-sekundnimi prekinitvami na ledu. Lizo pa smo izvajali 20 minut v hipotoničnem pufru za ekstrakcijo pri sobni temperaturi.

Vzeli smo vzorec tumorskega tkiva in ga strli v terilnici s tekočim dušikom. Strto tkivo smo prenesli v dve Eppendorf epruveti približno v enakih količinah. Pripravili smo ekstrakt z UZ, tako da smo zdrobljenemu tkivu dodali pufer za ekstrakcijo. Sledil je ultrazvok v 5 pulzih po 3 sekunde s 3-sekundnimi premori na ledu, s katerim smo razbili

celice in sprostili FAS iz celic. Vzorec smo 15 minut centrifugirali na 8000g pri 4 °C, da smo odstranili razbite celice in dobili supernatant.

Ekstrakt z lizo celic v pufru za ekstrakcijo smo pripravili tako, da smo na 1 mg tkiva dodali 10 µL pufra za ekstrakcijo. Vzorec smo razmešali s spatulo, nato pa pustili stati pri sobni temperaturi 20 minut v hipotoničnem pufru za ekstrakcijo, da je prišlo do lize celic in sproščanja intracelularnega FAS. Sledilo je 15 minutno centrifugiranje vzorca na 8000g pri 4 °C, da smo dobili supernatant.

Dobljenima supernatantoma smo izmerili fluorescenco ob različnih časih inkubacije v pufru A: 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50 in 60 minut. Reakcijo smo prekinili z dodanim CPM v DMSO, ki smo ga inkubirali 15 minut v vzorcih preden smo opravili meritev. Izmerjenim vrednostim vzorcev smo odšteli slepo vzorca in narisali graf odvisnosti fluorescence od časa (slika 7).



Slika 7: Graf odvisnosti fluorescence od časa – primerjava UZ in liza celic.

Pričakovano obliko encimske kinetike smo dobili pri ekstraktu pripravljenem z lizo celic: najprej hiter porast fluorescence (linearno območje), ki mu sledi upočasnitev in doseg platoja že v 20 minutah. Plato se je pojavil ali zaradi porabe substratov ali zaradi sinteze inhibitornih molekul (CoA). Pri ekstraktu pripravljenem z UZ smo dobili graf z vrhom v prvi minuti, ki mu sledi padec in počasen porast fluorescence. V 60 minutah še ni dosežen plato.

Ugotovili smo, da je liza celic v hipotoničnem pufru primernejši postopek za izolacijo FAS, saj pri pripravi ekstrakta ni bilo ultrazvoka, ki bi lahko poškodoval FAS. Tako smo dobili več aktivnega encima FAS v izolatu in posledično smo izmerili tudi višjo

fluorescenco. Ocenili smo, da je območje linearnosti encimske kinetike nekje med 0 in 20 minutami.

Problem se nam je pojavil pri krvavih tkivih (krvava je bila večina kontrolnih tkiv), ko se nam je med 20-minutno lizo v hipotoničnem pufru tvoril strdek. Ta je onemogočal obsežnejšo lizo celic in s tem sprostitvev encima. Problem smo rešili tako, da smo z dvema pulzoma UZ dosegli razbitje strdka, dispergiranje celic po celotnem pufru, kar je bistveno povečalo učinkovitost izluževanja FAS iz tkiva v pufer za ekstrakcijo. Ker pa povzroča UZ tudi segrevanje raztopine, smo jo med pulzoma hladili na ledu. S tem smo preprečili morebitno pregrevanje raztopine in posledično denaturacijo oz. poškodbo encima.

Optimalni pogoji in postopek za izolacijo encima iz celic in pripravo ekstrakta iz tumorskih in kontrolnih tkiv so bili naslednji: košček tkiva smo z dletom odlomili od zamrznjenega pljučnega tkiva, potopljenega v tekoči dušik. S tem smo zagotovili, da je bil preostanek tkiva stalno zamrznjen še za morebitne kasnejše meritve. Odlomljen košček tkiva smo strli in z UZ (2 pulza po 3 sekunde, vmesna prekinitev na ledu) homogenizirali v pufru za ekstrakcijo. Dva pulza UZ sta namreč zadostovala za razbitje strdka. Pri večjem številu pulzov smo že tvegali poškodbo encima, kar se je pokazalo v manjši izmerjeni fluorescenci. Ekstrakt smo nato pustili lizirati še 20 minut na sobni temperaturi.

#### 4.1.4 Stabilnost reagentov in pripravljenih raztopin

Za zanesljive rezultate je bila izjemnega pomena uporaba svežih raztopin. Uporaba raztopin s pretečenim rokom uporabe je pomembno vplivala na zmanjšanje vrednosti izmerjene fluorescence oz. na aktivnost FAS. Ugotovili smo, da je stabilnost pripravljenih raztopin substratov za encimsko reakcijo izredno problematična. Proizvajalec Sigma navaja, da je acetyl-CoA stabilen 6 mesecev v raztopini shranjeni na  $-80^{\circ}\text{C}$ , na  $-20^{\circ}\text{C}$  pa le 2 tedna. Stabilnost NADPH v 0,02M NaOH na  $-80^{\circ}\text{C}$  je samo 1 teden. Za Ma-CoA ni bilo podatka. Mi smo vse reagente, tudi NADPH, raztopili v UČ vodi, kar je še dodatno skrajšalo njegov rok uporabe in jih shranjevali v zamrzovalniku na  $-80^{\circ}\text{C}$ . Meritve aktivnosti FAS smo zaradi problematične stabilnosti raztopine NADPH opravili s sveže pripravljeno raztopino.

Stabilnost pripravljene pufru A (Avz in Asl) je bila znotraj enega dne, saj se nam je po tem času brezbarvna raztopina obarvala rumeno, kar je bil znak neustreznosti. Možen

vzrok nestabilnosti pufera A je prisotnost kofaktorja NADPH, ki je kot reducent zelo občutljiv. Pufer A smo zato pripravljali vedno sproti, prav tako pa je bil tik pred uporabo pripravljen hipotoničen pufer za ekstrakcijo.

#### 4.1.5 CPM in fluorescenca

Preverjali smo obstojnost fluorescenčnega produkta CPM-CoA. CPM smo inkubirali v reakcijski zmesi supernatanta in pufera A 0, 10, 20 in 30 minut, preden smo opravili meritve fluorescence. Tako smo izvedli 4 meritve v 10-minutnih razmakih (takoj po dodatku CPM, čez 10 minut, čez 20 minut in čez 30 minut) in ugotovili, da se izmerjene vrednosti po teh časih med sabo bistveno ne razlikujejo. Produkt je bil obstojen najmanj pol ure. Opazili smo tudi, da so izmerjene fluorescence veliko bolj primerljive med paralelkami, če pustimo CPM inkubirati v reakcijski mešanici vsaj 15 minut, kot če izvedemo meritve takoj po dodatku CPM.

CPM smo dodajali v reakcijsko mešanico v prebitku, saj naj bi bila izmerjena fluorescenca posledica vezave CPM na proste SH-skupine proteinov, encimov, CoA. Več smo imeli sulfhidrilnih skupin v vzorcu, večja naj bi bila izmerjena fluorescenca, ne glede na količino dodanega prebitka CPM. Da bi to trditev preverili, smo v 20  $\mu\text{L}$  supernatanta in 100  $\mu\text{L}$  pufera A po 15 minutah dodali različne volumne CPM (50, 100, 150 in 300  $\mu\text{L}$ ) ter z UČ vodo dopolnili do skupnega volumna 420  $\mu\text{L}$ . Preteklo je 15 minut, preden smo izmerili fluorescenco.

Ugotovili smo, da fluorescenca ni posledica le vezanega CPM na SH skupine, ampak tudi prostega nevezanega CPM v vzorcu. Fluorescenca je torej močno odvisna od količine dodanega prebitka CPM v reakcijsko zmes. Ker je imel CPM že sam po sebi neko svojo lastno fluorescenco, je bilo pomembno, da smo v supernatant vzorca in slepe vzorca vedno dodali enako količino CPM. To smo zagotovili tako, da smo vedno uporabili isto pripravljeno redčeno raztopino CPM za vzorec in njegovo slepo.

#### 4.1.6 Ponovljivost meritev

Preverjali smo ponovljivost rezultatov med puferi Avz. Pripravili smo dva po sestavi povsem enaka pufera: pufer Avz1 in pufer Avz2, v katerih smo inkubirali po 20  $\mu\text{L}$

pripravljenega supernatanta iz tumorskega tkiva. Naredili smo po tri paralelke za vsak supernatant. Fluorescence znotraj paralelk vzorcev in znotraj slepe vzorca so bile ponovljive, prav tako so bile ponovljive fluorescence med pufri A.

Problem so nam v začetku predstavljali prisotni zračni mehurčki, ki so nastali med pipetiranjem in mešanjem vzorcev na mikrotiterski ploščici. Ti so motili merjenje fluorescence, zaradi česar smo dobili manj ponovljive ali celo negative rezultate. Pri mešanju smo bili na njih bolj pozorni in smo morebitno nastale mehurčke pred meritvijo fluorescence odstranili.

#### 4.1.7 Izbor valovnih dolžin emisije in ekscitacije

Pri merjenju fluorescence smo dobivali negativne vrednosti večinoma pri kontrolnih tkivih, ki so bila ponavadi tudi močno krvava. Sprva smo mislili, da je za negativne vrednosti krivo gašenje fluorescence s hemoglobinom, zato smo analizirali rezultate RFU izmerjene pri različnih valovnih dolžinah vzbujanja (380, 405 nm) in emisije fluorescence (480, 500, 530 nm). Prišli smo do naslednjih zaključkov:

1. Vzbujanje fluorescence je bilo boljše s svetlobo valovne dolžine 405 nm kot s svetlobo valovne dolžine 380 nm.
2. Gašenje fluorescence s Hb je bilo najmanjše pri 500 nm (manjše kot pri 480 nm), najmočnejše pa je bilo izraženo pri merjenju fluorescenčne svetlobe pri 530 nm;
3. Vrednosti RFU so bile največje pri 480 nm (kjer je maksimum fluorescenčne svetlobe, torej je tam največja občutljivost metode), manjše so bile pri 500 nm, daleč najmanjše pa pri 530 nm.
4. Bolje je bilo meriti na desni strani krivulje fluorofora (torej pri 500 nm, 530 nm ali v maksimumu 480 nm), kot na levi strani (na primer pri 450 nm).

Glede na ugotovljeno je bilo CPM najboljše vzbujati s svetlobo valovne dolžine 405 nm in meriti emisijo pri 530 nm. Slednje je bil kompromis med velikostjo RFU oz. občutljivostjo metode in najmanjšim gašenjem fluorescence s hemoglobinom. Gašenje fluorescence s hemoglobinom ni bil glavni krivec za negativne rezultate v kontrolnih tkivih.

#### 4.1.8 Različna pufra A za vzorec in slepo vzorca

V začetni fazi razvoja metode smo slepo vzorca pripravili tako, da smo na mikrotitersko ploščico najprej odpipetirali 100  $\mu$ L pufra Avz in 100  $\mu$ L redčene raztopine CPM, šele nato smo dodali 20  $\mu$ L ekstrakta. Ker je bil supernatant dodan direktno v CPM, reakcija ni potekala. CPM se je takoj vezal v aktivno mesto na SH skupino encima in s tem onemogočil potek reakcije, prav tako pa se je vezal še na vse ostale SH skupine prisotne v supernatantu (razni encimi, proteini, CoA...). Zmes smo inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi, ter izmerili fluorescenco nastalega produkta med CoA in CPM s fluorimetrom. Izmerjene razlike fluorescence vzorca in slepe vzorca so bile večkrat negativne, kljub uporabi svežih raztopin reagentov. Edina razlika med pripravo vzorca in slepe vzorca je bila v času inkubacije vzorca v pufri A, ko ta še ni vseboval CPM.

Postavili smo naslednjo hipotezo: med potekom reakcije FAS se tvorijo nove SH skupne zaradi sinteze CoA, hkrati pa se SH skupine tudi porabljajo (ne tiste na sintetiziranih CoA ampak druge, s katerimi kasneje dodani CPM prav tako reagira). V slepih vzorca te porabe ni bilo, ker smo takoj dodali CPM. Ta se je vezal na SH skupine in s tem porabo SH skupin preprečil. Prav tako ni bilo nastajanja CoA. Vse je bilo odvisno od razmerja nastajanja SH skupin v vzorcu v času reakcije. Če je bilo nastajanje novih CoA zaradi aktivnosti FAS hitrejše od porabe drugih SH skupin, kot smo opazili v večini tumorskih tkiv, potem je bila fluorescenca v vzorcu večja kot v slepi vzorca. Če pa je bilo nastajanje CoA zaradi nizke aktivnosti FAS počasnejše od porabe ostalih SH, kot smo opazili v večini kontrolnih tkiv, potem je bila fluorescenca v vzorcu nižja kot v slepi vzorca. V slednjem primeru smo torej dobili negativne vrednosti, ki so bile pravzaprav odraz zelo nizke aktivnosti FAS.

Z namenom, da bi to hipotezo dokazali, smo inkubirali tudi slepo vzorca v pufri A enak čas kot smo inkubirali vzorec. Šele nato smo obema hkrati dodali CPM. Da pa reakcija pri slepi vzorca ni tekla, smo odvzeli enega od substratov, in sicer Ac-CoA. Tako smo ločeno pripravili dva pufra A. Enega za vzorec in enega za slepo vzorca, ki ni vseboval Ac-CoA.

Ta modifikacija metode nam je omogočila merjenje aktivnosti FAS tudi v vzorcih, kjer smo poprej dobivali negativne vrednosti relativne fluorescence (tako krvavih kot nekrvavih). Meritve vseh 84 vzorcev smo zato ponovili pod temi pogoji.

#### 4.1.9 Izračuni in standardizacija rezultatov

Pri izračunu aktivnosti FAS smo upoštevali porast fluorescence v 10 minutah inkubacije FAS s substrati (RFU vzorca smo odšteli RFU slepe vzorca).

Rezultate smo standardizirali kot porast relativne fluorescence na maso tkiva (RFU/g tkiva). Pri izračunu smo upoštevali vse spremenljivke, ki vplivajo na rezultat: zatehta tkiva, dodane volumne pufra za ekstrakcijo in pufra A, čas merjenja encimske aktivnosti in koncentracijo proteinov v vzorcu.

#### 4.1.10 Pomen razvite metode merjenja aktivnosti FAS

Metoda iz katere smo izhajali pri razvoju postopka merjenja aktivnosti FAS (Chung in sod.), ni bila primerna za tkiva ampak le za čiste sisteme, v katerih je bil izoliran encim v puftru. Za izolacijo encima je bil potreben dolgotrajen in zahteven postopek, ki je otežil merjenje aktivnosti FAS. Zato smo razvili postopek, s katerim smo omogočili merjenje aktivnosti FAS v tkivu brez predhodne izolacije encima. To je močno poenostavilo samo pripravo vzorca, skrajšalo čas dela in zmanjšalo stroške.

Uspelo nam je torej razviti enostavno, varno in hitro metodo za merjenje aktivnosti FAS *in vivo*. Prednosti postopka so bile v tem, da nam ni bilo potrebno izolirati encima, niti pripravljati reagentov, saj so bili ti komercialno dostopni. Pri merjenju nismo uporabljali izotopov ali drugih radioaktivnih snovi, zaradi česar je bila metoda povsem varna.

Razvita metoda bo lahko sedaj omogočila široko proučevanje aktivnosti FAS in njene vloge v rasti tumorja. Ker do sedaj ni bilo enostavne metode, teh raziskav ni bilo oziroma so poskušali raziskovalci z merjenjem proteina FAS ali pa z merjenjem izražanja gena FAS, kar pa ni isto kot merjenje aktivnosti encima. Količina nastalega proteina FAS ali izraženega gena ne odražata tudi encimske aktivnosti. Lahko izmerimo velike količine proteina FAS, vendar bi bilo narobe, če bi avtomatično sklepali tudi na veliko aktivnost, saj je nastali encim lahko nefunkcionalen in zato nima encimske aktivnosti.

## 4.2 Merjenje aktivnosti FAS pri bolnikih

### 4.2.1 Klinični podatki o bolnikih

Klinične podatke o bolnikih, ki so sodelovali v študiji, smo zbrali v preglednico VI.

*Preglednica VI: Klinične značilnosti in laboratorijski rezultati bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom.*

parameter	podatki
število	41
spol (ženske/moški)	11/30
starost (leta)	63,0 {53,0/67,0} (44–77)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24,8 {22,2/28,3} (16,4–46,5)
izguba teže v zadnjih treh mesecih (ne/da)	24/17
kadilec (nikoli/trenutni ali bivši)	5/36
stadij bolezni (I–III)*	17/14/10
histološki tip tumorja (ploščatocelični/žlezni/velikocelični/drugi)	19/13/5/4

Vrednosti so predstavljene kot mediana {25-percentil/75-percentil} in (najmanjša vrednost–največja vrednost) ali število osebkov

\* po TNM klasifikaciji (17)

Med 4-letnim spremljanjem bolnikov jih je 21 umrlo zaradi napredovanja bolezni, 20 jih je bilo po 4 letih še živih, 1 bolnik pa je umrl zaradi nerakavega vzroka, zato smo ga iz statistične analize izključili. V raziskavi so sodelovali pretežno moški, bilo jih je 30, žensk samo 11. Njihova starost je bila v povprečju 63 let, povprečna starost žensk 53 let, moških pa 67 let.

BMI oz. indeks telesne mase podaja razmerje med telesno maso in višino ter je dober pokazatelj ocene debelosti in s tem dejavnikov tveganja za razvoj z debelostjo povezanih bolezni (sladkorna bolezen, srčno-žilne bolezni...). V povprečju je bil indeks telesne mase 24,8, kar je tik pod mejo, da bi lahko udeležence študije označili kot čezmerno prehranjene. Čezmerno prehranjenih je bilo 25 % udeležencev s povprečnim BMI 28,3.

Težo je v zadnjih treh mesecih izgubilo 17 bolnikov, kar lahko povežemo z napredovanjem bolezni.



Pomemben podatek je, da so bili skoraj vsi bolniki kadilci, le 5 je bilo takih, ki niso nikoli kadili. To se ujema z dejstvom, da je kajenje glavni dejavnik tveganja za nastanek pljučnega raka.

Študija je vključevala bolnike v stadiju bolezni od I do III. V Začetnih stadijih I in II je bilo 75 % udeležencev. Prevladovali so bolniki s ploščatoceličnim histološkim tipom tumorja, sledil je žlezni in za njim druge oblike raka.

## 4.2.2 Rezultati meritev aktivnosti FAS

### 4.2.2.1 Aktivnost FAS v tumorskem in kontrolnem tkivu

Do sedaj še ni bilo objavljenih raziskav, kjer bi izmerili aktivnost FAS v povezavi z rakom. Raziskovalci so večinoma določali FAS le imunohistokemično (kot protein), redkeje pa so merili izražanje gena za FAS. Po naših podatkih ni še nihče izmeril aktivnosti FAS v pljučnem tumorskem in obtumorskem tkivu ali katerem drugem človeškem tkivu.

Izjema je članek Rashid A. in sod. (19), v katerem so preučili ekspresijo in aktivnost FAS v kolorektalnem raku in ocenili korelacijo s tumorsko rastjo in prognozo. Z izotopsko metodo so izmerili povečano aktivnost FAS v histoloških rezinah kolorektalnega raka in izmerili 2–7-krat višjo aktivnost FAS v rakavem tkivu kot v sosednjem zdravem tkivu. Aktivnost je korelirala z imunohistokemično določitvijo encima kot proteina, niso pa našli povezave med preživetjem in aktivnostjo encima.

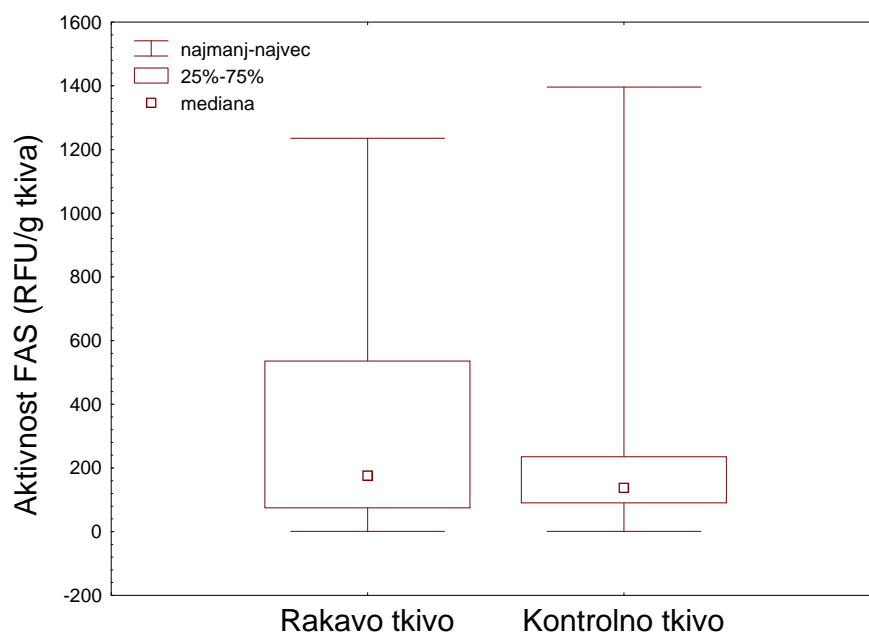
Še dve drugi skupini raziskovalcev (20, 21) sta izmerili aktivnost in protein FAS, vendar so študije izvedli na človeških celičnih linijah, kjer so proučevali vpliv androgenov in progesterinov.

Mi smo, podobno kot Rashid in sod. (19), izmerili v tumorju za 28 % višjo aktivnost FAS kot v sosednjem kontrolnem tkivu, vendar razlika ni bila statistično signifikantna (mediani 176 RFU/g tkiva vs. 137 RFU/g tkiva;  $p = 0,4024$ ). Rezultati so predstavljeni v preglednici VII in na sliki 8.

*Preglednica VII: Deskriptivna statistika aktivnosti FAS v tkivu.*

parameter	rezultati
aktivnost FAS v tumorskem tkivu (RFU/g tkiva)	176,0 {74,3/536,2} (0,685–1235,6)
aktivnost FAS v kontrolnem tkivu (RFU/g tkiva)	137,4 {90,1/235,2} (1,042–1396,2)

Vrednosti so predstavljene kot mediana {25-percentil/75-percentil} in (najnižja vrednost–najvišja vrednost)



Slika 8: Statistična analiza aktivnosti FAS v tumorskem in kontrolnem tkivu.

#### 4.2.2.2 Korelacije

S Spermanovim testom korelacije smo poiskali morebitne povezave s kliničnimi podatki bolnikov, kot so stadij bolezni, število let kajenja, starost, spol, teža bolnikov in 4-letno preživetje. Aktivnost FAS v tumorju je korelirala z dejavnikoma BMI in trigliceridi.

1. Nižji BMI je bil povezan z višjo aktivnostjo FAS v rakavem tkivu ( $r = -0,3881$ ;  $p = 0,0146$ ). Višja aktivnost FAS v rakavem tkivu vodi v povečano sintezo in porabo energetske bogatih molekul (višjih maščobnih kislin), kar se kaže kot bolnikovo hujšanje. Težo je v zadnjih mesecih izgubilo 17 udeležencev, kar je verjetno povezano z napredovanjem bolezni.
2. Nižja koncentracija trigliceridov v serumu je bila povezana z višjo aktivnostjo FAS v tumorju ( $r = -0,3175$ ;  $p = 0,0489$ ). Povečana potreba rakavih celic po energetske bogatih molekulah povzroči znižanje koncentracije trigliceridov v serumu bolnika.

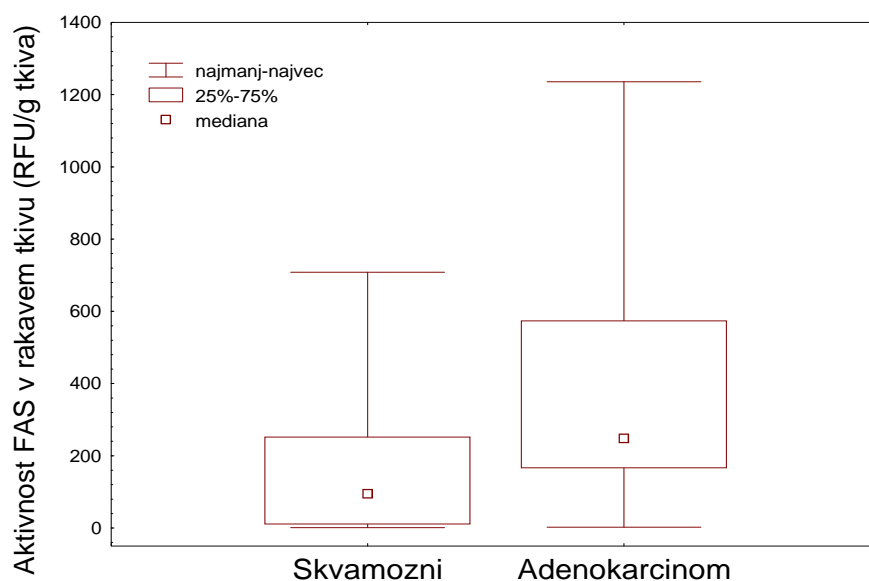
Aktivnost FAS v kontrolnem tkivu pa je korelirala le s pitjem alkohola. Zauživanje večjih količin etanola je bilo povezano z višjo aktivnostjo FAS v kontrolnem tkivu ( $r = 0,4422$ ;  $p = 0,0048$ ).

Z ostalimi kliničnimi podatki ni bilo povezav.

#### 4.2.2.3 Histološki tipi

V študijo smo vzeli bolnike s stadijem od I do III, 75 % jih je bilo na začetku bolezni, torej v stadiju I ali II. Pri pregledu histološkega tipa tumorja je prevladoval ploščatocelični rak, kar je zanimivo, saj je ta tip po pojavnosti šele na drugem mestu. Najpogostejši je sicer žlezni rak, ki je bil v našem primeru za ploščatoceličnim, sledil je velikocelični ter druge oblike nedrobnoceličnega raka.

Bolniki z adenokarcinomom so imeli 1,61-krat višjo aktivnost FAS v rakavem tkivu kot bolniki s skvamoznim histološkim tipom raka (248 RFU/g tkiva vs. 95 RFU/g tkiva;  $p = 0,0309$ ) (slika 9). Znano je, da je adenokarcinom agresivnejši od ploščatoceličnega raka in povezan s krajšim preživetjem bolnika. Ali višja aktivnost FAS omogoča adenokarcinomu agresivnejši potek bolezni ali pa je le posledica omenjenega tipa raka, bi morali preučiti z nadaljnjimi preiskavami.



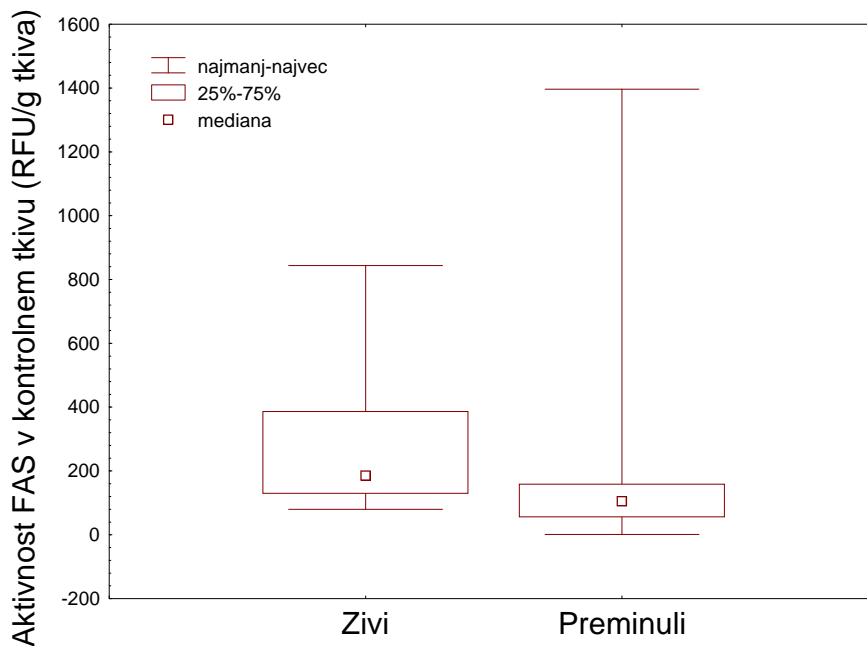
Slika 9: Statistična analiza aktivnosti FAS v rakavem skvamoznem tkivu in adenokarcinomu.

Naši rezultati se navidezno ne ujemajo z rezultati Wang J. in sod. (22), ki so imunohistokemično določali FAS pri NSCLC. Prisotnost proteina FAS so dokazali pri 31 % bolnikov (55/175). Pojavnost tega proteina je bila pogostejša pri bolnikih z neadenokarcinomi kot z adenokarcinomi (38,4 % vs 22,4 %;  $p = 0,036$ ). Prav tako pa niso našli povezav med pojavnostjo proteina FAS in ostalimi kliničnimi podatki, kot so spol, starost, kajenje, velikost tumorja in stadij. Velja pa poudariti, da so v omenjeni raziskavi

merili encim kot protein. Menimo, da je naš pristop (merjenje aktivnosti encima) pravilnejši, saj masa encima pogosto ne odraža njegove aktivnosti.

#### 4.2.2.4 Preživetje

Primerjali smo aktivnost FAS med živimi in po 4 letih raziskave pokojnimi bolniki. Mrtvi so imeli kar za 86,3 % višjo aktivnost FAS v tumorskem tkivu kot živi bolniki, vendar razlika ni bila statistično značilna (281,72 RFU/g tkiva vs. 151,71 RFU/g tkiva;  $p = 0,3993$ ). Deskriptivna statistika aktivnosti FAS v kontrolnem tkivu pa je pokazala, da imajo preminuli za 43,3 % nižjo aktivnost FAS kot živi (105 RFU/g tkiva vs. 185 RFU/g tkiva;  $p = 0,0064$ ) (slika 10).



Slika 10: Statistična analiza aktivnosti FAS v kontrolnem tkivu živih in preminulih bolnikov.

Preminuli so imeli nižjo aktivnost FAS v kontrolnem tkivu, kar je lahko vodilo v izčrpanje zdravega pljučnega tkiva in izgubo telesne teže. Kaheksija rakavih bolnikov je znano povezana z napredovanjem bolezni. Nasprotno pa pomeni višja aktivnost FAS v rakavem tkivu večjo preskrbo rakavega tkiva z višjimi maščobnimi kislinami in morda ugodno podlago za agresivnejši potek bolezni. Omeniti še velja, da je višja aktivnost v rakavem tkivu sorazmerno povezana z nižjim BMI, nižjimi trigliceridi, kar kaže, da je pri

agresivnejšemu poteku bolezni morda prisotno izčrpavanje celotnega organizma. To zopet vodi v kaheksijo.

#### 4.2.2.5 Prognostičen pomen

Našli smo tri članke (22, 23, 24) v katerih so ugotavljali prognostičen pomen FAS v pljučnem rakavem tkivu, vendar je ta pri vseh temeljil na imunohistokemičnem določanju proteina FAS. Opazili smo, da so te raziskovalne skupine podale različna mnenja glede prognostičnega pomena FAS.

Skupina Wang in sod. (23) so imunohistokemično v rakavem tkivu določali FAS pri 84 bolnikih z stadijem I NSCLC. Potrdili so, da je FAS neodvisni prognostični kazalec, a le v stadiju I NSCLC: FAS pozitivni bolniki (29,8 %) so imeli krajše petletno preživetje kot FAS negativni bolniki (35,1 % vs. 66,1 %,  $p = 0,0079$ ).

Visca P. in sod. (24) so analizirali FAS imunohistokemično v rakavem tkivu pri 106 bolnikih z NSCLC. Obarvanje se je pojavilo pri 61 bolnikih (57,54 %). Odkrili so, da ima prisotnost proteina FAS v rakavem tkivu nizko prognostično vrednost ( $p = 0,14$ ), nasprotno pa ima njegova odsotnost trend boljšega preživetja v stadiju I, kar pa tudi ni bilo statistično signifikantno ( $p = 0,10$ ).

Wang in sod. (22) so prav tako imunohistokemično določali protein FAS v rakavem tkivu in njegov prognostičen pomen pri 175 bolnikih z NSCLC. Med FAS pozitivnimi in FAS negativnimi bolniki niso našli signifikantne razlike v preživetju bolnikov ( $p = 0,066$ ). Izjema so bili bolniki v stadiju I, kjer so našli prognostičen pomen FAS, saj so imeli FAS pozitivni bolniki slabše preživetje kot FAS negativni bolniki v stadiju I NSCLC ( $p = 0,005$ ). Nobene korelacije niso našli med FAS in ostalimi kliničnimi dejavniki, razen slabe prognoze pri bolnikih v začetnih stadijih bolezni.

Če opazujemo vse štiri stadije bolezni, prognostičnega pomena proteina FAS v tumorskem tkivu niso našli (24, 25). Nihče pa še ni meril aktivnosti FAS in določal njegova prognostičnega pomena tudi v obtumorskem, zdravem tkivu. Prav tako do sedaj še ni bila narejena nobena imunohistokemična meritev obtumorskega tkiva bolnika s pljučnim rakom.

S Cox-ovo regresijsko analizo smo poiskali signifikantne kazalce krajšega preživetja bolnika z NSCLC. V univariantni analizi so napovedovali slabše preživetje

bolnika višji stadij bolezni ( $p = 0,009$ ), izguba teže ( $p = 0,032$ ) in nižja aktivnost FAS v kontrolnem tkivu ( $p = 0,038$ ). Rezultati so prikazani v tabeli VIII.

*Tabela VIII: Kazalci krajšega preživetja pri bolnikih z NSCLC, univariantna Cox-ova regresijska analiza.*

spremenljivka	tveganje (95 % interval zaupanja)	p
spol (ženske vs. Moški)	2,048 (0,688–6,094)	0,198
starost (visoka vs. nizka) <sup>a</sup>	1,765 (0,741–4,201)	0,199
BMI (visok vs. nizek) <sup>a</sup>	0,522 (0,216–1,261)	0,149
izguba teže v zadnjih 3 mesecih (da vs. ne)	2,480 (1,036–5,939)	0,032
kadilec (trenutni ali bivši vs. nikoli)	3,392 (0,455–25,296)	0,233
stadij bolezni (II ali III vs. I)	5,149 (1,505–17,583)	0,009
histološki tip tumorja (adenokarcinom vs. neadenokarcinomi)	0,502 (0,148–1,373)	0,179
aktivnost FAS v kontrolnem tkivu (nizka vs. visoka)	2,654 (1,052–6,693)	0,038
aktivnost FAS v tumorskem tkivu (visoka vs. nizka)	1,824 (0,7404–4,493)	0,191

Krajše preživetje bolnika torej napovedujejo trije dejavniki: izguba telesne teže, višji stadij bolezni in nižja aktivnost FAS v kontrolnem tkivu. Bolniki, ki so izgubili telesno težo, so imeli 2,48-krat večje tveganje za krajše preživetje kot bolniki, ki telesne teže niso izgubljali ( $p = 0,032$ ). Bolniki s stadijem II ali III so imeli kar 5,149-krat večje tveganje za krajše preživetje kot bolniki v začetnem stadiju bolezni ( $p = 0,009$ ). Bolniki z nizko FAS aktivnostjo v kontrolnem tkivu so imeli 2,654-krat večje tveganje za krajše preživetje kot bolniki z visoko FAS aktivnostjo v zdravem pljučnem tkivu ( $p = 0,038$ ).

Z multivariantno Cox-ovo regresijsko analizo smo med signifikantnimi spremenljivkami poiskali tiste, ki so bile neodvisno povezane s slabšim preživetjem bolnika (preglednica IX).

*Preglednica IX: Kazalci krajšega preživetja pri bolnikih z NSCLC, multivariantna Cox-ova regresijska analiza.*

spremenljivka	tveganje (95 % interval zaupanja)	p
stadij bolezni (II ali III vs. I)	3,900 (1,112–13,673)	0,033
izguba teže v zadnjih 3 mesecih (da vs. ne)	2,824 (1,072–7,434)	0,035
aktivnost FAS v kontrolnem tkivu (nizka vs. visoka)	2,206 (0,856–5,684)	0,101

Nizka aktivnost FAS v kontrolnem tkivu ni neodvisno povezana s krajšim preživetjem ( $p = 0,101$ ). Njegovo napovedno vrednost povsem zadovoljivo opišeta že stadij bolezni in izguba telesne teže.

#### 4.2.2.6 Aktivnost FAS in aktivnost lipoproteinske lipaze

LPL je poglavitni encim, ki skrbi za presnovo trigliceridov v krvnem obtoku. Sintetizira se v tkivih, od koder se prenese na površino endotelija žil. Uravnavanje sinteze in aktivnosti LPL omogoča tkivom z velikimi presnovnimi potrebami učinkovito črpanje lipidov iz krvnega obtoka (26).

Zoran Trošt in sod. (26) so raziskovali aktivnost LPL in njen prognostičen pomen pri bolnikih z NSCLC. Ugotovili so, da je aktivnost LPL večja v tumorskem kot v kontrolnem pljučnem tkivu, zaradi česar rakavo tkivo lažje črpa lipide iz krvi kot nerakavo tkivo. To je potencialni mehanizem s katerim si tumor poveča eksterno preskrbo z lipidi, ki predstavljajo vir energije in gradnike za sintezo lipidnih komponent za celično rast. Večja je bila aktivnost LPL v rakavem tkivu, slabše je bilo preživetje takega bolnika.

Primerjali smo aktivnost LPL z aktivnostjo FAS in našli sledečo povezavo: višje razmerje aktivnosti LPL v tumorju glede na kontrolno tkivo je bilo povezano z višjo aktivnostjo FAS v tumorju ( $r = 0,4563$ ;  $p = 0,0035$ ) in nižjo aktivnostjo FAS v kontrolnem tkivu ( $r = -0,4429$ ;  $p = 0,0047$ ) ter višjim razmerjem aktivnosti FAS v tumorju glede na kontrolno tkivo ( $r = 0,4435$ ;  $p = 0,0047$ ).

Večja aktivnost LPL in FAS v tumorju vodita v povečano eksterno preskrbo rakavih celic z lipidi in povečano intracelularno sintezo višjih maščobnih kislin, kar je odraz povečanih potreb hitro rastočih rakavih celic. Kontrolno tkivo je posledično zapostavljeno zaradi slabše eksterne preskrbe (zaradi nizke aktivnosti LPL) in zaradi slabe

intracelularne sinteze višjih maščobnih kislin (zaradi nizke aktivnosti FAS). Kontrolno tkivo strada za razliko od rakavega, ki je dobro preskrbljeno. Tako stanje napoveduje bolniku krajše preživetje.

## 5 SKLEP

V raziskavi smo uspešno razvili postopek merjenja aktivnosti FAS izluženega iz pljučnih rakavih in kontrolnih tkiv 42 bolnikov. Glavna prednost razvite metode je v tem, da encima ni bilo potrebno izolirati, saj za meritve aktivnosti nismo rabili čistega sistema. To je močno poenostavilo samo pripravo vzorca, skrajšalo čas dela in zmanjšalo stroške. Tudi reagentov nismo pripravljali sami, saj so bili ti komercialno dostopni. Pri delu za razliko od ostalih metod ni bilo potrebno uporabljati izotopov ali drugih radioaktivno označenih snovi, zaradi česar je bila metoda povsem varna. Uspelo nam je torej razviti enostavno, varno in hitro metodo za merjenje aktivnosti FAS *in vivo*. Razvita metoda bo sedaj lahko omogočila široko preučevanje aktivnosti FAS v tumorju in njegove vloge pri tumorski rasti.

S postopkom smo dokazali za 28 % večjo aktivnost FAS v rakavem pljučnem tkivu kot v sosednjem, navidezno zdravem pljučnem tkivu istega bolnika, kar pa ni bilo statistično signifikantno. S primerjanjem aktivnosti FAS med različnimi tipi pljučnega raka smo potrdili večjo aktivnost FAS pri adenokarcinomih kot pri neadenokarcinomih. Našli smo obratno sorazmerno povezavo med aktivnostjo FAS v tumorju z BMI, in tudi s koncentracijo trigliceridov v serumu in obratno sorazmerno povezavo med aktivnostjo FAS v kontrolnem tkivu z uživanjem alkohola. Signifikantni kazalci slabega preživetja so bili: izguba telesne teže, višji stadij bolezni in nižja aktivnost FAS v kontrolnem pljučnem tkivu.

Našli smo zanimivo povezavo med aktivnostjo FAS in LPL. Zaradi velikih presnovnih potreb se rakave celice poslužujejo tkivno specifičnega uravnavanja njune sinteze in s tem tudi aktivnosti. Nadvse zanimivo bi bilo nadaljnje preučevanje vloge in povezanosti LPL in FAS pri energetski preskrbi rakavih celic, saj predstavljata morebitno pomembno diagnostično, prognostično in terapevtsko orodje.



## 6 LITERATURA

1. Andriani F., Conte D., Mastrangelo T., Leon M., Ratcliffe C., Roz L., Pelosi G., Goldstraw P., Sozzi G., Pastorino U.: *Detecting lung cancer in plasma with the use of multiple genetic markers*. International Journal of Cancer 2004; 108: 91–96.
2. *Smernice za diagnostiko in zdravljenje bolnikov z rakom pljuč*, 2006, Ur. Zwitter Matjaž.
3. Mitja Košnik: *Bolezni dihal*, tretja izdaja, Interna medicina, 2005, Ur. A. Kocijančič, F. Mrevlje, D. Štajer, Littera picta, str. 348–354.
4. Gil Lionel, Marta Adonis: *Genomics and proteomics offers new hopes towards a personalized approach to lung cancer prevention and treatment*. Electronic Journal of Biotechnology 2003; 6: 3.
5. Kobal, Alfred Bogomir: *Vpliv rudnika živega srebra na zdravje rudarjev in prebivalcev Idrije*. Sanitas et labor 2001, letn. 2, št.1, str. 143–153.
6. Small cell carcinoma. <http://adam.about.com/encyclopedia/Small-cell-carcinoma.htm> (23. 4. 2008).
7. Squamous cell carcinoma. <http://adam.about.com/encyclopedia/Squamous-cell-carcinoma.htm> (23. 4. 2008)
8. Lung cancer. The Immune Recovery Clinic of the Immune Recovery Foundation <http://www.immunerecovery.net/Lung%20Cancer.htm> (23. 4. 2008).
9. Andrej Debeljak, Nadja Triller, Peter Kecelj, Vera Pompe-Kirn, Tomaž Rott, Katarina Osolnik in sod.: *Smernice za internistično obravnavo bolnika s pljučnim rakom*. Uradno stališče Združenja pulmologov Slovenije, Zdravniški vestnik, letnik 70, dec 2001, št. 12, str. 721–794.

10. Kuhajda FP: *Fatty acid Synthase and Cancer: New application of an old pathway*. Cancer Research 2006; 66: 5977–5980.
11. T. Mashima, H. Seimiya, T. Zsuruo: *De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy*. British Journal of Cancer 2009; 100; 1369–1372.
12. Černe D: *Lipoprotein lipase activity and gene expression in lung cancer and in adjacent noncancer lung tissue*. Experimental lung research 2007; 33: 217–225.
13. Kuhajda FP: *Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase*. PNAS 2000; 97: 3450 – 3454.
14. Donna R. Weiss, J. Fraser Glickman: *Characterization of fatty acid synthase activity using scintillation proximity*. ASSAY and Drug Development Technologies 2003; 1: 1–2.
15. Christine C. Chung, Kenji Ohwaki, Jonathan E. Schneeweis, Erica Stec in sod.: *A fluorescence-based thiol quantification assay for ultra-high-throughput screening for inhibitors of coenzyme a production*. ASSAY and Drug Development Technologies 2003; 1: 1–2.
16. Nathan W. Bays, Armetta D. Hill, Ilona Kariv: *A simplified scintillation proximity assay for fatty acid synthase activity: development and comparison with other FAS activity assay*. Journal of Biomolecular Screening 2009.
17. Sobin LH, Wittekind C.: *TNM Classification of Malignant Tumors*. 6 th ed Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2002.
18. Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK in sodlavci: *World Health Organization Classificaton of Tumours*. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon, France: IARC Press; 2004.

19. Rashid A, Pizer ES, Moga M, Miligraum LZ, Zahurak M, Pasternack GR, Kuhajda FP, Hamilton SR: *Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia*. Am J Pathol, 1997 Jan; 150 (1): 201–208.
20. Swinnen JV, Esquenet M, Goossens K, Heyns W, Verhoeven G: *Androgens stimulate fatty acid synthase in the human prostate cancer cell line LNCaP*. Cancer Res. 1997 Mar 15; 57 (6): 1086–1090.
21. Chalbos D, Chambon M, Ailhaud G, Rochefort H: *Fatty acid synthetase and its mRNA are induced by progestins in breast cancer cells*. J Biol Chem. 1987 Jul 25; 262 (21): 9923–9926.
22. Wang Y, Zhang X, Tan W, Fu J, Zhang W: *Significance of fatty acid synthase expression in non-small cell lung cancer*. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. 2002 May; 24 (3): 271–273.
23. Wang Y, Zhang X, Tan W, Fu J, Zhang W: *Prognostic value of expression of FASE, Her-2/neu, bcl-2 and p53 in stage I non-small cell lung cancer*. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. 2004 Jun; 26 (6): 369–372.
24. Visca P, Sebastiani V, Botti C, Diodoro MG, Lasagni RP, Romagnoli F, Brenna A, De Joannon BC, Donnorso RP, Lombardi G, Alo PL: *Fatty acid synthase (FAS) is a marker of increased risk of recurrence in lung carcinoma*. Anticancer Res. 2004 Nov-Dec; 24 (6): 4169–4173.
25. Zoran Trost, Miha Sok, Janja Marc, Darko Černe: *Increased lipoprotein lipase activity in non-small cell lung cancer tissue predicts shorter patient survival*. Archives of Medical Research 2009.