

Akademia Medyczna w Gdańsku
Katedra i Zakład Biochemii AMG

Narcyz Knap

**Oczyszczanie białka wiążącego kwasy tłuszczowe z wątroby ludzkiej,
otrzymywanie specyficznych przeciwciał przeciwko temu białku i ich
zastosowanie w metodzie ELISA**

Praca na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: Prof. dr hab. med. Julian Świerczyński

Kierownik Katedry i Zakładu Biochemii

Akademii Medycznej w Gdańsku

Gdańsk 2005

Spis treści

1.	Wykaz stosowanych skrótów	5
2.	Wstęp	9
3.	Cele pracy	27
4.	Materiały	28
4.1.	Odczynniki	28
4.1.1.	Bufor AP z substratami dla alkalicznej fosfatazy stosowany w technice Western-blotting i dot-blotting.	28
4.1.2.	Bufor do transferu mokrego	28
4.1.3.	Bufor węglanowy do testu ELISA	29
4.1.4.	Bufor do płukania płytki ELISA	29
4.1.5.	Bufor blokujący do testu ELISA.....	29
4.1.6.	Bufor z substratem dla AP stosowany w metodzie ELISA	29
4.2.	Materiał biologiczny	30
4.2.1.	wątroba ludzka	30
4.2.2.	serce ludzkie.....	30
4.2.3.	kwę.....	30
4.2.4.	żółć	30
4.3.	Zwierzęta doświadczalne	31
4.3.1.	króliki	31
4.3.2.	szczury rasy Wistar	31
5.	Stosowane metody	32
5.1.	Izolacja L-FABP z wątroby ludzkiej.....	32
5.1.1.	Homogenizacja wątroby ludzkiej.....	32
5.1.2.	Otrzymywanie ekstraktu wątrobowego.....	32
5.1.3.	Otrzymywanie frakcji cytosolu wątrobowego	32
5.1.4.	Denaturacja termiczna frakcji cytosolu wątrobowego.....	32
5.1.5.	Delipidacja denaturowanej termicznie frakcji cytosolu wątrobowego 33	
5.1.6.	Sączenie molekularne na żelu Sephadex G-50 Superfine.....	33
5.1.7.	Analiza elektroforetyczna białka metodą SDS-PAGE.....	34
5.1.8.	Test wiązania wolnych kwasów tłuszczowych z białkiem	36
5.1.9.	Liofilizacja	37

5.1.10.	Sączenie molekularne na żelu BioGel P-10.....	37
5.1.11.	Ultrafiltracja	38
5.1.12.	Ocena homogenności białka metodą SDS-PAGE na żelu gradientowym.....	38
5.1.13.	Chromatografia jonowymienna – DEAE Sephadex A-25	40
5.1.14.	Elektroforeza preparatywna	41
5.2.	Produkcja poliklonalnych przeciwciał anti-L-FABP	42
5.2.1.	Pobranie surowicy „zerowej” (kontrola negatywna)	42
5.2.2.	Pierwsza dawka antygeny (dzień 0.).....	43
5.2.3.	Pierwsza dawka przypominająca (dzień 28.).....	43
5.2.4.	Druga dawka przypominająca (dzień 56.)	43
5.2.5.	Skrwawienie królika (dzień 70.)	43
5.2.6.	Immunodetekcja specyficznych przeciwciał anti-L-FABP metodą dot-blotting	44
5.2.7.	Izolacja immunoglobulin IgG z surowicy królika	45
5.2.8.	Kontrola specyficzności otrzymanych immunoglobulin anti-L-FABP 46	
5.2.9.	Kontrola czułości otrzymanych immunoglobulin anti-L-FABP.....	48
5.3.	Ilościowe oznaczanie L-FABP w materiale biologicznym metodą kompetycyjnego testu ELISA	51
5.4.	Model zwierzęcy ostrej niewydolności wątroby indukowanej galaktozaminą	56
6.	Analiza statystyczna.....	58
7.	Wyniki.....	59
7.1.	Oczyszczanie białka wiążącego kwasy tłuszczowe z wątroby ludzkiej	59
7.1.1.	Rozdział denaturowanej termicznie frakcji cytosolu wątroby ludzkiej na kolumnie Sephadex G-50	59
7.1.2.	Analiza elektroforetyczna białka metodą SDS-PAGE.....	60
7.1.3.	Test wiązania wolnych kwasów tłuszczowych z białkiem	60
7.1.4.	Sączenie molekularne na żelu BioGel P-10.....	61
7.1.5.	Ocena homogenności białka zebranego z kolumny BioGel P-10 metodą SDS-PAGE na żelu gradientowym	62
7.1.6.	Chromatografia jonowymienna – Sephadex A-25.....	63

7.1.7.	Elektroforetyczna analiza frakcji zebranych z kolumny jonowymiennej Sephadex A-25	64
7.1.8.	Elektroforeza preparatywna	65
7.2.	Otrzymywanie specyficznych przeciwciał przeciwko izoformie wątrobowej białka wiążącego kwasy tłuszczowe	66
7.2.1.	Immunodetekcja specyficznych przeciwciał anty-L-FABP metodą dot-blotting	66
7.2.2.	Kontrola specyficzności otrzymanych immunoglobulin anty-L-FABP 67	
7.2.3.	Kontrola czułości otrzymanych immunoglobulin anty-L-FABP	68
7.3.	Zastosowanie przeciwciał w metodzie ELISA do oznaczania izoformy wątrobowej ludzkiego białka wiążącego kwasy tłuszczowe w materiale biologicznym	69
7.3.1.	Kompetycyjny test ELISA	69
7.3.2.	Określenie czułości metody	70
7.3.3.	Określenie powtarzalności metody	71
7.3.4.	Określenie dokładności metody	72
7.3.5.	Kontrola specyficzności narządowej immunoglobulin anty-L-FABP	72
7.3.6.	Kontrola specyficzności gatunkowej immunoglobulin anty-L-FABP 73	
7.3.7.	Oznaczanie L-FABP w ekstrakcie wątroby ludzkiej	73
7.3.8.	Oznaczanie L-FABP w żółci	76
7.3.9.	Oznaczanie L-FABP w surowicy krwi chorych z potwierdzoną laboratoryjnie patologią wątroby	79
7.3.10.	Oznaczanie L-FABP w surowicy krwi chorych ze stwierdzoną klinicznie ostrą niewydolnością wątroby	83
7.3.11.	Oznaczanie L-FABP w surowicy krwi szczurów z ostrą niewydolnością wątroby indukowaną galaktozaminą	87
7.3.12.	Oznaczanie L-FABP w surowicy krwi chorych z przewlekłą niewydolnością nerek	88
8.	Dyskusja	90
9.	Streszczenie	107
10.	Wnioski	109
11.	Piśmiennictwo	110

1. Wykaz stosowanych skrótów

ACBP – białko wiążące acylo-koenzym A (z ang. acyl-CoA-binding protein)

A-FABP – izoforma białka wiążącego kwasy tłuszczowe charakterystyczna dla tkanki tłuszczowej (z ang. Adipocyte Fatty Acid Binding Protein)

Ala – alanina

AlAT – aminotransferaza alaninowa (GPT)

AP – fosfataza alkaliczna (z ang. Alkaline Phosphatase)

APS – nadsiarczan amonu (z ang. Amonium Persulphate)

Asn – asparagina

Asp – asparaginian

AspAT – aminotransferaza asparaginianowa (GOT)

ATP – trifosforan adenozyne

BCIP – Bromo-Chloro-Indolylo-Phosphate

B-FABP – izoforma mózgowa białka wiążącego kwasy tłuszczowe (z ang. Brain Fatty Acid Binding Protein)

BioGel P-10 – poliakrylamid stosowany jako żel do sączenia molekularnego

BSA – albumina bydlęca (z ang. Bovine Serum Albumine)

C/EBP – białko wiążące sekwencję wzmacniającą CCAAT (z ang. CCAAT/Enhancer-Binding Protein)

CCAAT – sekwencja wzmacniająca, występująca w regionach promotorowych wielu genów, która odwracalnie wiąże białko C/EBP

Coomassie Brilliant Blue R-250 – barwnik stosowany do detekcji białka

CRABP – białko wiążące kwas retinowy (z ang. Cellular Retinoic Acid Binding Protein)

CRBP – białko wiążące retinol (z ang. Cellular Retinol Binding Protein)

Cys – cysteina

DEAE Sephadex A-25 – pochodna polimeru dekstranu (Diethylaminoethyl Sephadex) o właściwościach wymiennicza anionowego stosowana w chromatografii

DHFA – Dihydro-Formamid

E-FABP – izoforma naskórkowa białka wiążącego kwasy tłuszczowe (z ang. Epidermal Fatty Acid Binding Protein)

ELISA – Enzymatyczny Test Immunoadsorpcji (z ang. Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

EPA – kwas eikozapentaenowy (z ang. Eicosapentaenoic Acid)

FAAR – receptor aktywowany przez kwas tłuszczowy (z ang. Fatty Acid-Activated Receptor)

FABP – białko wiążące kwasy tłuszczowe (z ang. Fatty Acid Binding Protein)

FABP_{pm} – błonowe białko wiążące kwasy tłuszczowe (z ang. Plasma Membrane Fatty Acid Binding Protein)

FARE – sekwencja odpowiedzi na kwas tłuszczowy (z ang. Fatty Acid Response Element)

FasL – ligand receptora FasR (CD95L)

FasR – receptor Fas (Fas, CD95)

FAT – translokaza kwasów tłuszczowych (z ang. Fatty Acid Translocase)

FATP – białko transportujące kwasy tłuszczowe (z ang. Fatty Acid Transport Protein)

FFA – wolny kwas tłuszczowy (z ang. Free Fatty Acid)

GGTP – gamma-glutamylotranspeptydaza

GRE – sekwencja odpowiedzi na glukokortykoidy (z ang. Glucocorticoid Response Element)

HDL – lipoproteina o wysokiej gęstości (z ang. High Density Lipoprotein)

H-FABP – izoforma sercowa białka wiążącego kwasy tłuszczowe (z ang. Heart Fatty Acid Binding Protein)

Hsp – białko szoku termicznego (z ang. Heat Shock Protein)

I-FABP – izoforma jelitowa białka wiążącego kwasy tłuszczowe (z ang. Intestinal Fatty Acid Binding Protein)

I-LBP – izoforma białka wiążącego kwasy tłuszczowe charakterystyczna dla jelita krętego (z ang. Ileal Lipid Binding Protein)

Immobilon P – membrana (Polyvinylidene Difluoride Membrane) stosowana w technice Western-blotting

KCl – chlorek potasu

kD – kiloDalton (kilojednostka masy atomowej)

LDL – lipoproteina o niskiej gęstości (z ang. Low Density Lipoprotein)

L-FABP – izoforma wątrobowa białka wiążącego kwasy tłuszczowe (z ang. Liver Fatty Acid Binding Protein)

L-FABP-SSG – białko L-FABP związane z glutationem przez mostek dwusiarczkowy

Lipidex 1000 – Hydroxyalkoxypropyl Dextran Type VI (złoże lipofilne)

LXR α – receptor jądrowy aktywowany przez oksysterol, tzw. wątrobowy receptor X (z ang. Liver X Receptor)

Met – metionina

M-FABP – izoforma mielinowa białka wiążącego kwasy tłuszczowe (z ang. Myelin Fatty Acid Binding Protein)

MgCl $_2$ – siarczan magnezu

mRNA – informacyjny kwas rybonukleinowy

n – liczebność populacji statystycznej

Na $_2$ CO $_3$ – dwuzasadowy węglan sodowy

NaCl – chlorek sodu

NaHCO $_3$ – jednozasadowy węglan sodowy

NaN $_3$ – azyd sodu

NBT – Nitro Blue Tetrazolium

NMR – magnetyczny rezonans jądrowy (z ang. Nuclear Magnetic Resonance)

OD – gęstość optyczna (absorbancja), z ang. Optical Density

PA-FABP – białko wiążące kwasy tłuszczowe związane z łuszczyką (z ang. Psoriasis-Associated Fatty Acid-Binding Protein)

PBS – buforowany roztwór soli fizjologicznej (z ang. Phosphate Buffered Saline)

pH – odczyn kwasowości

pI – punkt izoelektryczny

pNPP – fosforan *para*-nitrofenolu (z ang. para-NitroPhenyl Phosphate)

PPAR – receptor aktywowany przez proliferator peroksysomalny (z ang. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor)

PPRE – czynnik odpowiedzi na proliferator peroksysomalny (z ang. Peroxisome Proliferator Response Element)

RIA – test radioimmunochemiczny (z ang. Radioimmunoassay)

rozdz. – rozdział lub podrozdział niniejszego opracowania

RXR – receptor retinoidowy X (z ang. Retinoid Receptor X)

SAS – powierzchnia białka dostępna dla rozpuszczalnika (z ang. Solvent Accessible Surface)

SCP – białko przenoszące sterol (z ang. Sterol-Carrier Protein)

SD – odchylenie standardowe

SDS – Siarczan Dodecyłu Sodowy (z ang. Sodium Dodecyl Sulphate)

SDS-PAGE – Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym (z ang. Sodium Dodecyl Sulphate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

SEM – standardowy błąd średniej arytmetycznej

Sephadex G-50, G-25 – polimer dekstranu stosowany jako żel do sączenia molekularnego

TEMED – N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

T-FABP – izoforma jądrowa białka wiążącego kwasy tłuszczowe (z ang. Testicular Fatty Acid Binding Protein)

Thr – treonina

Trizma @base – 2-amino-2-(hydroksymetylo)-1,3-propandiol

Tween 20 – Polyethylene glycol sorbitan monolaurate

Tyr – tyrozyna

V₀ – objętość próżna kolumny chromatograficznej

V_e – objętość elucji, tj. całkowita objętość eluatu uzyskana do określonej frakcji (włącznie)

V_f – objętość frakcji zbieranych z kolumny chromatograficznej

VLDL – lipoproteina o bardzo niskiej gęstości (z ang. Very Low Density Lipoprotein)

V_S – objętość wyjściowa próbki rozdzielanej metodą chromatografii kolumnowej

vs. – w porównaniu z (z łac. *versus*)

V_T – całkowita objętość złoża w kolumnie chromatograficznej

2. Wstęp

Metabolizm lipidów ma fundamentalne znaczenie dla struktury i funkcji komórki. Związki chemiczne należące do tej grupy są z definicji nierozpuszczalne lub słabo rozpuszczalne w wodzie. W organizmie człowieka występują białka, które mogą odwracalnie wiązać niektóre lipidy, jak kwasy tłuszczowe, triacyloglicerole, fosfolipidy, cholesterol i jego estry, hormony steroidowe czy witaminy rozpuszczalne w tłuszczach. Klasyfikacja białek wiążących lipidy jest niedoskonała i ma charakter akademicki. Zwykle wyróżnia się wysoce niejednorodną grupę zewnątrzkomórkowych transporterów związków lipidowych, do której należą, m.in. albumina, lipoproteiny osocza krwi, α -fetoproteina, białko wiążące witaminę D, lipokaliny z β -laktoglobuliną, oraz specyficzne białka wiążące hormony płciowe. Grupa błonowych białek wiążących kwasy tłuszczowe obejmuje, m.in. FABP_{pm}, FAT, FATP, które biorą udział w transporcie kwasów tłuszczowych przez błonę cytoplazmatyczną. Wreszcie do wewnątrzkomórkowych białek wiążących lipidy zalicza się, m.in. białko wiążące acylo-CoA (ACBP), białko przenoszące sterole (SCP-2), S-transferazę glutationu, białko szoku termicznego Hsp70 oraz grupę cytosolowych białek wiążących kwasy tłuszczowe (FABP), do których ze względu na podobieństwo strukturalne zalicza się również białka komórkowe wiążące retinol lub kwas retinowy (CRBP i CRABP) [1–4]. W środowisku wodnym komórki, lipidy mogą być wiązane przez szereg różnych białek w zależności od rodzaju lipidu oraz specyfiki komórki bądź tkanki.

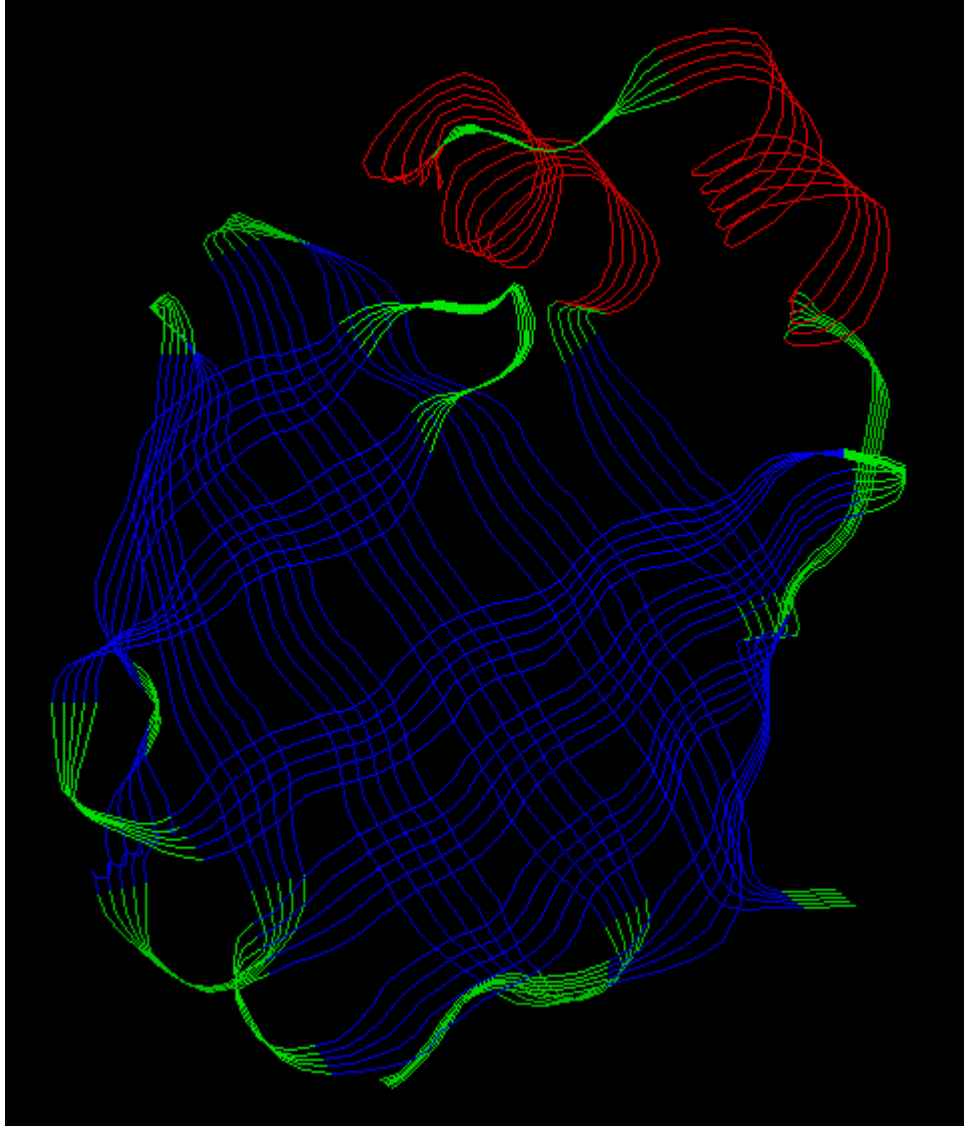
Badania nad rodziną białek wiążących kwasy tłuszczowe mają stosunkowo niedługą aczkolwiek ugruntowaną tradycję. W 1972 r. Robert Ockner i wsp. [5] opublikowali pierwsze doniesienie na temat białek wiążących kwasy tłuszczowe zlokalizowanych w śluzówce jelita, wątrobie, mięśniu sercowym i innych tkankach. Obecnie wyróżnia się przynajmniej 9 typów białek wiążących kwasy tłuszczowe, których nazwy bądź ich angielskie akronimy tworzone są w zależności od narządu lub tkanki, w których występują najbardziej obficie lub w których wykryto je po raz pierwszy (Tabela 1) [1,6]. Niektóre narządy zawierają rozmaite izoformy FABP w różnych typach komórek, jak np. mózg, nerka czy żołądek. Zdarza się, że kilka izoform FABP występuje w tej samej komórce, np. w enterocycie [1,4].

Tabela 1. Izoformy białek wiążących kwasy tłuszczowe (FABP) wraz z lokalizacją narządową w organizmie człowieka.

	Izoforma FABP	Lokalizacja narządowa
1.	L-FABP	wątroba, jelito, żołądek, nerka, prostata, trzustka, łożysko, płuco
2.	I-FABP	jelito, żołądek
3.	H-FABP	serce, aorta, mięsień szkieletowy, mięsień gładki, nerka, mózg, płuco, żołądek, łożysko, nadnercza, jądro, jajnik, gruczoł piersiowy
4.	A-FABP	tkanka tłuszczowa
5.	E-FABP	skóra, śródbłonek, mózg, soczewka oka, siatkówka
6.	I-LBP	jelito kręte, żołądek, jajnik, nadnercza
7.	B-FABP	mózg, komórki Browicza-Kupfera
8.	M-FABP	obwodowy układ nerwowy
9.	T-FABP	jądro

Białka wiążące kwasy tłuszczowe zbudowane są z pojedynczego łańcucha polipeptydowego (o masie cząsteczkowej 14 – 15 kD), złożonego ze 127 - 135 reszt aminokwasowych. Struktura trzeciorzędowa białek FABP jest wysoce konserwatywna pomimo tego, że homologia sekwencji aminokwasowej pomiędzy różnymi izoformami występującymi u człowieka wykazuje stosunkowo znaczącą rozbieżność 22% - 67% (wg analizy programem BLAST). Wszystkie izoformy FABP zbudowane są z 10 przeciwrównoległych β -wstążek zorganizowanych w 2 ortogonalne β -harmonijki oraz 2 krótkich α -helis tworzących razem charakterystyczną strukturę przestrzenną określaną mianem β -beczułki. Strukturę trzeciorzędową białka wiążącego kwasy tłuszczowe z wątroby szczura (82% homologii z ludzkim L-FABP) przedstawiono na ryc. 1.

Hydrofobowy ligand (np. kwas tłuszczowy) wiąże się z białkiem w wewnętrznej „kieszeni” strukturalnej wypełnionej wodą, która stanowi nawet do 10% objętości cząsteczki białka [1,4,7]. Związany z białkiem kwas tłuszczowy przyjmuje zazwyczaj konformację litery „U”. Wyjątkiem są białka I-FABP oraz A-FABP wymuszające bardziej prostoliniową strukturę związanego liganda [4,8,9]. Acylowy fragment kwasu tłuszczowego lokalizuje się wewnątrz białka FABP, gdzie stabilizują go wiązania hydrofobowe bocznych łańcuchów aminokwasów niepolarnych, natomiast hydrofilowa grupa karboksylowa jest stabilizowana siecią wiązań wodorowych tworzonych zwykle przez reszty argininy, tyrozyny, a w niektórych przypadkach treoniny oraz uporządkowane cząsteczki wody [4,6,8].



Ryc. 1. Struktura trzeciorzędowa białka L-FABP z wątroby szczura wygenerowana przy pomocy programu Rasmol v.2.6. Kolorem niebieskim zaznaczono β -wstążki, kolorem czerwonym α -helisy.

Obie α -helisy pełnią rolę strukturalnej „klapki” zamykającej „kieszę”, która oddziela hydrofobowy ligand od powierzchni dostępnej dla wody. Mechanizm wiązania liganda polega na jego wymianie z cząsteczkami wody wypełniającymi wewnętrzną „kieszę” wiążącą. Sugeruje się, że woda wypełniająca „kieszę” stabilizuje strukturę przestrzenną cząsteczki apo-białka, podobnie jak związany ligand stabilizuje strukturę holo-białka. Skład aminokwasowy „kieszni”, zbudowanej z aminokwasów tak polarnych jak i niepolarnych, determinuje rodzaj wiązanej liganda oraz powinowactwo z jakim wiąże się on z FABP. Wnikliwą analizę struktury przestrzennej izoform FABP umożliwiły badania krystalograficzne

[8,10–13]. Jednak trudności techniczne związane uzyskaniem formy krystalicznej niektórych białek, m.in. ludzkiej izoformy L-FABP, spowodowały że w ostatnich latach coraz częściej wykorzystuje się metodę magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) do analizy natywnej struktury przestrzennej białka FABP w roztworze [14–18].

Większość białek FABP wiąże długołańcuchowe kwasy tłuszczowe, chociaż niektóre izoformy wykazują zgoła inną specyfikę, jak chociażby białko I-LBP (gastrotropina) wiążące głównie kwasy żółciowe w jelicie krętym lub izoforma wątrobowa (L-FABP) wykazująca stosunkowo szerokie powinowactwo do ligandów hydrofobowych, m.in. kwasów tłuszczowych oraz ich estrów z L-karnityną, tioestrów z koenzymem A, fosfolipidów, soli kwasów żółciowych, bilirubiny, hemu, eikozanoidów, hormonów steroidowych, niektórych ksenobiotyków (bromosulfoftaleina) a także leków hipolipemicznych z grupy fibratów [4,6,19,20]. Zasadniczo białka FABP wiążą ligandy w stosunku molowym 1 : 1. Wyjątkiem jest białko L-FABP, które może wiązać kwasy tłuszczowe w stosunku molowym 2 : 1 [8]. W odniesieniu do białka H-FABP, niektóre publikacje szacują stechiometrię wiązania kwasów tłuszczowych na poziomie 0,5 : 1, co tłumaczy się skłonnością H-FABP do dimeryzacji [4,21,22].

Geny kodujące białka FABP są zlokalizowane u człowieka w chromosomach: 1, 2, 4, 5, 6, 8. Odznaczają się podobną strukturą, obejmującą 4 eksony oraz 3 introny. Sekwencja nukleotydowa genów białek FABP (z wyjątkiem T-FABP) jest znana. Najbardziej konserwatywny charakter wykazuje ekson 1, który prawdopodobnie koduje sekwencję polipeptydową warunkującą powinowactwo białek FABP do ligandów hydrofobowych. W regionach promotorowych genów kodujących białka FABP odkryto szereg sekwencji regulatorowych, m.in. PPRE, FARE, GRE oraz CCAAT, które odgrywają istotną rolę w regulacji ekspresji tych genów poprzez oddziaływanie z odpowiednimi czynnikami transkrypcyjnymi. Jądrowe czynniki transkrypcyjne biorące udział w regulacji ekspresji genów FABP mogą być bezpośrednio aktywowane przez rozmaite ligandy hydrofobowe, m.in. proliferatory peroksysomów, glikokortykosteroidy, kwasy tłuszczowe, kwasy żółciowe, prostaglandyny, leukotrieny [4,7,23]. Aktywowany przez hydrofobowy ligand czynnik transkrypcyjny, np. PPAR α (z ang. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) tworzy heterodimeryczny kompleks z receptorem retinoidowym (RXR α) i

w takiej postaci oddziałuje z odpowiednią sekwencją regulatorową promotora, w tym przypadku PPRE [2,24]. Z reguły czynniki transkrypcyjne modulujące ekspresję genów FABP oddziałują również z promotorami genów kodujących enzymy uczestniczące w metabolizmie lipidów. Wykazano, że receptor PPAR α występuje głównie w tkankach charakteryzujących się wysoką aktywnością β -oksydacji kwasów tłuszczowych, a więc w wątrobie, sercu, nerce, mięśniach szkieletowych i reguluje utlenianie kwasów tłuszczowych [23]. Konsekwencją aktywacji receptora PPAR α jest, m.in. indukcja ekspresji syntetazy acylo-CoA [25], palmitoilotransferazy karnitynowej I [26,27] i II [28], lipazy lipoproteinowej [29] oraz białka L-FABP [30,31], co prowadzi do wzrostu tempa β -oksydacji kwasów tłuszczowych zarówno peroksysomalnej, jak i mitochondrialnej [23]. Ponadto aktywny czynnik PPAR α stymuluje remodeling lipoprotein w hepatocycie i wydzielanie VLDL o mniejszej zawartości triacylogliceroli [32], a także indukuje transkrypcję m-RNA białek wchodzących w skład lipoprotein o dużej gęstości (HDL), tj. ApoA-I i ApoA-II [33,34]. Przypuszczalnie, obserwowana równolegle indukcja receptora jądrowego LXR α stymulującego konwersję cholesterolu do kwasów żółciowych [35], jak również wzrost ekspresji genu Mdr2 (kanalikowy translokator fosfolipidów) biorącego udział w procesie sekrecji żółci [36], może tłumaczyć obniżenie osoczowego poziomu potencjalnie miażdżycogennej frakcji cholesterolu LDL w trakcie terapii lekami hipolipemicznymi z grupy fibratów. Insulina powoduje zmniejszenie poziomu mRNA receptora PPAR α w hepatocycie, natomiast kwasy tłuszczowe i deksametazon wywierają przeciwny wpływ na poziom tego transkryptu [37]. Receptor PPAR γ charakterystyczny zwłaszcza dla tkanki tłuszczowej, choć występujący również w wątrobie, sercu, mięśniach i nerce, moduluje aktywności enzymatyczne związane z biosyntezą lipidów [24]. Głodzenie powoduje ponad 80% obniżenie poziomu mRNA receptora PPAR γ w mysich adipocytach, podczas gdy dieta bogatotłuszczowa powoduje prawie 50% wzrost poziomu tego transkryptu w tkance tłuszczowej [38]. Najbardziej rozpowszechniony w tkankach ssaków jest receptor PPAR δ , określany również mianem PPAR β lub FAAR, czyli receptor aktywowany przez kwasy tłuszczowe. Sugeruje się, że reguluje on ekspresję genów kodujących białka biorące udział w procesach transportu i aktywacji kwasów tłuszczowych, a więc również białka FABP [1,24,39]. Ponieważ poziom ligandów hydrofobowych oraz ich dostępność w jądrze

komórkowym jest zależna od poziomu białka FABP w komórce, uważa się że w pewnym stopniu występuje tu zjawisko autoregulacji ekspresji genu. Kwasy tłuszczowe, w zależności od długości łańcucha wodorowęglowego oraz stopnia nienasylenia, wykazują różne powinowactwo do czynników PPAR, podobnie jak z różnym powinowactwem wiążą się z białkami FABP. Zarówno wątrobowa izoforma L-FABP, jak i receptor PPAR α oraz PPAR δ charakteryzują się znamienne wyższym powinowactwem w stosunku do wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [6,40,41]. Wykazano, że kwas eikozapentaenowy (EPA - 20:5) szczególnie silnie aktywuje czynniki transkrypcyjne PPAR α i PPAR δ , a w konsekwencji katabolizm lipidów w komórce [42,43]. Przypuszcza się, że ten mechanizm może tłumaczyć korzystny wpływ wielonienasyconych ω -3 kwasów tłuszczowych (w tym EPA) na obniżenie poziomu triacylogliceroli w osoczu krwi człowieka [41].

Regulacja transkrypcji genów FABP jest złożona i w znacznym stopniu niejasna. Wiadomo natomiast, że duże znaczenie w tym procesie odgrywają ogólnoustrojowe mechanizmy neurohormonalne kontrolujące metabolizm lipidów. Udowodniono, że insulina powoduje wzrost poziomu mRNA białka A-FABP oraz L-FABP, zaś niedobór insuliny u szczurów z cukrzycą indukowaną streptozotocyną przeciwnie, powoduje zmniejszenie poziomu transkryptu w komórce [44]. Udokumentowano wpływ testosteronu i estrogenów na regulację poziomu L-FABP w wątrobie. Testosteron obniża, zaś estrogeny podwyższają poziom L-FABP w hepatocycie, natomiast testosteron podwyższa poziom H-FABP w mięśniach szkieletowych [2,45–48]. Wykazano również znaczący wpływ diety, a zwłaszcza ilości i jakości tłuszczu w diecie, na poziom niektórych białek FABP. Zwiększenie zawartości tłuszczu w diecie powoduje wzrost poziomu białka L-FABP w komórkach mięsnych wątroby oraz komórkach nabłonka jelita cienkiego. Podobnie wzrasta komórkowy poziom I-FABP w jelicie oraz H-FABP w mięśniach szkieletowych. Podawanie tranu zawierającego w przeważającej ilości nienasycone kwasy tłuszczowe powoduje większy wzrost poziomu L-FABP w wątrobie niż dieta bogata w olej kokosowy, zawierający głównie nasycone kwasy tłuszczowe [1,7,47,49–51]. Według niektórych doniesień trening fizyczny zwiększa poziom H-FABP w mięśniu sercowym oraz mięśniach szkieletowych, co może mieć związek z intensyfikacją katabolizmu kwasów tłuszczowych w mięśniach [3,47,51,52]. Udokumentowano związek niektórych chorób z modulacją poziomu białek wiążących kwasy

tłuszczowe w komórkach i tkankach. W niedoczynności tarczycy obserwuje się zmniejszenie ilości L-FABP w wątrobie, natomiast zwiększenie w naczynności gruczołu tarczowego [53]. Nadciśnienie tętnicze powoduje wzrost poziomu H-FABP w sercu, zaś spadek w aorcie, a także spadek poziomu L-FABP w proksymalnym kanaliku nerki [4,54]. Badania kliniczne wykazały zmniejszenie ekspresji genu oraz spadek poziomu białka A-FABP w adipocytach chorych na cukrzycę insulinoniezależną [55,56]. Stwierdzono spadek poziomu H-FABP w aorcie królików hodowanych przez 16 tygodni na diecie miazdżycogennej [57]. W przebiegu marskości wątroby dysfunkcja hepatocytów wyraża się, m.in. zmniejszeniem stężenia L-FABP w cytosolu [4,58]. Podobnie w nowotworach wątroby i jelita grubego obniża się komórkowy poziom L-FABP [4]. Wreszcie znamienne wzrost ilości białka E-FABP w keratynocytach obserwuje się u chorych na łuszczycę, stąd pierwotnie nazwano tę izoformę PA-FABP (z ang. Psoriasis Associated-FABP), czyli białko wiążące kwasy tłuszczowe skojarzone z łuszczycą [4,59]. Wiele dowodów wskazuje na to, że regulacja komórkowego poziomu białek FABP odbywa się na poziomie transkrypcji odpowiednich genów, co przejawia się zmianą poziomu mRNA oraz modulacją aktywności czynników transkrypcyjnych. Istnieją również doniesienia na temat potranskrypcyjnej regulacji poziomu L-FABP. Besnard i wsp. [60] wykazali, że u ciężarnych samic szczura a także u samic w okresie laktacji, poziom wątrobowego białka L-FABP jest podwyższony, podczas gdy poziom odpowiedniego mRNA nie różni się lub jest nawet niższy w porównaniu do samic kontrolnych.

W przypadku niektórych genów FABP zaobserwowano zjawisko polimorfizmu. Dotyczy ono, m.in. genów kodujących I-FABP oraz H-FABP [1]. W plemienu północnoamerykańskich Indian *Pima* stwierdzono substytucję aminokwasową (Ala → Thr) w pozycji 54. łańcucha polipeptydowego białka I-FABP. Badania kliniczne populacji przeprowadzone przez Narodowy Instytut Zdrowia USA wykazały, że zarówno heterozygoty Thr⁵⁴/Ala⁵⁴, jak i homozygoty Thr⁵⁴/ Thr⁵⁴ charakteryzują się znamienne wyższym stężeniem wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu krwi po posiłku, w porównaniu z homozygotami Ala⁵⁴/ Ala⁵⁴. Być może jest to jedna z przyczyn wyższego odsetka przypadków otyłości oraz insulinooporności i cukrzycy typu II, stwierdzanych w tej grupie Indian [61]. W badaniach biochemicznych dowiedziono, że izoforma I-FABP (Thr⁵⁴) wykazuje większe powinowactwo do

kwasów tłuszczowych, co może tłumaczyć szybsze tempo wchłaniania kwasów tłuszczowych zawartych w diecie [1]. Doniesienia odnośnie polimorfizmu genu kodującego izoformę L-FABP są sprzeczne. Murphy i wsp. [62] oraz Schroeder i wsp. [40] sugerują, że dwa typy L-FABP wyizolowane z wątroby szczura, różniące się właściwościami biochemicznymi (wartość punktu izoelektrycznego, powinowactwo do ligandów hydrofobowych), są w istocie konformerami strukturalnymi powstałymi na drodze alternatywnego zwijania białka. Z kolei Di Pietro i wsp. [63] oraz Frolov i wsp. [64] podają, że w wątrobie szczura istnieją dwie izoformy L-FABP różniące się substytucją aminokwasową (Asn → Asp) w pozycji 105. łańcucha polipeptydowego. Nie wiadomo wszak, czy różnice w składzie aminokwasowym domniemanych izoform L-FABP wynikają rzeczywiście z polimorfizmu genu, alternatywnego składania RNA, edycji RNA czy być może modyfikacji potranslacyjnych. Aktualnie nie ma danych w piśmiennictwie dotyczących występowania potencjalnych izoform L-FABP w wątrobie dorosłego człowieka, aczkolwiek Das i wsp. [65] stwierdzili występowanie 3 izoform L-FABP w wątrobie ludzkiego płodu i wykazali, że ich wzajemna proporcja pozostaje stała pomiędzy 5. a 40. tygodniem ciąży. Schroeder i wsp. [40] sugerują, żeby warianty danej izoformy FABP określać mianem „alternatywnej formy białka” przynajmniej do czasu uzyskania dowodów na istnienie rzeczywistej różnicy w składzie aminokwasowym badanych wariantów. Weryfikacja niektórych doniesień wykazała bowiem, że stwierdzone metodą ogniskowania izoelektrycznego lub chromatografii jonowymiennej rzekome izoformy, były w istocie wynikiem modyfikacji potranslacyjnych polegających na utworzeniu mostków dwusiarczkowych z cysteiną lub glutationem. Hitomi i wsp. [66] wyizolowali z wątroby szczura alternatywną formę białka L-FABP związaną z glutationem poprzez cysteinę w pozycji 69. łańcucha polipeptydowego (Cys⁶⁹), która charakteryzowała się mniejszym powinowactwem względem nienasyconych kwasów tłuszczowych, przy niezmiennym powinowactwie do nasyconych kwasów tłuszczowych. Przypuszcza się, że fizjologiczna funkcja alternatywnej formy L-FABP (L-FABP-SSG) może być związana z regulacją metabolizmu kwasów tłuszczowych zależną od potencjału oksydoredukcyjnego hepatocyta. Fosforylacja białek FABP została udowodniona w odniesieniu do izoformy sercowej (H-FABP) obecnej w komórkach nabłonka gruczołu piersiowego lub sercu szczura i A-FABP izolowanej z mysiej

tkanki tłuszczowej. W każdym przypadku fosforylacja dotyczy tyrozyny w pozycji 19. (Tyr¹⁹) łańcucha polipeptydowego [67–69]. Znikomy udział tego wariantu białka w komórkowej puli FABP (do 1%) sugeruje, że fosforylacja ma znaczenie regulacyjne [40]. Istotnie, na modelu bezkomórkowym udokumentowano wzrost poziomu ufosforylowanej formy rekombinowanego białka A-FABP po inkubacji z izolowanym receptorem insulinowym [67]. Powyższe obserwacje potwierdziły badania fosforylacji H-FABP w odpowiedzi na insulinę prowadzone na modelu komórkowym [69]. Ponadto badania kinetyczne wykazały, że forma ufosforylowana A-FABP wykazuje mniejsze powinowactwo do kwasów tłuszczowych. Nie udało się natomiast wykazać fosforylacji L-FABP szczura, pomimo zastosowania bardzo precyzyjnych technik analitycznych, z sekwencjonowaniem białka i spektrometrią masową włącznie [40]. Należy pamiętać, że różnorodność wariantów FABP może wynikać z szeregu innych modyfikacji potranslacyjnych, jak np. amidacja/deamidacja, dekarboksylacja, N-acetylowanie dotycząca zwykle pierwszej metioniny (Met¹), selenylacja oraz alternatywne fałdowanie łańcucha polipeptydowego [4,40,70].

Białka FABP pełnią wiele istotnych funkcji w komórce, w zależności od izoformy i specyfiki tkankowej. Nie ulega wątpliwości, że ze względu na zdolność wiązania ligandów hydrofobowych, odgrywają ważną rolę w ich transporcie wewnątrzkomórkowym. Hipotezę tę potwierdzono w wielu doświadczeniach z zastosowaniem znakowanych kwasów tłuszczowych bądź ich fluorescencyjnych lub fotoreaktywnych analogów [71–73]. Wykazano, że w hodowli fibroblastów różnicujących się w kierunku adipocytów, nastąpił ponad 8-krotny wzrost zużycia oleinianu zsynchronizowany z indukcją genu białka A-FABP w dojrzałych adipocytach. Ponadto fotoreaktywny analog kwasu tłuszczowego był w znacznym stopniu wiązany przez izolowane z hodowli białko A-FABP [71]. Dodając białko wiążące kwasy tłuszczowe (izolowane z mięśni ryb) do cytosolu pozbawionego FABP, udokumentowano ponad 6-krotny wzrost współczynnika dyfuzji oleinianu [74]. McCormack i wsp. [75] udowodnili istotną rolę wątrobowej izoformy L-FABP w transporcie długołańcuchowych kwasów tłuszczowych pomiędzy liposomami a związaną z mikrosomami syntetazą acylo-CoA. Efektywność wiązania znakowanych radioaktywnie kwasów tłuszczowych z rekombinowanymi białkami szczura I-FABP oraz L-FABP mierzono również przy pomocy techniki rezonansu

magnetycznego [76,77]. W serii doświadczeń z hodowlą fibroblastów transfekowanych genem białka L-FABP (lub I-FABP) wykazano ponad dwukrotny wzrost fluorescencji w porównaniu z komórkami kontrolnymi, po inkubacji fibroblastów z fluoryzującymi analogami kwasów tłuszczowych [78–80]. Badania z zastosowaniem technik laserowych i fluorescencyjnych wykazały, że tempo cytoplazmatycznej dyfuzji znakowanego fluorescencyjnie analogu kwasu stearynowego znacznie wzrasta w hodowli hepatocytów izolowanych z wątroby szczurów traktowanych klofibratem, który indukuje ponad 4-krotny wzrost poziomu białka L-FABP w wątrobie. Milliano i wsp. [81] udowodnili, że L-FABP zwiększa wewnątrzkomórkową pulę mobilnych kwasów tłuszczowych, tj. związanych z białkiem, kosztem puli wolnych kwasów tłuszczowych immobilizowanych w błonach biologicznych. Prowadzi to do wzrostu gradientu wolnych kwasów tłuszczowych przez błonę plazmatyczną, co może mieć kluczowe znaczenie w mechanizmie ułatwionego transportu kwasów tłuszczowych do komórki. Białka wiążące kwasy tłuszczowe odpowiadają za dystrybucję długołańcuchowych kwasów tłuszczowych do określonych kompartmentów subkomórkowych, m.in. do mitochondriów, peroksosomów oraz retikulum endoplazmatycznego, w których są one metabolizowane [1,82]. Dostarczając lub usuwając niezbędne substraty/produkty do odpowiednich szlaków metabolicznych białka FABP wpływają pośrednio na aktywność katalityczną niektórych enzymów, m.in. syntetazy acylo-CoA czy dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej [40,65,75]. Ockner i wsp. [83] wykazali, że zastosowanie niemetalizowanego α -bromopalmitynianu, który kompetycyjnie hamuje wiązanie kwasów tłuszczowych z białkiem I-FABP, powoduje spadek estryfikacji znakowanego radioaktywnie oleinianu. Świadczy to o istotnej funkcji jaką pełni I-FABP w wewnątrzkomórkowym transporcie kwasów tłuszczowych i pośrednio w regulacji biosyntezy triacylogliceroli w nabłonku jelita cienkiego. Wykazano korelację pomiędzy poziomem H-FABP w dojrzewającym mięśniu a szybkością mitochondrialnej β -oksydacji [39,84]. Podobnie zaobserwowano, że tempo peroksyosomalnej β -oksydacji w izolowanych hepatocytach szczura koreluje dodatnio ze wzrostem poziomu L-FABP indukowanym przez fibraty [39,85].

Białka FABP stanowią swoisty cytosolowy bufor wolnych kwasów tłuszczowych. Stężenie niezwiązanych z białkiem, wolnych kwasów tłuszczowych w środowisku

wodnym cytoplazmy wynosi zaledwie 2 nM. Stężenie kwasów tłuszczowych związanych z białkiem H-FABP w kardiomiocycie wynosi ok. 2,5 μM , co oznacza że białko FABP zwiększa stężenie kwasów tłuszczowych w cytosolu ponad 1000-krotnie [47]. Szacuje się, że w zależności od stanu metabolicznego komórki, nawet do 60% kwasów tłuszczowych obecnych w cytosolu kardiomiocyta lub hepatocyta, może być związanych z odpowiednim białkiem FABP [86]. Zdolność buforowania nadmiaru wolnych kwasów tłuszczowych wydaje się mieć znaczenie cytoprotekcyjne. Wykazują one bowiem właściwości detergentów, w związku z czym mogą destabilizować błony biologiczne i w ten sposób uszkadzać komórkę [51]. Dowiedziono również, że nadmiar wolnych kwasów tłuszczowych może powodować rozprężenie fosforylacji oksydacyjnej w wątrobie szczura, a w konsekwencji spadek produkcji ATP [87]. Incydenty niedokrwienia mięśnia sercowego szczura prowadzą do wzrostu poziomu wolnych kwasów tłuszczowych w kardiomiocycie (najprawdopodobniej wskutek zahamowania β -oksydacji), które z kolei powodują rozprężenie fosforylacji oksydacyjnej, co klinicznie objawia się większą skłonnością do niemiaryowości serca [88]. Zaburzenia struktury i funkcji błon biologicznych indukowane przez kwasy tłuszczowe, mogą również przyczyniać się do hamowania aktywności błonowej ATP-azy Na^+/K^+ -zależnej oraz translokatora nukleotydów adeninowych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, a także zaburzenia przepuszczalności kanałów jonowych K^+ , Ca^{2+} , Cl^- [4]. Niekontrolowany wzrost stężenia wolnych kwasów tłuszczowych może ponadto powodować dysregulację metabolizmu komórkowego na drodze aktywacji/deaktywacji jądrowych czynników transkrypcyjnych [4]. Sugeruje się, że H-FABP pełni funkcję ochronną w kardiomiocycie zwłaszcza w warunkach stresu wywołanego procesami ischemii/reperfuzji [51,89]. Wykazano również, że białko H-FABP ułatwia adaptację komórki mięśnia szkieletowego do zwiększonego katabolizmu kwasów tłuszczowych indukowanego głodem lub treningiem fizycznym [51]. Rola cytoprotekcyjna białek FABP może być też związana z transportem hydrofobowych ksenobiotyków i tym samym pośrednim udziałem w procesach detoksykacji ustrojowych w wątrobie [24]. Niektóre doniesienia podają, że białka FABP mogą także pełnić funkcję ochronną jako zmiatacze wolnych rodników tlenowych, a zwłaszcza anionorodnika ponadtlenkowego, rodnika hydroksylowego i podchlorynu, przy czym fizjologiczna zdolność wiązania oleinianu

przez białko H-FABP preinkubowane w warunkach stresu oksydacyjnego spada jedynie o ok. 20% [4,90,91].

Znaczenie białek FABP w regulacji metabolizmu i sygnalizacji komórkowej nie budzi wątpliwości jeśli uwzględnimy fakt, że warunkują one stężenie oraz wewnątrzkomórkową dystrybucję ligandów aktywujących jądrowe czynniki transkrypcyjne z grupy PPAR lub C/EBP, przez co wywierają plejotropowy wpływ na metabolizm komórkowy, w tym procesy wzrostu i różnicowania komórkowego [7,41]. Udowodniono, że po związaniu kwasu linolowego białko L-FABP przemieszcza się z cytoplazmy do jądra komórkowego przekazując sygnał do indukcji mitozy, przy czym poziom L-FABP istotnie wzrasta w czasie mitozy tak w normalnych, jak i regenerujących się hepatocytach szczura [7,92,93]. Bordewick i wsp. [94] udokumentowali metodami immunohistochemicznymi obecność znakowanej złotem izoformy L-FABP w jądrach komórkowych hepatocytów szczura. Fahimi i wsp. [95] potwierdzili powyższe spostrzeżenia przy użyciu mikroskopu elektronowego. Wykazano, że komórki raka wątrobowokomórkowego transfekowane genem kodującym L-FABP charakteryzowały się ok. 3-krotnie wyższą aktywnością mitotyczną skorelowaną z niemal 5-krotnym wzrostem inkorporacji znakowanej radioaktywnie tymidyny, w porównaniu z komórkami transfekowanymi sekwencją kodującą antysensowny mRNA L-FABP. Ponadto w badaniach tych dowiedziono, że kwas linolowy stosowany jako stymulator syntezy DNA i aktywności mitotycznej komórki, nie działa bezpośrednio ale poprzez produkty reakcji katalizowanych przez cyklooksygenazę, jako że dodanie indometacyny znosiło promitotyczny wpływ kwasu linolowego [96,97]. Interesującym wydaje się fakt, że jedynie nienasycone kwasy tłuszczowe w odróżnieniu od nasyconych wywierały widoczny wpływ na indukcję syntezy DNA i aktywność mitotyczną komórek raka wątrobowokomórkowego [97]. Zaobserwowano również korelację cytosolowego poziomu białka A-FABP lub H-FABP, odpowiednio w różnicujących się adipocytach lub dojrzewającym mięśniem, ze stopniem zaawansowania tych procesów [39,71,84]. Ogólnie można stwierdzić, że geny izoform I-FABP, L-FABP, H-FABP oraz A-FABP ulegają ekspresji w pełni zróżnicowanych komórkach, które charakteryzują się wysokim poziomem metabolizmu lipidów [4,98–100]. Z kolei najwyższy poziom izoform B-FABP i M-FABP w komórce występuje w trakcie różnicowania, kiedy to komórki ośrodkowego

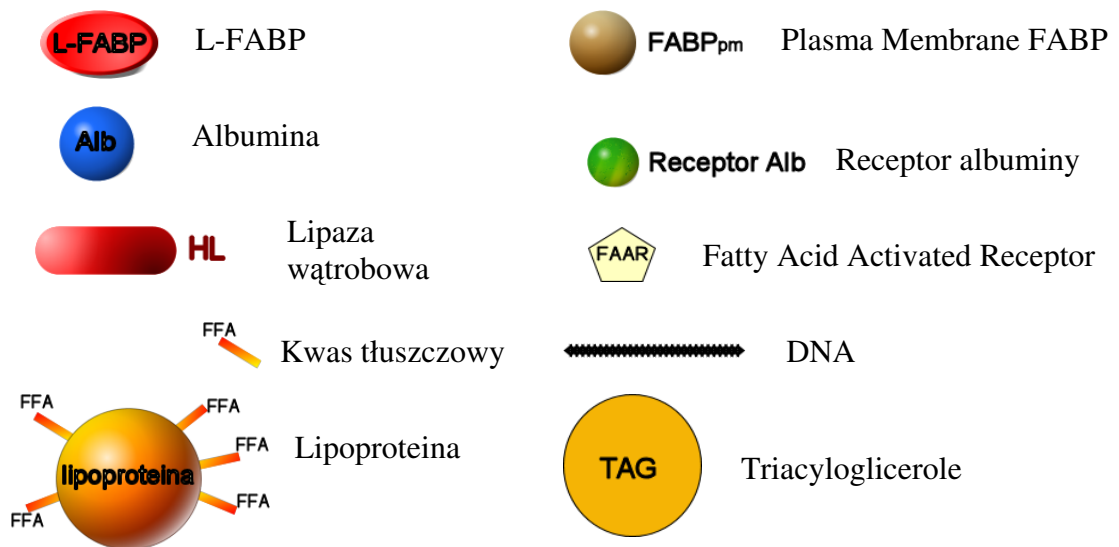
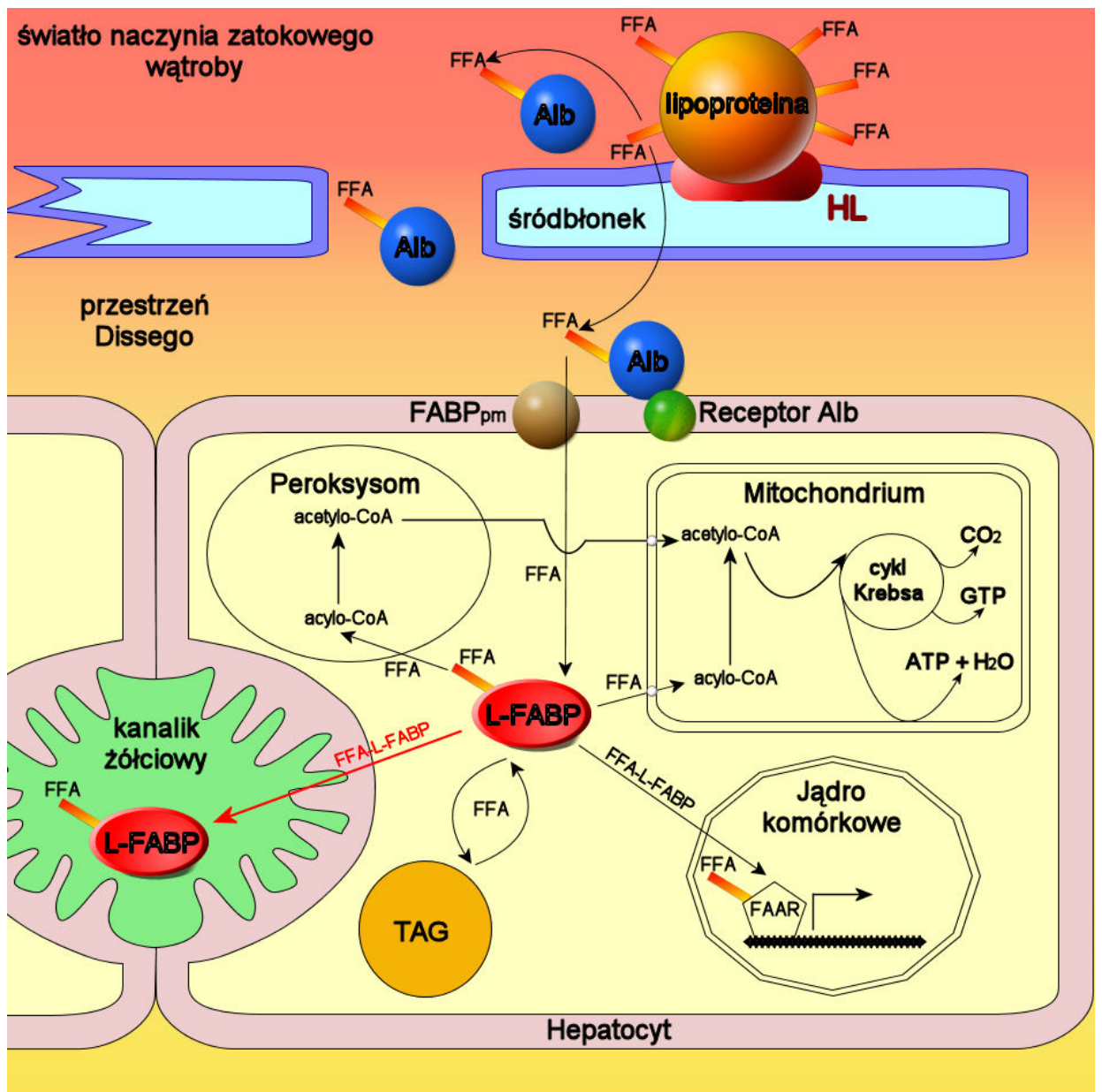
i obwodowego układu nerwowego zużywają znaczne ilości kwasów tłuszczowych w procesach biogenezy błon lipidowych [101–103]. Dobrze udokumentowane badania potwierdzają również ważną rolę białek I-FABP i L-FABP w determinacji składu fosfolipidowego błon biologicznych fibroblastów, co oczywiście wpływa pośrednio na strukturę i funkcję komórki [104].

Wiele hipotez dotyczących fizjologicznej funkcji białek FABP potwierdzono w badaniach na zwierzętach transgenicznych pozbawionych funkcjonalnego genu określonej izoformy FABP (tzw. genetyczny knockout). Wykazano ponad 50% spadek zużycia kwasów tłuszczowych przez kardiomiocyty izolowane z serca myszy z wyłączoną funkcją genu H-FABP a ponadto zaobserwowano remodeling błon fosfolipidowych w porównaniu z kontrolą [105]. Hepatocyty myszy z knockoutem genu L-FABP charakteryzowały się ponad 80% spadkiem wiązania kwasów tłuszczowych. Radioaktywność mięszu wątroby była znacząco niższa u myszy L-FABP (-/-) po dożylnym podaniu oleinianu znakowanego izotopem ^{14}C . Ponadto, u homozygot L-FABP (-/-) zamiennie wzrósł komórkowy poziom białka przenoszącego sterole (SCP-2), zaś komórki mięszowe wątroby zawierały znacznie więcej cholesterolu i jego estrów w porównaniu z osobnikami kontrolnymi [106]. Ablacja genu L-FABP powodowała również ponad 95% spadek wiązania znakowanego radioaktywnie oleilo-CoA w porównaniu z typem dzikim myszy L-FABP (+/+), pomimo tego że jednocześnie obserwowano u osobników transgenicznych wzrost poziomu białka wiążącego acylo-CoA (ACBP), nawet rzędu 80% [107]. Ostatnie doniesienia dowodzą, że knockout określonych genów kodujących izoformy FABP, nie powoduje wszak spodziewanych rozległych zmian fenotypowych i dramatycznych skutków patofizjologicznych u zwierząt transgenicznych. Prawdopodobnie przyczyną tego zjawiska jest kompensacyjna nadekspresja genów innych izoform FABP lub białek transportujących lipidy niespokrewnionych genetycznie z rodziną FABP [108].

Wśród białek wiążących kwasy tłuszczowe izoforma wątrobową L-FABP zajmuje pozycję szczególną, zarówno ze względu na swoje unikalne właściwości jak również kluczową rolę wątroby w metabolizmie ogólnoustrojowym. Białko L-FABP występuje u człowieka oraz wielu gatunków zwierząt, m.in. krowy, świni, szczura, myszy, świnki morskiej, ryb, drobiu, robaków, żab i owadów, wykazując bardzo wysoki stopień homologii międzygatunkowej, nawet powyżej 90% [2]. Wyjątkiem

jest białko L-FABP z wątroby rekina, które bardziej przypomina szczurzą izoformę sercową H-FABP, niż izoformy wątrobowe innych gatunków [109]. Porównanie sekwencji aminokwasowej ludzkiej i szczurzej izoformy L-FABP przy pomocy modułu „Blastp” programu „BLAST 2 Sequences” [110] zwraca wynik: 82% identyczności oraz 89% podobieństwa. W rozwoju ontogenetycznym człowieka poziom białka L-FABP w wątrobie jest mierzalny już w 16. dniu życia płodowego, po czym stopniowo wzrasta osiągając w 70. dniu życia niemowlaka wartość charakterystyczną dla człowieka dorosłego [85,111,112]. Szacuje się, że białko L-FABP stanowi od 3 do 5% wszystkich białek występujących w cytosolu hepatocyta [7,47].

Lokalizacja L-FABP w płaciku wątrobowym nie jest przypadkowa. Najwyższy poziom komórkowy L-FABP obserwuje się w przestrzeni okołowrotnej płacika wątrobowego. Poziom białka jak również odpowiedniego mRNA maleje stopniowo w kierunku strefy okołozylnej, gdzie osiąga wartość najniższą [2]. Należy pamiętać, że procesy związane z katabolizmem kwasów tłuszczowych, a zwłaszcza β -oksydacją kwasów tłuszczowych przebiegają najintensywniej właśnie w dobrze utlenowanej strefie okołowrotnej mięszu wątroby [113], bogatej w duże, wrzecionowate mitochondria [114], co może tłumaczyć kolokalizację białka L-FABP w tym obszarze. Dokładny mechanizm molekularny interakcji L-FABP z błoną fosfolipidową nie jest znany. Wydaje się, że w odróżnieniu od innych izoform FABP oddziałujących z błonami lipidowymi na drodze kolizji, ligandy wiązane przez L-FABP dyfundują z błony lipidowej do miejsca wiązania [39,115]. Wspomniana już zdolność izoformy L-FABP do wiązania wielu różnorodnych ligandów hydrofobowych sugeruje, że jej funkcja regulacyjna jest nie mniej istotna niż funkcja cytosolowego transportera kwasów tłuszczowych czy innych ligandów hydrofobowych. Stosunkowo niewiele wiadomo na temat udziału L-FABP w procesie wydzielania żółci w warunkach fizjologicznych oraz w patologii wątroby i dróg żółciowych. Można domniemywać, że wykazując wysokie powinowactwo do kwasów żółciowych, białko L-FABP mogłoby pełnić w drogach żółciowych ważną rolę transportową a także protekcyjną przed detergentopodobnym działaniem tychże kwasów na biegun żółciowy hepatocyta oraz komórki nabłonka dróg żółciowych. Schematyczny przegląd zasadniczych funkcji białka L-FABP w hepatocycie przedstawiono na ryc. 2.



Ryc. 2. Schematyczna ilustracja zasadniczych funkcji izoformy L-FABP w hepatocycie. Czerwona strzałka oznacza domniemaną rolę L-FABP w procesie wydzielania żółci, która jest przedmiotem badań opisanych w niniejszej rozprawie.

Nie należy zapominać, że białko L-FABP występuje również poza wątrobą, m.in. w żołądku, jelicie oraz kanalikule proksymalnym nerki [116]. Komórkowy poziom L-FABP w enterocycie wykazuje charakterystyczny gradient malejący od dwunastnicy do okrężnicy. Dystrybucja L-FABP w śluzówce jelita jest również charakterystyczna – najwyższe stężenie obserwuje się w enterocytach kosmków jelitowych, zaś najniższe w regionie krypt jelitowych [2,7].

Studium patofizjologicznej roli L-FABP w organizmie nie byłoby możliwe bez odpowiednich narzędzi biochemicznych przy pomocy których można oznaczyć białko w tkance lub narządzie, a ponadto odróżnić je od innych izoform FABP. Analiza jakościowa i ilościowa wątrobowego białka wiążącego kwasy tłuszczowe wydaje się być interesująca nie tylko ze względu na niewątpliwy walor poznawczy w świetle badań dotyczących patofizjologii wątroby i dróg żółciowych ale również ze względu na potencjalną użyteczność w diagnostyce klinicznej. Chociaż aspekt klinicznego zastosowania analizy immunochemicznej L-FABP wydaje się wciąż niedoceniony, w ostatnich latach pojawiło się kilka publikacji podnoszących ten problem. Suzuki i wsp. [117] wykazali, że niektóre pierwotne guzy wątroby zawierają białko L-FABP. Około 40% przypadków wątrobiaka płodowego i 20% przypadków raka wątrobowokomórkowego wybarwia się immunohistochemicznie w kierunku białka L-FABP. Ponadto, zaobserwowano pozytywną korelację pomiędzy stopniem zróżnicowania guza a intensywnością wybarwienia preparatu. Immunohistochemiczna analiza guzów okrężnicy wg Carrol i wsp. [118] wykazała od 30% do 60% przypadków L-FABP-pozytywnych. Wydaje się interesujące, że w niektórych preparatach zaobserwowano mozaikowy rozkład immunoznacznika, co oznacza że komórki gruczolaka lub gruczolakoraka różnicują się nierównomiernie w obrębie tego samego ogniska pierwotnego. Lawrie i wsp. [119] wykazali, że pozytywne barwienie immunohistochemiczne w kierunku L-FABP koreluje ze stopniem zróżnicowania guzów okrężnicy. W badaniach retrospektywnych zespołu Yamazaki i wsp. [120] udokumentowano, że niektóre guzy przerzutowe wątroby, z ogniskiem pierwotnym w okrężnicy, wykazują korelację dodatnią pomiędzy stopniem zróżnicowania histologicznego a intensywnością wybarwienia preparatów immunohistochemicznych w kierunku L-FABP. Około 56% guzów przerzutowych wątroby charakteryzowało się obecnością białka L-FABP w komórce. Obraz immunohistochemiczny guza przerzutowego i ogniska pierwotnego był zazwyczaj

porównywalny. Autorzy stwierdzają, że oznaczenie L-FABP w guzach przerzutowych wątroby pochodzących z okrężnicy może być przydatnym klinicznie czynnikiem prognostycznym.

Hashimoto i wsp. [121] wykazali immunohistochemicznie obecność izoformy L-FABP w ponad 95% przypadków metaplazji jelitowej oraz w ok. 38% przypadków raka żołądka, chociaż nie zaobserwowali korelacji pomiędzy progresją guza lub rokowaniem a ekspresją genu L-FABP. Wykazano kilkakrotny wzrost ekspresji genu L-FABP w komórkach raka prostaty uzyskanych z biopatów diagnostycznych. Sugeruje się, że białko L-FABP mogłoby być markerem agresywnego fenotypu raka prostaty [122]. Coraz większe zainteresowanie budzi możliwość oznaczania L-FABP w surowicy krwi jako markera patologii wątroby lub jelita, chociaż danych z piśmiennictwa dotyczącego tematu jest wciąż niewiele a ich przydatność kliniczna pozostaje wątpliwa [123–125]. Białka wiążące kwasy tłuszczowe mogą okazać się niezwykle istotne dla rozwoju parazytologii klinicznej. Warto uzmysłwić sobie, że wiele pasożytów nie potrafi syntetyzować kwasów tłuszczowych *de novo*, ponieważ w tym zakresie są one zależne od żywiciela, jak chociażby glisty, przywry lub tasiemce [1,126,127]. Z tego względu białka FABP pełnią w tych organizmach kluczową rolę metaboliczną. Pomimo znacznego podobieństwa sekwencji i struktury charakterystycznej dla organizmów wyższych, potencjalne epitopy nieciągłe, niewystępujące u ssaków, mogłyby posłużyć do opracowania szczepionki lub leku przeciwko białku wiążącemu kwasy tłuszczowe w organizmie pasożyta [128]. Przyszłościowo rozważa się więc możliwość badań klinicznych w kierunku immuno- i chemioterapii robaczyc przewodu pokarmowego celowanej na białko FABP określonego pasożyta [129].

Opisano wiele metod analizy ilościowej białek wiążących kwasy tłuszczowe. Można wśród nich wyróżnić, m.in. techniki chromatograficzne, elektroforetyczne, testy wiązania radioaktywnych lub fluoryzujących pochodnych kwasów tłuszczowych, spektrometrię masową czy wreszcie metody immunochemiczne, jak immunodyfuzja, test radioimmunochemiczny, fluoroimmunochemiczny, enzymatyczny test immunoadsorpcji czy niedawno opracowane modyfikacje testu ELISA z wykorzystaniem pola magnetycznego, elipsometrii spektralnej oraz biosensorów immunochemicznych [58,112,130–153]. Wydaje się jednak, że najbardziej

powszechną i praktyczną techniką w codziennej pracy laboratoryjnej pozostaje enzymatyczny test immunoadsorpcji, czyli ELISA.

Chociaż opracowano już wiele testów ELISA do detekcji białek wiążących kwasy tłuszczowe, w tym również izoformy wątrobowej tego białka (L-FABP), uzyskane wyniki różnią się niekiedy dość znacznie pomiędzy różnymi ośrodkami badawczymi [112,133–135,147–150]. Nie można zatem bezkrytycznie odnosić się do bezwzględnych wartości poziomu L-FABP w materiale biologicznym, podawanych w piśmiennictwie [3,4]. Aby móc prowadzić badania biochemiczne, fizjologiczne czy kliniczne związane z oceną zmiany poziomu L-FABP w narządach lub tkankach, wydaje się konieczne opracowanie wiarygodnej metody immunochemicznej, która umożliwiłaby obiektywną ocenę poziomu L-FABP w określonych warunkach biochemicznych lub klinicznych poprzez porównanie uzyskanych wyników z ustalonym wcześniej przy pomocy tej samej metody zakresem normy fizjologicznej. Dysponowanie autorską metodą analityczną zapewnia większą powtarzalność i porównywalność wyników w dłuższej perspektywie czasu, a co więcej pozwala na modyfikację wybranych parametrów metody, jak np. zakres detekcji lub granica czułości. Nie bez znaczenia w pracy badawczej jest również aspekt ekonomiczny. Takie właśnie przesłanki zdecydowały aby podjąć trud opracowania immunochemicznej metody detekcji L-FABP i wykonania oznaczeń w próbach materiału biologicznego wybranych w kontekście szeroko rozumianej patofizjologii wątroby i dróg żółciowych. Ponadto, na podstawie przesłanek z piśmiennictwa sugerujących kliniczną użyteczność oznaczania H-FABP w surowicy krwi, jako markera uszkodzenia kardiomiocyta (np. w zawale mięśnia serca) [142,147,154], wydawało się że L-FABP może być dobrym markerem uszkodzenia komórki wątroby. Przemawiały za tym również stosunkowo wysokie stężenia białka wiążącego kwasy tłuszczowe w wątrobie ludzkiej [58,133]. Zważywszy, że izoforma L-FABP jest białkiem o niskiej masie cząsteczkowej (ok. 15 kD), można przypuszczać, iż nawet niewielkie uszkodzenie wątroby powinno powodować uwolnienie znacznych ilości izoformy L-FABP do krwioobiegu.

3. Cele pracy

1. Oczyszczenie białka wiążącego kwasy tłuszczowe z wątroby ludzkiej w celu otrzymania specyficznych przeciwciał przeciwko temu białku.
2. Zastosowanie otrzymanych przeciwciał w metodzie ELISA do ilościowej analizy poziomu L-FABP:
 - a. w wątrobie ludzkiej,
 - b. w żółci chorych z patologią dróg żółciowych,
 - c. w surowicy krwi chorych z objawami patologii wątroby,
 - d. w surowicy krwi szczurów z indukowanym galaktozaminą ostrym uszkodzeniem wątroby.

4. Materiały

4.1. Odczynniki

Odczynniki zakupiono w firmie Sigma-Aldrich. Wyjątki od tej reguły opatrzone stosowną adnotacją.

4.1.1. Bufor AP z substratami dla alkalicznej fosfatazy stosowany w technice Western-blotting i dot-blotting.

Optimum pH dla jelitowej izoformy bydłczej alkalicznej fosfatazy wynosi 9,8. Ze względu na fakt, że taka wartość pH leży poza zakresem zdolności buforowej powszechnie stosowanego Tris, środowisko dla enzymu sporządzono na bazie dietanolaminy.

Bufor dietanolaminowy

10% (w/w) roztwór wodny dietanolaminy doprowadzono stężonym kwasem solnym do pH 9,8. Następnie dodano $MgCl_2$ – kofaktor fosfatazy alkalicznej do końcowego stężenia 0,5 mM.

Substraty dla fosfatazy alkalicznej:

NBT (Nitro Blue Tetrazolium) oraz BCIP (Bromo-Chloro-Indolylo-Phosphate). 75 mg NBT rozpuszczono w 1 ml 70% roztworu wodnego DHFA (Dihydro-Formamid). 50 mg BCIP rozpuszczono w 1 ml H_2O . Roztwory przechowywano w temp. 4⁰C bez dostępu światła. Tuż przed ostatnim etapem immunodetekcji sporządzano świeży roztwór substratów dla AP dodając do 10 ml buforu dietanolaminowego 45 μ l roztworu NBT i 35 μ l roztworu BCIP.

Produktem reakcji NBT z BCIP w obecności AP jest nierozpuszczalny w środowisku wodnym niebieski osad formazanu.

4.1.2. Bufor do transferu mokrego

W półtoralitrowej zlewce odważono 1,5 g Trizma ®base, następnie dosypano naważkę 14,4g glicyny i uzupełniono wodą podwójnie destylowaną do 1l. Dokładnie wymieszano zawartość przy pomocy mieszadła magnetycznego uzyskując klarowny roztwór.

4.1.3. Bufor węglanowy do testu ELISA

Roztwór A – 70 ml 0,1 M NaHCO₃ :

Naważkę 0,588 g NaHCO₃ uzupełniono do objętości 70 ml wodą podwójnie destylowaną.

Roztwór B – 30 ml 0,1 M Na₂CO₃ :

Naważkę 0,318 g Na₂CO₃ uzupełniono do objętości 30 ml wodą podwójnie destylowaną.

Zmieszano roztwory A i B otrzymując bufor węglanowy o pH 9,6.

4.1.4. Bufor do płukania płytki ELISA

Roztwór PBS plus Tween 20 w stężeniu 0,05%.

4.1.5. Bufor blokujący do testu ELISA

PBS + 1% BSA + 0,05% Tween 20.

4.1.6. Bufor z substratem dla AP stosowany w metodzie ELISA

Do buforu dietanolaminowego dla AP (pkt. 4.1.1) dodano pNPP (fosforan *para*-nitrofenolu) w stężeniu 1 mg/ml. Sporządzony na świeżo roztwór pNPP jest bezbarwny. Fosfataza alkaliczna katalizuje hydrolizę cząsteczki pNPP z uwolnieniem reszty fosforanowej. Produkty reakcji są rozpuszczalne w środowisku wodnym, przy czym *para*-nitrofenol powoduje zmianę barwy roztworu na żółtą. Gęstość optyczna roztworu (OD) przy długości fali $\lambda=405$ nm zmierzona kolorymetrycznie w określonym arbitralnie czasie t , jest w przybliżeniu wprost proporcjonalna do ilości aktywności enzymatycznej obecnej w studzience, a pośrednio do ilości II przeciwciał, przeciwciał I lub antygenu związanego ze studzienką.

4.2. Materiał biologiczny

4.2.1. wątroba ludzka

Materiał uzyskano z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AMG. Wątrobę pobrano ze zwłok (do 24 h od chwili śmierci). Materiał bez makroskopowych cech patologii narządowej transportowano w lodzie do Zakładu Biochemii AMG, gdzie był przechowywany w temp. — 80⁰ C do czasu wykonania doświadczenia.

4.2.2. serce ludzkie

Materiał uzyskano z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AMG. Fragmenty mięśnia serca transportowano w lodzie do Zakładu Biochemii AMG, gdzie były przechowywane w temp. — 80⁰ C do czasu wykonania doświadczenia.

4.2.3. krew

Materiał uzyskano z Centralnego Laboratorium Państwowego Szpitala Klinicznego AMG oraz od pacjentów hospitalizowanych w I Klinice Chorób Wewnętrznych i Ostrej Zatruc AMG. Surowicę krwi przechowywano w temp. — 80⁰ C do czasu wykonania oznaczeń.

4.2.4. żółć

Materiał uzyskano od pacjentów hospitalizowanych w Klinice Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej i Endokrynologicznej AMG, Klinice Chirurgii Ogólnej i Transplantacyjnej AMG oraz w Oddziale Chirurgii Ogólnej Szpitala Wojewódzkiego w Gdańsku. Żółć transportowano w lodzie i zabezpieczono w temp. — 80⁰ C do dalszych badań.

Na przeprowadzenie badań z wykorzystaniem ludzkiego materiału biologicznego uzyskano zgodę uczelnianej Komisji Etyki Badań Naukowych.

4.3. Zwierzęta doświadczalne

4.3.1. króliki

Do doświadczeń użyto samców królików w wieku ok. 5 mies., o masie ok. 3 kg. Zwierzęta hodowano w klatkach drucianych, w temp. 22 C^o, w 12-godzinnym cyklu dobowym (światło od 8.00 rano do 8.00 wieczorem). Do karmienia użyto paszy pochodzącej z Centralnego Laboratorium Przemysłu Paszowego w Motyczu, oraz wody kranowej.

Zwierzęta były traktowane w sposób humanitarny, zgodnie z przepisami zawartymi w podręczniku „Zasady hodowli zwierząt laboratoryjnych”, sformułowanymi przez Narodowe Towarzystwo Badań Medycznych. Na przeprowadzenie badań z wykorzystaniem królików uzyskano zgodę uczelnianej Komisji Etyki Badań Naukowych.

4.3.2. szczury rasy Wistar

Do doświadczeń użyto samców szczurów rasy Wistar, o masie ok. 300 g. Zwierzęta hodowano w klatkach drucianych, w temp. 22 C^o, w 12-godzinnym cyklu dobowym (światło od 8.00 rano do 8.00 wieczorem). Do karmienia użyto paszy pochodzącej z Centralnego Laboratorium Przemysłu Paszowego w Motyczu, oraz wody kranowej.

Zwierzęta były traktowane w sposób humanitarny, zgodnie z przepisami zawartymi w podręczniku „Zasady hodowli zwierząt laboratoryjnych”, sformułowanymi przez Narodowe Towarzystwo Badań Medycznych. Na przeprowadzenie badań z wykorzystaniem szczurów uzyskano zgodę uczelnianej Komisji Etyki Badań Naukowych.

5. Stosowane metody

5.1. Izolacja L-FABP z wątroby ludzkiej

5.1.1. Homogenizacja wątroby ludzkiej

Z rozmrożonej wątroby usunięto widoczne elementy tkanki łącznej. 50g miąższu wątrobowego pocięto na drobne skrawki i przepłukano 3-krotnie buforem homogenizacyjnym zawierającym: 10 mM Tris HCl, 150 mM KCl (pH 8,0 ; temp. 4⁰C), aby pozbyć się elementów morfotycznych krwi, białek osocza, resztek tkanki łącznej i tłuszczowej. Na bazie powyższego buforu sporządzono 30% homogenat wątroby przez homogenizację w temp. topniejącego lodu.

5.1.2. Otrzymywanie ekstraktu wątrobowego

Homogenat wątrobowy wirowano w 30 tys. x g przez 20 min. w temp. 4⁰C. Supernatant przesączono przez podwójną warstwę gazy celem pozbycia się pływającego na powierzchni tłuszczu. Uzyskany ekstrakt wątrobowy poddano dalszej procedurze oczyszczania.

5.1.3. Otrzymywanie frakcji cytosolu wątrobowego

Ekstrakt wątrobowy (pkt. 5.1.2) wirowano w 105 tys. x g przez 90 min. Supernatant przesączono przez podwójną warstwę gazy uzyskując frakcję cytosolu wątrobowego.

5.1.4. Denaturacja termiczna frakcji cytosolu wątrobowego

Ze względu na termostabilność białka wiążącego kwasy tłuszczowe z wątroby ludzkiej, zastosowano denaturację termiczną frakcji cytosolu jako kolejny etap oczyszczania. Frakcję cytosolu wątrobowego (uzyskanego z 50g wątroby) inkubowano przez 0,5 h w temp. 50⁰C na łaźni wodnej nieustannie mieszając. Następnie zawiesinę schłodzono do temp. 4⁰C i wirowano w 30 tys. x g przez 20 min. Supernatant zabezpieczono do dalszego oczyszczania.

5.1.5. Delipidacja denaturowanej termicznie frakcji cytosolu wątrobowego

L-FABP wiąże kwasy tłuszczowe, zwłaszcza długołańcuchowe, wielonienasycone. Związanie białka z ligandem może mieć wpływ na jego właściwości fizykochemiczne, jak np. pI, co teoretycznie mogłoby interferować na dalszych etapach izolacji. Przeprowadzono zatem delipidację denaturowanej termicznie frakcji cytosolu wątrobowego aby rozbić potencjalne kompleksy białka z kwasem tłuszczowym. Frakcję cytosolu wątrobowego podzielono na 10 porcji o jednakowej objętości i przesączono kolejno przez kolumnę chromatograficzną (10 x 1 cm) wypełnioną lipofilnym złożem – Hydroxyalkoxypropyl Dextran Type VI (znany również jako Lipidex 1000) w temp. 37⁰C przy przepływie 50 ml/h. W takich warunkach hydroxyalkoxypropyl dextran wiąże kwasy tłuszczowe wolne oraz związane z białkiem. Przed naniesieniem kolejnej porcji frakcji cytosolu, kolumnę reaktywowano przepłukując ją metanolem a następnie równoważąc buforem o składzie: 10 mM Tris, 150 mM KCl, pH 8,0.

Otrzymany eluat schłodzono do 4⁰C i odwirowano w 30 tys. x g przez 20 min. Supernatant poddano dalszemu oczyszczaniu. Delipidowaną frakcję cytosolu wątrobowego poddano liofilizacji w celu zagęszczenia białka w próbce, uzyskując stężenie końcowe 45 mg/ml.

5.1.6. Sączenie molekularne na żelu Sephadex G-50 Superfine

Kolumnę chromatograficzną o wymiarach 5 x 100 cm wypełniono 1440 ml odpowiednio przygotowanego, odgazowanego żelu Sephadex G-50 Superfine. Tak przygotowaną kolumnę zrównoważono w temp. 4⁰C buforem: 10 mM Tris, 150 mM KCl, 0,02% NaN₃ o pH 8,0, zwanym dalej „buforem kolumnowym”.

Następnie wykonano kalibrację kolumny używając jako standardu masowego końskiego cytochromu c o masie cząsteczkowej 14,2 kD. Przed rozdziałem kolumnę przepłukano czterema litrami „buforu kolumnowego”.

Próbkę zagęszczonego cytosolu o objętości 10 ml naniesiono na kolumnę i eluowano „buforem kolumnowym” pod kontrolą pompy perystaltycznej przy stałym przepływie 40 ml/h w temp. 4⁰C. Frakcje o objętości 5 ml zbierano przy pomocy kolektora frakcji. Analizę frakcji przeprowadzono fotometrycznie (Beckman DU-68

Spectrophotometer) mierząc absorbancję poszczególnych frakcji przy długości fali $\lambda=280$ nm względem próby ślepej zawierającej bufor kolumnowy.

Objętość próżna kolumny V_0 wynosiła 480 ml. Absorbancje frakcji (5 ml) w tym zakresie były bliskie zeru. Na dalszym przebiegu chromatogramu, aż do frakcji 210 (Ryc. 4, str. 59) zaobserwowano trzy wyraźne szczyty absorbancji (tzw. *puncta maxima* dla funkcji absorbancji od objętości eluatu, gdzie $\frac{dA}{dV_e} = 0$, przy czym A

oznacza tu absorbancję próby mierzoną przy długości fali $\lambda=280$ nm, a V_e – objętość eluatu). Frakcje o numerach od 161 do 167 (Ryc. 4, str. 59), tworzące ostatni szczyt chromatogramu korelowały z wypływem cytochromu c (14,2 kD) w trakcie kalibracji. Wymienione powyżej 7 kolejnych frakcji białkowych zebrano do jednego naczynia, zamrożono w (-80^0C) i zabezpieczono do dalszego oczyszczania. Dla porównania zabezpieczono również kilkanaście sąsiednich frakcji z obu stron typowanego szczytu. Każde 6 kolejnych frakcji zebrano do jednego naczynia, zamrożono w (-80^0C) i zabezpieczono do dalszej analizy. Próbkę poddano analizie elektroforetycznej na 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących w celu określenia masy cząsteczkowej białek w zebranych frakcjach.

5.1.7. Analiza elektroforetyczna białka metodą SDS-PAGE

Przygotowanie żelu rozdzielającego (dolnego).

Do przygotowania żelu zastosowano 30% wodny roztwór mieszaniny Akrylamidu i N,N'-Methylene-bis Akrylamidu w stosunku wagowym 36,5 : 1, zwany dalej roztworem akrylamidów. Na bazie roztworu akrylamidów sporządzono roztwór o składzie: 15% akrylamidy; 10% SDS; 10% APS; 0,05% TEMED; 1,5 M Tris; pH 8,8.

Roztwór wprowadzono do przestrzeni międzypłytkowej aparatu do wylewania żelu MiniGel Slab firmy Hoeffer nanosząc płyn przy pomocy pipety po krawędzi płytki. Na powierzchnię roztworu akrylamidów naniesiono ok. 0,5 cm warstwę mieszaniny butanolu z wodą destylowaną aby odizolować roztwór od tlenu atmosferycznego, który zaburza proces polimeryzacji żelu. Roztwór akrylamidów polimeryzował przez 0,5 godziny w temp. pokojowej.

Przygotowanie żelu zagęszczającego (górnego).

Po przepłukaniu przestrzeni międzypłytkowej wodą destylowaną, na górny brzeg żelu rozdzielającego naniesiono roztwór akrylamidów o następującym składzie: 4% akrylamidy; 10% SDS; 20% APS; 0,2% TEMED; 0,5 M Tris; pH 6,8. W polimeryzującym roztworze żelu górnego (zagęszczającego) zanurzono formę w kształcie grzebienia aby wymodelować studzienki do naniesienia próbek białka. Po upływie 15 min. roztwór akrylamidów osiągnął zadowalający stopień polimeryzacji, pozwalający na przeprowadzenie elektroforezy białka w warunkach denaturujących.

Przygotowanie próbki białka do rozdziału na żelu.

Próbki białka poddano ultrafiltracji na „sicie” o punkcie odcięcia 10 kD i rozcieńczono wodą destylowaną uzyskując stężenie 1mg/ml. Do próbówki Eppendorf naniesiono 10 µl tak przygotowanego roztworu, co odpowiada 10 µg białka. Następnie dodano 10 µl buforu redukującego (Laemli Buffer) zawierającego SDS, β-merkaptotanol, glicerol, bromophenol blue i Tris-HCl o pH 6,8. Tak przygotowane próbki poddano denaturacji termicznej przez ogrzewanie na łaźni wodnej w temp. 95⁰C przez 4 min.

Elektroforeza.

Przygotowano bufor elektrodowy do elektroforezy o składzie: 25 mM Tris, 192 mM glicyna, 0,1% SDS. Bufor schłodzono przed użyciem do 4⁰C. Po usunięciu formy z żelu zagęszczającego, płytki z żelem zamocowano w aparacie do elektroforezy firmy Hoeffer. Kompartymy aparatu i wolną przestrzeń międzypłytkową wraz ze studzienkami w żelu, wypełniono buforem elektrodowym. Do studzienek naniesiono 20 µl próbki białka i oraz wzorce masowe. Do elektrody dolnej aparatu podłączono biegun dodatni zasilacza prądu stałego a do elektrody górnej biegun ujemny. Elektroforezę prowadzono przez 2,5 h prądem o napięciu 80-100 V.

Wybarwienie żelu.

Żel przepłukano kilkakrotnie wodą i zanurzono w roztworze barwiącym zawierającym Coomassie R-250, metanol i kwas octowy. Barwienie żelu przeprowadzono na kołysce elektrycznej w temp. pokojowej przez 2 godziny.

Odbarwienie żelu i interpretacja wyników.

Wybarwiony żel zanurzono w wodnym roztworze odbarwiającym o składzie: 10% vol. metanol, 10% vol. kwas octowy na okres 3 godzin. Następnie usunięto roztwór odbarwiający a żel zalano wodą. Obraz żelu zapisano przy pomocy skanera DeskJet

Ilcx firmy Hewlett Packard. Frakcje oceniono analizując położenie, intensywność i liczbę prążków białkowych na odpowiedniej ścieżce żelu.

5.1.8. Test wiązania wolnych kwasów tłuszczowych z białkiem

Charakterystyczną właściwością L-FABP jest zdolność wiązania wolnych kwasów tłuszczowych. Naturalnymi ligandami białka L-FABP są zatem wolne kwasy tłuszczowe, zwłaszcza wielonienasycone, które wiążą się do niego z dużym powinowactwem. Aby ocenić zawartość L-FABP we frakcjach eluowanych z kolumny Sephadex G-50 przeprowadzono test wiązania znakowanych radioaktywnie wolnych kwasów tłuszczowych z białkami zebranych frakcji.

Przygotowanie próbek białka.

Doświadczenie przeprowadzono na 5 próbach kolejno zebranych z kolumny Sephadex G-50, oznaczonych odpowiednio: A, B, C, D i E (Ryc. 4, str. 59). Jako kontroli pozytywnej użyto odfuszczonej albuminy bydlęcej (BSA), a jako kontroli negatywnej cytochromu c izolowanego z końskiego serca. Każdą z 7 testowanych próbek białka umieszczono w probówce typu Eppendorf i rozcieńczono buforowanym roztworem soli fizjologicznej PBS o pH 7,4 uzyskując 400 µl roztwór zawierający 5 µg białka. Próbki inkubowano w obecności 1 µM roztworu znakowanego radioaktywnie palmitynianu [$1\text{-}^{14}\text{C}$] w temp. 37°C przez 10 min. W trakcie inkubacji radioaktywny palmitynian wysyczał potencjalne miejsca wiązania kwasów tłuszczowych w cząsteczkach białka. Po zakończeniu inkubacji próbki schłodzono w lodzie przez 5 min. Następnie próbki „odsolono” metodą chromatografii kolumnowej aby pozbyć się niezwiązanych z białkiem cząsteczek radioaktywnego liganda. Zastosowano w tym celu komercyjną kolumnę chromatograficzną o wymiarach 1 x 10 cm wypełnioną złożem Sephadex G-25. Na kolumnę nanoszono każdą z próbek i sączono grawitacyjnie elując białko buforem PBS. Zbierano frakcje o objętości 1 ml. Białko związane z radioaktywnym ligandem wypływało w objętości próżnej kolumny, tj. ok. 4 ml objętości elucji, co potwierdzono oznaczając białko metodą Bradforda [155].

Pomiar radioaktywności.

Zmierzono radioaktywność każdej z zebranych frakcji. Analizę przeprowadzono na liczniku scyntylicyjnym (Beckman LS6000IC) z zastosowaniem specjalnego programu liczącego dla radioaktywnego izotopu węgla ^{14}C . Próbkę o objętości 50 µl

każdej z zebranych frakcji zawieszono w 5 ml roztworu scyntylacyjnego i poddano analizie. Wartość zmierzonej radioaktywności odczytywano w jednostkach [cpm]. Jako kontrolę pozytywną wykorzystano 50 µl próbkę 1 µM roztworu znakowanego radioaktywnie roztworu palmitynianu [$1\text{-}^{14}\text{C}$] o radioaktywności równej 40 tys. cpm. Kontrolą negatywną był bufor wykazujący radioaktywność na poziomie 15 cpm.

Interpretacja wyników.

Najwyższą radioaktywność wśród badanych frakcji (A – E) wykazała typowana na obecność L-FABP frakcja „C” zebrana z kolumny Sephadex G-50 (Ryc. 4, str. 59). Znacznie mniejszą radioaktywnością charakteryzowała się próbka cytochromu c inkubowana z radioaktywnym palmitynianem. Natomiast większą radioaktywność zmierzono w próbce delipidowanej albuminy bydlęcej inkubowanej z radioaktywnym palmitynianem (Ryc. 6, str. 61).

5.1.9. Liofilizacja

Frakcję białkową zabezpieczoną po rozdzieleniu na kolumnie chromatograficznej Sephadex G-50 Superfine poddano liofilizacji w temp. (-20°C) w warunkach podciśnienia w celu zagęszczenia próbki.

5.1.10. Sączenie molekularne na żelu BioGel P-10

Kolumnę chromatograficzną o średnicy 2,5 cm upakowano objętością 0,5 l złoża BioGel P-10 po uprzednim zawieszeniu w buforze kolumnowym o składzie: 10 mM Tris, 150 mM KCl, 0,02% NaN_3 o pH 8,0 i termicznym odgazowaniu. Kolumnę zrównoważono przepłukując złożę 1,5 l buforu kolumnowego w temp. 4°C . Następnie przeprowadzono kalibrację kolumny wykorzystując jako standard masowy cytochrom c o masie cząsteczkowej 14,2 kD izolowany z końskiego serca. Objętość elucji cytochromu c wynosiła 230 ml. Przed właściwym rozdzieleniem próbki kolumnę ponownie przepłukano 3 objętościami złoża.

Liofilizat z pkt. 5.1.9 rozpuszczono w 3,5 ml wody destylowanej. Całą objętość roztworu naniesiono na powierzchnię złoża i rozpoczęto elucję buforem kolumnowym o składzie podanym powyżej. Rozdział prowadzono w temp. 4°C przy stałym przepływie 40 ml/h. Frakcje o objętości 5ml zbierano przy pomocy kolektora frakcji i analizowano mierząc absorbancję przy długości fali $\lambda=280$ nm. Analiza

chromatogramu wykazała obecność 2 szczytów absorbancji (Ryc. 7, str. 62). Pierwszy szczyt odpowiadał objętości elucji równej 180 ml a drugi objętości elucji równej 220 ml. Zgodnie z chromatogramem kalibracyjnym frakcje składające się na drugi szczyt powinny zawierać białka o masie 14 – 15 kD, co potwierdzono elektroforetycznie. Na tej podstawie zebrano i zabezpieczono 3 frakcje drugiego szczytu o nr 42-44 (Ryc. 7, str. 62).

5.1.11. Ultrafiltracja

Kolejnym etapem oczyszczania białka wiążącego kwasy tłuszczowe z wątroby ludzkiej była ultrafiltracja 15 ml próbki białka zebranej z kolumny BioGel P-10. Próbkę naniesiono na membranę o punkcie odcięcia 10 kD i wirowano w temp. 4⁰C przy 1,5 tys. x g przez 30 min. W trakcie ultrafiltracji dwukrotnie wymieniono bufor na 10 mM Tris o pH 8,2. Uzyskano 1,9 ml renatantu. Stężenie białka w renatancie zmierzone metodą Bradforda wynosiło 2,6 mg/ml.

5.1.12. Ocena homogenności białka metodą SDS-PAGE na żelu gradientowym

Przygotowanie gradientowego żelu rozdzielającego (dolnego).

Do przygotowania poliakrylamidowego żelu gradientowego zastosowano 30% wodny roztwór mieszaniny Akrylamidu i N,N'-Methylene-bis Akrylamidu w stosunku wagowym 36,5 : 1, zwany dalej roztworem akrylamidów. Na bazie roztworu akrylamidów sporządzono 2 roztwory różniące się stężeniem procentowym akrylamidów, tzw. roztwór „lekki” o składzie: 8% akrylamidy; 10% SDS; 10% APS; 0,05% TEMED; 1,5 M Tris; pH 8,8 oraz roztwór „ciężki” o następującym składzie: 18% akrylamidy; 10% SDS; 10% APS; 0,05% TEMED; 1,5 M Tris; pH 8,8; 0,47 M sacharoza.

Oba roztwory wprowadzono do komór miksera gradientu umożliwiając ich wzajemny kontakt przez niewielki otwór w ścianie rozdzielającej obie komory, przy czym roztwór „lekki” umieszczono w komorze z zewnętrznym otworem wypływu. W tej samej komorze zainstalowano mieszadło magnetyczne, aby zapewnić równomierne mieszanie się roztworów w trakcie wypływu. Pod kontrolą pompy perystaltycznej przepompowano zawartość obu komór do aparatu do wylewania żelu

MiniGel Slab firmy Hoeffer. Roztwór żelu gradientowego pompowano do aparatu przez specjalny otwór wpustowy u jego podstawy. Następnie do aparatu wpompowano roztwór wypełniający o bardzo dużej gęstości, tzw. plug solution (1,46 M sacharoza, 0,125 M Tris; pH 8,8), który wypełnił komorę wlotową u podstawy aparatu i przemieścił gradientowy roztwór akrylamidów do przestrzeni pomiędzy płytkami aparatu. W ten sposób, frakcja roztworu akrylamidów o stężeniu ok. 8% znalazła się w górnej części przestrzeni międzypłytkowej a frakcja o większym stężeniu akrylamidów – ok. 18% wypełniła przypośrednią część tej przestrzeni. Na powierzchnię gradientowego roztworu akrylamidów naniesiono ok. 0,5 cm warstwę mieszaniny butanolu z wodą destylowaną, aby odizolować roztwór od tlenu atmosferycznego, który zaburza proces polimeryzacji żelu. Gradientowy roztwór akrylamidów polimeryzował przez 0,5 godziny w temp. pokojowej. Otrzymano gradientowy żel rozdzielający o stężeniu akrylamidów zmieniającym się w sposób ciągły od 8% w górnej części żelu do 18% u jego podstawy.

Przygotowanie żelu zagęszczającego (górnego).

Po przepłukaniu przestrzeni międzypłytkowej wodą destylowaną, na górny brzeg gradientowego żelu rozdzielającego naniesiono roztwór akrylamidów o następującym składzie: 4% akrylamidy; 10% SDS; 20% APS; 0,2% TEMED; 0,5 M Tris-HCl; pH 6,8. W polimeryzującym roztworze żelu górnego (zagęszczającego) zanurzone formę w kształcie grzebienia, aby wymodelować studzienki do naniesienia próbek białka. Po upływie 15 min. roztwór akrylamidów osiągnął zadowalający stopień polimeryzacji, pozwalający na przeprowadzenie elektroforezy białka w warunkach denaturujących.

Przygotowanie próbki białka do rozdziału na żelu gradientowym.

Próbkę białka rozcieńczono wodą destylowaną uzyskując stężenie 1mg/ml. Do próbki Eppendorf naniesiono 10 μ l tak przygotowanego roztworu, co odpowiada 10 μ g białka. Do próbki dodano 10 μ l buforu redukującego (Laemli Buffer) zawierającego SDS, β -merkaptoetanol, glicerol, bromophenol blue i Tris-HCl o pH 6,8. Tak przygotowaną próbkę poddano denaturacji termicznej przez ogrzewanie na łaźni wodnej w temp. 95⁰C przez 4 min.

Elektroforeza.

Przygotowano bufor elektrodowy do elektroforezy o składzie: 25 mM Tris, 192 mM glicyna, 0,1% SDS. Bufor schłodzono przed użyciem do 4⁰C. Po usunięciu formy z

żelu zagęszczającego, płytki z żelem zamocowano w aparacie do elektroforezy firmy Hoeffler. Kompartymy aparatu i wolną przestrzeń międzypłytkową wraz ze studzienkami w żelu, wypełniono buforem elektrodowym. Do studzienek naniesiono 20 µl próbki białka i analogicznie przygotowaną próbkę cytochromu c oraz wzorce masowe. Do elektrody dolnej aparatu podłączono biegun dodatni zasilacza prądu stałego a do elektrody górnej biegun ujemny. Elektroforezę prowadzono przez 2,5 h prądem o napięciu 80-100 V.

Wybarwienie żelu.

Po usunięciu płytek z żelem z aparatu do elektroforezy, delikatnie oddzielono żel od powierzchni płytek. Żel przepłukano kilkakrotnie wodą i zanurzono w roztworze barwiącym zawierającym Coomassie R-250, metanol i kwas octowy. Barwienie żelu przeprowadzono na kołysce elektrycznej w temp. pokojowej przez 2 godziny.

Odbarwienie żelu i interpretacja wyników.

Wybarwiony żel zanurzono w wodnym roztworze odbarwiającym o składzie: 10% vol. metanol, 10% vol. kwas octowy na okres 3 godzin. Następnie usunięto roztwór odbarwiający a żel zalano wodą. Frakcje białka widoczne były jako poziome, niebieskie prążki na tle bezbarwnego żelu. Obraz żelu zapisano przy pomocy skanera DeskJet IIcx firmy Hewlett Packard.

5.1.13. Chromatografia jonowymienna – DEAE Sephadex A-25

Próbkę białka z pkt. 5.1.11 poddano dalszemu oczyszczaniu metodą chromatografii jonowymiennej. Kolumnę o wymiarach 1 x 12 cm wypełniono 10 ml odpowiednio przygotowanego złoża DEAE Sephadex A-25. Kolumnę zrównoważono 3 objętościami buforu: 10 mM Tris pH 8,2. Próbkę białka naniesiono na żel a następnie przepłukano kolumnę 3 objętościami ww. buforu. Dane z piśmiennictwa [62,156] oraz szacunki teoretyczne [157] wskazują, że punkt izoelektryczny wątrobowego białka wiążącego kwasy tłuszczowe jest znamienne niższy od 8 ($pI \approx 6$), a zatem w środowisku o pH 8,2 L-FABP powinno ono posiadać ładunek ujemny, co umożliwia związaną się białka ze złożem.

Elucję białka związanego z kolumną przeprowadzono gradientem stężenia NaCl od 0,01 do 0,5 M. Elucję przeprowadzono w temp. 4⁰C. Przepływ ustalono na 20 ml/h. Frakcje o objętości 1 ml zbierano przy pomocy kolektora frakcji i analizowano

fotometrycznie przy długości fali $\lambda=280$ nm względem próby ślepej zawierającej bufor 10 mM Tris pH 8,2. Analiza chromatogramu wykazała 2 nakładające się szczyty z *puncta maxima* przypadającymi odpowiednio na frakcje nr 22 i 25 (Ryc. 9, str. 64). Zebrano po 5 frakcji tworzących każdy ze szczytów, tj. 19-23, 24-28 krzywej chromatogramu. Każdą z prób o objętości 5 ml poddano analizie elektroforetycznej na poliakrylamidowym żelu gradientowym w warunkach denaturujących, zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 5.1.12. Pulę frakcji 24-28 uznano za roztwór homogenego białka L-FABP (Ryc. 10, str. 65). Próbkę poddano ultrafiltracji na membranie o punkcie odcięcia 10 kD w celu zagęszczenia i odsolenia. Uzyskano 2 mg homogenego L-FABP. Procedurę oczyszczania białka powtarzano wielokrotnie w celu uzyskania L-FABP w ilości wystarczającej do produkcji specyficznych przeciwciał poliklonalnych oraz zastosowania w teście ELISA.

5.1.14. Elektroforeza preparatywna

Ze względu na obecność śladowych zanieczyszczeń izoformy L-FABP (Ryc. 10, str. 65) uzyskanej zgodnie z opisaną wyżej procedurą (5.1.1. – 5.1.13) podjęto próbę zastosowania elektroforezy preparatywnej, jako kolejnego etapu oczyszczania w celu uzyskania białka o możliwie najwyższej homogenności.

Elektroforezę SDS-PAGE przeprowadzono na żelu gradientowym wg pkt. 5.1.12 z tą różnicą, że do 8 centralnych studzienek naniesiono po 20 μg L-FABP (z pkt. 5.1.13), natomiast do 2 skrajnych po 20 μg cytochromu c z końskiego serca jako barwnego wzorca masowego. Rozdział elektroforetyczny prowadzono równolegle na 2 żelach, co pozwalało na poddanie procedurze preparatyki 320 μg białka o wysokim stopniu homogenności.

Po zakończeniu rozdziału elektroforetycznego z obu żeli wycięto wąski pasek o szerokości prążka odpowiadającego masowo lokalizacji żółtego prążka cytochromu c. Po usunięciu skrajnych ścieżek oba wycięte paski żelu zawieszono w niewielkiej ilości buforu: 10 mM Tris, 150 mM KCl, 0,02% NaN_3 o pH 8,0 i dokładnie homogenizowano. Następnie otrzymaną zawiesinę rozcieńczono ww. buforem do objętości 50 ml i pozostawiono na noc w temp. 4°C intensywnie mieszając mieszadłem magnetycznym.

Po 12 godz. inkubacji zawiesinę wirowano przez 10 min. przy 20 tys. x g. Supernatant delikatnie zlano nad osadu żelu poliakrylamidowego i poddano ultrafiltracji na sicie o punkcie odcięcia 10 kD a następnie wirowano w temp. 4⁰C przy 1,5 tys. x g przez 30 min. W trakcie ultrafiltracji dwukrotnie wymieniono bufor na 10 mM Tris o pH 8,0. Uzyskano ok. 100 µl renatantu. Stężenie białka w renatancie zmierzone metodą Bradforda wynosiło 0,3 mg/ml. Całkowita ilość uzyskanego białka, ok. 30 µg stanowiła zatem poniżej 10% próby wyjściowej. Ze względu na mały odzysk zaniechano oczyszczania białka przy pomocy elektroforezy preparatywnej.

5.2. Produkcja poliklonalnych przeciwciał anti-L-FABP

Przeciwciała poliklonalne przeciwko ludzkiemu białku wiążącemu kwasy tłuszczowe w wątrobie otrzymano immunizując królika homogenym białkiem L-FABP z ludzkiej wątroby wyizolowanym zgodnie z opisaną powyżej procedurą (pkt. 5.1).

Przygotowanie próbki białka do szczepienia królika.

Do szczepienia stosowano emulsję próbki białka rozcieńczoną w jałowym PBS pH 7,4 z komercyjnym adjuwantem Freund'a kompletnym bądź niekompletnym. Emulsję sporządzano mieszając próbkę białka z oleistym adjuwantem Freund'a w stosunku objętościowym 1 : 1 w wyjałowionej próbówce Eppendorf. Do wytworzenia jednorodnej emulsji wykorzystano jednorazową, jałową strzykawkę o obj. 2 ml oraz jałową igłę o śr. 0,7 mm. Zawartość pobierano do strzykawki a następnie wstrzykiwano z powrotem do próbówki. Po 50-krotnym powtórzeniu tej operacji uzyskiwano jednorodną emulsję, którą podawano królikowi.

5.2.1. Pobranie surowicy „zerowej” (kontrola negatywna)

Tuż przed szczepieniem pobrano z żyły brzeżnej ucha królika ok. 10 ml krwi. Uzyskana z tej próbki surowica była stosowana jako kontrola negatywna, tj. niezawierająca specyficznych przeciwciał przeciwko białku wiążącemu kwasy tłuszczowe z wątroby ludzkiej.

5.2.2. Pierwsza dawka antygeny (dzień 0.)

Pierwszą dawkę antygeny przygotowano w postaci 2 ml emulsji 2 mg homogennego białka L-FABP w roztworze PBS z kompletnym adjuwantem Freundy w stosunku objętościowym 1 : 1. Emulsję podano królikowi podskórnie w okolicy karku.

5.2.3. Pierwsza dawka przypominająca (dzień 28.)

Pierwszą dawkę przypominającą antygeny przygotowano w postaci 2 ml emulsji 1 mg homogennego białka L-FABP w roztworze PBS z niekompletnym adjuwantem Freundy w stosunku objętościowym 1 : 1. Emulsję podano królikowi podskórnie w okolicy karku.

5.2.4. Druga dawka przypominająca (dzień 56.)

Drugą dawkę przypominającą antygeny przygotowano i podano analogicznie jak pierwszą dawkę przypominającą (patrz pkt. 5.2.3).

5.2.5. Skrwawienie królika (dzień 70.)

Cykl szczepień zakończono pobierając 20 ml krwi z żyły brzeżnej ucha królika. Krew pobraną od królika pozostawiano na 1 h w probówce typu Corning (25 ml) w temp. pokojowej. Następnie krew przetrzymywano przez 12 h w temp. 4°C. W kolejnym etapie probówkę ze skrzepłą krwią wirowano przy 1,5 tys. x g przez 15 min. w temp. 4°C. Ostrożnie zbierano supernatant, który zawierał surowicę królika. Surowicę podzielono na porcje po 1 ml i zabezpieczono w probówkach Eppendorf w temp. (-20°C). Skrócony protokół szczepienia i pobierania krwi przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Skrócony protokół immunizacji królika.

Dzień	Procedura	Dawka na królika
0	Pobranie surowicy "zerowej". Pierwsza dawka antygeny	2 mg L-FABP w 2 ml emulsji z kompletnym adjuwantem Freundy
28	Pierwsza dawka przypominająca	1 mg antygeny w 2 ml emulsji z niekompletnym adjuwantem Freundy
56	Druga dawka przypominająca	1 mg antygeny w 2 ml emulsji z niekompletnym adjuwantem Freundy
70	Skrwawienie królika	pobrano ok. 20 ml krwi

5.2.6. Immunodetekcja specyficznych przeciwciał anty-L-FABP metodą dot-blotting

Przeprowadzono immunodetekcję specyficznych przeciwciał anty-L-FABP w surowicy pobranej od królika przed i po immunizacji. Doświadczenie miało wykazać czy po cyklu szczepień w surowicy królika pojawiły się przeciwciała przeciwko białku wiążącemu kwasy tłuszczowe z wątroby ludzkiej.

Przygotowano roztwór białka L-FABP w PBS o stężeniu 1 mg/ml. Na 2 suche paski Immobilonu P naniesiono po 1 μ l roztworu. Oczekano 0,5 h, aż membrana wyschnie i zwiąże naniesione białko. Następnie obie membrany zanurzone w buforze blokującym zawierającym 5% roztwór odtłuszczonego mleka w PBS i inkubowano przez 1 h na kołysce elektrycznej w temp. pokojowej w celu wyblokowania potencjalnych miejsc wiążących białka na membranie. W kolejnym etapie każdą z membran inkubowano z surowicą króliczą rozcieńczoną buforem blokującym w stosunku 1: 100 mieszając na kołysce elektrycznej w temp. pokojowej. Membranę oznaczoną literą „A” inkubowano z surowicą zerową pobraną od królika przed immunizacją a membranę „B” z surowicą królika po immunizacji. Obie membrany przepłukano inkubując je 3-krotnie przez 15 min. w roztworze PBS, łagodnie mieszając na kołysce. Dalej każdą z membran zanurzone w roztworze komercyjnych przeciwciał (sprzężonych kowalencyjnie z bydlęcą fosfatazą alkaliczną) specyficznych względem króliczych IgG, rozcieńczonych buforem blokującym w stosunku 1: 3 tys. i inkubowano przez 1 h delikatnie mieszając. Obie membrany przepłukano następnie inkubując je 2-krotnie przez 15 min. z roztworem PBS, łagodnie mieszając na kołysce. Do ostatniego płukania użyto wody podwójnie destylowanej, aby wypłukać fosforan nieorganiczny, który jest inhibitorem fosfatazy alkalicznej – enzymu katalizującego w kolejnym etapie detekcji reakcję, której produktem jest barwny osad formazanu.

Roztwór substratów dla fosfatazy alkalicznej przygotowano zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale pt. „Odczynniki” (pkt. 4.1.1 rozdziału „Materiały i metody”). Każdą z membran zanurzone w naczyniu z roztworem substratów dla AP. Naczynie zasłonięto przed dopływem światła. Obserwowano czy na membranie pojawia się niebieski osad w kształcie mniej lub bardziej regularnych kół. Jeśli po 30 min. inkubacji z enzymem osad się nie pojawił, wynik immunodetekcji uznawano za negatywny, co oznaczało, że w surowicy nie ma przeciwciał specyficznych

względem ludzkiego L-FABP. Reakcję przerywano przepłukując membranę 3-krotnie wodą destylowaną, a po wysuszeniu skanowano i zapisywano obraz w formie elektronicznej (Ryc. 11 A, B, str. 66).

5.2.7. Izolacja immunoglobulin IgG z surowicy królika

Z próbki surowicy immunizowanego królika, w której potwierdzono obecność przeciwciał anty-L-FABP metodą dot-blotting, wyizolowano frakcję immunoglobulin IgG. Izolacja króliczych immunoglobulin miała na celu opracowanie czulej metody pomiaru stężenia L-FABP w płynach ustrojowych i wyeliminowanie potencjalnych, niespecyficzných interferencji w układzie pomiarowym ze strony innych białek obecnych w surowicy królika. Izolację immunoglobulin przeprowadzono metodą chromatografii powinowactwa wykorzystując zjawisko specyficznęj immunoadsorpcji króliczych immunoglobulin IgG z białkiem A [158].

Kolumnę chromatograficzną o wymiarach 0,5 x 2 cm wypełniono 1 ml złoża o właściwościach sita molekularnego (Sephacrose CL-4B firmy Pharmacia) z niskim punktem odcięcia, sprzężonego kowalencyjnie z białkiem A. Objętość 1 ml żelu „białko A–Sephacrose CL-4B” wiąże 10-20 mg czystych immunoglobulin IgG.

Kolumnę zrównoważono 10 ml buforu: 100 mM Tris pH 8,0. Do 1 ml surowicy króliczej dodano 0,1 ml buforu: 1 M Tris pH 8,0. Buforowany roztwór surowicy naniesiono na kolumnę powinowactwa. Następnie kolumnę przepłukano 10 ml buforu: 100 mM Tris pH 8,0 i 10 ml buforu: 10 mM Tris pH 8,0. W kolejnym etapie eluowano immunoglobuliny związane z kolumną przy pomocy kwaśnego roztworu glicyny: 100 mM glicyna pH 3,0. Frakcje o objętości 0,5 ml zbierano do probówek Eppendorf zawierających 50 μ l buforu: 1 M Tris pH 8,0. 10 pierwszych frakcji zebrano do jednego naczynia i poddano ultrafiltracji na sicie z punktem odcięcia równym 30 kD, w celu wymiany buforu na PBS i jednoczesnego zagęszczenia próbki króliczych IgG. Stężenie immunoglobulin określono fotometrycznie mierząc absorbancję próbki przy długości fali $\lambda=280$ nm względem buforu glicynowego jako próby ślepej. W obliczeniach uwzględniono wartość współczynnika gęstości optycznej dla IgG, która wynosi 1,33 dla roztworu IgG o stężeniu 1 mg/ml [158]. Z 1 ml surowicy królika otrzymano ok. 5 mg czystych immunoglobulin IgG. Próbkę

IgG o stężeniu 3,6 mg/ml rozporcjowano do probówek Eppendorf po 50 µl i przechowywano w temp. (-20°C).

5.2.8. Kontrola specyficzności otrzymanych immunoglobulin anty-L-FABP

Przed zastosowaniem immunoglobulin anty-L-FABP do ilościowego oznaczania L-FABP w materiale biologicznym, sprawdzono specyficzność przeciwciał względem L-FABP. Zasadniczym założeniem doświadczenia było wykluczenie ewentualnych reakcji krzyżowych przeciwciał anty-L-FABP z innymi białkami ekstraktu wątroby ludzkiej. W tym celu zastosowano metodę z wyboru, czyli Western-blotting.

Ekstrakt wątroby ludzkiej przygotowano zgodnie z opisaną wcześniej procedurą – pkt. 5.1.1 – 5.1.2. Zmierzono stężenie białka w otrzymanym ekstrakcie metodą Bradforda [155], a następnie rozcieńczono ekstrakt wodą destylowaną uzyskując stężenie białka w próbce równe 1 mg/ml. Tak przygotowaną próbkę ekstraktu podzielono na 8 części i ponumerowano od 2 do 9. Do próbek o numerach od 3 do 9 dodano wyizolowane z wątroby ludzkiej homogenne białko L-FABP, tak by stężenie dodanego L-FABP (nie licząc stężenia natywnego L-FABP obecnego w ekstrakcie) wynosiło odpowiednio: 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml. Jako kontrolę negatywną zastosowano próbkę końskiego cytochromu c w stężeniu 5 mg/ml. Do 10 µl każdej z próbek dodano 10 µl buforu lizującego (Laemli Buffer) i poddano je denaturacji termicznej zgodnie z pkt. 5.1.12.

Próbki naniesiono na kolejne ścieżki żelu gradientowego 8-18% przygotowanego wg opisanej wyżej procedury (patrz pkt. 5.1.12). Na skrajne ścieżki żelu (1. i 10.) naniesiono po 20 µl próbki z cytochromem c. Na kolejne ścieżki żelu (od 2. do 9.) naniesiono próbki oznaczone numerami odpowiednio od 2 do 9, jak opisano powyżej. Elektroforezę w warunkach denaturujących przeprowadzono wg opisu w pkt. 5.1.12. Elektroforezę przeprowadzono na dwóch bliźniaczych żelach gradientowych, z których jeden wybarwiono na obecność białka metodą Coomassie (zgodnie z pkt. 5.1.12), a drugi wykorzystano do transferu rozdzielonych frakcji białkowych na membranę Immobilon P (Ryc. 12 A i B, str. 67).

Przeprowadzono tzw. transfer mokry białka z żelu na membranę. Metoda polega na umieszczeniu żelu z rozdzielonymi elektroforetycznie próbkami białka oraz odpowiednio przygotowanej membrany w zbiorniku wypełnionym specjalnym

buforem elektrodowym (stąd nazwa „mokry”), w taki sposób, że kierunek linii sił pola elektrostatycznego jest prostopadły do płaszczyzny żelu i przylegającej do niego membrany, przy czym zwrot linii sił pola elektrostatycznego jest skierowany od membrany do żelu. W warunkach tak zdefiniowanego pola elektrostatycznego cząsteczki zdenaturowanych białek, opłaszczane ujemnie naładowanymi cząsteczkami SDS przemieszczają się z żelu na membranę Immobilon P, w strukturze której zostają uwięzione.

Przygotowanie żelu i membrany do transferu.

Żel wyjęto z aparatu do elektroforezy i przepłukano 3-krotnie wodą destylowaną. Wycięto pasek membrany Immobilon P o wymiarach żelu (8 x 10 cm). Czynność tę wykonywano w rękawicach uważając żeby nie zatłuszczyć powierzchni membrany. Z tego powodu wszelkie operacje manualne związane z przemieszczeniem membrany wykonywano przy pomocy specjalnej pęsety chwytając membranę delikatnie za jeden z brzegów. Membranę zanurzano na 1 minutę w naczyniu wypełnionym metanolem. Następnie przepłukano ją kilkakrotnie wodą destylowaną. Do złożenia „kanapki” z żelu i membrany wykorzystano również 6 pasków bibuły filtracyjnej o wymiarach nieco większych od wymiarów żelu, które rozmieszczono po 3 z każdej strony „kanapki”. Do plastikowej kuwety wiano bufor do transferu przygotowany zgodnie z opisaną procedurą (pkt. 4.1.2). Moduł aparatu do formowania kanapki zanurzano w kuwecie z buforem i umieszczono kolejno 3 warstwy bibuły, membranę Immobilon P, żel poliakrylamidowy i ponownie 3 warstwy bibuły. Następnie walcowano „kanapkę” przy pomocy bagietki szklanej, aby usunąć ewentualne pęcherze powietrza zgromadzone pomiędzy warstwami „kanapki”. Tak przygotowaną „kanapkę” umieszczono w zbiorniku aparatu do transferu wypełnionym buforem do transferu (pkt. 4.1.2). Następnie do elektrod aparatu podłączono napięcie prądu stałego o wartości 20 V w taki sposób, że biegun dodatni znalazł się po stronie membrany a ujemny po stronie żelu. Transfer prowadzono przez 14 h.

Immunodetekcja.

Po zakończeniu transferu membranę usunięto z „kanapki”, umieszczono w plastikowej kuwecie i przepłukano 3-krotnie roztworem PBS. Następnie membranę zanurzano w buforze blokującym zawierającym 5% roztwór odtłuszczonego mleka w PBS i inkubowano przez 1 h na kołyszce elektrycznej w temp. pokojowej w celu wyblokowania potencjalnych miejsc wiążących białka na membranie. W kolejnym

etapie membranę inkubowano z 10 ml roztworu oczyszczonych króliczych immunoglobulin IgG rozcieńczonych buforem blokującym do stężenia IgG równego 50 µg/ml mieszając nieustannie na kołysce elektrycznej w temp. pokojowej przez 1h. Dalej membranę przepłukano inkubując ją 3-krotnie przez 15 min. w 200 ml roztworu PBS, łagodnie mieszając na kołysce. Następnie membranę zanurzano w roztworze komercyjnych przeciwciał (sprzężonych kowalencyjnie z bydlęcą fosfatazą alkaliczną) specyficznych względem króliczych przeciwciał IgG, rozcieńczonych buforem blokującym w stosunku 1 : 3 tys. i inkubowano przez 1 h delikatnie mieszając. Membranę przepłukano następnie inkubując ją 2-krotnie przez 15 min. w roztworze PBS, łagodnie mieszając na kołysce. Do ostatniego płukania użyto wody podwójnie destylowanej, aby wypłukać fosforan nieorganiczny, który jest inhibitorem fosfatazy alkalicznej – enzymu katalizującego w kolejnym etapie detekcji reakcję, której produktem jest barwny osad formazanu.

Roztwór substratów dla fosfatazy alkalicznej przygotowano zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale pt. „Odczynniki” (pkt. 4.1.1 rozdziału „Materiały i metody”). Membranę zanurzano w naczyniu z roztworem substratów dla AP. Naczynie osłonięto przed dostępem światła. Obserwowano czy na membranie pojawia się niebieski osad w kształcie prążka. Jeśli po kilku minutach inkubacji wysycenie prążków było dostatecznie wyraźne, przerywano reakcję przepłukując membranę 3-krotnie wodą destylowaną. Po wysuszeniu membranę skanowano a zapis elektroniczny obrazu membrany zabezpieczono do analizy (Ryc. 12 B, str. 67).

Kontrola negatywna.

Western-blotting przeprowadzono ponownie w sposób opisany powyżej używając jako I przeciwciał w procesie immunodetekcji, roztworu „zerowej” (kontrolnej) surowicy królika pobranej przed immunizacją białkiem L-FABP, rozcieńczonej w buforze blokującym w stosunku 1 : 100.

5.2.9. Kontrola czułości otrzymanych immunoglobulin anty-L-FABP

Sprawdzenie czułości poliklonalnych immunoglobulin króliczych IgG anty-L-FABP przeprowadzono oznaczając stężenie wyizolowanego antygenu L-FABP w roztworze wodnym metodą pośredniego testu ELISA.

Pośredni test ELISA jest metodą z wyboru do ilościowego określenia zawartości antygeny w próbce o stosunkowo dużej czystości [159]. Polega on na wytapetowaniu studzienek na płytce polistyrenowej antygenem białkowym. W kolejnych etapach testu nanosi się do studzienek tzw. I przeciwciała skierowane przeciwko badanemu antygenowi a następnie po uprzednim wypłukaniu studzienek, nanosi się do nich przeciwciała tzw. II sprzężone z enzymem a specyficzne względem przeciwciał I-szych. Po dokładnym wypłukaniu płytki ELISA, enzym detekcyjny będzie obecny jedynie w tych studzienkach, w których znajduje się badany antygen w stężeniu mieszczącym się w zakresie czułości metody, co zależy m.in. od czułości I-szych przeciwciał. Homogenna próbka antygeny ułatwia równomierne wytapetowanie studzienek, eliminując problem konkurencji różnych antygenów o miejsca wiązania z polistyrenem, co zapewnia logarytmiczną zależność OD od stężenia antygeny w próbce.

Do przeprowadzenia testu wykorzystano homogeną próbkę wyizolowanego z ludzkiej wątroby białka wiążącego kwasy tłuszczowe L-FABP. Do wszystkich 96 studzienek na płytce Maxisorp (płytki ELISA o wzmożonym powinowactwie firmy Nunc), naniesiono 50 µl buforu węglanowego o pH 9,6 przygotowanego wg przepisu podanego w pkt. 4.1.3. Przygotowano próbkę antygeny L-FABP rozcieńczoną w buforze węglanowym do stężenia 2,56 µg/ml. Przy pomocy 8-kanalowej pipety automatycznej naniesiono 50 µl roztworu L-FABP do pierwszej kolumny studzienek oznaczonej cyfrą „1” i dokładnie wymieszano 8-krotnie napełniając i opróżniając końcówki pipety. Uzyskano w ten sposób w 1-szej kolumnie studzienek 100 µl roztworu L-FABP o stężeniu 1,28 µg/ml. Następnie z każdej z tych studzienek pobrano po 50 µl roztworu L-FABP i przeniesiono tę objętość do studzienek kolumny nr 2, dokładnie mieszając jak opisano wyżej. Czynność tę powtórzono jeszcze 10-krotnie, z tym, że 50 µl pobranych z każdej studzienki kolumny nr 11 nie przeniesiono już do kolumny 12-tej. Uzyskano w ten sposób seryjne rozcieńczenie L-FABP od 1,28 µg/ml w kolumnie 1-szej do 1,25 ng/ml w kolumnie 11. Studzienki kolumny 12. stanowiły kontrolę negatywną. Wysokie pH buforu węglanowego sprawia, że większość białek rozpuszczonych w tym środowisku staje się anionami co ułatwia kontakt z dodatnio naładowanym polistyrenem tworzącym ściany studzienek. Należy jednak podkreślić, że decydującą rolę w związaniu białka z płytką ELISA odgrywają wiązania hydrofobowe. Płytkę umieszczono na specjalnym

mieszadło elektrycznym wprawiającym płytkę w ruch obrotowy z prędkością 200 obr./min i inkubowano przez 1h w temp. pokojowej. Intensywne mieszanie zawartości studzienek ma na celu ułatwienie kontaktu cząsteczek ze ściankami studzienek, co znacznie skraca czas konieczny na kompletne wysycenie miejsc polistyrenu wiążących białko. Następnie wszystkie studzienki na płytce wypłukano 3-krotnie opróżniając zawartość każdej z nich a potem napełniając 200 μ l buforu do płukania płytki (pkt. 4.1.4). Czas nasączania (obecności roztworu płuczącego w studziencie w jednym cyklu mycia) tzw. soaking time wynosił 5 sek. Operację tę wykonywano przy użyciu automatycznej płuczki do płytek ELISA.

W kolejnym etapie do każdej z opróżnionych studzienek płytki ELISA dodano 100 μ l buforu blokującego (pkt. 4.1.5) w celu wyblokowania wolnych miejsc polistyrenu wiążących białko. Inkubację płytki przeprowadzono na mieszadło elektrycznym przez 1h w temp. pokojowej.

Po zakończonej inkubacji płytkę wypłukano zgodnie z wyżej opisaną procedurą. Do opróżnionych studzienek dodano następnie po 50 μ l immunoglobulin IgG anti-L-FABP rozcieńczonych w buforze blokującym do stężenia 5 μ g/ml. Płytkę inkubowano na mieszadło elektrycznym przez 1h w temp. pokojowej.

Wykonano kolejne płukanie płytki jak opisano wyżej.

Do każdej z opróżnionych studzienek płytki ELISA dodano po 50 μ l roztworu komercyjnych II przeciwciał (kozych immunoglobulin anti-królicze-IgG, sprzężonych z jelitową izoformą bydłczej fosfatazy alkalicznej), rozcieńczonych w buforze blokującym w stosunku 1 : 2 tys. Płytkę inkubowano ponownie na mieszadło elektrycznym przez 1h w temp. pokojowej.

Po zakończeniu inkubacji płytkę przepłukano 2-krotnie buforem do płukania płytki (pkt. 4.1.4), natomiast do trzeciego płukania użyto wody podwójnie destylowanej, aby wypłukać nadmiar fosforanu, który jest inhibitorem alkalicznej fosfatazy.

Detekcję przeprowadzono dodając do wszystkich studzienek po 50 μ l buforu z substratem dla AP (pkt. 4.1.6), który pod wpływem aktywności enzymatycznej alkalicznej fosfatazy przekształca się w rozpuszczalny w wodzie barwny produkt. Po 15 min. inkubacji płytki w temp. pokojowej w miejscu pozbawionym dostępu światła odczytano fotometrycznie wartość OD przy dł. fali $\lambda=405$ nm dla każdej ze studzienek przy pomocy specjalnego czytnika. Wyniki uśredniono i sporządzono wykres półlogarytmiczny zależności OD od stężenia antygeny, tj. L-FABP, którym

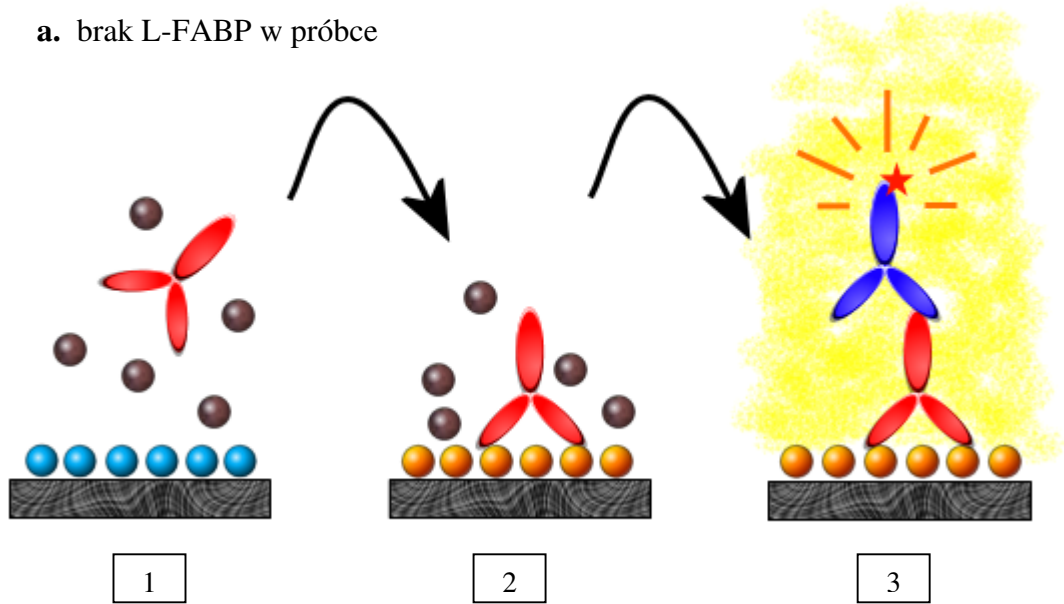
pokryto studzienki na płycie ELISA. Za granicę czułości metody przyjęto najmniejsze stężenie L-FABP, dla którego zmierzona wartość OD plasuje się na liniowym odcinku krzywej i różni się istotnie od zmierzonego tła.

5.3. Ilościowe oznaczanie L-FABP w materiale biologicznym metodą kompetycyjnego testu ELISA

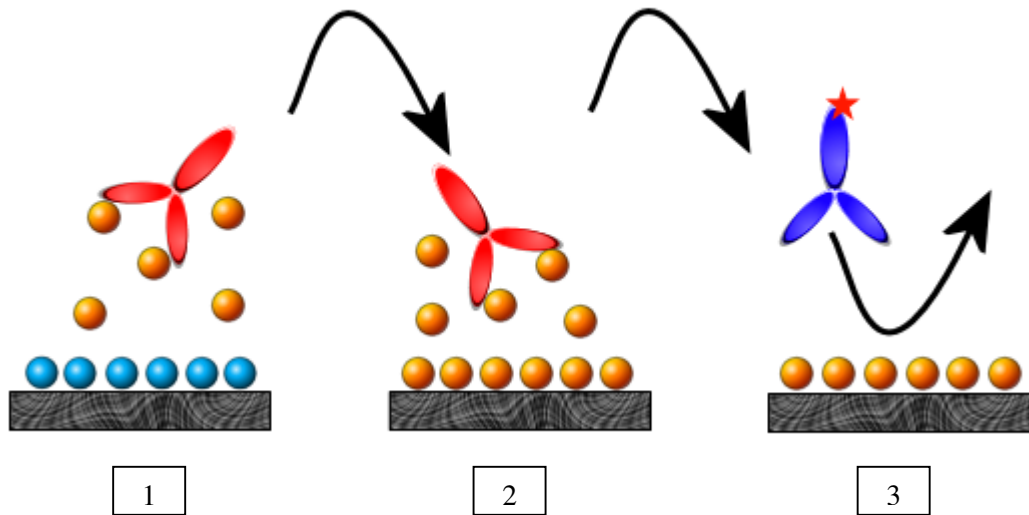
Kompetycyjny test ELISA (w układzie blokującym) do ilościowego oznaczania L-FABP w ludzkim materiale biologicznym zaprojektowano w następujący sposób. Najpierw inkubowano próbkę badaną z roztworem immunoglobulin IgG anty-L-FABP, w celu wyblokowania przeciwciał cząsteczkami natywnego L-FABP obecnego w próbce badanej. Następnie do studzienek wytapetowanych wysycającym roztworem L-FABP, naniesiono inkubowaną wcześniej mieszaninę złożoną z próbki badanej i roztworu oczyszczonych immunoglobulin IgG anty-L-FABP. W trakcie krótkiej inkubacji wiązanie immunoglobulin anty-L-FABP z antygenem opłaszczającym studzienkę było tym mniejsze, im większa była ilość natywnego L-FABP w próbce badanej, które specyficznym zablokowało miejsca wiążące immunoglobulin w trakcie fazy blokującej testu. Po standardowym wypłukaniu płytki, inkubacji z II przeciwciałami anty-królicze-IgG sprzężonymi z AP i przeprowadzeniu reakcji barwnej, zmierzona w 405 nm gęstość optyczna roztworu była odwrotnie proporcjonalna do ilości L-FABP w próbce badanej. Precyzyjne określenie stężenia L-FABP w badanej próbce było możliwe poprzez porównanie odczytanej wartości OD z krzywą wzorcową, sporządzoną w oparciu o seryjne rozcieńczenia oczyszczonego L-FABP o znanym stężeniu.

Poglądowy schemat kompetycyjnego testu ELISA z fazą blokującą przedstawiono na poniższej rycinie (Ryc. 3, str. 52).

a. brak L-FABP w próbce



b. L-FABP obecne w próbce



Ryc. 3. Poglądowy schemat kompetycyjnego testu ELISA z fazą blokującą. Wyróżniono 3 charakterystyczne etapy testu: 1 – blokowanie przeciwciał anty-L-FABP antygenami zawartymi w próbce badanej na płytce opłaszczanej albuminą (oznaczonej w tekście jako „B”), 2 – transfer mieszaniny z etapu 1. na płytkę opłaszczoną wyizolowanym L-FABP (oznaczoną w tekście jako „M”), 3 – płukanie z następującą fazą detekcji wtórnymi przeciwciałami anty-królicze IgG sprzężonymi z fosfatazą alkaliczną (AP). Jeśli w próbce badanej nie ma L-FABP

na płytce „M” pojawia się intensywne zabarwienie (Ryc. 3a), jeśli L-FABP jest obecne – koloru brak (Ryc. 3b).

Szczegółowy opis procedury doświadczalnej.

Każdy kompetycyjny test ELISA przeprowadzano przy użyciu 2 płytek Maxisorp (płytki ELISA firmy Nunc - o wzmożonym powinowactwie do białka), z których jedną określoną roboczo mianem **pomiarowej** oznaczano literą „M” od ang. (measure), a drugą używaną do rozcieńczania prób badanych i mieszania z przeciwciałami w fazie blokującej testu, oznaczano literą „B” (od ang. block) i określano roboczo mianem płytki **blokującej**.

Przygotowanie płytki pomiarowej „M”.

Do wszystkich 96 studzienek płytki pomiarowej naniesiono po 50 µl roztworu oczyszczonego L-FABP w buforze węglanowym o pH 9,6 (pkt. 4.1.3) w stężeniu 5 µg/ml, które jak wykazano wcześniej jest stężeniem wysycającym wszystkie miejsca płytki polistyrenowej wiążące białko (pkt. 5.2.9).

Płytkę „M” umieszczono na specjalnym mieszadle elektrycznym wprawiającym płytkę w ruch obrotowy z prędkością 200 obr./min i inkubowano przez 1h w temp. pokojowej. Intensywne mieszanie zawartości studzienek ma na celu ułatwienie kontaktu cząsteczek ze ściankami studzienek, co znacznie skraca czas konieczny na kompletne wysycenie miejsc polistyrenu wiążących białko. Następnie wszystkie studzienki na płytce „M” wypłukano 3-krotnie opróżniając zawartość każdej z nich a potem napełniając 200 µl buforu do płukania płytki (pkt. 4.1.4). Czas nasączenia (obecności roztworu płuczącego w studzience w jednym cyklu mycia) tzw. soaking time wynosił 5 sek. Operację tę wykonywano przy użyciu automatycznej płuczki do płytek ELISA.

W kolejnym etapie do każdej z opróżnionych studzienek pomiarowej płytki ELISA dodano 100 µl buforu blokującego (pkt. 4.1.5) aby wyblokować ewentualne pozostałe miejsca polistyrenu wiążące białko. Inkubację płytki „M” przeprowadzono na mieszadle elektrycznym przez 1h w temp. pokojowej.

Po zakończonej inkubacji płytkę „M” wypłukano zgodnie z wyżej opisaną procedurą.

Przygotowanie płytki „B”.

Do wszystkich 96 studzienek płytki blokującej „B” naniesiono po 200 μ l buforu blokującego (pkt. 4.1.5) aby wysycić wszystkie miejsca polistyrenu wiążące białko, czyli innymi słowy, pozbawić płytkę ELISA „B” jakiegokolwiek zdolności wiązania białka.

Krzywa kalibracyjna.

Ażeby zapewnić większą kontrolę powtarzalności pomiaru, każdorazowo sporządzano 2 krzywe kalibracyjne, dla których rezerwowano 2 „górne” poziome rzędy studzienek płytki ELISA „B”, opisane standardowo literami „A” i „B”. W obu rzędach: „A” i „B”, składających się z 12-tu studzienek sporządzano seryjne rozcieńczenia oczyszczonego L-FABP w buforze blokującym (pkt. 4.1.5) zaczynając od stężenia 2,5 μ g/ml w kolumnie nr 1, aż do około 2 ng/ml w kolumnie nr 11. Objętość naniesionego do każdej ze studzienek roztworu wynosiła 50 μ l. Do ostatniej studzienki w rzędzie „A” oraz w rzędzie „B” (o numerze kolumny równym 12) płytki blokującej ELISA naniesiono 50 μ l buforu blokującego bez L-FABP (kontrola negatywna).

Przygotowanie próbek badanych.

Do pozostałych rzędów studzienek (tj. z wyjątkiem 2 „górnych” rzędów opisanych literami „A” oraz „B”) na płytce „B” nanoszono seryjne rozcieńczenia próbek badanych w buforze blokującym (pkt. 4.1.5), w taki sposób, że każdy rząd studzienek był przeznaczony na seryjne rozcieńczenie jednej próbki. Ostatnie studzienki w każdym z rzędów (tj. studzienki w kolumnie nr 12) wypełniano „czystym” buforem blokującym. Objętość roztworu we wszystkich studzienkach płytki blokującej „B” wynosiła na tym etapie procedury doświadczalnej 50 μ l.

Faza blokująca kompetycyjnego testu ELISA.

Do każdej z 96 studzienek blokującej płytki „B” dodano po 50 μ l roztworu immunoglobulin IgG anty-L-FABP w buforze blokującym o stężeniu 1 μ g/ml. A zatem w każdej ze studzienek płytki B znajdowało się teraz po 100 μ l roztworu immunoglobulin IgG anty-L-FABP o stężeniu 0,5 μ g/ml, rozcieńczonych różnymi próbkami zarówno badanymi, jak i „wzorcowymi” o różnej zawartości białka L-FABP. Płytkę „B” inkubowano następnie nieustannie mieszając na mieszadle elektrycznym (200 obr./min) przez 1 h w temp. pokojowej. Na tym etapie testu L-FABP obecne w niektórych próbkach wiązało się specyficznym z immunoglobulinami

IgG anty-L-FABP blokując tym samym miejsca wiążące cząsteczek immunoglobulin. Stąd nazwa tego etapu testu – faza blokująca.

Faza immunoadsorpcji immunoglobulin IgG.

W kolejnym etapie testu przeniesiono po 50 μ l zawartości każdej ze studzienek płytki „B” na płytkę pomiarową „M”, zachowując oryginalne koordynaty każdej próbki, tzn. 50 μ l próbki A1 z płytki „B” przeniesiono do studzienki A1 na płytce „M”, 50 μ l próbki A2 z płytki „B” przeniesiono do studzienki A2 na płytce „M”, itd. Inkubację prowadzono przez 30 min. w celu związania nadmiaru niewyblokowanych immunoglobulin IgG anty-L-FABP ze ściankami studzienek płytki „M” opłaszczonych białkiem L-FABP. Im większa była zawartość natywnego L-FABP w próbce badanej, tym więcej było w mieszaninie kompleksów antygen-przeciwciało a tym samym, mniej wolnych immunoglobulin wiązało się ze studzienką na płytce „M”.

Faza detekcji.

Wykonano kolejne płukanie płytki „M” jak opisano wyżej (patrz podrozdział pt. „Przygotowanie płytki pomiarowej M” pkt. 5.3).

Do każdej z opróżnionych studzienek płytki ELISA dodano po 50 μ l roztworu komercyjnych II przeciwciał (kozich immunoglobulin anty-królicze-IgG, sprzężonych z jelitową izoformą bydlęcej fosfatazy alkalicznej), rozcieńczonych w buforze blokującym w stosunku 1 : 2 tys. Płytkę pomiarową „M” inkubowano ponownie na mieszadle elektrycznym przez 1h w temp. pokojowej.

Po zakończeniu inkubacji płytkę przepłukano 2-krotnie buforem do płukania płytki (pkt. 4.1.4), natomiast do trzeciego płukania użyto wody podwójnie destylowanej, aby wypłukać nadmiar fosforanu, który jest inhibitorem alkalicznej fosfatazy.

Detekcję przeprowadzono dodając do wszystkich studzienek po 50 μ l buforu z substratem dla AP (pkt. 4.1.6), który pod wpływem alkalicznej fosfatazy przekształca się w rozpuszczalny w wodzie barwny produkt. Po 15-minutowej inkubacji płytki w temp. pokojowej w miejscu pozbawionym dostępu światła odczytano fotometrycznie wartość OD przy dł. fali $\lambda=405$ nm dla każdej ze studzienek przy pomocy fotometru do mikropłytek (BioRad Microplate Reader, Model 3550-UV). Na podstawie odczytanych absorbancji sporządzono wykres półlogarytmiczny zależności OD od stężenia antygeny w próbkach „wzorcowych” i próbkach badanych. Ze względu na charakter kompetycyjnego testu ELISA

uzyskano odwrotnie proporcjonalną zależność OD od stężenia antygeny w próbce (korelacja ujemna).

Krzywą wzorcową sporządzano każdorazowo na podstawie średnich absorbancji odczytanych dla każdego punktu pomiarowego z rzędu „A” i „B”. Właściwą krzywą kalibracyjną stanowiła linia regresji wykreślona dla średnich absorbancji stężeń wzorcowych L-FABP.

Stężenie natywnego L-FABP w próbce badanej określono poprzez porównanie wartości OD odczytanej z krzywej regresji rozcieńczeń seryjnych próbki z wartością stężenia L-FABP odczytanego z punktu krzywej kalibracyjnej o tej samej wartości OD i przemnożenie odczytanego stężenia przez krotność rozcieńczenia próbki.

Analiza wyników.

Wartości stężenia L-FABP zmierzone w materiale biologicznym pochodzącym z jednorodnej próby uśredniono i podano wraz z odchyleniem standardowym.

Rozcieńczenia seryjne próbek badanych miały na celu zwiększenie prawdopodobieństwa uzyskania optymalnego rozcieńczenia próbki, dla którego odczytane OD zawierałoby się w przedziale odpowiadającym prostoliniowemu odcinkowi krzywej wzorcowej. Ponadto stanowiły dodatkową kontrolę poprawności pomiaru, ponieważ prawidłowo wykonane rozcieńczenia seryjne próbki tworzyły półlogarytmiczną zależność OD od rozcieńczenia, o przebiegu równoległym do krzywej wzorcowej. Analiza przebiegu krzywej rozcieńczeń dla próbki pozwalała na stosunkowo łatwe wychwycenie przypadkowych błędów grubych, co byłoby niemożliwe przy ograniczeniu metody do pomiaru absorbancji w punkcie.

Krzywa wzorcową była sporządzana niezależnie dla każdego pomiaru w celu zapewnienia maksymalnej dokładności i powtarzalności metody.

5.4. Model zwierzęcy ostrej niewydolności wątroby indukowanej galaktozaminą

W celu oceny kinetyki uwalniania L-FABP do krwi w przebiegu ostrej niewydolności wątroby wykorzystano zwierzęcy model doświadczalny ostrej niewydolności wątroby indukowanej D-galaktozaminą. Z powodów oczywistych tego rodzaju badań nie można przeprowadzić na ludziach. Na wykonanie badań na zwierzętach uzyskano wymaganą zgodę Komisji Etyki Badań Naukowych.

Do doświadczenia wykorzystano 49 szczurów (samców), z czego 25 zwierząt stanowiło subpopulację kontrolną (nieotraktowaną), którą wykorzystano do wyznaczenia „normy” fizjologicznej L-FABP w surowicy krwi (przy pomocy kompetycyjnego testu ELISA), charakteryzującej badaną populację szczurów. Poziom górnej granicy „normy” L-FABP w surowicy szczura wyliczono sumując średnią arytmetyczną z populacji 25 nieotraktowanych szczurów kontrolnych i podwojoną wartość odchylenia standardowego charakteryzującego tę populację.

Pozostałą grupę 24 zwierząt wykorzystano do właściwego doświadczenia i podzielono w tym celu na 2 podgrupy: kontrolną – traktowaną solą fizjologiczną (8 zwierząt) i grupę szczurów traktowanych galaktozaminą (16 zwierząt). Szczurom kontrolnym podano dootrzewnowo roztwór soli fizjologicznej w objętości 1ml. Szczurom traktowanym podano w tym samym czasie roztwór D-galaktozminy w soli fizjologicznej, w dawce 1200 mg/kg masy ciała [160,161], co odpowiadało średniej dawce 450 mg galaktozminy na 1 zwierzę. Następnie w zdefiniowanych odstępach czasu, po: 0, 2, 6, 10, 15, 20, 24 i 48 godz. od podania, zwierzęta znieczulano eterem dietylowym, uśmiercano przez dekapitację i skrwawiano. Każdorazowo pobierano krew od 1 szczura kontrolnego i 2 szczurów traktowanych galaktozaminą. Krew pobraną od każdego ze szczurów pozostawiano na 1 h w probówce typu Corning w temp. pokojowej. Następnie krew przetrzymywano przez 12 h w temp. 4⁰C. W kolejnym etapie próbkę ze skrzepłą krwią wirowano przy 1,5 tys. x g przez 15 min. w temp. 4⁰C. Ostrożnie zbierano supernatant, który zawierał surowicę szczura. Surowicę zabezpieczono w próbkach Eppendorf w temp. (-20⁰C).

W uzyskanych próbkach surowicy krwi oznaczano L-FABP metodą kompetycyjnego testu ELISA oraz AlAT korzystając ze standardowej usługi Centralnego Laboratorium Klinicznego AMG. Wyniki oznaczeń poziomu L-FABP w surowicy szczurów uzyskane w trakcie doświadczenia kinetycznego porównano z zakresem ustalonej wcześniej „normy” fizjologicznej.

6. Analiza statystyczna

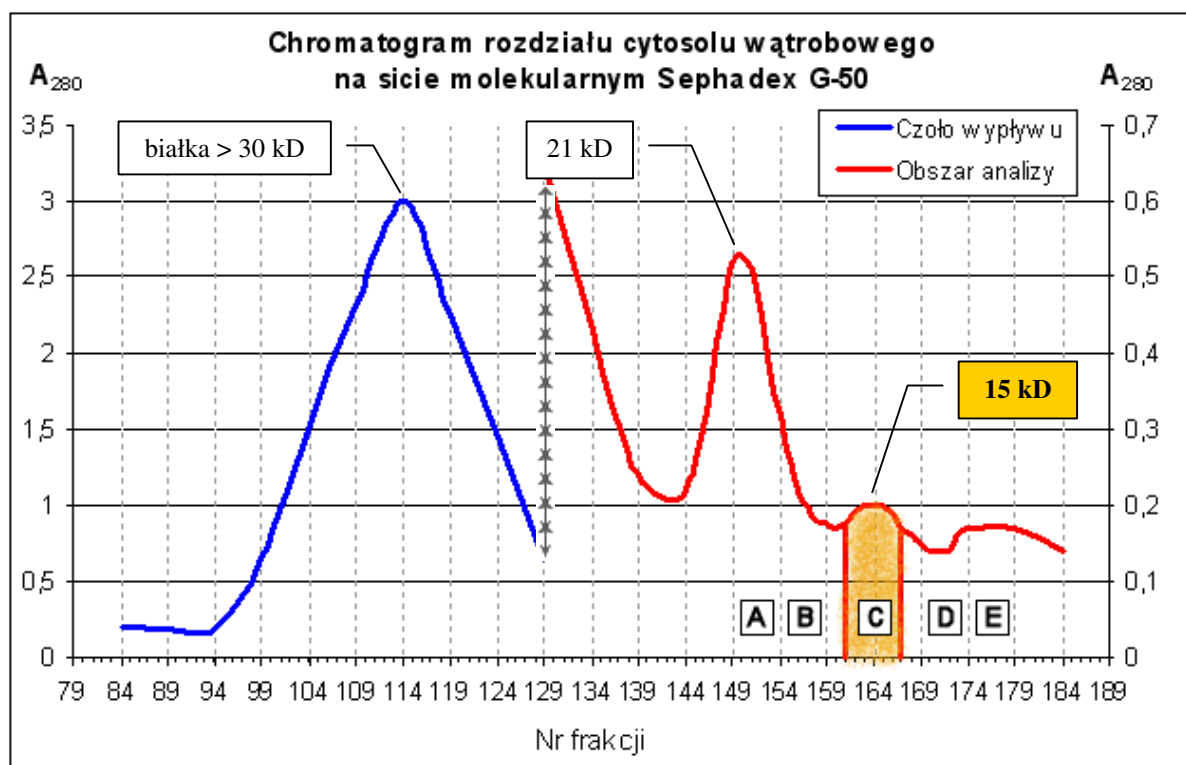
Wyniki przedstawiono jako wartości średnie wraz z wartością odchylenia standardowego (SD) lub błędem standardowym średniej (SEM). Analizę statystyczną przy porównaniu dwóch średnich przeprowadzono stosując niesparowany test t-Studenta (jednostronny lub dwustronny), test Cochran-Coxa (jednostronny lub dwustronny) oraz test nieparametryczny U Manna-Whitneya. Porównanie wielu średnich arytmetycznych przeprowadzono stosując test ANOVA jednoczynnikowa z powtarzanymi pomiarami. Weryfikację normalności rozkładu danych przeprowadzono testem Shapiro-Wilka. Do weryfikacji hipotezy o jednorodności wariancji zastosowano test Levena. Do analizy regresji liniowej zastosowano test korelacyjny Pearsona, natomiast do analizy regresji nieliniowej test korelacyjny Spearmana. Za poziom statystycznej istotności przyjęto $p = 0,05$. Obliczenia statystyczne oraz wykresy wykonano przy pomocy programu Statistica 6.0 firmy StatSoft, Inc., pakietu biostatystycznego GraphPad Prism 4, firmy GraphPad Software, Inc. oraz arkusza kalkulacyjnego Microsoft Excel 2000 firmy Microsoft Corporation wraz z pakietem narzędzi Analysis Tool Pack, firmy Pearson Software Consulting, LLC.

7. Wyniki

7.1. Oczyszczanie białka wiążącego kwasy tłuszczowe z wątroby ludzkiej

7.1.1. Rozdział denaturowanej termicznie frakcji cytosolu wątroby ludzkiej na kolumnie Sephadex G-50

W wyniku rozdziału denaturowanej termicznie frakcji cytosolu z wątroby ludzkiej na kolumnie wypełnionej złożem Sephadex G-50 uzyskano chromatogram przedstawiony na ryc. 4. Widocznych jest kilka szczytów białka. Dalszej analizie poddano frakcje białek o masie ok. 15 kD wraz z frakcjami sąsiadującymi, oznaczonymi na rycinie literami od A do E.



$$V_T = 1440 \text{ ml (objętość złoża)}$$

$$V_S = 10 \text{ ml (objętość próbki)}$$

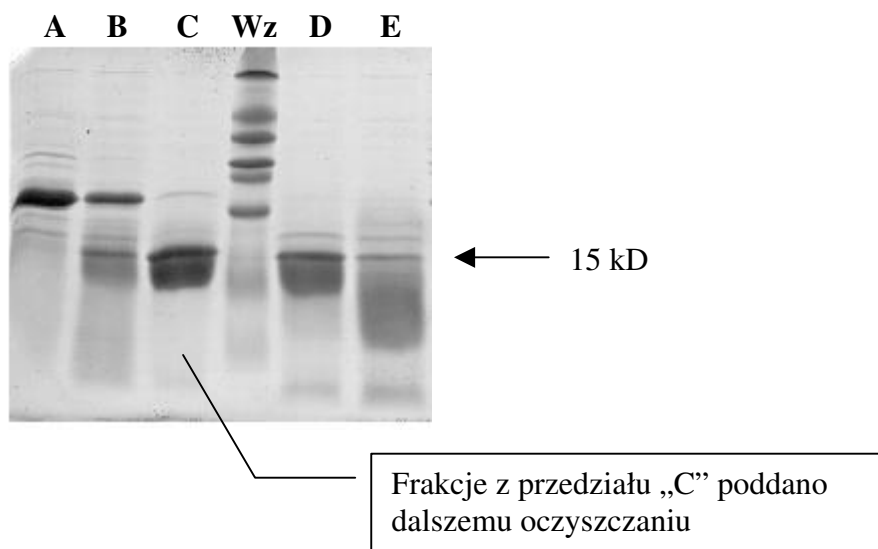
$$V_f = 5 \text{ ml (objętość frakcji)}$$

$$\text{Przepływ} = 40 \text{ ml/h}$$

Ryc. 4. Chromatogram denaturowanej termicznie frakcji cytosolu wątrobowego na kolumnie ze złożem Sephadex G-50.

7.1.2. Analiza elektroforetyczna białka metodą SDS-PAGE

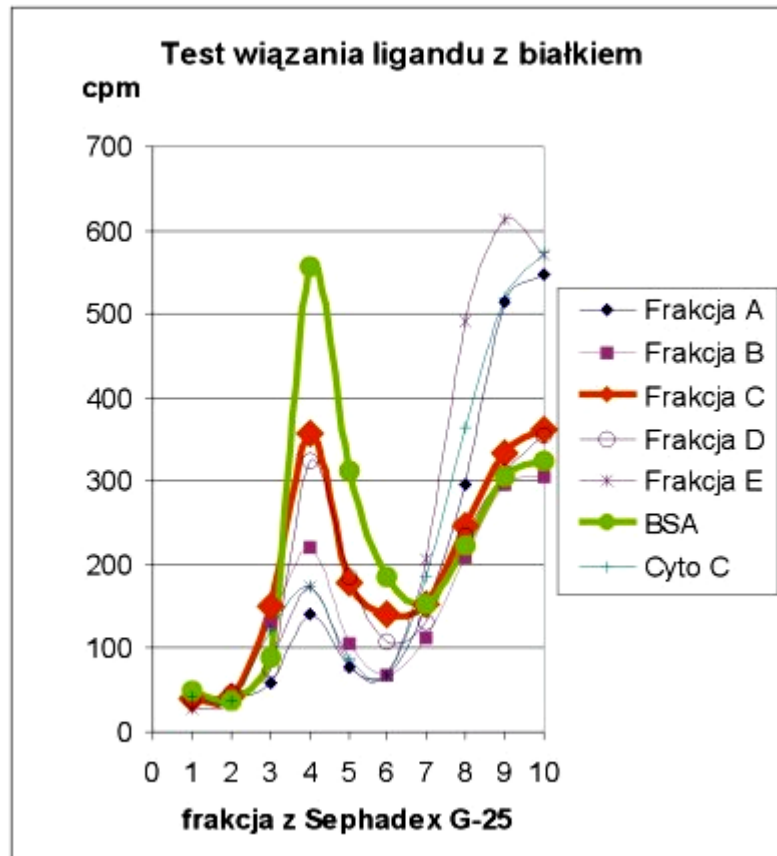
Aby potwierdzić obecność białka wiążącego kwasy tłuszczowe we frakcjach zebranych z kolumny Sephadex G-50 przeprowadzono rozdział uzyskanych frakcji chromatograficznych metodą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym (Ryc. 5) oraz test wiązania wolnych kwasów tłuszczowych (Ryc. 6).



Ryc. 5. Analiza elektroforetyczna białka wypływającego z kolumny Sephadex G-50 we frakcjach A – E. Oznaczenia frakcji A – E jak na ryc. 4. Wz – wzorce masowe.

7.1.3. Test wiązania wolnych kwasów tłuszczowych z białkiem

Białko wiążące kwasy tłuszczowe z wątroby ludzkiej nie posiada aktywności enzymatycznej. Z tego powodu jego detekcja w próbce została przeprowadzona w oparciu o test wiązania kwasu palmitynowego znakowanego izotopem ^{14}C z białkiem. Celem doświadczenia było potwierdzenie obecności białka wiążącego kwasy tłuszczowe w otrzymanych frakcjach A – E (ryc. 4). Wyniki przedstawiono w formie chromatogramów na ryc. 6.

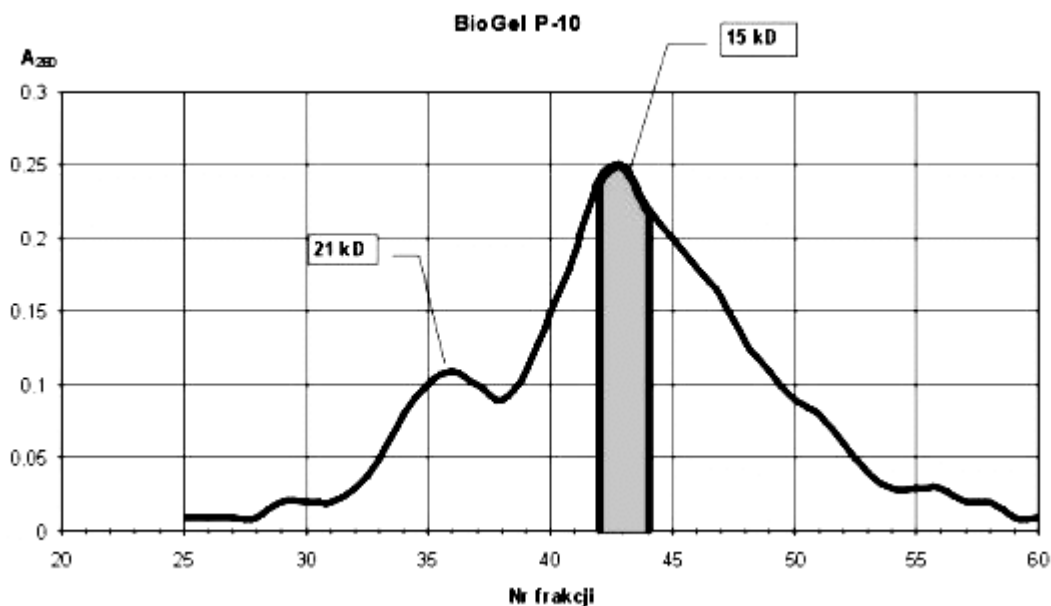


Ryc. 6. Test wiązania znakowanego radioaktywnie palmitynianu z białkiem. Oznaczenia frakcji A – E jak na ryc. 4.

Zgodnie z oczekiwaniem, spośród zebranych frakcji A – E najwyższą zdolność wiązania kwasu palmitynowego zaobserwowano dla frakcji białek o masie ok. 15 kD, oznaczonej literą C (frakcje A – E oznakowano jak na ryc. 4). Frakcję tę po poprzedniej liofilizacji poddano dalszemu oczyszczaniu na kolumnie ze złożem BioGel P-10.

7.1.4. Sączenie molekularne na żelu BioGel P-10

Liofilizat białka (frakcji C z ryc. 4) poddano chromatografii na złożu BioGel P-10. Wyniki rozdziału przedstawia ryc. 7.



$V_T = 500$ ml (objętość złoża)

$V_S = 4$ ml (objętość próbki)

$V_f = 5$ ml (objętość frakcji)

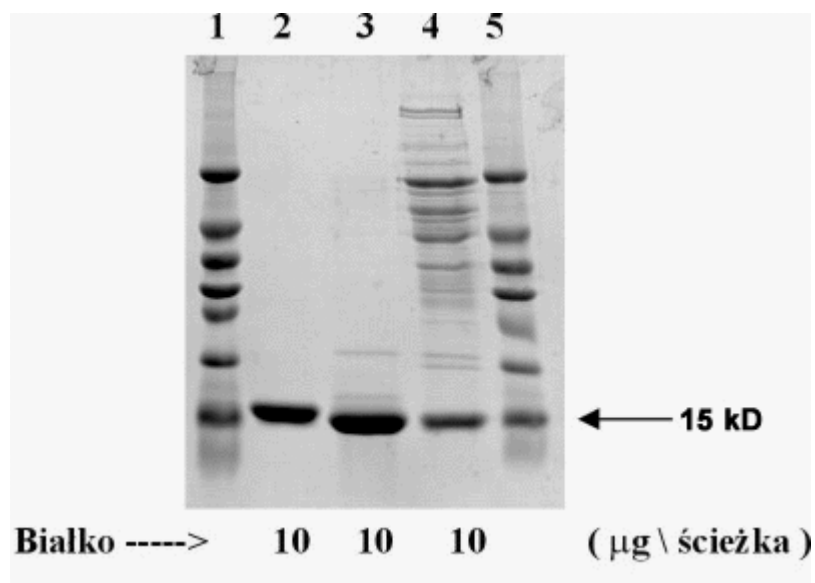
Przepływ = 40 ml/h

Ryc. 7. Chromatogram sączenia białka na żelu BioGel-P10.

Fracje odpowiadające masie cząsteczkowej ok. 15 kD (nr 42-44) zebrano i poddano ultrafiltracji. W następnym etapie przeprowadzono kontrolę homogenności próbki wykorzystując technikę elektroforezy na gradientowym żelu poliakrylamidowym (patrz pkt. 7.1.5).

7.1.5. Ocena homogenności białka zebranego z kolumny BioGel P-10 metodą SDS-PAGE na żelu gradientowym

Próbkę białka z pkt. 7.1.4 poddano elektroforetycznej kontroli homogenności. Dla porównania stopnia oczyszczenia użyto denaturowanej termicznie frakcji cytosolu wątrobowego a jako kontroli masowej cytochromu c z końskiego serca i standardowych wzorców masowych (dla białek o niskich masach cząsteczkowych). Zastosowano technikę elektroforezy na żelu gradientowym, ażeby uniknąć efektu „rozmycia” białek niskomasowych na żelu. Reprezentatywny elektroforegram przedstawiono na ryc. 8.



1, 5 – wzorce

2 – cytochrom c

3 – frakcja bogata w L-FABP

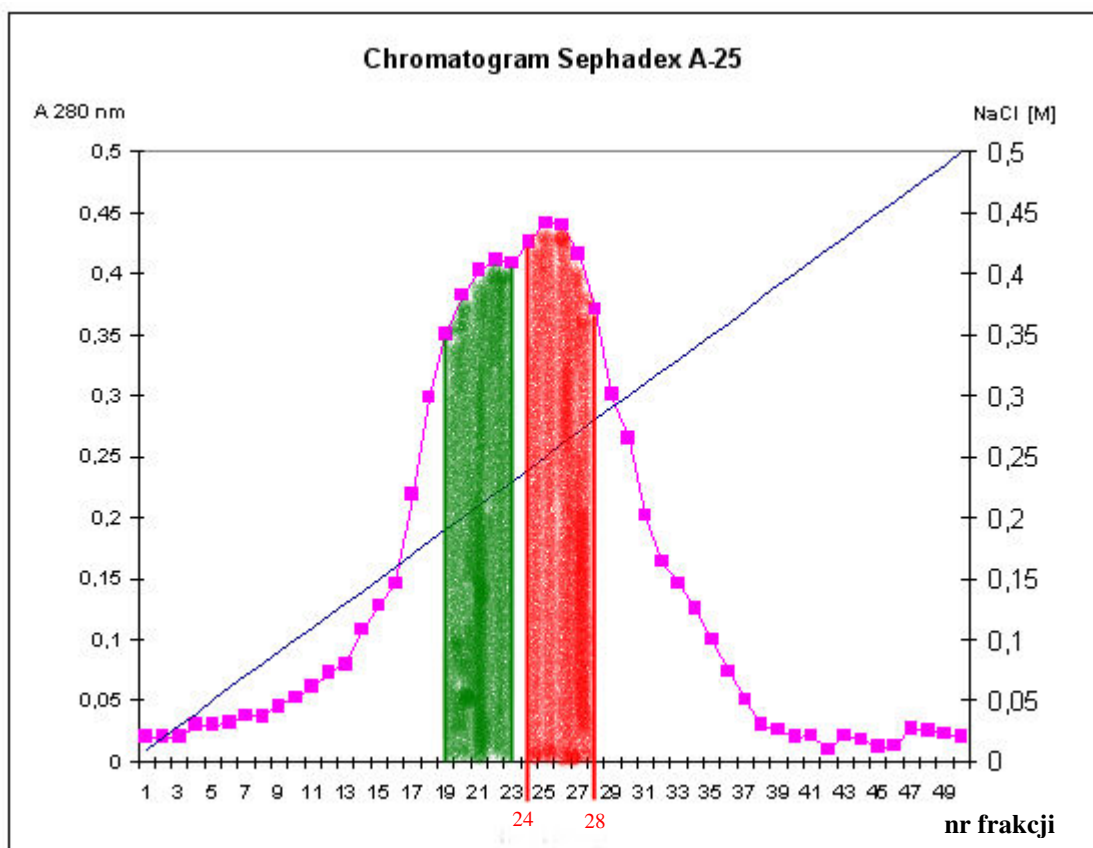
4 – denaturowana termicznie frakcja cytosolu wątrobowego

Ryc. 8. Elektroforegram gradientowy frakcji zebranej z kolumny BioGel P-10.

Na podstawie elektroforegramu można oszacować, że uzyskano wysoki stopień czystości białka odpowiadającego masie ok. 15 kD. Widać jedynie śladowe zanieczyszczenie białkami o nieco większej masie cząsteczkowej. Aby pozbyć się tych białek w następnym etapie oczyszczania zastosowano technikę chromatografii jonowymiennej.

7.1.6. Chromatografia jonowymienna – Sephadex A-25

Próbkę białka z pkt. 7.1.4 (zebraną z kolumny BioGel P-10) poddano dalszemu oczyszczaniu na złożu o właściwościach wymiennicza anionowego. Reprezentatywny chromatogram przedstawiono na poniższej rycinie (Ryc. 9).



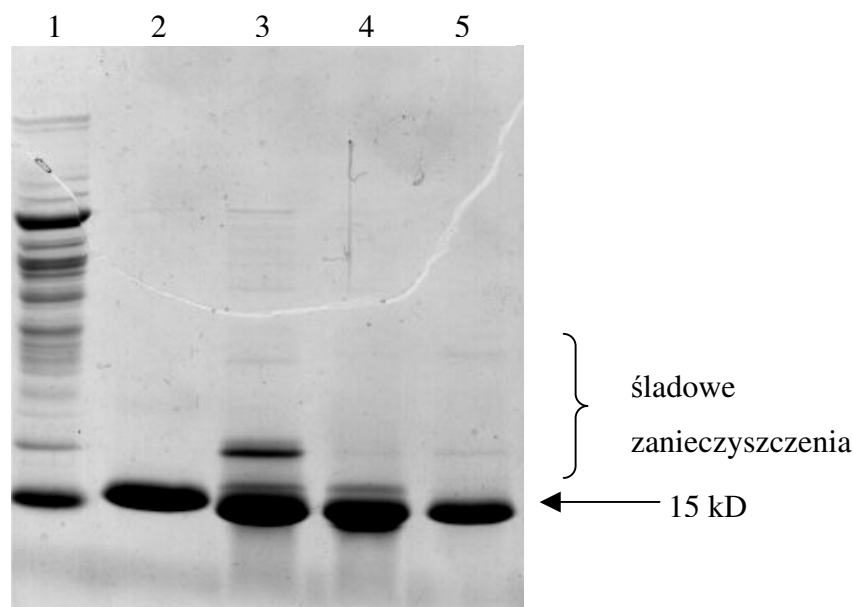
Ryc. 9. Chromatografia jonowymienna na złożu DEAE Sephadex A-25. Widoczne 2 szczyty białka oznaczone odpowiednio kolorem zielonym i czerwonym.

Zebrano po 5 frakcji odpowiadających obu szczytom chromatogramu: 19-23 (kolor zielony) i 24-28 (kolor czerwony).

7.1.7. Elektroforetyczna analiza frakcji zebranych z kolumny jonowymiennej Sephadex A-25

Obie frakcje zebrane z kolumny wypełnionej DEAE Sephadex A-25 (pkt. 7.1.6), oznaczone na ryc. 9 odpowiednio kolorem zielonym i czerwonym, po uprzedniej ultrafiltracji poddano elektroforetycznej kontroli homogenności na gradientowym żelu poliakrylamidowym. Na podstawie analizy elektroforegramu (Ryc. 10) wydaje się, że próbka ze ścieżki nr 5 (odpowiadająca frakcji „czerwonej” z ryc. 9) zawiera białko o stosunkowo wysokim stopniu czystości w ilości zapewniającej

akceptowalną wydajność metody izolacji białka wiążącego kwasy tłuszczowe z wątroby ludzkiej, tj. ok. 2mg białka z 50 g miększu wątroby.



- 1 – denaturowana termicznie frakcja cytosolu wątrobowego
- 2 - cytochrom c
- 3 - próbka wyjściowa naniesiona na wymiennicz anionowy
- 4, 5 - kolejne frakcje zebrane z jonowymieniacza Sephadex A-25:
 - 4 – frakcja „zielona” z ryc. 9 (nr 19-23)
 - 5 – frakcja „czerwona” z ryc. 9 (nr 24-28)

Ryc. 10. Elektroforegram gradientowy frakcji zebranych z kolumny jonowymiennej.

Do szczepienia królika w celu uzyskania specyficznych przeciwciał anti-L-FABP użyto frakcji „czerwonej” z ryc. 9 (nr 24-28), przedstawionej na ścieżce nr 5 powyższego elektroforegramu (Ryc. 10), w której stwierdzono jedynie śladowe zanieczyszczenia.

7.1.8. Elektroforeza preparatywna

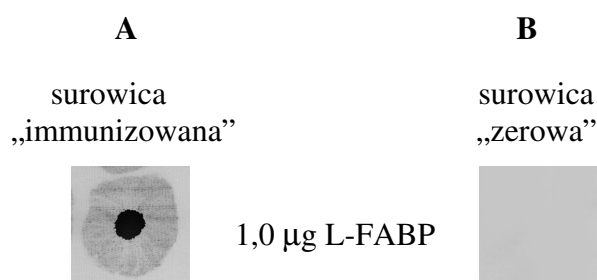
Próbowano również zastosować elektroforezę preparatywną w celu pozbycia się śladów zanieczyszczeń obecnych we frakcji „czerwonej” zebranej z wymienniacza anionowego (Ryc. 9 i Ryc. 10). Ze względu na niską wydajność metody (poniżej 10%) oraz potencjalną możliwość istotnej zmiany właściwości antygenowych białka

(destrukcja epitopów nieliniowych), zaniechano stosowania tej procedury jako kolejnego etapu oczyszczania białka L-FABP.

7.2. Otrzymywanie specyficznych przeciwciał przeciwko izoformie wątrobowej białka wiążącego kwasy tłuszczowe

7.2.1. Immunodetekcja specyficznych przeciwciał anty-L-FABP metodą dot-blotting

Skuteczność immunizacji zweryfikowano techniką dot-blotting oceniając powinowactwo immunoglobulin obecnych w pełnej surowicy królika względem immunogenu czyli wyizolowanego L-FABP. Dot-blotting wykonano w układzie z surowicą pobraną od królika immunizowanego białkiem L-FABP i surowicą „zerową” (kontrola negatywna). Wyniki przedstawiono na poniższej rycinie (Ryc. 11 A, B).



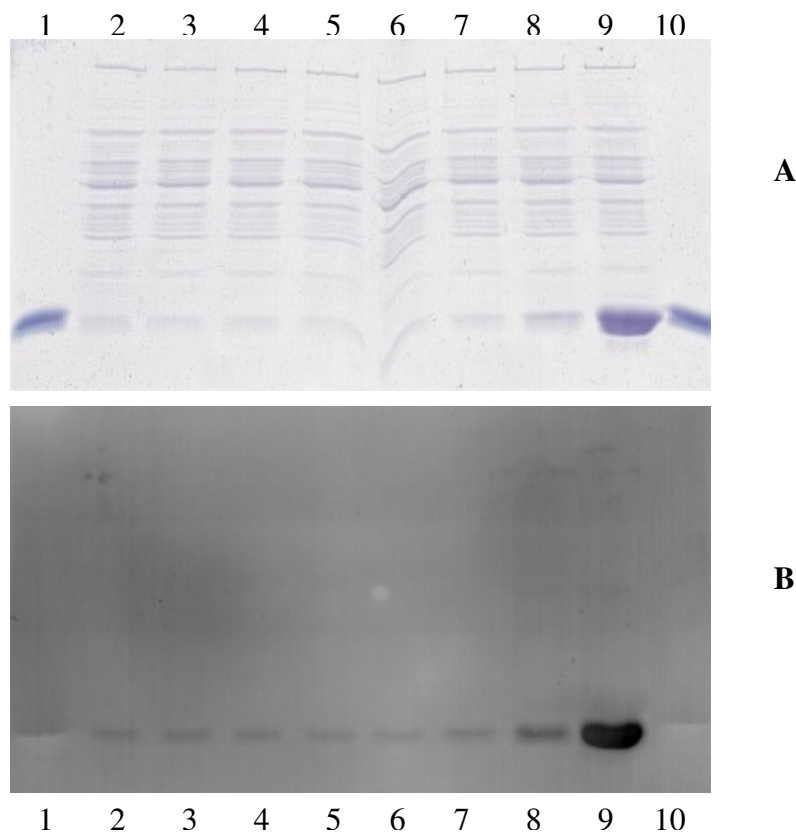
Ryc. 11. Immunodetekcja specyficznych przeciwciał anty-L-FABP metodą dot-blotting: A - pozytywny wynik testu z surowicą „immunizowaną”, B – negatywny wynik testu z surowicą „zerową”.

Zgodnie z oczekiwaniem surowica „zerowa” okazała się immunochemicznie obojętna względem antygeny L-FABP, natomiast surowica „immunizowana” charakteryzowała się wysokim powinowactwem do L-FABP umożliwiając detekcję śladowych ilości białka.

W testach ELISA stosowano immunoglobuliny klasy IgG wyizolowane techniką chromatografii powinowactwa z surowicy królika immunizowanego ludzkim białkiem L-FABP (jak opisano w 5.2.7) po uprzednim sprawdzeniu ich specyficzności i czułości.

7.2.2. Kontrola specyficzności otrzymanych immunoglobulin anty-L-FABP

Test specyficzności przeciwciał anty-L-FABP względem ekstraktu wątrobowego przeprowadzono techniką Western-blotting, jak opisano w 5.2.8. Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinie poniżej (Ryc. 12).



A – elektroforegram gradientowy ekstraktu wątrobowego

B – membrana wybarwiona techniką Western-blotting

Ścieżki od 3 do 9 zawierają ekstrakt wątrobowy „wzbogacony” wyizolowanym wcześniej białkiem wiążącym kwasy tłuszczowe z wątroby ludzkiej, dodawanym w stężeniach rosnących zgodnie z opisem:

2 - 0 ng/ml, 3 - 10 ng/ml, 4 - 100 ng/ml, 5 - 1 µg/ml, 6 - 10 µg /ml, 7 - 100 µg /ml,

8 - 1 mg/ml, 9 - 10 mg/ml, ścieżki: 1, 10 - cytochrom c (14,2 kD) - kontrola negatywna

Ryc. 12. Kontrola specyficzności immunoglobulin anty-L-FABP metodą Western-blotting.

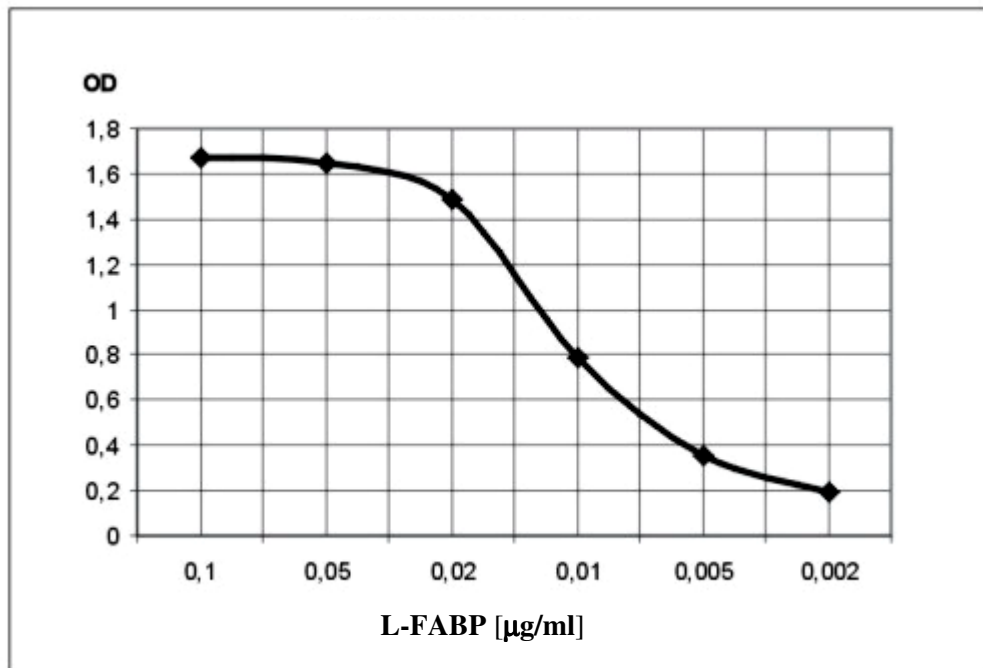
Otrzymane przeciwciała nie wykazywały reakcji immunochemicznej z białkami ekstraktu wątrobowego za wyjątkiem L-FABP. Wynika z tego, że oczyszczone immunoglobuliny królicze IgG są wysoce specyficzne względem białka wiążącego kwasy tłuszczowe z wątroby ludzkiej.

Zgodnie z oczekiwaniem, wzbogacenie próbki ekstraktu wątrobowego odpowiednią ilością wyizolowanego wcześniej białka L-FABP, powoduje wzrost gęstości optycznej prążków odpowiadających masowo ok. 15 kD, co widać szczególnie wyraźnie na ścieżkach: 8 i 9 (Ryc. 12).

7.2.3. Kontrola czułości otrzymanych immunoglobulin anty-L-FABP

Kontrolę czułości immunoglobulin anty-L-FABP oszacowano metodą pośredniego (niekompetycyjnego) testu ELISA. W warunkach doświadczenia granicę czułości metody określono na **2,5 ng/ml** L-FABP, co odpowiada standardom testu ELISA.

Na podstawie analizy półlogarytmicznej zależności absorbancji od stężenia L-FABP zdefiniowano stężenie L-FABP w buforze węglanowym równe **5 µg/ml** jako wysycające (z dostatecznym nadmiarem) wszystkie miejsca wiążące białko na polistyrenie tworzącym studzienki w płytce ELISA, co wykorzystano w projektowaniu dalszych doświadczeń (Ryc. 13, str. 69).



Ryc. 13. Kontrola czułości immunoglobulin anti-L-FABP względem zakresu stężeń wyizolowanego antygenu (L-FABP) wykonana metodą pośredniego testu ELISA.

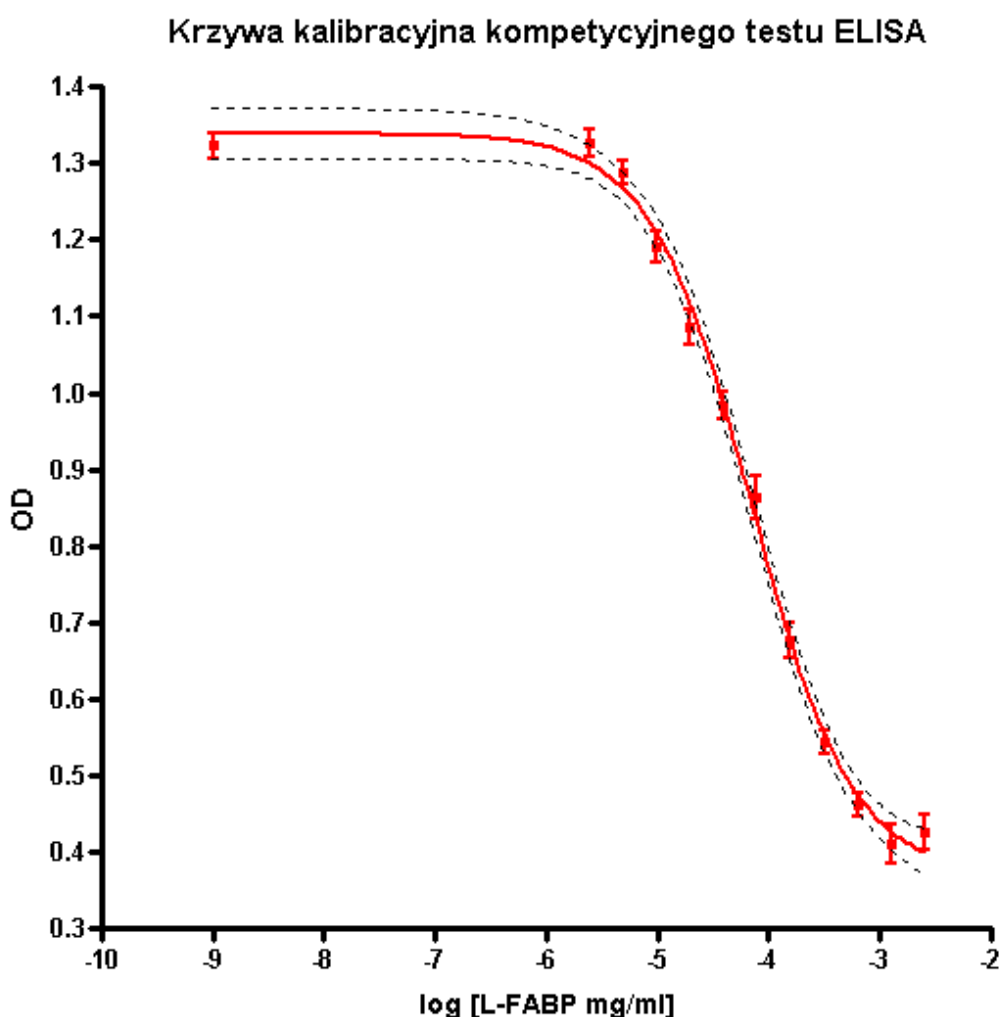
7.3. Zastosowanie przeciwciał w metodzie ELISA do oznaczania izoformy wątrobowej ludzkiego białka wiążącego kwasy tłuszczowe w materiale biologicznym

7.3.1. Kompetycyjny test ELISA

Kompetycyjny test ELISA (Competitive ELISA) jest metodą z wyboru stosowaną do ilościowego oznaczania antygenu w próbce, w której dominują białka nie będące przedmiotem zainteresowania [159]. Takie warunki doświadczalne wykluczają zastosowanie niekompetycyjnego testu ELISA w układzie pośrednim lub bezpośrednim, ponieważ ze względu na niską zawartość badanego antygenu w próbce nie mógłby on efektywnie konkurować o miejsca wiążące białko na płycie polistyrenowej. Na podstawie analizy wyników otrzymanych w trakcie procedury oczyszczania L-FABP z wątroby ludzkiej oraz przesłanek z piśmiennictwa, należy oczekiwać, że procentowa zawartość L-FABP w ludzkich tkankach, a w szczególności w płynach ustrojowych jest stosunkowo niewielka. Stąd, konieczność zastosowania nieco bardziej złożonego układu pomiarowego – jednej z modyfikacji kompetycyjnego testu ELISA, tj. kompetycyjnego testu ELISA w układzie blokującym [159].

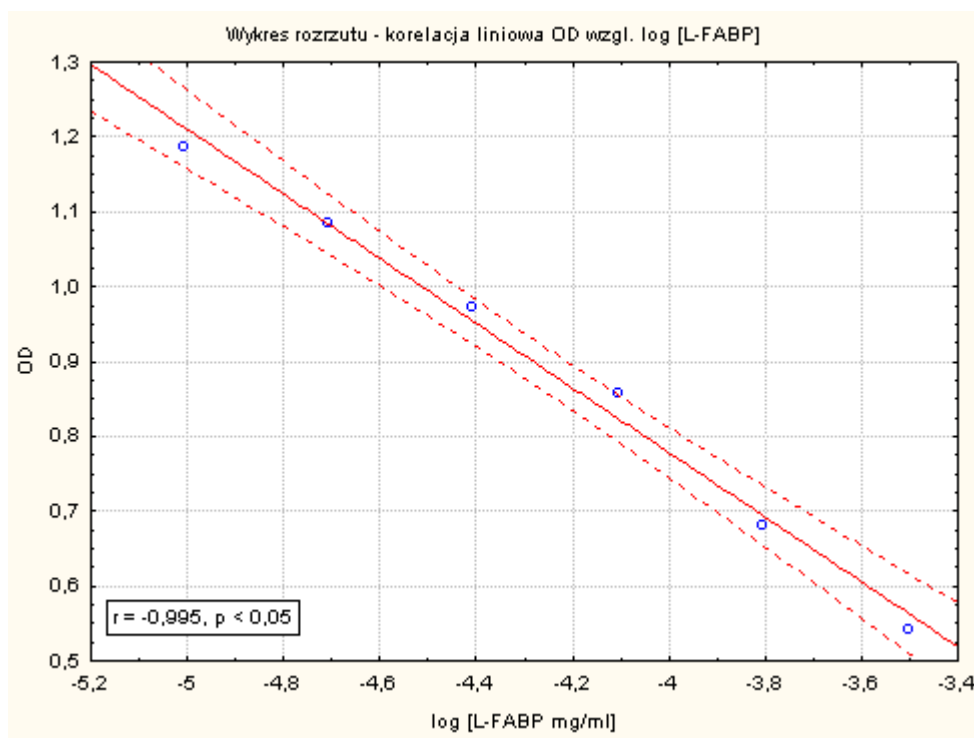
7.3.2. Określenie czułości metody

Czułość kompetycyjnego testu ELISA określono na podstawie analizy przebiegu krzywej kalibracyjnej sporządzonej dla seryjnych rozcieńczeń wyizolowanego antygeny L-FABP w buforze blokującym. Krzywa regresji nieliniowej (sigmoidal dose-response) reprezentująca zależność OD od logarytmu stężenia L-FABP ma charakterystyczny przebieg sigmoidalny, typowy dla kompetycyjnego testu ELISA, z dwoma wyraźnymi plateau. Rycina 14. przedstawia zależność uśrednionej wartości OD od logarytmu stężenia L-FABP (wyrażonego w mg/ml), sporządzoną na podstawie 8 jednoczesnych oznaczeń dla każdego punktu pomiarowego.



Ryc. 14. Krzywa regresji nieliniowej opisująca zależność OD od logarytmu stężenia L-FABP [mg/ml] ($R^2 = 0,97$). Punkty wykresu przedstawiają średnią wartość OD \pm SEM (liczba oznaczeń $n = 8$). Linia przerywaną zaznaczono przedział ufności dla $p = 0,05$.

Zakres stężeń L-FABP w metodzie ELISA określono wg 6. punktów pomiarowych leżących na linii zbliżonej do prostej i różniących się statystycznie znamienne od obu plateau krzywej sigmoidalnej, odpowiednio dolnego plateau (OD > 0,46 dla [L-FABP] = 312 ng/ml) i górnego plateau (OD < 1,29 dla [L-FABP] = 10 ng/ml). Dla wybranych punktów pomiarowych wykreślono krzywą regresji liniowej, która stanowiła właściwą krzywą kalibracyjną (przykład na ryc. 15).



Ryc. 15. Krzywa kalibracyjna kompetycyjnego testu ELISA. Wsp. korelacji liniowej $r = -0,995$, $p < 0,05$. Linia przerywaną zaznaczono przedział ufności dla $p = 0,05$.

Jako granicę czułości metody przyjęto najmniejszą wartość stężenia L-FABP, którą można odczytać z prostoliniowego odcinka krzywej kalibracyjnej, tj. **10 ng/ml** i która spełnia warunek: $A_{\min} < A_0 - 2 \times SD_0$, gdzie: A_{\min} – średnia absorbancja dla punktu będącego granicą czułości testu, A_0 – średnia absorbancja dla próby ślepej ([L-FABP] = 0 ng/ml), SD_0 – odchylenie standardowe dla próby ślepej.

7.3.3. Określenie powtarzalności metody

Powtarzalność (precyzję) metody oszacowano obliczając współczynniki zmienności stężenia L-FABP dla próbki o znanym stężeniu zawieszony w buforze blokującym,

w oznaczeniach jednoczesnych (na jednej płytce) i niejednoczesnych (na różnych płytkach). Dla serii jednoczesnych uzyskano średni współczynnik zmienności $W_z (\pm SD) = 17,3 \pm 4,2$ ($n = 6$), natomiast dla serii niejednoczesnych $W_z (\pm SD) = 21,6 \pm 6,4$ ($n = 6$) dla roboczego zakresu badanych stężeń.

7.3.4. Określenie dokładności metody

Dokładność (rzetelność) metody określono sposobem „odzysku” dla próbek: L-FABP w buforze blokującym, surowicy, żółci oraz ekstrakcie wątrobowym, wzbogaconych wyizolowanym L-FABP do finalnego stężenia w próbce wynoszącego odpowiednio: 15 ng/ml, 60 ng/ml, 200 ng/ml oraz 160 µg/ml, dobranego tak by było wyższe ok. 1,5 raza od stężenia w próbce wyjściowej. Obliczony odzysk wyrażono w procentach, uśredniono i podano wraz z odchyleniem standardowym, zgodnie z poniższym wzorem.

$$\text{odzysk} = 100\% \times (\text{L-FABP}_{\text{wzb.}} - \text{L-FABP}_{\text{nwzb.}}) / \text{L-FABP}_{\text{dod.}},$$

gdzie L-FABP_{wzb.} – ilość L-FABP w próbce wzbogaconej, L-FABP_{nwzb.} – ilość L-FABP w próbce niewzbogaconej, L-FABP_{dod.} – ilość L-FABP dodana do próbki niewzbogaconej.

Wyniki zamieszczono w poniższej tabeli.

Tab. 3. Wyniki testu dokładności przeprowadzonego sposobem „odzysku” dla różnych rodzajów badanego materiału. Podano odzysk [%] ± SD ($n = 6$).

Materiał badany	Odzysk [%] ± SD
L-FABP + bufor blok.	94,3 ± 17,1
ekstrakt wątroby ludzkiej	90,2 ± 18,4
żółć	101,2 ± 21,2
surowica ludzka	92,4 ± 32,8

7.3.5. Kontrola specyficzności narządowej immunoglobulin anty-L-FABP

W związku z tym, że białko wiążące kwasy tłuszczowe występuje w organizmie człowieka w kilku izoformach w zależności od tkanki lub narządu, m.in. jako izoforma sercowa (H-FABP) - najbardziej rozpowszechniona, występująca obficie w

sercu, mięśniach szkieletowych, mięśniówce gładkiej i wielu innych tkankach [1,4], zasadnym wydawało się sprawdzenie specyficzności narządowej otrzymanych immunoglobulin anty-L-FABP. Ponieważ nie dysponowano oczyszczonym ludzkim białkiem H-FABP zdecydowano oznaczyć poziom H-FABP w przeliczeniu na mg białka cytosolu mięśnia sercowego i porównać wynik z danymi z piśmiennictwa. Poziom H-FABP w sercu oznaczony wyżej opisaną metodą (przy użyciu immunoglobulin anty-L-FABP) wyniósł **0,13 µg/mg** białka, podczas gdy dane z piśmiennictwa szacują ten poziom na ok. **21 µg/mg** białka [133]. Tak więc określone w sposób pośredni krzyżowe powinowactwo immunoglobulin anty-L-FABP do H-FABP wynosi **0,6%** ($(0,13 / 21) \times 100\%$). Otrzymany wynik jest wyraźnie niższy od uzyskanego przez Paulussena i wsp. - 8% [133] i porównywalny z wartością uzyskaną przez Zimmermana i wsp. - 1% [6].

7.3.6. Kontrola specyficzności gatunkowej immunoglobulin anty-L-FABP

Ponieważ jeden z etapów rozprawy wiązał się z pracą na modelu zwierzęcym, a dokładniej indukowanej ostrej niewydolności wątroby u szczura, zasadnym było sprawdzenie krzyżowego powinowactwa immunoglobulin przeciwko ludzkiemu białku L-FABP względem szczurzego L-FABP. Ponieważ nie dysponowano oczyszczonym szczurzym L-FABP zdecydowano oznaczyć poziom szczurzego L-FABP we frakcji cytosolu wątrobowego i porównać wynik z danymi z piśmiennictwa. Poziom szczurzego L-FABP oznaczony wyżej opisaną metodą (przy użyciu immunoglobulin przeciwko ludzkiemu L-FABP) wyniósł **22 µg/mg** białka, podczas gdy dane z piśmiennictwa szacują ten poziom na ok. **30 µg/mg** białka. Tak więc określone w sposób pośredni krzyżowe powinowactwo immunoglobulin przeciwko ludzkiemu L-FABP względem szczurzego L-FABP wynosi ok. **70%** ($(22 / 30) \times 100\%$) i jest porównywalne z danymi z piśmiennictwa, które szacują tę wartość na 58%.

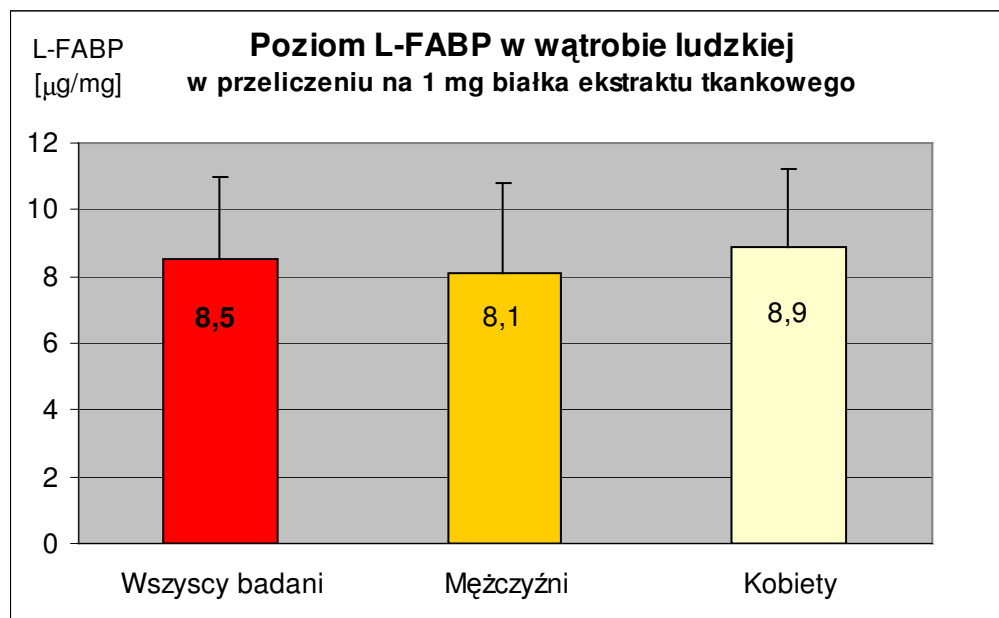
7.3.7. Oznaczanie L-FABP w ekstrakcie wątroby ludzkiej

Ekstrakt wątroby ludzkiej pobranej ze zwłok przygotowano zgodnie z procedurą opisaną wyżej (pkt. 5.1.1 – 5.1.2). Następnie oznaczano poziom L-FABP w

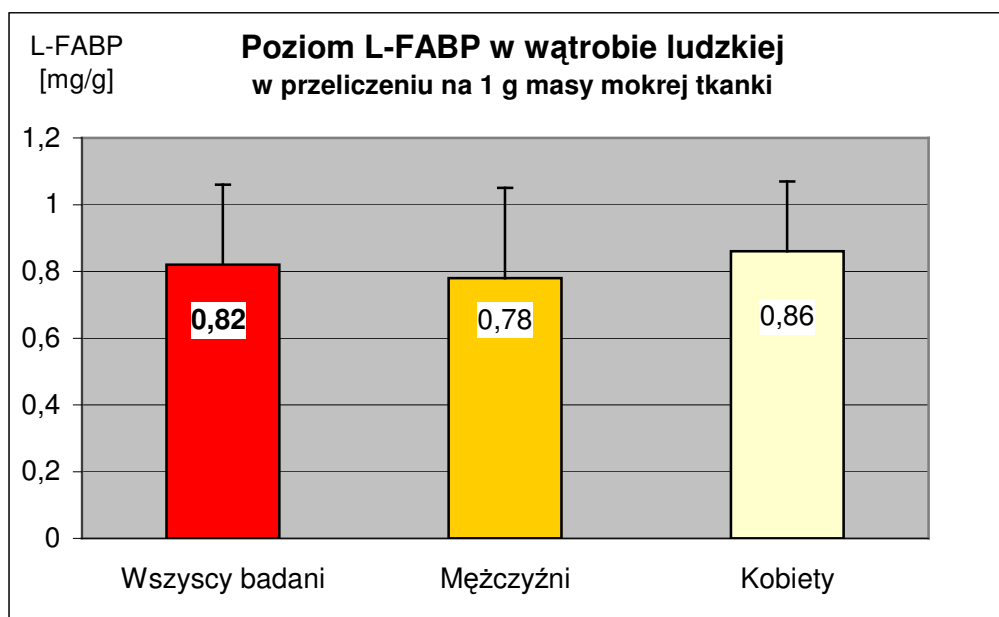
ekstrakcie wątrobowym metodą kompetycyjnego testu ELISA. Wyniki podano w przeliczeniu na 1 mg białka ekstraktu wątrobowego oraz na 1g masy mokrej tkanki. Łącznie zbadano 44 próbki pochodzące ze świeżych zwłok osób w wieku od 22 r.ż. do 73 r.ż. (śr. wieku: $56,3 \pm 13,2$ lat), z których 23 osoby stanowili mężczyźni, a 21 kobiety. Uzyskane wyniki zebrano w poniższej tabeli oraz przedstawiono graficznie na diagramach (Ryc. 16, 17).

Tabela 4. Poziom L-FABP w wątrobie ludzkiej w przeliczeniu na białko ekstraktu wątrobowego oraz na gram tkanki. Podano średnie arytmetyczne wraz z odchyleniem standardowym dla każdej z badanych grup.

Grupa badana	L-FABP [$\mu\text{g}/\text{mg}$ białka] \pm SD	L-FABP [mg/g tkanki] \pm SD
Wszyscy badani (♂ oraz ♀), n=44	$8,5 \pm 2,5$	$0,82 \pm 0,24$
Mężczyźni (♂), n=23	$8,1 \pm 2,7$	$0,78 \pm 0,27$
Kobiety (♀), n=21	$8,9 \pm 2,3$	$0,86 \pm 0,21$



Ryc. 16. Poziom L-FABP w wątrobie ludzkiej w przeliczeniu na 1 mg białka ekstraktu tkankowego.



Ryc. 17. Poziom L-FABP w wątrobie ludzkiej w przeliczeniu na 1 g masy mokrej tkanki.

Nie stwierdzono statystycznie znamiennej różnicy w poziomie L-FABP u obu płci ($p > 0,3$). Nie stwierdzono również korelacji pomiędzy poziomem L-FABP a wiekiem osób badanych.

W celu zapewnienia możliwości porównania poziomu L-FABP w wątrobie oznaczonego przy pomocy opracowanego testu ELISA z danymi z piśmiennictwa, które najczęściej prezentują poziom L-FABP w tkance w przeliczeniu na białko cytosolu wątrobowego, wykonano serię oznaczeń poziomu L-FABP w pełnej (tj. niedenaturowanej termicznie) frakcji cytosolu wątrobowego, uzyskując wynik $28,4 \pm 7,3 \mu\text{g}/\text{mg}$ ($n=12$).

Poziom L-FABP w wątrobie przeliczeniu na 1 g masy mokrej tkanki wyniósł $0,82 \pm 0,24 \text{ mg}/\text{g}$ ($n=44$). Dysponując poziomem L-FABP w przeliczeniu na 1g mięszu wątroby można dokonać szacunkowej kalkulacji wątrobowej puli L-FABP. Ponieważ masa wątroby dorosłego człowieka wynosi średnio 1500g [114], zatem całkowita pula wątrobowego L-FABP wynosi: $0,82 \text{ mg}/\text{g}$ tkanki (patrz wyniki w tab. 4) $\times 1500\text{g} \approx 1200 \text{ mg}$.

7.3.8. Oznaczanie L-FABP w żółci

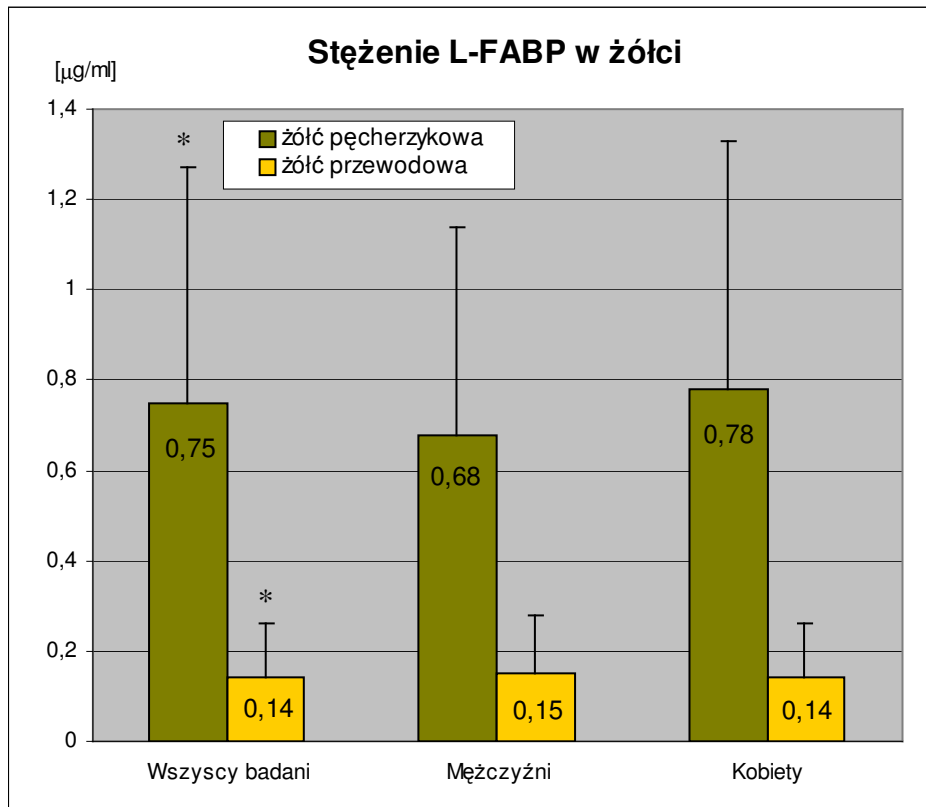
Oznaczono poziom L-FABP metodą kompetycyjnego testu ELISA w żółci pobranej od pacjentów poddanych cholecystektomii (laparoskopowej bądź klasycznej). Grupę pacjentów stanowiło 39 chorych w wieku od 37 do 65 r.ż. (śr. wieku: $48,7 \pm 7,3$ lat) hospitalizowanych w oddziałach chirurgicznych z powodu kamicy żółciowej. W grupie pacjentów było 15 mężczyzn i 24 kobiety. Materiał badany stanowiła żółć pęcherzykowa (22 przypadki) oraz żółć przewodowa pobrana techniką drenażu dróg żółciowych przez dren Khera (17 przypadków). Stężenie L-FABP w żółci wyrażono w $\mu\text{g/ml}$ oraz w przeliczeniu na mg białka całkowitego żółci. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach 5 i 6. Porównanie oznaczonych parametrów dla żółci pęcherzykowej i przewodowej przedstawiono graficznie na diagramach (Ryc. 18-20).

Tabela 5. Stężenie L-FABP w żółci pęcherzykowej wyrażone w $[\mu\text{g/ml}]$ oraz w przeliczeniu na 1 mg białka całkowitego $[\mu\text{g/mg}]$. Podano średnie arytmetyczne wraz z odchyleniem standardowym dla każdej z badanych grup.

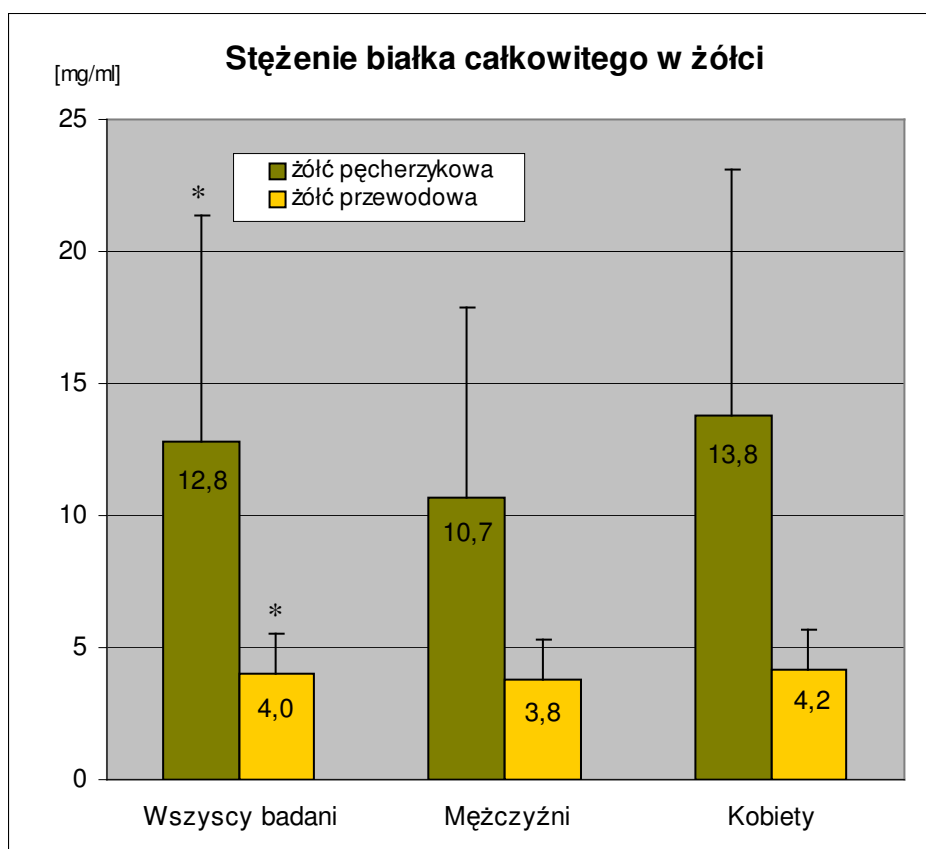
Grupa badana	L-FABP $[\mu\text{g/ml}] \pm \text{SD}$	Białko całkowite $[\text{mg/ml}] \pm \text{SD}$	L-FABP/białko $[\mu\text{g/mg}] \pm \text{SD}$
Wszyscy badani (♂ oraz ♀), n=22	$0,75 \pm 0,52$	$12,8 \pm 8,6$	$0,072 \pm 0,049$
Mężczyźni (♂), n=7	$0,68 \pm 0,46$	$10,7 \pm 7,2$	$0,065 \pm 0,024$
Kobiety (♀), n=15	$0,78 \pm 0,55$	$13,8 \pm 9,3$	$0,076 \pm 0,058$

Tabela 6. Stężenie L-FABP w żółci przewodowej wyrażone w $[\mu\text{g/ml}]$ oraz w przeliczeniu na 1 mg białka całkowitego $[\mu\text{g/mg}]$. Podano średnie arytmetyczne wraz z odchyleniem standardowym dla każdej z badanych grup.

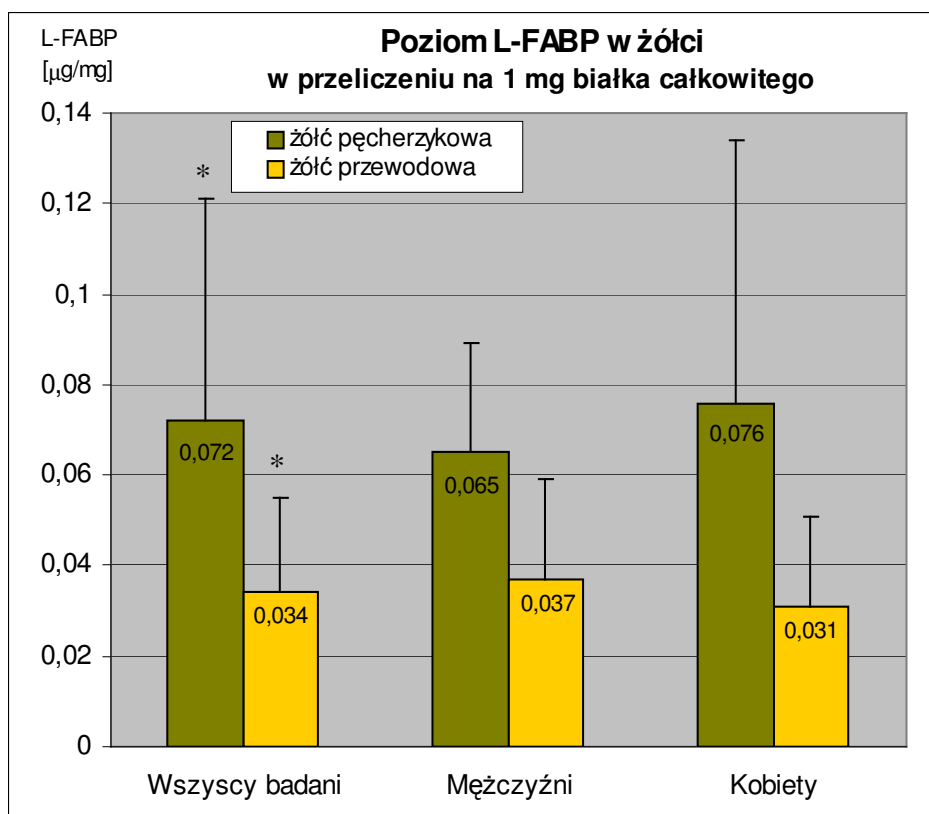
Grupa badana	L-FABP $[\mu\text{g/ml}] \pm \text{SD}$	Białko całkowite $[\text{mg/ml}] \pm \text{SD}$	L-FABP/białko $[\mu\text{g/mg}] \pm \text{SD}$
Wszyscy badani (♂ oraz ♀), n=17	$0,14 \pm 0,12$	$4,0 \pm 1,5$	$0,034 \pm 0,021$
Mężczyźni (♂), n=8	$0,15 \pm 0,13$	$3,8 \pm 1,5$	$0,037 \pm 0,022$
Kobiety (♀), n=9	$0,14 \pm 0,12$	$4,2 \pm 1,5$	$0,031 \pm 0,020$



Ryc. 18. Stężenie L-FABP w żółci pęcherzykowej oraz przewodowej [$\mu\text{g/ml}$] ($p < 0,001$).



Ryc. 19. Stężenie białka całkowitego w żółci pęcherzykowej oraz przewodowej [mg/ml] ($p < 0,001$).



Ryc. 20. Poziom L-FABP w żółci pęcherzykowej oraz przewodowej w przeliczeniu na 1 mg białka całkowitego [µg/mg] ($p < 0,003$).

Nie stwierdzono statystycznie znamiennej różnicy w poziomie L-FABP w żółci w zależności od płci. Nie stwierdzono statystycznie znamiennej różnicy w poziomie białka całkowitego żółci w zależności od płci. Nie stwierdzono również korelacji pomiędzy poziomem L-FABP w żółci a wiekiem osób badanych. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem białka całkowitego w żółci a wiekiem osób badanych. Stwierdzono silną korelację dodatnią pomiędzy stężeniem L-FABP w żółci, a stężeniem białka całkowitego w żółci, uzyskując następujące współczynniki korelacji liniowej: $r = 0,51$ ($p < 0,02$) dla żółci pęcherzykowej oraz $r = 0,65$ ($p < 0,005$) dla żółci przewodowej.

Stwierdzono statystycznie znamiennej różnicę w stężeniu L-FABP w żółci pęcherzykowej oraz przewodowej ($0,75 \mu\text{g/ml}$ vs. $0,14 \mu\text{g/ml}$, $p < 0,001$). Stwierdzono statystycznie znamiennej różnicę w stężeniu białka całkowitego w żółci pęcherzykowej oraz przewodowej ($12,8 \text{ mg/ml}$ vs. $4,0 \text{ mg/ml}$, $p < 0,001$). Stwierdzono statystycznie znamiennej różnicę w poziomie L-FABP w przeliczeniu na 1 mg białka całkowitego w żółci pęcherzykowej oraz przewodowej ($0,072 \mu\text{g/mg}$ vs. $0,034 \mu\text{g/mg}$, $p < 0,003$).

Dysponując powyższymi wynikami oraz danymi z piśmiennictwa dotyczącymi fizjologii wątroby i dróg żółciowych człowieka [162], można pokusić się o dokonanie szacunkowego bilansu dobowego wydzielania L-FABP do żółci. Człowiek wydziela w ciągu doby ok. 500 ml żółci, a wraz z nią ok. 10g białka [162]. Z prostego mnożenia otrzymujemy zatem dobową ilość L-FABP wydzielaną z żółcią:

$$\mathbf{L-FABP/24h} = 500 \text{ ml/24h} \times 0,14\mu\text{g/ml} \approx \mathbf{70 \mu\text{g/24h}}$$

$$\mathbf{L-FABP/24h} = 10.000 \text{ mg/24h} \times 0,034\mu\text{g/mg} \approx \mathbf{340 \mu\text{g/24h}}$$

Jak widać obie kalkulacje dają różne wartości dobowej utraty L-FABP z żółcią. Należy pamiętać, że poziomy L-FABP w ludzkiej żółci zmierzone przez autora niniejszego opracowania dotyczą przypadków patologicznych, przeto mogą one różnić się od wartości fizjologicznych. Jakkolwiek, ze względu na problem pozyskania próbek żółci od osobników zdrowych, póki co trudno o lepszą aproksymację.

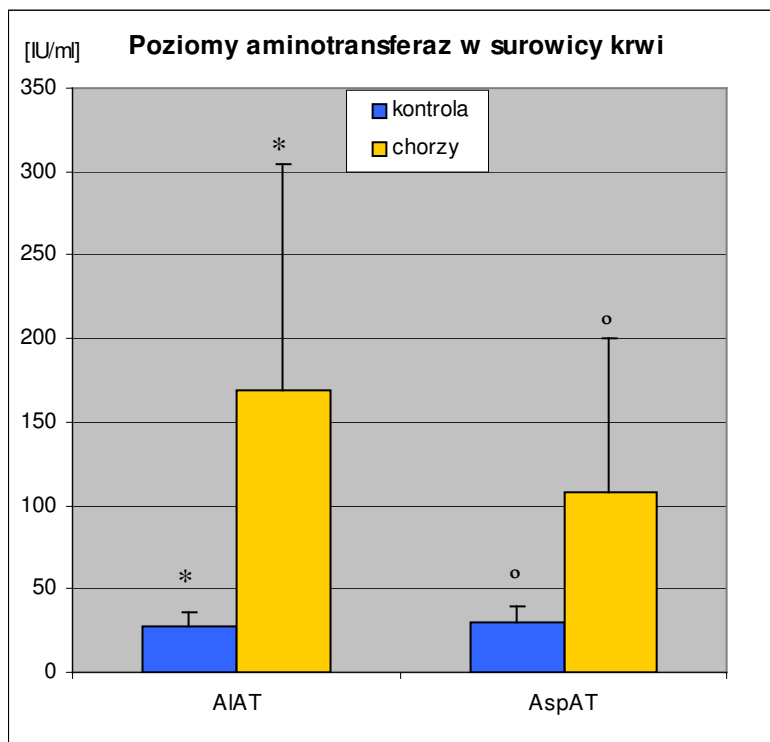
7.3.9. Oznaczanie L-FABP w surowicy krwi chorych z potwierdzoną laboratoryjnie patologią wątroby

Oznaczono poziom L-FABP metodą kompetycyjnego testu ELISA w próbkach surowicy krwi pacjentów hospitalizowanych lub ambulatoryjnych, pozyskanych z Laboratorium Szpitala Klinicznego AMG. Grupę badaną stanowiło 85 próbek krwi anonimowych pacjentów, których podzielono na podstawie analizy poziomów aminotransferaz (AspAT, AlAT) w surowicy krwi na 2 podgrupy: 40 osób bez laboratoryjnych objawów patologii wątroby (AspAT i AlAT w granicach normy – grupa kontrolna) oraz 45 osób z potwierdzoną laboratoryjnie patologią wątroby (warunkiem koniecznym kwalifikacji do tej grupy były podwyższone poziomy aminotransferaz, ze wskaźnikiem de Ritisa (AspAT/AlAT) < 0,9).

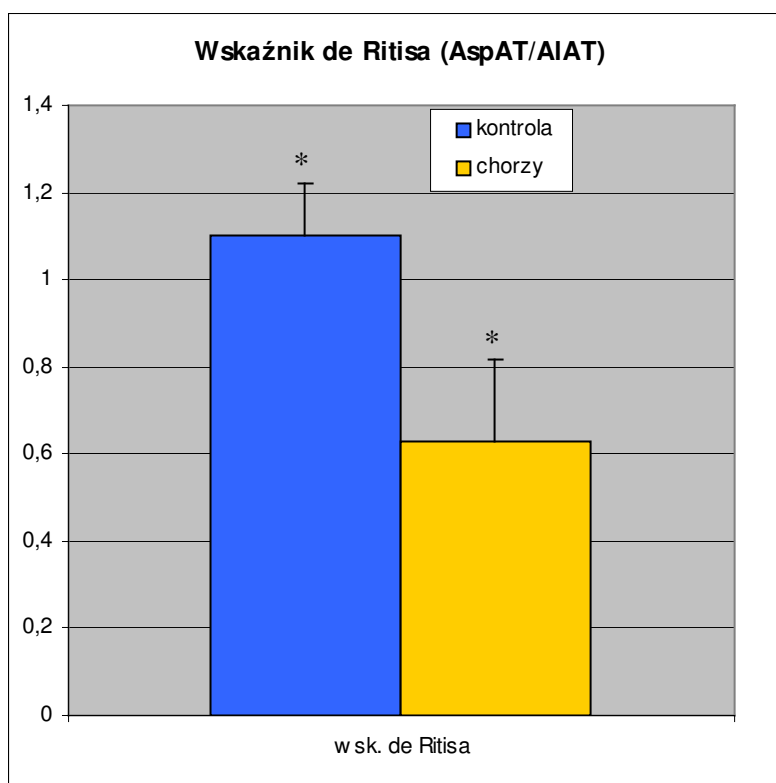
Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 7. Porównanie oznaczonych parametrów dla grupy kontrolnej i grupy chorych z laboratoryjnie potwierdzoną patologią wątroby przedstawiono graficznie na diagramach (Ryc. 21 – 24).

Tabela 7. Poziomy wybranych parametrów wydolności wątroby oraz L-FABP oznaczonych w surowicy krwi w grupie kontrolnej oraz grupie chorych. Podano średnie arytmetyczne wraz z odchyleniem standardowym dla każdej z badanych grup.

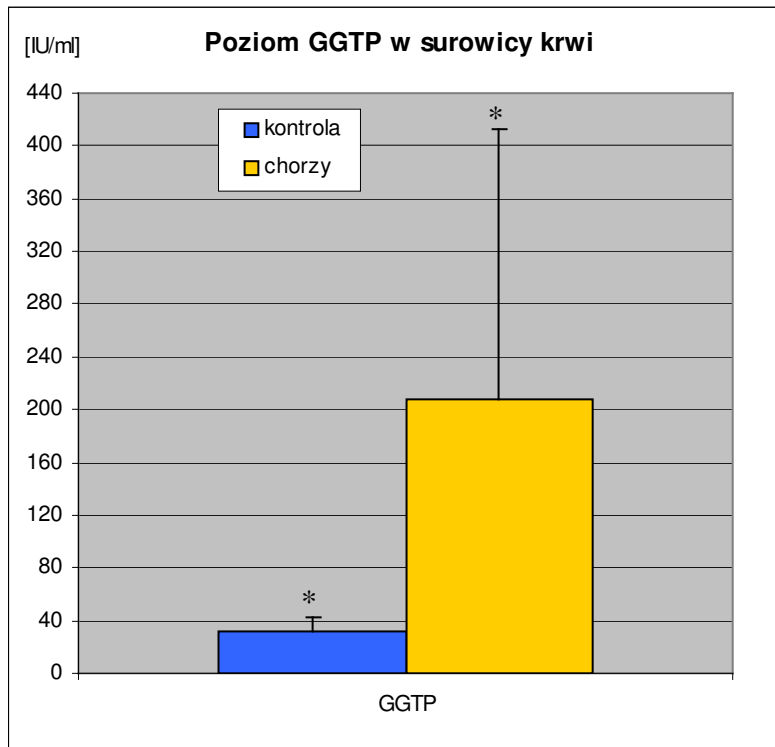
Grupa badana	AlAT [IU/ml]	AspAT [IU/ml]	Wskaźnik de Ritisa	GGTP [IU/ml]	L-FABP [ng/ml]
kontrola n=40	27,7 ± 8,6	30,2 ± 9,0	1,1 ± 0,1	31,9 ± 10,5	38,8 ± 13,1
chorzy n=45	169,2 ± 135,5	107,5 ± 93,2	0,6 ± 0,2	207,9 ± 204,7	44,1 ± 21,0



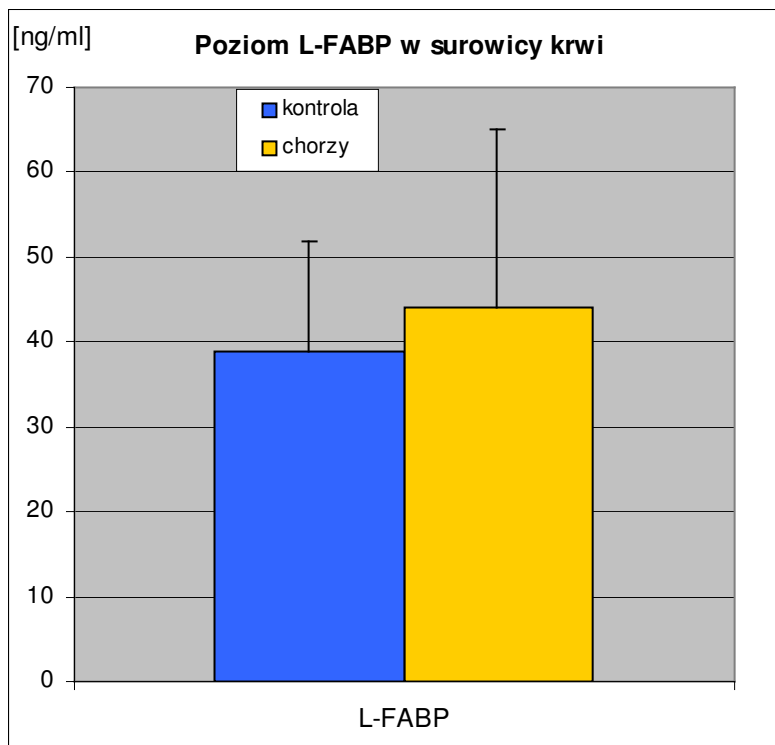
Ryc. 21. Poziomy aminotransferaz w surowicy krwi [IU/ml] w grupie kontrolnej i grupie chorych ($p < 0,001$).



Ryc. 22. Wartość wskaźnika de Ritisa (AspAT/AIAT) w grupie kontrolnej i grupie chorych ($p < 0,001$).



Ryc. 23. Poziom GGTP w surowicy krwi [IU/ml] w grupie kontrolnej i grupie chorych ($p < 0,001$).



Ryc. 24. Poziom L-FABP w surowicy krwi [ng/ml] w grupie kontrolnej i grupie chorych z cechami uszkodzenia wątroby w badaniach laboratoryjnych ($p > 0,08$ w jednostronnym teście Cochran-Coxa).

Stwierdzono statystycznie znamienne różnice w poziomach aminotransferaz oraz GGTP pomiędzy grupą kontrolną a grupą chorych z laboratoryjnymi cechami patologii wątroby ($p < 0,001$). Stężenia aktywności tych enzymów w surowicy krwi były wyższe w grupie chorych. Wskaźnik de Ritisa (AspAT/AlAT) był natomiast znamienne niższy w grupie chorych niż zdrowych ($p < 0,001$) i wynosił 0,6 a więc znacznie poniżej normy fizjologicznej.

Nie stwierdzono statystycznie znamiennej różnicy w poziomie L-FABP oznaczonym w surowicy pomiędzy grupą kontrolną a grupą chorych ($p > 0,05$ w jednostronnym teście Cochran-Coxa). Średnia wartość stężenia L-FABP w surowicy wynosiła odpowiednio dla grupy kontrolnej i grupy chorych: $38,8 \pm 13,1$ ng/ml oraz $44,1 \pm 21,0$ ng/ml.

Stwierdzono bardzo silną korelację dodatnią pomiędzy poziomem AlAT i AspAT w grupie wszystkich badanych ($r \approx 0,9$; $p < 0,001$). Stwierdzono również korelację dodatnią o średnim natężeniu pomiędzy poziomami aminotransferaz a GGTP w tej grupie ($r \approx 0,48$; $p < 0,001$).

Stwierdzono bardzo słabą korelację dodatnią pomiędzy poziomem L-FABP a poziomami aminotransferaz w grupie wszystkich badanych. Nie stwierdzono natomiast korelacji pomiędzy poziomem L-FABP a poziomami pozostałych parametrów laboratoryjnych patologii wątroby, tj. wskaźnikiem de Ritis a oraz GGTP.

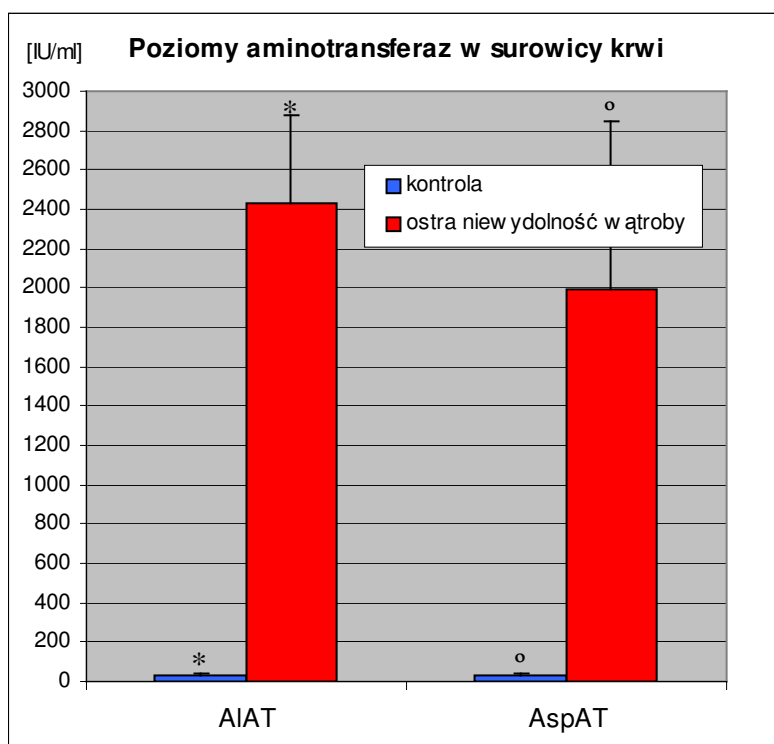
7.3.10. Oznaczenie L-FABP w surowicy krwi chorych ze stwierdzoną klinicznie ostrą niewydolnością wątroby

Oznaczono poziom L-FABP metodą kompetycyjnego testu ELISA w surowicy krwi pacjentów I Kliniki Chorób Wewnętrznych i Ostrej Zatruc AMG hospitalizowanych z powodu ostrej niewydolności wątroby. Próbkę krwi pobierano w ramach rutynowej procedury szpitalnej, w miarę możliwości wg określonej sekwencji czasowej: 0, 6, 12, 24 i 48 godz. od momentu przyjęcia do Kliniki. Łącznie pobrano 20 próbek krwi od 5 chorych. Zmierzono poziom L-FABP oraz aminotransferaz w badanych próbach. Wyniki porównano z kontrolną grupą pacjentów bez laboratoryjnych objawów patologii wątroby (zdefiniowaną w punkcie 7.3.9). Przeprowadzono również analizę porównawczą prób krwi uzyskiwanych w

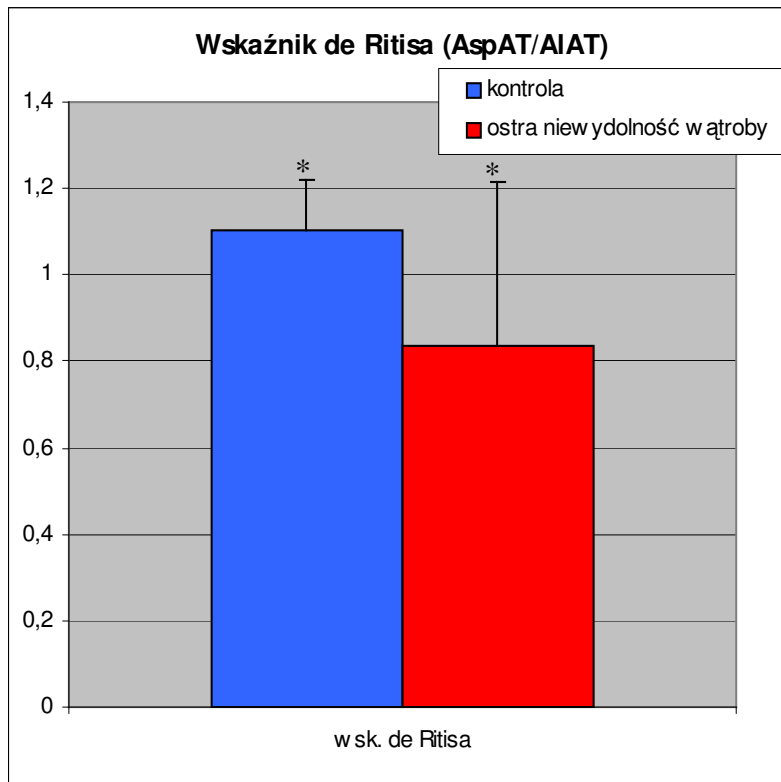
różnych odstępach czasu. Ponadto porównano stężenia L-FABP w surowicy krwi z górną granicą „normy” fizjologicznej zdefiniowanej na bazie populacji kontrolnej.

Tabela 8. Poziomy wybranych parametrów wydolności wątroby oraz L-FABP oznaczonych w surowicy krwi w grupie kontrolnej oraz grupie chorych z ostrą niewydolnością wątroby. Podano średnie arytmetyczne wraz z odchyleniem standardowym dla każdej z badanych grup.

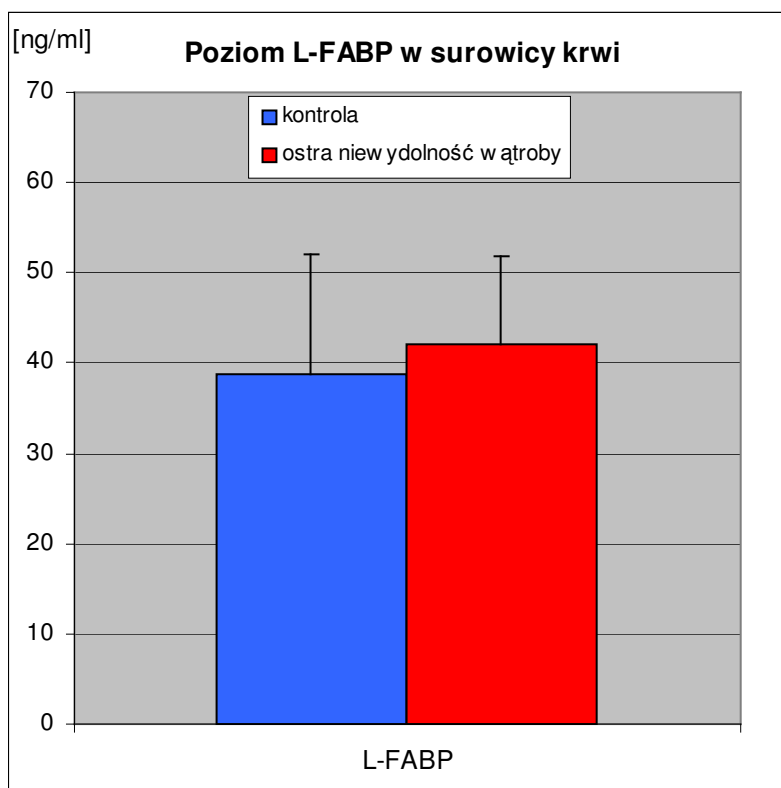
Grupa badana	AIAT [IU/ml]	AspAT [IU/ml]	Wskaźnik de Ritisa	L-FABP [ng/ml]
próbki kontrolne n=40	27,7 ± 8,6	30,2 ± 9,0	1,1 ± 0,1	38,8 ± 13,1
próbki od chorych z ostrą niewydolnością wątroby, n=20	2433,3 ± 448,5	1992,4 ± 859,2	0,8 ± 0,4	42,1 ± 9,7



Ryc. 25. Poziomy aminotferaz w surowicy krwi [IU/ml] w grupie kontrolnej i grupie chorych z ostrą niewydolnością wątroby ($p < 0,001$).



Ryc. 26. Wartość wskaźnika de Ritisa (AspAT/AlAT) w grupie kontrolnej i grupie chorych z ostrą niewydolnością wątroby ($p < 0,001$).



Ryc. 27. Poziom L-FABP w surowicy krwi [ng/ml] w grupie kontrolnej i grupie chorych z ostrą niewydolnością wątroby ($p > 0,14$ w jednostronnym teście t-Studenta).

Stwierdzono statystycznie znamienne różnice w poziomach aminotransferaz pomiędzy grupą kontrolną a grupą chorych z ostrą niewydolnością wątroby ($p < 0,001$). Stężenia aktywności tych enzymów w surowicy krwi były wyższe w grupie chorych. Wskaźnik de Ritisa (AspAT/AlAT) był natomiast znamienne niższy w grupie chorych niż zdrowych ($p < 0,001$) i wynosił 0,8 a więc znacznie poniżej normy fizjologicznej.

Średnia wartość stężenia L-FABP w surowicy chorych wynosiła $42,1 \pm 9,7$ ng/ml. Nie stwierdzono statystycznie znamiennej różnicy w poziomie L-FABP oznaczonym w surowicy pomiędzy grupą kontrolną a grupą chorych ($p > 0,14$ w jednostronnym teście t-Studenta).

Nie stwierdzono statystycznie znamiennej różnicy pomiędzy poziomami L-FABP w próbach krwi pobieranych w różnych odstępach czasu ($p > 0,3$ w teście ANOVA z powtarzanymi pomiarami). Natomiast stwierdzono różnice pomiędzy poziomami aminotransferaz w próbach krwi pobieranych w różnych odstępach czasu ($p < 0,001$ w teście ANOVA z powtarzanymi pomiarami).

Wartość średnia poziomu L-FABP w surowicy populacji kontrolnej (pacjentów bez laboratoryjnych objawów patologii wątroby) wyniosła $38,8 \pm 13,1$ ng/ml. Górną granicę fizjologicznej „normy” L-FABP w surowicy dla populacji kontrolnej ustalono wg wzoru: $NF = X + 2SD$, gdzie NF oznacza „normę” fizjologiczną, X – średnią arytmetyczną poziomu L-FABP w surowicy populacji kontrolnej, SD – odchylenie standardowe opisujące rozproszenie wyników wokół wartości średniej. Tak więc, górną granicę „normy” fizjologicznej L-FABP dla populacji kontrolnej określono na **65,0 ng/ml** (zgodnie z rachunkiem: $38,8 \text{ ng/ml} + 2 \times 13,1 \text{ ng/ml}$). W żadnej z 20 prób krwi pobieranych od chorych z ostrą niewydolnością wątroby w przeciągu 48 godz. hospitalizacji nie stwierdzono poziomu L-FABP przekraczającego górną granicę zdefiniowanej wcześniej normy fizjologicznej. Maksymalny poziom L-FABP oznaczony w tych próbach wynosił **56 ng/ml**.

Nie stwierdzono korelacji (liniowej lub nieliniowej) pomiędzy poziomem L-FABP a poziomem aminotransferaz lub wskaźnikiem de Ritisa w surowicy chorych z ostrą niewydolnością wątroby. Nie stwierdzono również współzależności pomiędzy poziomem L-FABP a czasem obserwacji.

7.3.11. Oznaczanie L-FABP w surowicy krwi szczurów z ostrą niewydolnością wątroby indukowaną galaktozaminą

Wartość średnia poziomu L-FABP w surowicy określona w populacji 25 szczurów kontrolnych (nieotraktowanych) wyniosła $29,1 \pm 12,6$ ng/ml. Górną granicę fizjologicznej „normy” L-FABP w surowicy dla populacji szczurów nieotraktowanych ustalono wg wzoru: $NF = X + 2SD$, gdzie NF oznacza „normę” fizjologiczną, X – średnią arytmetyczną poziomu L-FABP w surowicy 25 szczurów kontrolnych, SD – odchylenie standardowe opisujące rozproszenie wyników wokół wartości średniej. Tak więc, górną granicę „normy” fizjologicznej L-FABP w surowicy szczura wyliczono na **54,3 ng/ml** (zgodnie z rachunkiem: $29,1 \text{ ng/ml} + 2 \times 12,6 \text{ ng/ml}$).

W surowicy krwi szczurów traktowanych galaktozaminą oraz kontrolnych, traktowanych solą fizjologiczną oznaczono L-FABP oraz AlAT w przeciągu 48 godz. od podania odpowiednio hepatotoksyny lub soli fizjologicznej. Wyniki zestawiono w poniższej tabeli.

Tabela 9. Poziomy L-FABP w surowicy szczurów traktowanych galaktozaminą oraz kontrolnych (NaCl) mierzone w różnych odstępach czasu od momentu podania hepatotoksyny (lub NaCl).

Czas od momentu iniekcji dootrzewnowej (w godzinach)	Szczury kontrolne		Pary szczurów traktowanych			
	AlAT [IU/ml]	L-FABP [ng/ml]	Szczur I		Szczur II	
			AlAT [IU/ml]	L-FABP [ng/ml]	AlAT [IU/ml]	L-FABP [ng/ml]
0	38	17	21	53	43	24
2	45	37	93	18	123	46
6	39	18	246	32	311	33
10	41	23	714	12	657	51
15	25	21	701	52	833	38
20	32	24	506	20	1546	17
24	27	39	1377	18	1216	36
48	35	45	816	31	1102	14

Stwierdzono znaczny wzrost poziomu aminotransferazy alaninowej w surowicy w grupie szczurów traktowanych galaktozaminą już po 2 godz. od podania hepatotoksyny (123 IU/ml, przy normie do 50 IU/ml). Maksymalny wzrost poziomu aminotransferazy alaninowej w surowicy szczurów traktowanych galaktozaminą obserwowano po ok. 24 godz. od podania hepatotoksyny (**1546 IU/ml**, przy normie do 50 IU/ml). Poziom aminotransferazy alaninowej w surowicy szczurów

kontrolnych (sól fizjologiczna zamiast galaktozaminy) nie przekraczał 45 IU/ml przez cały czas trwania doświadczenia.

Nie stwierdzono wzrostu poziomu L-FABP w surowicy szczurów traktowanych galaktozaminą ani kontrolnych (NaCl) powyżej górnej granicy „normy” fizjologicznej, określonej wcześniej na 54 ng/ml. Średni poziom L-FABP w surowicy 16 szczurów traktowanych galaktozaminą wyniósł: **30,9 ± 14,1 ng/ml**, natomiast w grupie szczurów kontrolnych (NaCl): **28,0 ± 10,7 ng/ml**. Porównanie poziomów L-FABP w populacji szczurów traktowanych galaktozaminą oraz szczurów kontrolnych (NaCl), podobnie jak porównanie poziomów L-FABP w populacji szczurów traktowanych galaktozaminą oraz szczurów nietraktowanych, nie wykazało statystycznie istotnych różnic ($p > 0,6$).

Nie stwierdzono korelacji (liniowej lub nieliniowej) pomiędzy poziomem L-FABP a poziomem aminotransferazy alaninowej w surowicy szczurów traktowanych. Nie stwierdzono również współzależności (liniowej lub nieliniowej) pomiędzy poziomem L-FABP a czasem mierzonym od momentu podania hepatotoksyny. Stwierdzono natomiast bardzo wyraźną zależność nieliniową poziomu AlAT od czasu traktowania galaktozaminą.

7.3.12. Oznaczanie L-FABP w surowicy krwi chorych z przewlekłą niewydolnością nerek

Z piśmiennictwa wynika, że nerki odgrywają istotną rolę w eliminacji białek FABP z krwioobiegu [147,150,163]. Z tego względu zdecydowano się oznaczyć stężenie L-FABP w surowicy krwi chorych ze znacznie upośledzonym klirensiem kreatyniny w przebiegu przewlekłej niewydolności nerek. Grupę badaną stanowiło 7 chorych hospitalizowanych w Klinice Chorób Nerek AMG. Stężenie kreatyniny w surowicy krwi tych chorych, będące wyrazem stopnia zaawansowania przewlekłej niewydolności nerek zawierało się w granicach od 10,4 do 15,7 mg%, przy normie klinicznej do 1,5 mg%. Średnie stężenie L-FABP w surowicy krwi chorych z przewlekłą niewydolnością nerek wynosiło $41,7 \pm 12,4$ ng/ml i nie różniło się statystycznie znamienne w porównaniu z grupą kontrolną ($p > 0,29$ w jednostronnym teście t-Studenta). Ponadto w żadnej z prób surowicy krwi chorych z przewlekłą niewydolnością nerek nie stwierdzono stężenia L-FABP przekraczającego górną granicę zdefiniowanej wcześniej normy fizjologicznej, tj. 65

ng/ml (pkt. 7.3.10). Maksymalny poziom L-FABP oznaczony w tych próbach wynosił 64 ng/ml.

8. Dyskusja

Opracowanie testu ELISA, choć teoretycznie wydaje się być banalne, w praktyce następuje szeregu trudności natury technicznej. Problem jest tym większy, im większa musi być czułość i dokładność testu. Wielu autorów publikujących wyniki uzyskane przy użyciu opracowanych przez siebie testów ELISA opisuje obiektywne trudności metodyczne związane z konstruowaniem testu i wynikające stąd większe lub mniejsze ograniczenia w zastosowaniu metody [3,4,142].

Jednym z najistotniejszych warunków opracowania funkcjonalnego testu ELISA jest uzyskanie specyficznych przeciwciał. W testach ELISA stosuje się przeciwciała poliklonalne lub monoklonalne. Wybór rodzaju przeciwciał jest uzależniony od typu testu ELISA, dostępności antygeny o wysokim stopniu homogenności, jak również możliwości technologicznych i ekonomicznych. W niniejszej rozprawie zdecydowano się na zastosowanie przeciwciał poliklonalnych, których produkcja jest technologicznie mniej skomplikowana i znacznie tańsza [164], a praktyka laboratoryjna wykazała ich wysoką skuteczność w rozmaitych typach testu ELISA do analizy ilościowej białek z rodziny FABP [112,133–135,142,144,165,166], w tym również L-FABP [112,133–135,165]. Ponadto jedną z przesłanek przeciwko stosowaniu przeciwciał monoklonalnych do oznaczania L-FABP były dobrze udokumentowane problemy z ich zastosowaniem do oznaczania izoformy sercowej białka wiążącego kwasy tłuszczowe (H-FABP) opisane w monografii autorstwa grupy Kleine i wsp. [142], którzy po serii niepowodzeń zdecydowali się również na aplikację przeciwciał poliklonalnych.

W przypadku oznaczania substancji o relatywnie niskim stężeniu względem innych białek obecnych w próbce badanej, testem z wyboru jest kanapkowy test ELISA (wg terminologii anglojęzycznej: Sandwich ELISA) [159]. Jednakże konstrukcja kanapkowego testu ELISA nie zawsze jest metodycznie możliwa, zwłaszcza gdy badaną substancją jest związek o niskiej masie i stosunkowo małym stężeniu w próbce. W przypadku białek o niewielkiej masie cząsteczkowej, jak H-FABP czy L-FABP, trudności w opracowaniu kanapkowego testu ELISA, wymagającego ze swej natury przynajmniej dwóch populacji przeciwciał specyficznych względem dwóch różnych epitopów, wynikają m.in. z niewielkiej liczby epitopów na powierzchni białka oraz niekorzystnych oddziaływań sterycznych pomiędzy przeciwciałami

wiązającymi te epitopy, zlokalizowane na małej powierzchni. Lepsze zrozumienie problemu umożliwi model matematyczny analizujący geometrię wiązania antygeny z przeciwciałem. Z piśmiennictwa wiadomo, że powierzchnia antygeny pokrywana monowalentnie przez komplementarne przeciwciało wiążące wynosi ok. 15 nm^2 [159]. Na podstawie komputerowej analizy struktury krystalograficznej szczurzego L-FABP obliczono powierzchnię białka dostępną dla rozpuszczalnika (tzw. SAS, z ang. Solvent Accessible Area), którym w tym konkretnym przypadku jest woda. Okazuje się, że powierzchnia szczurzego L-FABP obliczona przy użyciu programów do analizy geometrii białka (modułu Areaimol z pakietu CCP4 v. 5.0 [167] oraz CryCo/CSU [168]) działających w oparciu o powszechnie akceptowany algorytm Lee i Richardsa [169], wynosi ok. 65 nm^2 . Ze względu na fakt, że struktura krystalograficzna ludzkiej izoformy L-FABP wciąż nie została opracowana, w obliczeniach posłużono się strukturą krystalograficzną szczurzego białka L-FABP [8], które wykazuje 82% homologii względem ludzkiego L-FABP [170]. Przy pomocy powyższego oprogramowania obliczono również pole powierzchni dostępnej dla wody, kilkunastu innych białek z rodziny FABP występujących u człowieka jak również u innych gatunków zwierząt, w tym filogenetycznie znacznie odległych. Uzyskano porównywalne wyniki, co świadczy o tym, że wartość szacowanej powierzchni ludzkiego L-FABP jest wiarygodna. Prosta kalkulacja pokazuje, że liczba potencjalnych miejsc monowalentnie wiążących przeciwciała w tym samym czasie (tj. teoretycznie możliwych epitopów jednocześnie wiążących przeciwciała w kanapkowym teście ELISA) wynosi: $65 \text{ nm}^2 / 15 \text{ nm}^2$, czyli ok. 4. Należy zdać sobie sprawę, że uśredniona powierzchnia pokrywająca antygen przez przeciwciało wiążące (15 nm^2) jest zaniżona w stosunku do obliczonej powierzchni białka. Stanowi ona swego rodzaju przybliżenie, będące rzutem powierzchni wiązania na sferę opisaną na antygenie, a więc nie uwzględnia pofałdowania powierzchni białka, w przeciwieństwie do oprogramowania zliczającego powierzchnię antygeny. Ponadto część powierzchni dostępnej dla solwenta jest w sensie dosłownym dostępna li tylko dla solwenta (wody) lub drobnocząsteczkowych ligandów (L-FABP posiada strukturalną „kieszę” wiążącą dwa ligandy hydrofobowe) [2,3], a nie jest dostępna dla przeciwciała. Jeśli uwzględnimy jeszcze problem zawady sterycznej pomiędzy dwoma przeciwciałami (masa cząsteczkowa ok. 150 kD) wiążącymi się z niskocząsteczkowym białkiem (15 kD), a więc o

wymiarach znacznie mniejszych niż wymiar każdego z przeciwciał, liczba optymalnych miejsc wiązania przeciwciał na powierzchni antygeny maleje jeszcze bardziej. Tak więc rzeczywista liczba potencjalnych miejsc na powierzchni L-FABP monowalennie wiążących przeciwciała w tym samym czasie jest mniejsza niż 4. Wydaje się zatem oczywiste, że uzyskanie przeciwciał poliklonalnych, które zawierałyby subpopulacje przeciwciał wiążących dwa epitopy zlokalizowane na powierzchni L-FABP w sposób optymalny, a więc przeciwbiegunowo, jest problematyczne. Istotnym uzupełnieniem powyższych rozważań jest poniekąd oczywisty fakt, że nie wszystkie fragmenty powierzchni białka są wystarczająco immunogenne by wytworzyć w organizmie immunizowanego zwierzęcia dostatecznie liczną subpopulację przeciwciał wiążących dany epitet z odpowiednio dużym powinowactwem. Dowodu na poparcie tej tezy dostarcza powszechnie akceptowana i stosowana w praktyce laboratoryjnej metoda Jamesona-Wolfa (tzw. Antigenicity Index) typowania potencjalnie immunogennych epitetów na powierzchni białka [171]. Polega ona na kompleksowej analizie hydrofilności sekwencji peptydowych wg Hoppa-Woodsa [172], prawdopodobieństwa ekspresji epitetu na powierzchni białka wg Emini [173], elastyczności fragmentów łańcucha polipeptydowego wg Karplusa-Schultza [174], oraz struktury drugorzędowej wg Chou-Fasmana [175] i Garniera-Robsona [176]. Analiza ludzkiego L-FABP wykonana tą metodą przy pomocy programu Protean v. 5.08 z pakietu Lasergene, firmy DNASTAR, Inc. wykazała obecność 5 oligopeptydowych sekwencji o stosunkowo wysokim indeksie antygenowym (wartość powyżej 1), a dokładniej: 2 helisy zlokalizowane w N-terminalnym obszarze sekwencji L-FABP, beta zwój zlokalizowany na C-końcu L-FABP oraz rozmieszczone pomiędzy tymi strukturami 2 pętle aminokwasowe. Ze względu na bliskie sąsiedztwo w strukturze pierwszorzędowej L-FABP, wydaje się, że przynajmniej 2 z 5 typowanych epitetów, nie mogą być wiązane przez specyficzne przeciwciała jednocześnie z pozostałymi 3 epitetami. Powyższa obserwacja dobrze koreluje z analizą struktury krystalograficznej szczurzego L-FABP (82% homologii z ludzkim) przy użyciu programu Rasmol v.2.6 do trójwymiarowej wizualizacji makromolekuł [177].

Naturalnie nie znaczy to, że w przypadku białek z rodziny FABP, w ogóle nie jest możliwe opracowanie kanapkowego testu ELISA – niektórzy autorzy opisują

pozytywne doświadczenia w tej kwestii, chociaż zwykle w testach kanapkowych stosują oni odpowiednio wyselekcjonowane przeciwciała monoklonalne [124,142]. Produkcja przeciwciał o wysokim stopniu specyficzności oraz czułości wymaga uzyskania wystarczająco homogennego antygeny o konformacji możliwie zbliżonej do natywnej, który następnie wykorzystuje się do immunizacji królika. Wydaje się, że warunek ten został w niniejszej pracy spełniony. Uzyskano bowiem bardzo wysoki stopień czystości antygeny (powyżej 99% homogenności wg analizy densytometrycznej elektroforegramu), czyli białka L-FABP (wyzolowanego z wątroby człowieka), którego użyto następnie do produkcji specyficznych przeciwciał przeciwko temu białku, a także jako jeden z elementów układu w kompetycyjnym teście ELISA. Aby uzyskać możliwie najwyższy stopień czystości antygeny, procedurę izolacji L-FABP z wątroby ludzkiej prowadzono wieloetapowo przy pomocy technik chromatograficznych. Procedura izolacji L-FABP ma charakter autorski. Została opracowana w oparciu o doświadczenia własne oraz dane z piśmiennictwa dotyczące izolacji FABP z różnych narządów człowieka [138,142,178–181], zwierząt [62,131,132,138,139,145,146,178,182–184] i roślin [185], oraz dostępne protokoły laboratoryjne [186–190] i zmodyfikowana w taki sposób, aby zapewnić jak najwyższą jakość finalnego produktu, nawet kosztem znacznego zmniejszenia wydajności metody. Jedną z zastosowanych modyfikacji było wprowadzenie już na pierwszym etapie oczyszczania denaturacji termicznej frakcji cytosolu wątrobowego w temp. 50°C [185]. Wykorzystując właściwość stabilności termicznej L-FABP [21] można było, w ten stosunkowo prosty sposób, pozbyć się znacznej ilości innych białek o większej skłonności do denaturacji pod wpływem podwyższonej temperatury. Kolejną modyfikacją była delipidacja frakcji cytosolu wątrobowego (denaturowanej termicznie w poprzednim etapie) przeprowadzona na lipofilnym złożu Lipidex 1000 w temp. 37°C [139]. Lipidex 1000 (hydroxyalkoxypropyl dextran) posiada zdolność adsorbowania lipidowych ligandów, przy czym w temp. 4°C wiąże jedynie ligandy niezwiązane z białkiem, natomiast w temp. 37°C wiąże zarówno ligandy niezwiązane jak i związane z białkiem. Głównym celem delipidacji białek frakcji cytosolowej było zmniejszenie heterogenności L-FABP związanej z opisywanym w piśmiennictwie zjawiskiem konformerii strukturalnej L-FABP, indukowanej przez związany ligand [40,62,63,191,192]. Konformery strukturalne L-FABP wykazują dość znaczne

różnice w zakresie struktury drugo- i trzeciorzędowej oraz wartości punktu izoelektrycznego w zależności od tego, czy są związane z ligandem czy też nie, a także prawdopodobnie w zależności od rodzaju związanego liganda [1,40]. Mogłoby to doprowadzić do znacznych strat na dalszym etapie oczyszczania metodą chromatografii jonowymiennej.

Fracjonowanie delipidowanego cytosolu wątrobowego przeprowadzono przy użyciu technik chromatograficznych: filtracji żelowej oraz chromatografii jonowymiennej, chociaż niektórzy autorzy pomijają ten ostatni etap oczyszczania L-FABP uzyskując również zadowalające rezultaty [112,131]. Aby upewnić się, że frakcje cytosolu wątrobowego uzyskane po pierwszym etapie chromatografii żelowej (Sephadex G-50) zawierają natywną formę L-FABP, która nie uległa denaturacji pod wpływem wcześniejszych procedur prowadzonych w podwyższonej temperaturze (denaturacja termiczna frakcji cytosolu w temp. 50⁰C, delipidacja frakcji cytosolu w temp. 37⁰C) wykonano test wiązania kwasów tłuszczowych. Wyniki testu potwierdziły obecność białek wiążących kwasy tłuszczowe w zebranych frakcjach cytosolu wątrobowego o masie ok. 15 kD, a ponadto wykazały istotnie wyższą zdolność wiązania kwasów tłuszczowych przez białka w typowanych frakcjach w stosunku do próby kontrolnej (cytochrom c) oraz innych frakcji zebranych z kolumny chromatograficznej. Wyniki poszczególnych etapów oczyszczania monitorowano elektroforetycznie (SDS-PAGE) uzyskując na ostatnim etapie procedury izolacji białko o bardzo wysokim stopniu homogenności, oszacowanym densytometrycznie na ponad 99%.

Procedurę immunizacji królików przeprowadzono wykorzystując homogenne L-FABP. Otrzymano kilka populacji przeciwciał anty-L-FABP, które testowano metodami immunochemicznymi (dot-blotting, Western-blotting, pośredni test ELISA) oceniając je pod kątem specyficzności względem L-FABP (tj. braku reakcji krzyżowych z innymi białkami cytosolu) oraz czułości (tj. detekcji jak najmniejszych stężeń L-FABP). Do testu ELISA wybrano populację przeciwciał o optymalnych parametrach immunochemicznych.

Jednym z zasadniczych celów pracy było opracowanie testu ELISA umożliwiającego ocenę ilościową L-FABP w materiale biologicznym w możliwie szerokim zakresie stężeń. Z założenia pośredni test ELISA, choć stosowany przez niektórych autorów [112,133] do pomiaru stężenia L-FABP w wątrobie, gdzie poziom L-FABP jest stosunkowo wysoki, jest mało przydatny do oznaczania L-FABP w materiale

biologicznym zawierającym znacznie mniejsze stężenie tego białka [159], np. surowica czy żółć szczura [134], i jak wykazano dalej żółć człowieka. Ponieważ próby opracowania kanapkowego testu ELISA (Sandwich ELISA) nie przyniosły zadowalających rezultatów (czułość testu była zbyt mała) zdecydowano się na rozwiązanie alternatywne, tj. kompetycyjny test ELISA z fazą blokującą (wg terminologii anglojęzycznej: Indirect Antigen Competition Blocking ELISA).

Granica czułości opracowanego testu ELISA na poziomie 10 ng/ml wydaje się być zadowalająca i jest porównywalna zakresem stężeń białek FABP oznaczanych w surowicy krwi [123,124,142,154].

Precyzja opracowanego testu ELISA, mierzona wartością średnią współczynników zmienności w seriach jednoczesnych (17%) i niejednoczesnych (22%) wydaje się być akceptowalna dla potrzeb badań biologicznych i porównywalna z danymi z piśmiennictwa [124], chociaż wartości obu współczynników są wyższe od niezwykle restrykcyjnych wartości referencyjnych dla testów klinicznych (poniżej 10%).

Średnia dokładność metody, mierzona sposobem odzysku, jest również zadowalająca i plasuje się na poziomie 95%.

Rodzina białek FABP zawiera rozmaite izoformy o podobnej strukturze i funkcji, wykazujące pewien stopień homologii. Zatem teoretycznie wyniki testu ELISA mogłyby być zawyżone z powodu krzyżowych reakcji przeciwciał anty-L-FABP z innymi izoformami białek wiążących kwasy tłuszczowe obecnymi w materiale biologicznym pochodzenia pozawątrobowego. Szczególnie wysokie ryzyko interferencji podczas oznaczania stężenia L-FABP w surowicy krwi mogłoby wystąpić ze strony izoformy sercowej H-FABP, która jak wykazano wcześniej jest uwalniana do krwi w znacznych ilościach z mięśnia sercowego oraz mięśni szkieletowych [141,142,154]. Z tego względu celowym wydawało się potwierdzenie specyficzności narządowej testu ELISA wykorzystującego otrzymane przeciwciała, a ściślej rzecz ujmując jego specyficzności immunochemicznej względem izoformy wątrobowej białka L-FABP. Zbadano więc reaktywność przeciwciał anty-L-FABP z cytozolem ludzkiego serca uzyskując stopień krzyżowej reakcji na poziomie zaledwie 0,6%, który jest porównywalny z danymi z piśmiennictwa [6,112,133,180] i zapewnia wysoką specyficzność testu względem najbardziej prawdopodobnego czynnika interferującego, obecnego w surowicy krwi.

Oczywiście nieco problematycznym byłoby sprawdzanie reakcji krzyżowych przeciwciał anti-L-FABP względem wszystkich białek z rodziny FABP. Z piśmiennictwa wiadomo jednak, że przeciwciała anti-L-FABP wykazują znikomy procent krzyżowych reakcji z innymi izoformami białek wiążących kwasy tłuszczowe [6,133], których stopień homologii z L-FABP nie przekracza 36% (wg analizy programem BLAST [170]).

Potwierdzeniem wiarygodności opracowanego testu było porównanie oznaczeń poziomu L-FABP w wątrobie z danymi z piśmiennictwa powtarzanymi wielokrotnie przez różnych autorów. Uzyskany wynik 28,4 µg/mg w przeliczeniu na białko cytosolu, jest porównywalny z wartościami cytowanymi w odniesieniu tak do człowieka [133] jak i szczura [53,112,131,132,193]. Jedynie wyniki oznaczeń poziomu L-FABP w wątrobie szczura wykonane przez Foucaud i wsp. (nb. przy pomocy analogicznego, kompetycyjnego testu ELISA!) są ponad 2-krotnie wyższe w porównaniu do uzyskanych przez autora tej rozprawy [134,135]. Podobną rozbieżność wykazują oznaczenia Paulussena [133] wykonane w cytosolu wątroby świni. Natomiast bardzo wysoką zbieżność wyników uzyskano porównując poziom L-FABP w wątrobie człowieka, wyrażony w miligramach białka na gram mokrej masy tkanki (0,82 mg/g) z oznaczeniami zespołu Kamisaki [58] wykonanymi techniką testu radioimmunochemicznego (RIA). Ponad 3-krotnie wyższy poziom L-FABP w przeliczeniu na masę tkanki (oznaczony kanapkowym testem ELISA) podaje Pelsers [124]. Rozbieżności w oznaczonych poziomach L-FABP mogą wynikać z odmienności gatunkowej [133], różnicy wieku [132] lub płci [45,46] (choć w badaniach prowadzonych przez autora niniejszej rozprawy nie zaobserwowano zależności poziomu L-FABP od wieku bądź płci), stanu odżywienia [51], diety [194], istnienia ukrytej patologii narządowej [4,58], a nawet dobowych wahań poziomu L-FABP [195]. Niezwykle istotne znaczenie mogą mieć różnice metodyczne, zarówno w zakresie wyboru testów immunochemicznych (RIA, różne warianty ELISA), jak i przygotowania materiału biologicznego do pomiaru (np. pomiar *ex tempore* bądź po rozmrożeniu fragmentów tkanki). Oznaczenia wykonane przez autora rozprawy przeprowadzono na uprzednio głęboko mrożonych (-80°C), a następnie rozmrożonych fragmentach wątroby pobranej ze zwłok. Procedura mrożenia - rozmrożenia tkanki powoduje rozpad znacznej ilości mitochondriów a tym samym uwolnienie dużej ilości białka macierzy

mitochondrialnej do cytosolu. W konsekwencji poziom L-FABP zmierzony we frakcji cytosolowej (wyrażony na mg białka) jest zaniżony, w porównaniu z wynikami oznaczeń wykonanymi na materiale niemrożonym, tj. tuż po pobraniu. W niniejszej pracy zastosowano ponadto pomiar poziomu L-FABP w ekstrakcie wątrobowym, a nie cytosolu wątrobowym, co może stanowić wygodną modyfikację metodyczną o porównywalnym znaczeniu biologicznym. Większość próbek wątroby potraktowano właśnie w taki sposób uzyskując wartość średnią poziomu L-FABP równą 8,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ białka ekstraktu wątrobowego, co stanowi ok. 0,3 wartości zmierzonej we frakcji cytosolu wątrobowego.

Opracowanie kompetycyjnego testu ELISA umożliwiło wykonanie pomiarów poziomu L-FABP w ludzkiej żółci. Do tej pory nie opisano tego typu wyników w piśmiennictwie światowym. W latach 1998-1999 ukazały się zaledwie 2 prace autorstwa Foucaud i wsp. [134,135], w których przedstawiono poziom L-FABP zmierzony w żółci przewodowej szczura (u szczura nie występuje anatomiczny odpowiednik pęcherzyka żółciowego) oraz wykazano wyłącznie jakościowo (Western-blotting) obecność L-FABP w żółci pobranej od dwóch (sic!) pacjentów. Statystyczne opracowanie poziomu L-FABP zmierzonego w ludzkiej żółci wykonano w niniejszej pracy oddzielnie dla żółci przewodowej (zwanej również żółcią wątrobową) oraz żółci pęcherzykowej, gdyż stanowią one rezerwuary materiału biologicznego różniące się bardzo istotnie pod względem parametrów biochemicznych i właściwości patofizjologicznych [162,196–198]. Ze względu na brak referencji do analogicznych oznaczeń u człowieka, porównano jedynie poziom L-FABP zmierzony w ludzkiej żółci przewodowej z poziomem L-FABP w żółci przewodowej szczura [134]. Obie średnie okazują się praktycznie równe (ok. 140 ng/ml), aczkolwiek wartości zmierzone u człowieka wykazują dużo większy rozrzut wyników wokół wartości średniej ($SD = 120$ ng/ml) w porównaniu z rozrzutem cytowanych wartości stężenia L-FABP dla szczura ($SD = 17$ ng/ml). Należy jednakże pamiętać, że próbki żółci uzyskiwano śródoperacyjnie lub w okresie pooperacyjnym od chorych poddanych zabiegom chirurgicznym (laparoskopowym lub klasycznym) z powodu patologii dróg żółciowych. Chorzy ci stanowili niejednorodną grupę w sensie diagnozy klinicznej oraz stanu fizykalnego i parametrów biochemicznych, chociaż dominującą przyczyną większości zabiegów operacyjnych była kamica żółciowa lub jej powikłania. Pozyskano w ten sposób populację pacjentów, w której rozkład mierzonej cechy (poziomu L-FABP w żółci) ma charakter wielomodalny, a

jego analiza nie jest celem tego opracowania. Podobnie można tłumaczyć stosunkowo wysoki współczynnik zmienności statystycznej poziomu stężenia L-FABP mierzonego w ludzkiej żółci pęcherzykowej. Ponadto należy zdawać sobie sprawę, że patofizjologia pęcherzyka żółciowego warunkuje różny stopień zagęszczenia żółci wyrażający się, m.in. znacznym rozrzutem wartości stężenia białka całkowitego w próbkach, co obserwowano w badaniach własnych (Ryc. 19, str. 77), jak i piśmiennictwie [162]. Poza tym, żółć pęcherzykowa, ze względu na znaczne stężenie kwasów żółciowych oraz soli nieorganicznych mogących potencjalnie interferować w reakcjach immunochemicznych, była przed pomiarem poddawana ultrafiltracji na membranie o punkcie odcięcia rzędu 5 kD. Opisana wyżej procedura fizycznej obróbki prób żółci pęcherzykowej mogła stanowić dodatkowy generator zmienności statystycznej, zależny chociażby od składu żółci i stopnia jej zagęszczenia.

Komentarza wymagają wyniki pomiarów stężenia L-FABP w surowicy krwi. Rozważania na ten temat należałoby rozpocząć od dobrze udokumentowanych w piśmiennictwie światowym analogicznych badań dotyczących izoformy sercowej H-FABP oraz jelitowej I-FABP, które stanowiły swego rodzaju źródło inspiracji dla autora niniejszej rozprawy [136,137,140–144,147,150,154,199–207]. Analiza stężeń H-FABP w surowicy krwi cytowanych przez autorów tych prac na przestrzeni kilkunastu lat wykazuje niekiedy znaczne różnice, np. $3,65 \pm 1,81$ ng/ml [150] vs. 9 ± 5 ng/ml [142] vs. 28 ± 5 µg/ml [146] (sic!), co może świadczyć o problemach technicznych związanych z opracowaniem immunochemicznej metody pomiaru białka H-FABP w zakresie stosunkowo niskich stężeń. Pomimo zaangażowania potencjału intelektualnego liczących się ośrodków naukowych oraz finansowego firm biotechnologicznych, próba wdrożenia immunochemicznej metody oznaczania H-FABP do diagnostyki klinicznej zawału serca [143,199,208,209] lub udaru mózgu [200,210], nie wykroczyła wciąż poza obszar medycyny doświadczalnej. Podobna rozbieżność dotyczy immunochemicznych pomiarów I-FABP w surowicy ludzkiej. Dla przykładu Marks i wsp. [211] oraz Pelters i wsp. [124] podają stężenia I-FABP w surowicy człowieka na poziomie poniżej 0,1 ng/ml, podczas gdy Kaufman i wsp. [212] oraz Kanda i wsp. [206] szacują tę wartość na ok. 65 ng/ml. Tak znaczne różnice pomiędzy różnymi ośrodkami w oznaczeniach wykonanych przy pomocy testów ELISA niektórzy autorzy [124] próbują tłumaczyć innymi

właściwościami rekombinowanego białka I-FABP używanego do kalibracji oraz różnicą dotyczącą górnej granicy czułości testów.

Analogiczne badania izoformy wątrobowej L-FABP, polegające na pomiarze stężenia L-FABP w surowicy krwi i próbie korelacji otrzymanych wyników z określoną patologią wątroby, mają dość krótką historię. W przeciągu ostatnich 2 lat (w czasie kiedy praca nad niniejszą rozprawą dobiegła końca) opublikowano zaledwie 3 prace, których autorzy opracowali wystarczająco czuły test ELISA (m.in. typu kanapkowego, na bazie przeciwciał monoklonalnych, z rekombinowanym L-FABP jako kalibratorem) umożliwiający pomiar L-FABP w surowicy krwi człowieka [123–125]. Guthman i wsp. [123] podają, że oznaczanie L-FABP w surowicy krwi może okazać się przydatne w diagnostyce martwiczego zapalenia jelit u wcześniaków. Pelters i wsp. [125] zaobserwowali kilkukrotny wzrost poziomu L-FABP w surowicy krwi chorych zagrożonych zlewną martwicą przeszczepionej wątroby. W kolejnej publikacji ten sam zespół [124] badał stężenie L-FABP w surowicy chorych z patologią jelita lub wątroby. Wyraźny wzrost poziomu L-FABP w surowicy wykazano jedynie u chorych z martwicą jelita, pierwotną marskością żółciową wątroby oraz w niektórych przypadkach raka wątroby. Zaledwie mierny wzrost stężenia L-FABP obserwowano w niektórych przypadkach polekowego bądź alkoholowego uszkodzenia wątroby, ostrego zapalenia trzustki czy cholestazy. Jednak ze względu na niską liczebność badanych grup chorych (4 – 5 przypadków) prezentowane wyniki nie są dość przekonujące. Zresztą sami autorzy omawianej pracy [124] podkreślają ich wstępny charakter.

Poziom L-FABP w surowicy krwi pacjentów z grupy kontrolnej zmierzony przez autora tej pracy jest porównywalny, w sensie rzędu wielkości z wynikami uzyskanymi przez Peltersa i wsp. [124] i wynosi 38,00 (29,00 — 48,25) vs. 9,46 (4,50 — 17,50) ng/ml (mediana, 25 — 75 percentyl). Oczywistym jest, że różnice pomiędzy ośrodkami badawczymi w wynikach testów immunochemicznych są do pewnego stopnia nieuniknione i nie należy porównywać ich wprost w sensie dosłownym [3,4].

Nie stwierdzono statystycznie znamiennej różnicy poziomu L-FABP w surowicy chorych z laboratoryjnymi oznakami patologii wątroby względem grupy kontrolnej, chociaż wartość średnia była nieco wyższa niż w kontroli. Podobnie nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy pomiędzy poziomem L-FABP w surowicy chorych z

rozpoznaną klinicznie ostrą niewydolnością wątroby, a poziomem L-FABP w surowicy kontrolnej, chociaż wartość średnia była również wyższa niż w kontroli. Ponadto nie stwierdzono, żeby poziom L-FABP w surowicy chorych z ostrą niewydolnością wątroby wykazywał oczekiwaną zmienność odpowiadającą kinetyce uwalniania białka z uszkodzonej tkanki lub przekraczał górną granicę „normy” fizjologicznej zdefiniowanej jako średnia arytm. kontroli + 2 x SD.

Uzasadnienia powyższych obserwacji można dopatrywać się poniekąd w naturze opracowanego testu ELISA. Wiele pomiarów L-FABP w surowicy tylko nieznacznie przekraczało dolną granicę czułości testu, określoną na 10 ng/ml, co mogło mieć wpływ na uzyskane wyniki. Ażeby uchwycić subtelne zmiany stężenia L-FABP na poziomie kilkunastu ng/ml należałoby prawdopodobnie obniżyć dolną granicę czułości testu o rząd wielkości. Być może konieczna byłaby modyfikacja testu ELISA polegająca na zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych lub rekombinowanego białka L-FABP i kalibracja testu w wąskim zakresie stężeń, poniżej 10 ng/ml.

Z drugiej strony należy pamiętać o specyfice patofizjologii wątroby. Struktura anatomiczna i charakterystyka czynnościowa tego narządu jest diametralnie różna w porównaniu z innymi narządami/tkankami badanymi pod kątem uwalniania FABP do krwioobiegu. Niezwykle istotnym jest fakt, że w odróżnieniu od mięśnia sercowego czy jelita, wątroba jest unaczyniona podwójnie, w ok. 35% przez tętnicę wątrobową a w ok. 65% przez żyłę wrotną oraz posiada szczególną strukturę mikrokrążenia [114]. W prawidłowych warunkach przez tętnicę wątrobową dociera ok. 50% tlenu zużywanego przez wątrobę [114]. Trudno zatem oczekiwać w odpowiedzi na niedokrwienie czy inny czynnik uszkodzający komórki podobnie gwałtownej reakcji miąższu wątroby przejawiającej się klasyczną krzywą „dzwonową” uwalniania białka cytosolowego do krwi, tak jak ma to miejsce w przypadku zawału serca lub martwicy krezki jelita. Ze względu na wysoką aktywność procesów detoksykacji ustrojowych oraz zdolność komórek miąższowych wątroby do regeneracji, podatność hepatocyta na stres jest relatywnie mniejsza, a w konsekwencji uwalnianie białka cytosolowego do krwioobiegu może być miernie nasilone i przedłużone w czasie. Protekcyjne znaczenie reperacji tkankowej miąższu wątroby nie budzi wątpliwości. Udowodniono wszak, że zahamowanie aktywności mitotycznej hepatocytów szczura przez podanie kolchicyny radykalnie zwiększa stopień stwierdzonego histopatologicznie uszkodzenia wątroby, podnosi poziom aminotransferazy

alaninowej we krwi oraz wskaźnik śmiertelności zwierząt wskutek intoksykacji paracetamolem, czterochlorkiem węgla czy bromobenzenem [213,214].

Należy pamiętać, że hepatocyt posiada 2 bieguny czynnościowe: naczyniowy i kanalikowy [114], co oznacza, że zwiększenie przepuszczalności błony komórkowej wskutek działania czynnika uszkodzającego komórkę, powoduje wzrost uwalniania białka cytosolowego nie tylko do krwioobiegu ale również do żółci. Mechanizm ten, wraz z udokumentowanymi w niniejszej pracy stosunkowo wysokimi poziomami L-FABP w ludzkiej żółci, może tłumaczyć brak istotnego wzrostu poziomu L-FABP w surowicy krwi chorych z patologią wątroby. Do tej pory doniesienia dotyczące metabolizmu białek klasy FABP uwzględniały jedynie klirens nerkowy jako sposób eliminacji frakcji FABP wydzielanej do przestrzeni pozakomórkowej [147,150,163]. Na podstawie przeprowadzonych badań wydaje się, że w przypadku L-FABP należy ponadto uwzględnić klirens wątrobowy jako istotną drogę eliminacji puli wątrobowej L-FABP. Z szacunkowych kalkulacji dokonanych w oparciu o prezentowane wyniki pracy (patrz rozdz. 7.3.7, 7.3.8) oraz dane z piśmiennictwa dotyczące kinetyki wydzielania żółci [162] wynika, że w ciągu doby człowiek wydziela z żółcią od ok. 0,006% do 0,028% całkowitej puli wątrobowej L-FABP. Chociaż oszacowana powyżej ilość L-FABP nie jest imponująca, wydaje się prawdopodobne, że w warunkach patologicznej destabilizacji bieguna kanalikowego błony komórkowej hepatocyta lub cholestazy może ona mieć wpływ na wahania stężenia L-FABP w płynach ustrojowych, w tym w osoczu krwi. Naturalnie przedstawiona powyżej symulacja ma charakter czysto spekulacyjny, tym niemniej daje pewne wyobrażenie o znaczącym udziale frakcji L-FABP wydzielanej z żółcią w dystrybucji ogólnoustrojowej puli L-FABP. Wyjaśnienia wymaga niewątpliwie możliwość zwrotnego wychwytu osoczowej frakcji L-FABP i wtórnego wydzielania tego białka do żółci. Hipoteza ta mogłaby znakomicie uzupełnić proponowane przez autora tego opracowania wytłumaczenie braku typowej kinetyki uwalniania wątrobowej puli L-FABP do krwi, obserwowanej w przypadku uszkodzenia innych narządów czy tkanek. Kwestią bezsporną jest natomiast aktywny udział układu fagocytów jednojądrzastych wątroby, śledziony i szpiku kostnego w eliminacji frakcji białek osocza [215], w tym osoczowej puli L-FABP.

Analiza specyfiki patofizjologicznej wątroby byłaby niepełna, gdyby nie wspomniano o patomechanizmie śmierci komórki wątrobowej jako reakcji na czynnik uszkodzający. Udowodniono ponad wszelką wątpliwość, że niedotlenienie oraz wiele ksenobiotyków, w tym hepatotoksyn może indukować nie tylko martwicę hepatocyta ale również apoptozę [216]. Wykazano, że szczególnie podatne na apoptozę są hepatocyty zlokalizowane w relatywnie mniej utlenowanej strefie okołozylnej (oznaczanej zwyczajowo cyfrą 3) płacika wątrobowego lub hodowane *in vitro* w warunkach zbliżonych [216–218]. Wystarczy wspomnieć, że paracetamol będący klasyczną hepatotoksyną wykazuje wyraźny tropizm właśnie w stosunku do hepatocytów strefy okołozylnej płacika wątrobowego [219–221]. Udowodniono również, że niektóre toksyny, leki a nawet substancje endogenne, jak kwasy żółciowe powodują aktywację receptora FasR (CD95) w nieobecności liganda FasL, co w konsekwencji prowadzi do apoptozy komórki wątrobowej [216]. Szczególnie interesujące z klinicznego punktu widzenia są doniesienia na temat indukcji apoptozy komórek mięszszowych wątroby pod wpływem soli kwasów żółciowych [222,223]. Wykazano, że podwiązanie przewodu żółciowego u myszy powoduje aktywację białka FasR i następową apoptozę hepatocytów [224]. Obserwacje te sugerują, że cholestaza zarówno zewnątrz- jak i wewnątrzwątrobowa może być czynnikiem indukującym apoptozę hepatocytów. W przebiegu ostrej niewydolności wątroby również stwierdzono zwiększoną ekspresję receptora FasR w hepatocytach [225]. Do niedawna sądzono, że D-galaktozamina stosowana jako hepatotoksyna w badaniach *in vitro* lub w doświadczalnym modelu ostrej niewydolności wątroby indukowanej galaktozaminą, powoduje wyłącznie martwicę hepatocytów szczura [226,227]. Istnieją przekonujące dowody na to, że w ciągu 24 godz. po dootrzewnowej iniekcji galaktozaminy, znaczący odsetek szczurzych hepatocytów ulega śmierci apoptotycznej [228–230]. Co więcej sugeruje się, że znaczna część komórek apoptotycznych w przebiegu intoksykacji galaktozaminą ulega wtórnej nekrozie [228]. Podwyższony poziom mRNA białka FasR udokumentowano w przebiegu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu B oraz C, a także w pozapalnej marskości wątroby [216,225,231,232]. Ponadto w wirusowym zapaleniu wątroby i marskości pozapalnej wykazano zwiększoną ekspresję liganda FasL w obrębie limfocytarnych nacieków zapalnych, co sugeruje swoistą kooperację cytotoksycznych limfocytów T i hepatocytów w realizacji procesu apoptozy [225].

Z kolei w alkoholowym uszkodzeniu wątroby poziom receptora FasR był porównywalny z poziomem charakterystycznym dla nieuszkodzonych hepatocytów, natomiast stwierdzono wyraźnie wyższy poziom ekspresji FasL w samych hepatocytach, co może świadczyć o indukcji apoptozy na drodze mechanizmów parakrynnych lub autokrynnych [225]. Jak wynika z powyższych rozważań apoptotyczny mechanizm śmierci komórek mięsaszowych wątroby jest niezwykle powszechny w przebiegu rozmaitych procesów patologicznych dotyczących tego narządu, zarówno o charakterze ostrym jak i przewlekłym. Fakt ten ma bardzo poważne znaczenie dla badań z zakresu diagnostyki laboratoryjnej chorób wątroby. Należy bowiem uświadomić sobie, że śmierć komórki na drodze apoptozy związana jest z jej kontrolowaną autolizą, a w konsekwencji brakiem uwalniania do przestrzeni pozakomórkowej biomolekuł o charakterze markerów, których poziom monitoruje się w przebiegu określonej patologii. Zatem apoptoza hepatocytów w odpowiedzi na bodziec uszkadzający wątrobę, może w pewnym stopniu tłumaczyć brak spodziewanej kinetyki uwalniania L-FABP do krwi. Hipoteza ta pozostaje w zgodności z wynikami pomiaru poziomu L-FABP w surowicy krwi pacjentów z laboratoryjnymi objawami patologii wątroby (rozdz. 7.3.9), chorych z ostrą niewydolnością wątroby (rozdz. 7.3.10) oraz chorych z cholestazą zewnątrzwątrobową w przebiegu kamicy żółciowej (dane nie przedstawione), a także szczurów z indukowaną galaktozaminą ostrą niewydolnością wątroby (rozdz. 7.3.11). Jak wynika z nielicznych jak dotąd doniesień z piśmiennictwa, wzrost poziomu L-FABP w surowicy uwarunkowany uszkodzeniem wątroby, pomimo znacznej masy narządu, jest zaskakująco mierny (0,5 – 3 x granica normy fizjol.) [124] w porównaniu ze wzrostem poziomu H-FABP w przypadku zawału serca (10 – 25 x) [142,147,163] czy I-FABP (10 – 40 x) oraz L-FABP (1 – 30 x) w przypadku martwicy jelita [124]. Wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy nie pozostają w sprzeczności z tymi danymi, a wręcz przeciwnie wydają się potwierdzać nietypową kinetykę uwalniania L-FABP do krwioobiegu w przypadku patologii wątroby. Oczywiście należy zachować odpowiedni dystans w stosunku do doniesień z piśmiennictwa o charakterze wstępnym, zwłaszcza ze względu na bardzo skąpą liczbę publikacji i ograniczoną liczebność badanych populacji (n = 4 – 5) [124].

Patologia wątroby jest pojęciem niezwykle szerokim, a choroby tego narządu mają przebieg bardzo różnorodny. Utrudnia to często postawienie wczesnego rozpoznania, zwłaszcza że wiele chorób wątroby w początkowej fazie ma przebieg subkliniczny. Niekiedy pacjent zgłasza się do lekarza ze znacznym opóźnieniem, ponieważ bagatelizuje objawy prodromalne [233,234]. Bywa tak na przykład w zatruciu muchomorem sromotnikowym (*Amanita phalloides*). W pierwszej fazie zatrucia, po 12 – 14 godz. od spożycia, dominują objawy dyspeptyczne spowodowane działaniem α -amanityny (silny inhibitor polimerazy RNA [235]) oraz słabo wchłanialnych falotoksyn na śluzówkę jelita, po czym następuje faza pozorowanej poprawy stanu chorego trwająca nawet do 24 godz., tj. do momentu kiedy amanityna uszkodzi znaczną część miąższu wątroby [234,236]. Hospitalizacja może być z tego powodu opóźniona nawet o ponad 2 doby [236]. Podobny przebieg kliniczny obserwuje się w zatruciu paracetamolem (nazwa międzynarodowa: acetaminophen [221]) oraz innymi hepatotoksynami, gdzie faza skąpoobjawowa lub wręcz bezobjawowa może trwać nawet 72 - 96 godz. od momentu ekspozycji [234]. Zazwyczaj chorzy trafiają do szpitala z bardzo wysokimi poziomami aminotransferaz w surowicy krwi, co może oznaczać, że niskocząsteczkowe białka cytosolowe, jak L-FABP zdążyły znacznie wcześniej osiągnąć maksymalny poziom w osoczu krwi, a być może nawet uległ on ponownej normalizacji. Analogiczne badania przeprowadzone na grupie pacjentów z zawałem serca lub martwicą krezki jelita wykazały bowiem, że białka klasy FABP są uwalniane z uszkodzonej tkanki do krwioobiegu już w pierwszych godzinach po zadziałaniu czynnika sprawczego, osiągając szczytowy poziom w surowicy krwi po ok. 4 godz., by powrócić do poziomu wyjściowego po ok. 12 - 20 godz. [142,151,154,237–239].

Kolejnym czynnikiem komplikującym interpretację obserwacji klinicznych jest fakt, że w przebiegu wielu chorób, jak cukrzyca, zapalenie wątroby, marskość wątroby, nowotwory wątroby stwierdzono wyraźny spadek wątrobowego poziomu L-FABP, co może mieć niebagatelny wpływ na ilość L-FABP uwalnianą do krwioobiegu w wyniku dysfunkcji lub martwicy hepatocyta [4,58].

Grupa pacjentów badanych w ramach niniejszego opracowania była klinicznie niejednorodna, albowiem przypadki ostrej niewydolności wątroby spowodowane były różnymi czynnikami patogenetycznymi, m.in. zatruciem grzybami, zatruciem paracetamolem (silna hepatotoksyna), zatruciem wielolekowym czy zaostrzeniem

przewlekłej niewydolności wątroby niejasnego pochodzenia. Weryfikacja uzyskanych wyników wymagałaby przeprowadzenia badań prospektywnych na dużej populacji i precyzyjnego doboru przypadków klinicznych z możliwie wczesnym rozpoznaniem ostrego uszkodzenia wątroby.

W celu potwierdzenia obserwacji poczynionych na ludziach, przeprowadzono doświadczenie na modelu zwierzęcym ostrej niewydolności wątroby, co umożliwiło znacznie lepszą kontrolę układu doświadczalnego. Do oznaczenia szczurzego L-FABP w surowicy krwi wykorzystano królicze przeciwciała przeciwko ludzkiemu L-FABP, co wydaje się być zasadne ze względu na znaczną homologię obu białek i wysoki poziom reakcji krzyżowych tych przeciwciał ze szczurzym białkiem L-FABP (patrz rozdz. 7.3.6) [133]. Analogicznie zresztą stosowano z powodzeniem królicze przeciwciała przeciwko szczurczemu L-FABP do oznaczania L-FABP w materiale biologicznym człowieka [240]. Ostłą niewydolność wątroby u szczura indukowano galaktozaminą podawaną dootrzewnowo [160,161]. Uzyskane wyniki potwierdziły obserwacje poczynione odnośnie człowieka, tzn. nie stwierdzono spodziewanego wzrostu poziomu L-FABP w surowicy krwi szczurów powyżej górnej granicy fizjologicznej „normy” ustalonej doświadczalnie dla populacji szczurów kontrolnych. Prawdopodobne przyczyny tego zjawiska są analogiczne jak w przypadku człowieka i zostały omówione powyżej. Tytułem uzupełnienia należałoby dodać, że wg niektórych doniesień okres półtrwania białek klasy FABP we krwi wynosi zaledwie ok. 20 min [124,203], podczas gdy okresy półtrwania aminotransferaz alaninowej i asparaginianowej oznaczanych rutynowo w diagnostyce i monitoringu chorób wątroby wynoszą odpowiednio: 47 godz. i 17 godz. [219,241]. Tak znaczna rozbieżność pomiędzy okresami półtrwania znakomicie tłumaczy udokumentowany przez autora rozprawą brak zależności pomiędzy osoczym poziomem aminotransferaz a L-FABP w przebiegu patologii wątroby zarówno u człowieka jak i szczura. W świetle powyższych danych nie można wykluczyć, że krótkotrwały wzrost stężenia L-FABP we krwi szczurów z ostrą niewydolnością wątroby nie został uchwycony ze względu na zbyt małą liczbę punktów pomiarowych w czasie. Uszkodzenie wątroby związane jest zwykle z dysfunkcją pewnej populacji hepatocytów, która przejawia się m.in. zahamowaniem syntezy białka na poziomie transkrypcji lub translacji. Okres półtrwania L-FABP w hepatocycie wynosi ok. 75 godz. [51,242], co oznacza że z czasem dochodzi do

spadku poziomu L-FABP w komórce. Wśród szeregu objawów klinicznych w przebiegu zatrucia hepatotoksyną stosunkowo często występuje faza dolegliwości dyspeptycznych manifestujących się, m.in. spadkiem łaknienia, wymiotami, biegunką. U szczurów traktowanych galaktozaminą stwierdzono przypadki nasilonej biegunki oraz wyraźnie mniejsze spożycie standardowej paszy laboratoryjnej. Jak wykazał Bass i wsp. [7,242,243] kilkudniowe głodzenie szczurów powoduje spadek zawartości L-FABP w wątrobie nawet o 70%. Tak znaczny spadek tkankowego poziomu L-FABP jest możliwy ze względu na nasilony katabolizm białka [51], co w konsekwencji może być związane z uwolnieniem mniejszej ilości L-FABP z krytycznie uszkodzonej lub martwiczej komórki.

Reasumując należy stwierdzić, że metabolizm L-FABP rozważany w kontekście patofizjologii wątroby i dróg żółciowych jest stosunkowo mało poznany. Wiele doniesień z ostatnich lat, jak również wyników prezentowanych w niniejszej pracy ma charakter wstępny i wymaga weryfikacji w toku kolejnych badań tak biochemicznych jak i klinicznych. Przydatność kliniczna immunochemicznych metod oznaczania L-FABP jest wciąż dyskutowana. Niewątpliwą szansą dla medycyny klinicznej są nowe generacje testów immunochemicznych o większej czułości i precyzji, jak chociażby amperometryczny immunosensor [152] czy elipsometryczny test immunoprecypitacji [148] pozwalający na oznaczanie białka w zakresie stężeń pikomolowych.

9. Streszczenie

1. Wyizolowano izoformę białka L-FABP z wątroby ludzkiej charakteryzującą się wysokim stopniem homogenności.
2. Wyprodukowano specyficzne przeciwciała przeciwko tej izoformie.
3. Opracowano immunochemiczną metodę pomiaru wątrobowego białka wiążącego kwasy tłuszczowe w ludzkim materiale biologicznym w zakresie stężeń nanomolowych.
4. W oparciu o tę metodę określono ilościowo poziom L-FABP w ekstrakcie z wątroby ludzkiej oraz frakcji cytosolu wątrobowego uzyskując wynik porównywalny z danymi z piśmiennictwa, co pozwala na jej adaptację do analizy ilościowej L-FABP w materiale biopsyjnym u chorych z patologią wątroby (np. uszkodzenie wątroby, diagnostyka różnicowa i prognostyczna guzów przerzutowych wątroby).
5. Określono ilościowo poziom L-FABP w żółci pęcherzykowej oraz przewodowej pobranej od chorych leczonych chirurgicznie z powodu patologii dróg żółciowych. Uzyskane wyniki mają niewątpliwy walor poznawczy, jako że w piśmiennictwie światowym nie opublikowano do tej pory ilościowej analizy L-FABP w ludzkiej żółci. Stanowią one punkt wyjścia do dalszych badań dotyczących patofizjologii wątroby i dróg żółciowych.
6. Wykazano brak bezpośredniej zależności pomiędzy uszkodzeniem hepatocytu (mierzonym aktywnością aminotransferaz w surowicy krwi chorych z objawami patologii wątroby) a wzrostem poziomu L-FABP w surowicy. Można to częściowo tłumaczyć specyfiką anatomiczną i patofizjologiczną wątroby, m.in. uwalnianiem znacznych ilości L-FABP do żółci przez biegun kanalikowy hepatocytu oraz krótkim okresem półtrwania L-FABP w osoczu krwi.
7. Wykazano wzrost stężenia aktywności aminotransferazy alaninowej i brak zmian poziomu L-FABP w surowicy krwi szczurów z indukowanym galaktozaminą

ostrym uszkodzeniem wątroby, co pozostaje w zgodności z obserwacjami dotyczącymi człowieka.

10. Wnioski

1. Izoforma L-FABP otrzymana w czystej postaci z wątroby człowieka może być użyta do produkcji specyficznych przeciwciał poliklonalnych.
2. Uzyskane przeciwciała można zastosować w metodzie ELISA do oznaczania izoformy L-FABP w materiale biologicznym człowieka (ekstrakt wątrobowy, żółć, surowica krwi).
3. Poziom L-FABP w wątrobie nie zależy od płci i wieku (podobnie jak poziom L-FABP w żółci).
4. Stężenie L-FABP w surowicy krwi nie wzrasta u chorych z uszkodzeniem wątroby mierzonym aktywnością aminotransferaz. Brak zmian może być spowodowany specyfiką patofizjologii wątroby (podwójne ukrwienie, wydzielanie L-FABP do żółci) oraz krótkim okresem półtrwania L-FABP w osoczu krwi.

11. Piśmiennictwo

1. Zimmerman, A. W., Veerkamp, J. H. (2002) New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell Mol.Life Sci.* 59, 1096-1116
2. Veerkamp, J. H., Maatman, R. G. (1995) Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: their structure and genes. *Prog.Lipid Res.* 34, 17-52
3. Veerkamp, J. H., van Kuppevelt, T. H., Maatman, R. G., Prinsen, C. F. (1993) Structural and Functional Aspects of Cytosolic Fatty Acid-Binding Proteins. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 49, 887-906
4. Glatz, J. F., van der Vusse, G. J. (1996) Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog.Lipid Res.* 35, 243-282
5. Ockner, R. K., Manning, J. A., Poppenhausen, R., Ho, W. (1972) A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium and other tissues. *Science* 177, 56-58
6. Zimmerman, A. W., van Moerkerk, H. T., Veerkamp, J. H. (2001) Ligand specificity and conformational stability of human fatty acid-binding proteins. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 33, 865-876
7. Bernlohr, D. A., Simpson, M. A., Hertzell, A. V., Banaszak, L. J. (1997) Intracellular lipid-binding proteins and their genes. *Annu.Rev.Nutr.* 17, 277-303
8. Thompson, J., Winter, N., Terwey, D., Bratt, J., Banaszak, L. (1997) The crystal structure of the liver fatty acid-binding protein. A complex with two bound oleates. *J.Biol.Chem.* 272, 7140-7150
9. Banaszak, L., Winter, N., Xu, Z., Bernlohr, D. A., Cowan, S., Jones, T. A. (1994) Lipid-binding proteins: a family of fatty acid and retinoid transport proteins. *Adv.Protein Chem.* 45, 89-151
10. Hohoff, C., Borchers, T., Rustow, B., Spener, F., van Tilbeurgh, H. (1999) Expression, purification, and crystal structure determination of recombinant human epidermal-type fatty acid binding protein. *Biochemistry* 38, 12229-12239
11. Sacchettini, J. C., Gordon, J. I., Banaszak, L. J. (1989) Crystal structure of rat intestinal fatty-acid-binding protein. Refinement and analysis of the Escherichia coli-derived protein with bound palmitate. *J.Mol.Biol.* 208, 327-339

12. Zanotti, G., Scapin, G., Spadon, P., Veerkamp, J. H., Sacchettini, J. C. (1992) Three-dimensional structure of recombinant human muscle fatty acid-binding protein. *J.Biol.Chem.* 267, 18541-18550
13. Balendiran, G. K., Schnutgen, F., Scapin, G., Borchers, T., Xhong, N., Lim, K., Godbout, R., Spener, F., Sacchettini, J. C. (2000) Crystal structure and thermodynamic analysis of human brain fatty acid-binding protein. *J.Biol.Chem.* 275, 27045-27054
14. Lassen, D., Lucke, C., Kromminga, A., Lezius, A., Spener, F., Ruterjans, H. (1993) Solution structure of bovine heart fatty acid-binding protein (H-FABPc). *Mol.Cell Biochem.* 123, 15-22
15. Mesgarzadeh, A., Pfeiffer, S., Engelke, J., Lassen, D., Ruterjans, H. (1998) Bound water in apo and holo bovine heart fatty-acid-binding protein determined by heteronuclear NMR spectroscopy. *Eur.J.Biochem.* 251, 781-786
16. Hodsdon, M. E., Ponder, J. W., Cistola, D. P. (1996) The NMR solution structure of intestinal fatty acid-binding protein complexed with palmitate: application of a novel distance geometry algorithm. *J.Mol.Biol.* 264, 585-602
17. Lucke, C., Zhang, F., Hamilton, J. A., Sacchettini, J. C., Ruterjans, H. (2000) Solution structure of ileal lipid binding protein in complex with glycocholate. *Eur.J.Biochem.* 267, 2929-2938
18. Lucke, C., Rademacher, M., Zimmerman, A. W., van Moerkerk, H. T., Veerkamp, J. H., Ruterjans, H. (2001) Spin-system heterogeneities indicate a selected-fit mechanism in fatty acid binding to heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP). *Biochem.J.* 354, 259-266
19. Rolf, B., Oudenampsen-Kruger, E., Borchers, T., Faergeman, N. J., Knudsen, J., Lezius, A., Spener, F. (1995) Analysis of the ligand binding properties of recombinant bovine liver-type fatty acid binding protein. *Biochim.Biophys.Acta* 1259, 245-253
20. Thumser, A. E., Wilton, D. C. (1996) The binding of cholesterol and bile salts to recombinant rat liver fatty acid-binding protein. *Biochem.J.* 320 (Pt 3), 729-733
21. Tanfani, F., Kochan, Z., Swierczynski, J., Zydowo, M. M., Bertoli, E. (1995) Structural properties and thermal stability of human liver and heart fatty acid

- binding proteins: a Fourier transform IR spectroscopy study. *Biopolymers* 36, 569-577
22. Veerkamp, J. H., Peeters, R. A., Maatman, R. G. (1991) Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1081, 1-24
 23. Duval, C., Fruchart, J. C., Staels, B. (2004) PPAR alpha, fibrates, lipid metabolism and inflammation. *Arch.Mal Coeur Vaiss.* 97, 665-672
 24. Coe, N. R., Bernlohr, D. A. (1998) Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1391, 287-306
 25. Martin, G., Schoonjans, K., Lefebvre, A. M., Staels, B., Auwerx, J. (1997) Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *J.Biol.Chem.* 272, 28210-28217
 26. Louet, J. F., Le May, C., Pegorier, J. P., Decaux, J. F., Girard, J. (2001) Regulation of liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by hormones and fatty acids. *Biochem.Soc.Trans.* 29, 310-316
 27. Louet, J. F., Chatelain, F., Decaux, J. F., Park, E. A., Kohl, C., Pineau, T., Girard, J., Pegorier, J. P. (2001) Long-chain fatty acids regulate liver carnitine palmitoyltransferase I gene (L-CPT I) expression through a peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)-independent pathway. *Biochem.J.* 354, 189-197
 28. Barrero, M. J., Camarero, N., Marrero, P. F., Haro, D. (2003) Control of human carnitine palmitoyltransferase II gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor through a partially conserved peroxisome proliferator-responsive element. *Biochem.J.* 369, 721-729
 29. Schoonjans, K., Peinado-Onsurbe, J., Lefebvre, A. M., Heyman, R. A., Briggs, M., Deeb, S., Staels, B., Auwerx, J. (1996) PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* 15, 5336-5348
 30. Besnard, P., Mallordy, A., Carlier, H. (1993) Transcriptional induction of the fatty acid binding protein gene in mouse liver by bezafibrate. *FEBS Lett.* 327, 219-223
 31. Poirier, H., Niot, I., Monnot, M. C., Braissant, O., Meunier-Durmort, C., Costet, P., Pineau, T., Wahli, W., Willson, T. M., Besnard, P. (2001) Differential

- involvement of peroxisome-proliferator-activated receptors alpha and delta in fibrate and fatty-acid-mediated inductions of the gene encoding liver fatty-acid-binding protein in the liver and the small intestine. *Biochem.J.* 355, 481-488
32. Linden, D., Lindberg, K., Oscarsson, J., Claesson, C., Asp, L., Li, L., Gustafsson, M., Boren, J., Olofsson, S. O. (2002) Influence of peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists on the intracellular turnover and secretion of apolipoprotein (Apo) B-100 and ApoB-48. *J.Biol.Chem.* 277, 23044-23053
33. Vu-Dac, N., Chopin-Delannoy, S., Gervois, P., Bonnelye, E., Martin, G., Fruchart, J. C., Laudet, V., Staels, B. (1998) The nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor alpha and Rev-erbalpha mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates. *J.Biol.Chem.* 273, 25713-25720
34. Vu-Dac, N., Schoonjans, K., Kosykh, V., Dallongeville, J., Fruchart, J. C., Staels, B., Auwerx, J. (1995) Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J.Clin.Invest* 96, 741-750
35. Tobin, K. A., Steineger, H. H., Alberti, S., Spydevold, O., Auwerx, J., Gustafsson, J. A., Nebb, H. I. (2000) Cross-talk between fatty acid and cholesterol metabolism mediated by liver X receptor-alpha. *Mol.Endocrinol.* 14, 741-752
36. Kok, T., Bloks, V. W., Wolters, H., Havinga, R., Jansen, P. L., Staels, B., Kuipers, F. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)-mediated regulation of multidrug resistance 2 (Mdr2) expression and function in mice. *Biochem.J.* 369, 539-547
37. Steineger, H. H., Sorensen, H. N., Tugwood, J. D., Skrede, S., Spydevold, O., Gautvik, K. M. (1994) Dexamethasone and insulin demonstrate marked and opposite regulation of the steady-state mRNA level of the peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR) in hepatic cells. Hormonal modulation of fatty-acid-induced transcription. *Eur.J.Biochem.* 225, 967-974
38. Vidal-Puig, A., Jimenez-Linan, M., Lowell, B. B., Hamann, A., Hu, E., Spiegelman, B., Flier, J. S., Moller, D. E. (1996) Regulation of PPAR gamma

- gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J.Clin.Invest* 97, 2553-2561
39. Storch, J., Thumser, A. E. (2000) The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1486, 28-44
40. Schroeder, F., Jolly, C. A., Cho, T. H., Frolov, A. (1998) Fatty acid binding protein isoforms: structure and function. *Chem.Phys.Lipids* 92, 1-25
41. Hamilton, J. A. (2002) How fatty acids bind to proteins: the inside story from protein structures. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 67, 65-72
42. Forman, B. M., Chen, J., Evans, R. M. (1997) Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 4312-4317
43. Krey, G., Braissant, O., L'Horset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M. G., Wahli, W. (1997) Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol.Endocrinol.* 11, 779-791
44. Melki, S. A., Abumrad, N. A. (1993) Expression of the adipocyte fatty acid-binding protein in streptozotocin-diabetes: effects of insulin deficiency and supplementation. *J.Lipid Res.* 34, 1527-1534
45. Ockner, R. K., Burnett, D. A., Lysenko, N., Manning, J. A. (1979) Sex differences in long chain fatty acid utilization and fatty acid binding protein concentration in rat liver. *J.Clin.Invest* 64, 172-181
46. Ockner, R. K., Lysenko, N., Manning, J. A., Monroe, S. E., Burnett, D. A. (1980) Sex steroid modulation of fatty acid utilization and fatty acid binding protein concentration in rat liver. *J.Clin.Invest* 65, 1013-1023
47. Glatz, J. F., Vork, M. M., Cistola, D. P., van der Vusse, G. J. (1993) Cytoplasmic fatty acid binding protein: significance for intracellular transport of fatty acids and putative role on signal transduction pathways. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 48, 33-41
48. Luxon, B. A., Holly, D. C., Milliano, M. T., Weisiger, R. A. (1998) Sex differences in multiple steps in hepatic transport of palmitate support a balanced uptake mechanism. *Am.J.Physiol* 274, G52-G61

49. Bernlohr, D. A., Coe, N. R., Simpson, M. A., Hertz, A. V. (1997) Regulation of gene expression in adipose cells by polyunsaturated fatty acids. *Adv.Exp.Med.Biol.* 422, 145-156
50. Glatz, J. F., Vork, M. M., van der Vusse, G. J. (1993) Significance of cytoplasmic fatty acid-binding protein for the ischemic heart. *Mol.Cell Biochem.* 123, 167-173
51. Zendzian-Piotrowska, M., Gorski, J. (1994) [Fatty acid binding protein (FABP)]. *Postepy Hig.Med.Dosw.* 48, 753-761
52. Zonderland, M. L., Bar, P. R., Reijneveld, J. C., Spruijt, B. M., Keizer, H. A., Glatz, J. F. (1999) Different metabolic adaptation of heart and skeletal muscles to moderate-intensity treadmill training in the rat. *Eur.J.Appl.Physiol Occup.Physiol* 79, 391-396
53. Nakagawa, S., Kawashima, Y., Hirose, A., Kozuka, H. (1994) Regulation of hepatic level of fatty-acid-binding protein by hormones and clofibrilic acid in the rat. *Biochem.J.* 297 (Pt 3), 581-584
54. Sarzani, R., Claffey, K. P., Chobanian, A. V., Brecher, P. (1988) Hypertension induces tissue-specific gene suppression of a fatty acid binding protein in rat aorta. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85, 7777-7781
55. Fisher, R. M., Eriksson, P., Hoffstedt, J., Hotamisligil, G. S., Thorne, A., Ryden, M., Hamsten, A., Arner, P. (2001) Fatty acid binding protein expression in different adipose tissue depots from lean and obese individuals. *Diabetologia* 44, 1268-1273
56. Fisher, R. M., Thorne, A., Hamsten, A., Arner, P. (2002) Fatty acid binding protein expression in different human adipose tissue depots in relation to rates of lipolysis and insulin concentration in obese individuals. *Mol.Cell Biochem.* 239, 95-100
57. St John, L. C., Bell, F. P. (1992) Temporal evaluation of fatty acid-binding protein (FABP) activity in association with the development of atherosclerosis in the rabbit. *Comp Biochem.Physiol Comp Physiol* 102, 357-361
58. Kamisaka, Maezawa, H., Inagaki, T., Okano, K. (1981) A low molecular weight binding protein for organic anions (Z protein) from human hepatic cytosol: purification and quantitation. *Hepatology* 1, 221-227

59. Watanabe, R., Fujii, H., Yamamoto, A., Hashimoto, T., Kameda, K., Ito, M., Ono, T. (1997) Immunohistochemical distribution of cutaneous fatty acid-binding protein in human skin. *J.Dermatol.Sci.* 16, 17-22
60. Besnard, P., Foucaud, L., Mallordy, A., Berges, C., Kaikaus, R. M., Bernard, A., Bass, N. M., Carlier, H. (1995) Expression of fatty acid binding protein in the liver during pregnancy and lactation in the rat. *Biochim.Biophys.Acta* 1258, 153-158
61. Pratley, R. E., Baier, L., Pan, D. A., Salbe, A. D., Storlien, L., Ravussin, E., Bogardus, C. (2000) Effects of an Ala54Thr polymorphism in the intestinal fatty acid-binding protein on responses to dietary fat in humans. *J.Lipid Res.* 41, 2002-2008
62. Murphy, E. J., Edmondson, R. D., Russell, D. H., Colles, S., Schroeder, F. (1999) Isolation and characterization of two distinct forms of liver fatty acid binding protein from the rat. *Biochim.Biophys.Acta* 1436, 413-425
63. Di Pietro, S. M., Santome, J. A. (2000) Isolation, characterization and binding properties of two rat liver fatty acid-binding protein isoforms. *Biochim.Biophys.Acta* 1478, 186-200
64. Frolov, A., Cho, T. H., Murphy, E. J., Schroeder, F. (1997) Isoforms of rat liver fatty acid binding protein differ in structure and affinity for fatty acids and fatty acyl CoAs. *Biochemistry* 36, 6545-6555
65. Das, T., Sa, G., Mukherjea, M. (1989) Human fetal liver fatty acid binding proteins. Role on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Biochim.Biophys.Acta* 1002, 164-172
66. Hitomi, M., Odani, S., Ono, T. (1990) Glutathione-protein mixed disulfide decreases the affinity of rat liver fatty acid-binding protein for unsaturated fatty acid. *Eur.J.Biochem.* 187, 713-719
67. Chinander, L. L., Bernlohr, D. A. (1989) Cloning of murine adipocyte lipid binding protein in Escherichia coli. Its purification, ligand binding properties, and phosphorylation by the adipocyte insulin receptor. *J.Biol.Chem.* 264, 19564-19572
68. Nielsen, S. U., Rump, R., Hojrup, P., Roepstorff, P., Spener, F. (1994) Differentiation regulation and phosphorylation of the fatty acid-binding protein from rat mammary epithelial cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1211, 189-197

69. Nielsen, S. U., Spener, F. (1993) Fatty acid-binding protein from rat heart is phosphorylated on Tyr19 in response to insulin stimulation. *J.Lipid Res.* 34, 1355-1366
70. Bansal, M. P., Cook, R. G., Danielson, K. G., Medina, D. (1989) A 14-kilodalton selenium-binding protein in mouse liver is fatty acid-binding protein. *J.Biol.Chem.* 264, 13780-13784
71. Trigatti, B. L., Mangroo, D., Gerber, G. E. (1991) Photoaffinity labeling and fatty acid permeation in 3T3-L1 adipocytes. *J.Biol.Chem.* 266, 22621-22625
72. Storch, J., Bass, N. M., Kleinfeld, A. M. (1989) Studies of the fatty acid-binding site of rat liver fatty acid-binding protein using fluorescent fatty acids. *J.Biol.Chem.* 264, 8708-8713
73. Storch, J. (1993) Diversity of fatty acid-binding protein structure and function: studies with fluorescent ligands. *Mol.Cell Biochem.* 123, 45-53
74. Stewart, J. M., Driedzic, W. R., Berkelaar, J. A. (1991) Fatty-acid-binding protein facilitates the diffusion of oleate in a model cytosol system. *Biochem.J.* 275 (Pt 3), 569-573
75. McCormack, M., Brecher, P. (1987) Effect of liver fatty acid binding protein on fatty acid movement between liposomes and rat liver microsomes. *Biochem.J.* 244, 717-723
76. Cistola, D. P., Sacchettini, J. C., Banaszak, L. J., Walsh, M. T., Gordon, J. I. (1989) Fatty acid interactions with rat intestinal and liver fatty acid-binding proteins expressed in *Escherichia coli*. A comparative ¹³C NMR study. *J.Biol.Chem.* 264, 2700-2710
77. Cistola, D. P., Sacchettini, J. C., Gordon, J. I. (1990) ¹³C NMR studies of fatty acid-protein interactions: comparison of homologous fatty acid-binding proteins produced in the intestinal epithelium. *Mol.Cell Biochem.* 98, 101-110
78. Murphy, E. J. (1998) L-FABP and I-FABP expression increase NBD-stearate uptake and cytoplasmic diffusion in L cells. *Am.J.Physiol* 275, G244-G249
79. Murphy, E. J., Prows, D. R., Jefferson, J. R., Schroeder, F. (1996) Liver fatty acid-binding protein expression in transfected fibroblasts stimulates fatty acid uptake and metabolism. *Biochim.Biophys.Acta* 1301, 191-198
80. Prows, D. R., Murphy, E. J., Moncecchi, D., Schroeder, F. (1996) Intestinal fatty acid-binding protein expression stimulates fibroblast fatty acid esterification. *Chem.Phys.Lipids* 84, 47-56

81. Milliano, M. T., Luxon, B. A. (2001) The peroxisomal proliferator clofibrate enhances the hepatic cytoplasmic movement of fatty acids in rats. *Hepatology* 33, 413-418
82. Peeters, R. A., Veerkamp, J. H. (1989) Does fatty acid-binding protein play a role in fatty acid transport? *Mol.Cell Biochem.* 88, 45-49
83. Ockner, R. K., Manning, J. A. (1976) Fatty acid binding protein. Role in esterification of absorbed long chain fatty acid in rat intestine. *J.Clin.Invest* 58, 632-641
84. Haunerland, N. H., Chen, X., Andolfatto, P., Chisholm, J. M., Wang, Z. (1993) Developmental changes of FABP concentration, expression, and intracellular distribution in locust flight muscle. *Mol.Cell Biochem.* 123, 153-158
85. Veerkamp, J. H., van Moerkerk, H. T. (1993) Fatty acid-binding protein and its relation to fatty acid oxidation. *Mol.Cell Biochem.* 123, 101-106
86. Spener, F., Borchers, T., Mukherjea, M. (1989) On the role of fatty acid binding proteins in fatty acid transport and metabolism. *FEBS Lett.* 244, 1-5
87. Schonfeld, P., Schild, L., Kunz, W. (1989) Long-chain fatty acids act as protonophoric uncouplers of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochim.Biophys.Acta* 977, 266-272
88. Burt, J. M., Massey, K. D., Minnich, B. N. (1991) Uncoupling of cardiac cells by fatty acids: structure-activity relationships. *Am.J.Physiol* 260, C439-C448
89. Glatz, J. F., van der Vusse, G. J. (1989) Intracellular transport of lipids. *Mol.Cell Biochem.* 88, 37-44
90. Samanta, A., Das, D. K., Jones, R., George, A., Prasad, M. R. (1989) Free radical scavenging by myocardial fatty acid binding protein. *Free Radic.Res.Commun.* 7, 73-82
91. Jones, R. M., Prasad, M. R., Das, D. K. (1990) Modulation of fatty acid-binding capacity of heart fatty acid-binding protein by oxygen-derived free radicals. *Mol.Cell Biochem.* 98, 161-166
92. Sorof, S. (1994) Modulation of mitogenesis by liver fatty acid binding protein. *Cancer Metastasis Rev.* 13, 317-336
93. Khan, S. H., Sorof, S. (1994) Liver fatty acid-binding protein: specific mediator of the mitogenesis induced by two classes of carcinogenic peroxisome proliferators. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 848-852

94. Bordewick, U., Heese, M., Borchers, T., Robenek, H., Spener, F. (1989)
 Compartmentation of hepatic fatty-acid-binding protein in liver cells and its effect on microsomal phosphatidic acid biosynthesis. *Biol.Chem.Hoppe Seyler* 370, 229-238
95. Fahimi, H. D., Voelkl, A., Vincent, S. H., Muller-Eberhard, U. (1990)
 Localization of the heme-binding protein in the cytoplasm and of a heme-binding protein-like immunoreactive protein in the nucleus of rat liver parenchymal cells: immunocytochemical evidence of the subcellular distribution corroborated by radioimmunoassay and immunoblotting. *Hepatology* 11, 859-865
96. Keler, T., Barker, C. S., Sorof, S. (1992) Specific growth stimulation by linoleic acid in hepatoma cell lines transfected with the target protein of a liver carcinogen. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 4830-4834
97. Keler, T., Sorof, S. (1993) Growth promotion of transfected hepatoma cells by liver fatty acid binding protein. *J.Cell Physiol* 157, 33-40
98. Kaikaus, R. M., Bass, N. M., Ockner, R. K. (1990) Functions of fatty acid binding proteins. *Experientia* 46, 617-630
99. Cohn, S. M., Simon, T. C., Roth, K. A., Birkenmeier, E. H., Gordon, J. I. (1992) Use of transgenic mice to map cis-acting elements in the intestinal fatty acid binding protein gene (Fabpi) that control its cell lineage-specific and regional patterns of expression along the duodenal-colonic and crypt-villus axes of the gut epithelium. *J.Cell Biol.* 119, 27-44
100. Distel, R. J., Robinson, G. S., Spiegelman, B. M. (1992) Fatty acid regulation of gene expression. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J.Biol.Chem.* 267, 5937-5941
101. Kurtz, A., Zimmer, A., Schnutgen, F., Bruning, G., Spener, F., Muller, T. (1994) The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. *Development* 120, 2637-2649
102. Myers-Payne, S. C., Hubbell, T., Pu, L., Schnutgen, F., Borchers, T., Wood, W. G., Spener, F., Schroeder, F. (1996) Isolation and characterization of two fatty acid binding proteins from mouse brain. *J.Neurochem.* 66, 1648-1656

103. Feng, L., Hatten, M. E., Heintz, N. (1994) Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* 12, 895-908
104. Murphy, E. J., Prows, D. R., Stiles, T., Schroeder, F. (2000) Liver and intestinal fatty acid-binding protein expression increases phospholipid content and alters phospholipid fatty acid composition in L-cell fibroblasts. *Lipids* 35, 729-738
105. Murphy, E. J., Barcelo-Coblijn, G., Binas, B., Glatz, J. F. (2004) Heart fatty acid uptake is decreased in heart fatty acid-binding protein gene-ablated mice. *J.Biol.Chem.* 279, 34481-34488
106. Martin, G. G., Danneberg, H., Kumar, L. S., Atshaves, B. P., Erol, E., Bader, M., Schroeder, F., Binas, B. (2003) Decreased liver fatty acid binding capacity and altered liver lipid distribution in mice lacking the liver fatty acid-binding protein gene. *J.Biol.Chem.* 278, 21429-21438
107. Martin, G. G., Huang, H., Atshaves, B. P., Binas, B., Schroeder, F. (2003) Ablation of the liver fatty acid binding protein gene decreases fatty acyl CoA binding capacity and alters fatty acyl CoA pool distribution in mouse liver. *Biochemistry* 42, 11520-11532
108. Haunerland, N. H., Spener, F. (2004) Fatty acid-binding proteins--insights from genetic manipulations. *Prog.Lipid Res.* 43, 328-349
109. Medzihradzky, K. F., Gibson, B. W., Kaur, S., Yu, Z. H., Medzihradzky, D., Burlingame, A. L., Bass, N. M. (1992) The primary structure of fatty-acid-binding protein from nurse shark liver. Structural and evolutionary relationship to the mammalian fatty-acid-binding protein family. *Eur.J.Biochem.* 203, 327-339
110. Tatusova, T. A., Madden, T. L. (1999) BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol.Lett.* 174, 247-250
111. Veerkamp, J. H., Peeters, R. A., Maatman, R. G. (1991) Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1081, 1-24
112. Paulussen, R. J., Geelen, M. J., Beynen, A. C., Veerkamp, J. H. (1989) Immunochemical quantitation of fatty-acid-binding proteins. I. Tissue and intracellular distribution, postnatal development and influence of

- physiological conditions on rat heart and liver FABP. *Biochim.Biophys.Acta* 1001, 201-209
113. Guzman, M., Castro, J. (1989) Zonation of fatty acid metabolism in rat liver. *Biochem.J.* 264, 107-113
114. Ostrowski, K. (1995) Wątroba i pęcherzyk żółciowy. In *Histologia* pp. 655-673, PZWL, Warszawa.
115. Zucker, S. D. (2001) Kinetic model of protein-mediated ligand transport: influence of soluble binding proteins on the intermembrane diffusion of a fluorescent fatty acid. *Biochemistry* 40, 977-986
116. Hertzfel, A. V., Bernlohr, D. A. (2000) The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. *Trends Endocrinol.Metab* 11, 175-180
117. Suzuki, T., Watanabe, K., Ono, T. (1990) Immunohistochemical demonstration of liver fatty acid-binding protein in human hepatocellular malignancies. *J.Pathol.* 161, 79-83
118. Carroll, S. L., Roth, K. A., Gordon, J. I. (1990) Liver fatty acid-binding protein: a marker for studying cellular differentiation in gut epithelial neoplasms. *Gastroenterology* 99, 1727-1735
119. Lawrie, L. C., Dundas, S. R., Curran, S., Murray, G. I. (2004) Liver fatty acid binding protein expression in colorectal neoplasia. *Br.J.Cancer* 90, 1955-1960
120. Yamazaki, T., Kanda, T., Sakai, Y., Hatakeyama, K. (1999) Liver fatty acid-binding protein is a new prognostic factor for hepatic resection of colorectal cancer metastases. *J.Surg.Oncol.* 72, 83-87
121. Hashimoto, T., Kusakabe, T., Watanabe, K., Sugino, T., Fukuda, T., Nashimoto, A., Honma, K., Sato, Y., Kimura, H., Fujii, H., Suzuki, T. (2004) Liver-type fatty acid-binding protein is highly expressed in intestinal metaplasia and in a subset of carcinomas of the stomach without association with the fatty acid synthase status in the carcinoma. *Pathobiology* 71, 115-122
122. Das, R., Hammamieh, R., Neill, R., Melhem, M., Jett, M. (2001) Expression pattern of fatty acid-binding proteins in human normal and cancer prostate cells and tissues. *Clin.Cancer Res.* 7, 1706-1715

123. Guthmann, F., Borchers, T., Wolfrum, C., Wustrack, T., Bartholomaeus, S., Spener, F. (2002) Plasma concentration of intestinal- and liver-FABP in neonates suffering from necrotizing enterocolitis and in healthy preterm neonates. *Mol.Cell Biochem.* 239, 227-234
124. Pelsers, M. M., Namiot, Z., Kisielewski, W., Namiot, A., Januszkiewicz, M., Hermens, W. T., Glatz, J. F. (2003) Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility. *Clin.Biochem.* 36, 529-535
125. Pelsers, M. M., Morovat, A., Alexander, G. J., Hermens, W. T., Trull, A. K., Glatz, J. F. (2002) Liver fatty acid-binding protein as a sensitive serum marker of acute hepatocellular damage in liver transplant recipients. *Clin.Chem.* 48, 2055-2057
126. Mei, B., Kennedy, M. W., Beauchamp, J., Komuniecki, P. R., Komuniecki, R. (1997) Secretion of a novel, developmentally regulated fatty acid-binding protein into the perivitelline fluid of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *J.Biol.Chem.* 272, 9933-9941
127. Esteves, A., Joseph, L., Paulino, M., Ehrlich, R. (1997) Remarks on the phylogeny and structure of fatty acid binding proteins from parasitic platyhelminths. *Int.J.Parasitol.* 27, 1013-1023
128. Chabalgoity, J. A., Harrison, J. A., Esteves, A., Demarco, d. H., Ehrlich, R., Khan, C. M., Hormaeche, C. E. (1997) Expression and immunogenicity of an *Echinococcus granulosus* fatty acid-binding protein in live attenuated *Salmonella* vaccine strains. *Infect.Immun.* 65, 2402-2412
129. Chabalgoity, J. A., Moreno, M., Carol, H., Dougan, G., Hormaeche, C. E. (2000) *Salmonella typhimurium* as a basis for a live oral *Echinococcus granulosus* vaccine. *Vaccine* 19, 460-469
130. Veerkamp, J. H., Paulussen, R. J., Peeters, R. A., Maatman, R. G., van Moerkerk, H. T., van Kuppevelt, T. H. (1990) Detection, tissue distribution and (sub)cellular localization of fatty acid-binding protein types. *Mol.Cell Biochem.* 98, 11-18
131. Glatz, J. F., Janssen, A. M., Baerwaldt, C. C., Veerkamp, J. H. (1985) Purification and characterization of fatty-acid-binding proteins from rat heart and liver. *Biochim.Biophys.Acta* 837, 57-66

132. Ockner, R. K., Manning, J. A., Kane, J. P. (1982) Fatty acid binding protein. Isolation from rat liver, characterization, and immunochemical quantification. *J.Biol.Chem.* 257, 7872-7878
133. Paulussen, R. J., van Moerkerk, H. T., Veerkamp, J. H. (1990) Immunochemical quantitation of fatty acid-binding proteins. Tissue distribution of liver and heart FABP types in human and porcine tissues. *Int.J.Biochem.* 22, 393-398
134. Foucaud, L., Grillasca, J., Niot, I., Domingo, N., Lafont, H., Planells, R., Besnard, P. (1999) Output of liver fatty acid-binding protein (L-FABP) in bile. *Biochim.Biophys.Acta* 1436, 593-599
135. Foucaud, L., Niot, I., Kanda, T., Besnard, P. (1998) Indirect dexamethasone down-regulation of the liver fatty acid-binding protein expression in rat liver. *Biochim.Biophys.Acta* 1391, 204-212
136. Trifonov, I. R., Katrukha, A. G., Iavelov, I. S., Averkov, O. V., Gratsianskii, N. A. (2003) [Diagnostic value of heart fatty-acid binding protein in early hospitalized patients with non ST elevation acute coronary syndrome]. *Kardiologija.* 43, 4-8
137. Trifonov, I. R., Katrukha, A. G., Deev, A. D., Iavelov, I. S., Averkov, O. V., Kuznetsov, B. V., Gratsianskii, N. A. (2002) [Heart fatty acid binding protein in patients with ST-elevation acute coronary syndrome hospitalized within 6 hours after onset of pain]. *Kardiologija.* 42, 18-23
138. Peeters, R. A., in 't Groen, M. A., de Moel, M. P., van Moerkerk, H. T., Veerkamp, J. H. (1989) The binding affinity of fatty acid-binding proteins from human, pig and rat liver for different fluorescent fatty acids and other ligands. *Int.J.Biochem.* 21, 407-418
139. Glatz, J. F., Veerkamp, J. H. (1983) A radiochemical procedure for the assay of fatty acid binding by proteins. *Anal.Biochem.* 132, 89-95
140. van Nieuwenhoven, F. A., Kleine, A. H., Wodzig, W. H., Hermens, W. T., Kragten, H. A., Maessen, J. G., Punt, C. D., Van Dieijen, M. P., van der Vusse, G. J., Glatz, J. F. (1995) Discrimination between myocardial and skeletal muscle injury by assessment of the plasma ratio of myoglobin over fatty acid-binding protein. *Circulation* 92, 2848-2854
141. Glatz, J. F., Kleine, A. H., van Nieuwenhoven, F. A., Hermens, W. T., Dieijen-Visser, M. P., van der Vusse, G. J. (1994) Fatty-acid-binding protein as a

plasma marker for the estimation of myocardial infarct size in humans.

Br.Heart J. 71, 135-140

142. Kleine, A. H. Fatty acid-binding protein as diagnostic marker of acute myocardial infarction in man. 9-110. 1993. Universitaire Pres Maastricht.
143. Okamoto, F., Sohmiya, K., Ohkaru, Y., Kawamura, K., Asayama, K., Kimura, H., Nishimura, S., Ishii, H., Sunahara, N., Tanaka, T. (2000) Human heart-type cytoplasmic fatty acid-binding protein (H-FABP) for the diagnosis of acute myocardial infarction. Clinical evaluation of H-FABP in comparison with myoglobin and creatine kinase isoenzyme MB. *Clin.Chem.Lab Med.* 38, 231-238
144. Tanaka, T., Hirota, Y., Sohmiya, K., Nishimura, S., Kawamura, K. (1991) Serum and urinary human heart fatty acid-binding protein in acute myocardial infarction. *Clin.Biochem.* 24, 195-201
145. Morrow, F. D., Martin, R. J. (1983) Quantitation of hepatic fatty acid-binding proteins by post-chromatographic ligand binding assay. *J.Lipid Res.* 24, 324-331
146. Knowlton, A. A., Burrier, R. E., Brecher, P. (1989) Rabbit heart fatty acid-binding protein. Isolation, characterization, and application of a monoclonal antibody. *Circ.Res.* 65, 981-988
147. Tsuji, R., Tanaka, T., Sohmiya, K., Hirota, Y., Yoshimoto, K., Kinoshita, K., Kusaka, Y., Kawamura, K., Morita, H., Abe, S., . (1993) Human heart-type cytoplasmic fatty acid-binding protein in serum and urine during hyperacute myocardial infarction. *Int.J.Cardiol.* 41, 209-217
148. Robers, M., Rensink, I. J., Hack, C. E., Aarden, L. A., Reutelingsperger, C. P., Glatz, J. F., Hermens, W. T. (1999) A new principle for rapid immunoassay of proteins based on in situ precipitate-enhanced ellipsometry. *Biophys.J.* 76, 2769-2776
149. Cheon, M. S., Kim, S. H., Fountoulakis, M., Lubec, G. (2003) Heart type fatty acid binding protein (H-FABP) is decreased in brains of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease. *J.Neural Transm.Suppl* 225-234
150. Ohkaru, Y., Asayama, K., Ishii, H., Nishimura, S., Sunahara, N., Tanaka, T., Kawamura, K. (1995) Development of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of human heart type fatty acid-binding protein in plasma and urine by using two different monoclonal

- antibodies specific for human heart fatty acid-binding protein.
J.Immunol.Methods 178, 99-111
151. Key, G., Schreiber, A., Feldbrugge, R., Glatz, J. F., Spener, F. (1997) An immunosensor for rapid estimation of the early heart infarction-marker FABP. *Acta Anaesthesiol.Scand.Suppl* 111, 289-292
152. Schreiber, A., Feldbrugge, R., Key, G., Glatz, J. F., Spener, F. (1997) An immunosensor based on disposable electrodes for rapid estimation of fatty acid-binding protein, an early marker of myocardial infarction.
Biosens.Bioelectron. 12, 1131-1137
153. Haik, Y., Cordovez, M., Chen, C. J., Chatterjee, J. (2002) Magnetic Immunoassay for Rapid Assessment of Acute Myocardial Infarction (AMI).
European Cells & Materials 3, 41-44
154. Kleine, A. H., Glatz, J. F., van Nieuwenhoven, F. A., van der Vusse, G. J. (1992) Release of heart fatty acid-binding protein into plasma after acute myocardial infarction in man. *Mol.Cell Biochem.* 116, 155-162
155. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal.Biochem. 72, 248-254
156. Das, T., Sa, G., Mukherjea, M. (1993) Characterization of cardiac fatty-acid-binding protein from human placenta. Comparison with placenta hepatic types. *Eur.J.Biochem.* 211, 725-730
157. ExPASy. Compute pI/Mw. www.expasy.org/cgi-bin/pi_tool?FABL_HUMAN .
 2004. ExPASy Proteomics Server.
158. Amersham Pharmacia Biotech AB (2000) Using Protein A Sepharose or rProtein A Sepharose media. In *Antibody Purification Handbook* pp. 33-36, Björkgatan 30, SE-751 84 Uppsala, Sweden.
159. Crowther, J. R. *Methods in Molecular Biology. ELISA: Theory and Practice.* [42], 1-223. 1995. Humana Press, Totawa, New Jersey.
160. Bereznowski, Z. (1997) Methacrylate uptake by isolated hepatocytes and perfused rat liver. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 29, 675-679
161. Kmieć, Z. Cytoprotekcyjny wpływ metylokarbacykliny oraz prostaglandyny E1 na poddane działaniu galaktozaminy izolowane hepatocyty młodych i starych szczurów. 6-9. 1994. Akademia Medyczna w Gdańsku.

162. LaRusso, N. F. (1984) Proteins in bile: how they get there and what they do. *Am.J.Physiol* 247, G199-G205
163. Sohmiya, K., Tanaka, T., Tsuji, R., Yoshimoto, K., Nakayama, Y., Hirota, Y., Kawamura, K., Matsunaga, Y., Nishimura, S., Miyazaki, H. (1993) Plasma and urinary heart-type cytoplasmic fatty acid-binding protein in coronary occlusion and reperfusion induced myocardial injury model. *J.Mol.Cell Cardiol.* 25, 1413-1426
164. Harlow, E., Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
165. Vergani, L., Fanin, M., Martinuzzi, A., Galassi, A., Appi, A., Carrozzo, R., Rosa, M., Angelini, C. (1990) Liver fatty acid-binding protein in two cases of human lipid storage. *Mol.Cell Biochem.* 98, 225-230
166. St John, L. C., Bell, F. P., Kezdy, F. J., Vosters, A., Sharma, S. K., Kinner, J. H., Smith, C. W. (1991) Production of an antibody to arterial fatty acid-binding protein (FABP) using a synthetic peptide as the antigen. *Comp Biochem.Physiol B* 99, 431-435
167. Collaborative Computational, P. N. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 50, 760-763
168. Sobolev, V., Sorokine, A., Prilusky, J., Abola, E. E., Edelman, M. (1999) Automated analysis of interatomic contacts in proteins. *Bioinformatics.* 15, 327-332
169. Lee, B., Richards, F. M. (1971) The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J.Mol.Biol.* 55, 379-400
170. Madden, T. L., Tatusov, R. L., Zhang, J. (1996) Applications of network BLAST server. *Methods Enzymol.* 266, 131-141
171. Jameson, B. A., Wolf, H. (1988) The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput.Appl.Biosci.* 4, 181-186
172. Hopp, T. P., Woods, K. R. (1981) Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78, 3824-3828
173. Emini, E. A., Hughes, J. V., Perlow, D. S., Boger, J. (1985) Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J.Virol.* 55, 836-839

174. Karplus, P. A., Schultz, G. E. (1985) Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften* 72, 212-213
175. Chou, P. Y., Fasman, G. D. (1978) Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv.Enzymol.Relat Areas Mol.Biol.* 47, 45-148
176. Garnier, J., Osguthorpe, D. J., Robson, B. (1978) Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J.Mol.Biol.* 120, 97-120
177. Sayle, R. A., Milner-White, E. J. (1995) RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem.Sci.* 20, 374
178. Paulussen, R. J., van der Logt, C. P., Veerkamp, J. H. (1988) Characterization and binding properties of fatty acid-binding proteins from human, pig, and rat heart. *Arch.Biochem.Biophys.* 264, 533-545
179. van Nieuwenhoven, F. A., Vork, M. M., Surtel, D. A., Kleine, A. H., van der Vusse, G. J., Glatz, J. F. (1991) High-yield two-step chromatographic procedure for purification of fatty acid-binding protein from human heart. *J.Chromatogr.* 570, 173-179
180. Peeters, R. A., in't Groen, M. A., Veerkamp, J. H. (1989) The fatty acid-binding protein from human skeletal muscle. *Arch.Biochem.Biophys.* 274, 556-563
181. Unterberg, C., Heidl, G., von Bassewitz, D. B., Spener, F. (1986) Isolation and characterization of the fatty acid binding protein from human heart. *J.Lipid Res.* 27, 1287-1293
182. Schoentgen, F., Pignede, G., Bonanno, L. M., Jolles, P. (1989) Fatty-acid-binding protein from bovine brain. Amino acid sequence and some properties. *Eur.J.Biochem.* 185, 35-40
183. Jagschies, G., Reers, M., Unterberg, C., Spener, F. (1985) Bovine fatty acid binding proteins. Isolation and characterisation of two cardiac fatty acid binding proteins that are distinct from corresponding hepatic proteins. *Eur.J.Biochem.* 152, 537-545
184. Di Pietro, S. M., Veerkamp, J. H., Santome, J. A. (1999) Isolation, amino acid sequence determination and binding properties of two fatty-acid-binding proteins from axolotl (*Ambistoma mexicanum*) liver. Evolutionary relationship. *Eur.J.Biochem.* 259, 127-134

185. Rickers, J., Tober, I., Spener, F. (1984) Purification and binding characteristics of basic fatty acid binding protein from *Avena Sativa* seedlings. *Biochim.Biophys.Acta* 794, 313-319
186. Pharmacia Fine Chemicals AB. Gel filtration theory and practice. 1-64. 1975. Box 175, S-751 04 Uppsala 1, Sweden.
187. Pharmacia Fine Chemicals AB. Sephadex gel filtration in theory and practice. 1-61. 1972. Box 175, S-751 04 Uppsala 1, Sweden.
188. Pharmacia Fine Chemicals AB. Ion Exchange Chromatography principles and methods. 1-71. 1975. Box 175, S-751 04 Uppsala 1, Sweden.
189. Himmelhoch, S. R. Chromatography of proteins on ion-exchange adsorbents. *Methods in Enzymology*. [22], 273-286. 1971.
190. Walker, J. M. *Methods in Molecular Biology. Basic Protein and Peptide Protocols*. 1994. Humana Press, Totawa, New Jersey.
191. Li, M. (1990) [Conformational changes of rat liver fatty acid binding protein induced by long chain fatty acid]. *Hokkaido Igaku Zasshi* 65, 549-559
192. Haunerland, N., Jagschies, G., Schulenberg, H., Spener, F. (1984) Fatty-acid-binding proteins. Occurrence of two fatty-acid-binding proteins in bovine liver cytosol and their binding of fatty acids, cholesterol, and other lipophilic ligands. *Hoppe Seylers.Z.Physiol Chem.* 365, 365-376
193. Glatz, J. F., van der Vusse, G. J. (1990) Cellular fatty acid-binding proteins: current concepts and future directions. *Mol.Cell Biochem.* 98, 237-251
194. Jump, D. B., Thelen, A., Mater, M. (1999) Dietary polyunsaturated fatty acids and hepatic gene expression. *Lipids* 34 Suppl, S209-S212
195. Glatz, J. F., Baerwaldt, C. C., Veerkamp, J. H., Kempen, H. J. (1984) Diurnal variation of cytosolic fatty acid-binding protein content and of palmitate oxidation in rat liver and heart. *J.Biol.Chem.* 259, 4295-4300
196. Nakano, A., Tietz, P. S., LaRusso, N. F. (1990) Circadian rhythms of biliary protein and lipid excretion in rats. *Am.J.Physiol* 258, G653-G659
197. Stark, M., Jornvall, H., Johansson, J. (1999) Isolation and characterization of hydrophobic polypeptides in human bile. *Eur.J.Biochem.* 266, 209-214
198. Kristiansen, T. Z., Bunkenborg, J., Gronborg, M., Molina, H., Thuluvath, P. J., Argani, P., Goggins, M. G., Maitra, A., Pandey, A. (2004) A proteomic analysis of human bile. *Mol.Cell Proteomics.* 3, 715-728

199. Seino, Y., Tomita, Y., Takano, T., Ohbayashi, K. (2004) Office cardiologists cooperative study on whole blood rapid panel tests in patients with suspicious acute myocardial infarction: comparison between heart-type fatty acid-binding protein and troponin T tests. *Circ.J.* 68, 144-148
200. Zimmermann-Ivol, C. G., Burkhard, P. R., Floch-Rohr, J., Allard, L., Hochstrasser, D. F., Sanchez, J. C. (2004) Fatty acid binding protein as a serum marker for the early diagnosis of stroke: a pilot study. *Mol.Cell Proteomics.* 3, 66-72
201. Nakata, T., Hashimoto, A., Hase, M., Tsuchihashi, K., Shimamoto, K. (2003) Human heart-type fatty acid-binding protein as an early diagnostic and prognostic marker in acute coronary syndrome. *Cardiology* 99, 96-104
202. Sorichter, S., Mair, J., Koller, A., Pelsers, M. M., Puschendorf, B., Glatz, J. F. (1998) Early assessment of exercise induced skeletal muscle injury using plasma fatty acid binding protein. *Br.J.Sports Med.* 32, 121-124
203. de Groot, M. J., Wodzig, K. W., Simoons, M. L., Glatz, J. F., Hermens, W. T. (1999) Measurement of myocardial infarct size from plasma fatty acid-binding protein or myoglobin, using individually estimated clearance rates. *Cardiovasc.Res.* 44, 315-324
204. Wodzig, K. W., Pelsers, M. M., van der Vusse, G. J., Roos, W., Glatz, J. F. (1997) One-step enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for plasma fatty acid-binding protein. *Ann.Clin.Biochem.* 34 (Pt 3), 263-268
205. Watanabe, T., Ohkubo, Y., Matsuoka, H., Kimura, H., Sakai, Y., Ohkaru, Y., Tanaka, T., Kitaura, Y. (2001) Development of a simple whole blood panel test for detection of human heart-type fatty acid-binding protein. *Clin.Biochem.* 34, 257-263
206. Kanda, T., Fujii, H., Tani, T., Murakami, H., Suda, T., Sakai, Y., Ono, T., Hatakeyama, K. (1996) Intestinal fatty acid-binding protein is a useful diagnostic marker for mesenteric infarction in humans. *Gastroenterology* 110, 339-343
207. Kanda, T., Fujii, H., Fujita, M., Sakai, Y., Ono, T., Hatakeyama, K. (1995) Intestinal fatty acid binding protein is available for diagnosis of intestinal ischaemia: immunochemical analysis of two patients with ischaemic intestinal diseases. *Gut* 36, 788-791

208. Fransen, E. J., Diris, J. H., Maessen, J. G., Hermens, W. T., Dieijen-Visser, M. P. (2002) Evaluation of "new" cardiac markers for ruling out myocardial infarction after coronary artery bypass grafting. *Chest* 122, 1316-1321
209. Chan, C. P., Sanderson, J. E., Glatz, J. F., Cheng, W. S., Hempel, A., Renneberg, R. (2004) A superior early myocardial infarction marker. Human heart-type fatty acid-binding protein. *Z.Kardiol.* 93, 388-397
210. Pelsers, M. M., Hanhoff, T., Van, D., V, Arts, B., Peters, M., Ponds, R., Honig, A., Rudzinski, W., Spener, F., De Kruijk, J. R., Twijnstra, A., Hermens, W. T., Menheere, P. P., Glatz, J. F. (2004) Brain- and heart-type Fatty Acid-binding proteins in the brain: tissue distribution and clinical utility. *Clin.Chem.* 50, 1568-1575
211. Marks, W. H., Gollin, G. (1993) Biochemical detection of small intestinal allograft rejection by elevated circulating levels of serum intestinal fatty acid binding protein. *Surgery* 114, 206-210
212. Kaufman, S. S., Lyden, E. R., Marks, W. H., Lieberman, J., Sudan, D. L., Fox, I. F., Shaw, B. W., Jr., Horslen, S. P., Langnas, A. N. (2001) Lack of utility of intestinal fatty acid binding protein levels in predicting intestinal allograft rejection. *Transplantation* 71, 1058-1060
213. Shankar, K., Vaidya, V. S., Apte, U. M., Manautou, J. E., Ronis, M. J., Bucci, T. J., Mehendale, H. M. (2003) Type 1 diabetic mice are protected from acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol.Sci.* 73, 220-234
214. Shankar, K., Vaidya, V. S., Corton, J. C., Bucci, T. J., Liu, J., Waalkes, M. P., Mehendale, H. M. (2003) Activation of PPAR-alpha in streptozotocin-induced diabetes is essential for resistance against acetaminophen toxicity. *FASEB J.* 17, 1748-1750
215. Smit, M. J., Wijnholds, J., Duursma, A. M., Bouma, J. M., Gruber, M. (1986) Plasma clearance of mitochondrial aspartate aminotransferase in the rat: competition with mitochondrial malate dehydrogenase. *Biomed.Biochim.Acta* 45, 1557-1561
216. Ockner, R. K. (2001) Apoptosis and liver diseases: recent concepts of mechanism and significance. *J.Gastroenterol.Hepatol.* 16, 248-260
217. Benedetti, A., Jezequel, A. M., Orlandi, F. (1988) Preferential distribution of apoptotic bodies in acinar zone 3 of normal human and rat liver. *J.Hepatol.* 7, 319-324

218. Ohno, K., Ammann, P., Fasciati, R., Maier, P. (1995) Transforming growth factor beta 1 preferentially induces apoptotic cell death in rat hepatocytes cultured under pericentral-equivalent conditions. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 132, 227-236
219. Angielski, S., Jakubowski, Z., Dominiczak, M. H. (1996) *Biochemia kliniczna*. Wydawnictwo PERSEUSZ, Sopot.
220. Herold, G. (1997) *Medycyna wewnętrzna*. PZWL, Warszawa.
221. Dixon, R. L. (1982) *Toxicology of The Liver*. Raven Press, New York.
222. Sodeman, T., Bronk, S. F., Roberts, P. J., Miyoshi, H., Gores, G. J. (2000) Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 278, G992-G999
223. Yerushalmi, B., Dahl, R., Devereaux, M. W., Gumprecht, E., Sokol, R. J. (2001) Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 33, 616-626
224. Miyoshi, H., Rust, C., Roberts, P. J., Burgart, L. J., Gores, G. J. (1999) Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. *Gastroenterology* 117, 669-677
225. Galle, P. R., Hofmann, W. J., Walczak, H., Schaller, H., Otto, G., Stremmel, W., Krammer, P. H., Runkel, L. (1995) Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J.Exp.Med.* 182, 1223-1230
226. Schanne, F. A., Pfau, R. G., Farber, J. L. (1980) Galactosamine-induced cell death in primary cultures of rat hepatocytes. *Am.J.Pathol.* 100, 25-38
227. Keppler, D., Lesch, R., Reutter, W., Decker, K. (1968) Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp.Mol.Pathol.* 9, 279-290
228. Gujral, J. S., Farhood, A., Jaeschke, H. (2003) Oncotic necrosis and caspase-dependent apoptosis during galactosamine-induced liver injury in rats. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 190, 37-46
229. Stachlewitz, R. F., Seabra, V., Bradford, B., Bradham, C. A., Rusyn, I., Germolec, D., Thurman, R. G. (1999) Glycine and uridine prevent D-galactosamine hepatotoxicity in the rat: role of Kupffer cells. *Hepatology* 29, 737-745

230. Tsutsui, S., Hirasawa, K., Takeda, M., Itagaki, S., Kawamura, S., Maeda, K., Mikami, T., Doi, K. (1997) Galactosamine-induced apoptosis in the primary mouse hepatocyte cultures. *Exp.Toxicol.Pathol.* 49, 301-306
231. Terradillos, O., Pollicino, T., Lecoeur, H., Tripodi, M., Gougeon, M. L., Tiollais, P., Buendia, M. A. (1998) p53-independent apoptotic effects of the hepatitis B virus HBx protein in vivo and in vitro. *Oncogene* 17, 2115-2123
232. Hiramatsu, N., Hayashi, N., Katayama, K., Mochizuki, K., Kawanishi, Y., Kasahara, A., Fusamoto, H., Kamada, T. (1994) Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 19, 1354-1359
233. Lampe, K. F., McCann, M. A. (1987) Differential diagnosis of poisoning by North American mushrooms, with particular emphasis on *Amanita phalloides*-like intoxication. *Ann.Emerg.Med.* 16, 956-962
234. Bosse, G. M., Matyunas, N. J. (1999) Delayed toxidromes. *J.Emerg.Med.* 17, 679-690
235. Stryer, L. (1997) *Biochemia*. PWN, Warszawa.
236. Cataletto, M. E. Mushrooms Toxicity. www.emedicine.com . 2004. eMedicine.
237. Pelsers, M. M., Chapelle, J. P., Knapen, M., Vermeer, C., Muijtjens, A. M., Hermens, W. T., Glatz, J. F. (1999) Influence of age and sex and day-to-day and within-day biological variation on plasma concentrations of fatty acid-binding protein and myoglobin in healthy subjects. *Clin.Chem.* 45, 441-443
238. Niewold, T. A., Meinen, M., van der, M. J. (2004) Plasma intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) concentrations increase following intestinal ischemia in pigs. *Res.Vet.Sci.* 77, 89-91
239. Edelson, M. B., Sonnino, R. E., Bagwell, C. E., Lieberman, J. M., Marks, W. H., Rozycki, H. J. (1999) Plasma intestinal fatty acid binding protein in neonates with necrotizing enterocolitis: a pilot study. *J.Pediatr.Surg.* 34, 1453-1457
240. Suzuki, T., Ono, T. (1987) Immunohistochemical studies on the distribution and frequency of fatty-acid-binding protein positive cells in human fetal, newborn and adult liver tissues. *J.Pathol.* 153, 385-394

241. Dufour, D. R., Lott, J. A., Nolte, F. S., Gretch, D. R., Koff, R. S., Seeff, L. B. (2000) Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clin.Chem.* 46, 2027-2049
242. Bass, N. M., Manning, J. A., Ockner, R. K. (1985) Turnover and short-term regulation of fatty acid binding protein in liver. *J.Biol.Chem.* 260, 9603-9607
243. Bass, N. M., Kaikasu, R. M., Ockner, R. K. (1993) Physiology and molecular biology of hepatic cytosolic fatty acid-binding protein. In *Hepatic Transport and Bile Secretion: Physiology and Pathophysiology* (Tavoloni, N. and Berk, P. D., eds) pp. 421-426, Raven Press, New York.