

# POSOUZENÍ KLINICKÉ RELEVANCE HODNOTY SÉROVÉ KONCENTRACE ADIPOCYTÁRNÍHO PROTEINU VÁZAJÍCÍHO MASTNÉ KYSELINY U PACIENTŮ S DIAGNÓZOU METABOLICKÉHO SYNDROMU NOVOU METODOU ELISA

DAVID STEJSKAL<sup>a</sup>, MICHAL KARPIŠEK<sup>b</sup>  
a PETER KOLLÁR<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Oddělení laboratorní medicíny Nemocnice Šternberk,

<sup>b</sup> Oddělení humánní farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

david.stejskal@quick.cz, michal.karpisek@email.cz,  
kollarp@vfu.cz

Došlo 16.1.06, přijato 30.3.06.

Klíčová slova: ELISA, metabolický syndrom

## Úvod

Adipocytární protein vázající mastné kyseliny (A-FABP, synonymum ALBP, gen FABP4) je protein o velikosti 14,4 kDa, který je členem rodiny FABP proteinů, schopných vázat mastné kyseliny a eikosanoidy. A-FABP byl lokalizován v cytosolu zralých adipocytů a makrofágů a je považován za regulátor produkce zánětlivých cytokinů a regulátor akumulace esterů cholesterolu<sup>1</sup>.

Bylo prokázáno, že A-FABP má význam pro transport mastných kyselin a zároveň ovlivňuje jejich účinek v buňkách. A-FABP se účastní transportu lipidových látek v krevním oběhu a může tak ovlivňovat insulinovou senzitivitu a energetický metabolismus. V tomto kontextu je zajímavé, že exprese genu FABP4 v makrofázích může být indukována oxidovaným LDL cholesterolem a snížena podáváním některých hypolipidemik (statinů)<sup>3</sup>, které inhibují syntézu cholesterolu. Experimentálně bylo také zjištěno, že koncentrace A-FABP je u lidí pozitivně asociována s přítomností obezity<sup>4</sup>. Přesná úloha A-FABP v metabolickém syndromu, především signální dráhy působení A-FABP, jsou však zatím nejasné.

V současné době byla provedena řada studií, ve kterých byla hodnocena hladina exprese genu FABP4, nicméně nebyla k dispozici žádná komerční souprava pro stanovení koncentrace proteinu A-FABP. V několika publika-

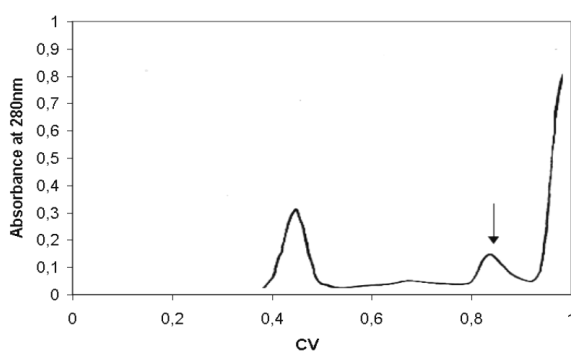
cích byl význam A-FABP posuzován pomocí zvířecích genetických modelů (myši modely, u kterých chyběl gen pro A-FABP), event. pomocí nespecifických testů založených na interakci A-FABP s jeho ligandy (mastnými kyselinami)<sup>5,6</sup>. Naším cílem byl vývoj, validace a klinické testování ELISA soupravy pro specifické stanovení sérové koncentrace lidského A-FABP. Potřeba tohoto testu je podtržena faktem, že A-FABP se vyskytuje v krevním oběhu (na rozdíl od jiných látek produkovaných tukovou tkání) v poměrně vysokých koncentracích.

## Experimentální část

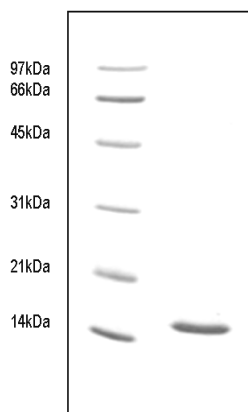
### Příprava rekombinantního lidského A-FABP

Sekvence mRNA genu FABP4 byla získána z databáze RefSeq (Accession Number NM\_001442); příslušná sekvence byla syntetizována a optimalizována pro *E.coli*. Syntetický gen byl klonován do restričních míst expresního vektoru pRSET (Invitrogen) a provedena transformace bakteriálního kmene *E.coli* BL21DE3. Kultivace produkčního kmene byla provedena při teplotě 37 °C a indukce exprese rekombinantního proteinu byla provedena pomocí isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG, Sigma). Po rozbití produkční kultury ultrazvukem byl ze supernatantu izolován gelovou chromatografií rekombinantní A-FABP (obr. 1).

Protein byl dialyzován do prostředí 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,2), čistota proteinu analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (12% homogenní gel, SDS PAGE) (obr. 2) a koncentrace bílkoviny stanovena metodou s kyselinou bicinchoninovou (BCA metoda, Sigma, katalogové číslo BCA1-1KT).



Obr. 1. Izolace rekombinantního lidského A-FABP gelovou chromatografií (GFC) Superdex 200 firmy Amersham Bioscience naplněný v koloně Pharmacia XK26/60; ekvilibrační roztok: 0,1 M-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,3 M-NaCl, pH 7,2, průtoková rychlost 1 ml min<sup>-1</sup>, nástřik 3 ml, retenční čas pro rekombinantní lidský A-FABP odpovídal 0,85 CV (objemu kolony) – příslušný pík je v obrázku označen šipkou



Obr. 2. Čistota proteinu byla ověřena elektroforézou (12% homogenní gel, SDS PAGE, metoda: Laemmli, barvení gelu: Coomassie blue). V levé dráze je standard připravený z proteinů o velikostech 14, 21, 31, 45, 66 a 97 kDa a v pravé dráze je izolovaný rekombinantní lidský A-FABP. Čistota proteinu je větší než 98 %

#### Příprava specifických protilátek proti lidskému A-FABP

Byla připravena králičí a kozi protilátka podle imunizačního schématu: dávka vždy 1 mg proteinu pro imunizaci kozy a 0,1 mg proteinu pro imunizaci králíka; první dávka byla v kompletním Freundově adjuvans a následně 3 dávky v inkompletním Freundově adjuvans, jednotlivě imunizace byly prováděny v 30denních intervalech. Z připraveného antiséra byla izolována specifická protilátka imunoafinitní chromatografií na koloně s imobilizovaným rekombinantním A-FABP, imunosorbent byl připraven podle návodu od výrobce (POROS-AL, Applied Biosystems, katalogové číslo 1-6022-24). Čistota protilátek byla analyzována opět elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (10% homogenní gel, SDS PAGE) a v obou případech byla větší než 97 %; koncentrace bílkoviny byla stanovena metodou s kyselinou bicinchoninovou. Alikvot králičí i kozi specifické protilátky byl navíc značen modifikovaným biotinem (Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin, Pierce, katalogové číslo 21338) podle návodu od výrobce.

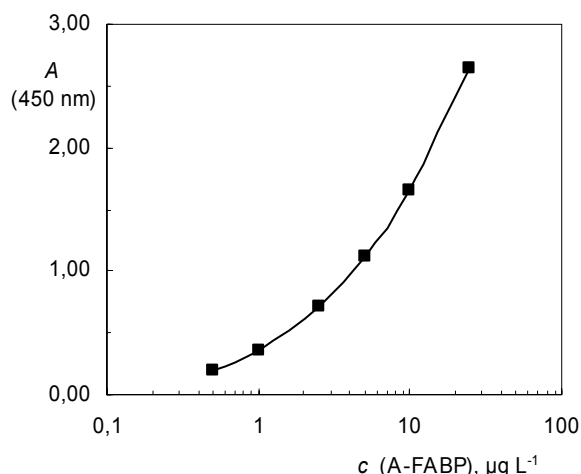
#### Vývoj sandwich ELISA testu pro stanovení A-FABP v lidském séru

Hodnoty sérové ani tkáňové koncentrace A-FABP nebyly známy, proto jsme se zaměřili na vývoj sandwich ELISA testu, který představuje při použití biotinem značené detekční protilátky vysoce citlivou a specifickou metodu.

V mikrotitrační desce (Corning Costar, High Binding, katalogové číslo 52-00-02) bylo vázáno 0,4  $\mu\text{g}$  protilátky/

jamku v 0,1 M karbonátovém pufru pH 9,0 (inkubace 12 h při 4 °C) a po odsátí vazného roztoku bylo do desky dávkováno 0,2 ml/jamku roztoku TBS (0,05 M-Tris, 0,15 M-NaCl, pH 7,2), 0,5 % BSA (hovězí sérový albumin), 4% sacharosa a deska inkubována 30 min při laboratorní teplotě pro zablokování nevyužitých vazebných míst na povrchu jamky. Po odsátí blokovacího roztoku bylo na desku dávkováno 0,1 ml příslušného standardu nebo 10 $\times$  ředěného sérového vzorku (všechna měření byla prováděna 2 $\times$ ) a následně byla deska inkubována 1 h při laboratorní teplotě. Po 3násobném promytí desky promývacím roztokem (TBS, 0,05 % Tween 20, pH 7,2) bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml biotinem značené specifické protilátky (0,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) a deska opět inkubována 1 h při laboratorní teplotě. Po 3násobném promytí desky bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml konjugátu streptavidin-křenová peroxidasa (Roche, katalogové číslo 1 089 153) naředěného 40 000 $\times$  a deska inkubována 1 h při pokojové teplotě. Po 3násobném promytí desky promývacím roztokem bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml substrátu TMB (1,2 mM tetramethylbenzidin s obsahem 3 mM peroxidu vodíku, KPL, katalogové číslo 52-00-01) a reakční směs inkubována 10 min při laboratorní teplotě. Reakce byla zastavena přidáním 0,1 M- $\text{H}_2\text{SO}_4$  a vzniklé žluté zbarvení (produkt) bylo změřeno fotometricky při vlnové délce 450 nm. Intenzita žlutého zbarvení je přímo úměrná obsahu analytu ve vzorku. Hodnoty A-FABP v neznámých vzorcích byly stanoveny z kalibrační křivky (obr. 3), která byla získána vynesením absorbanční standardů oproti jejich známé koncentraci.

Ředícím roztokem pro standardy, vzorky, biotinem značenou protilátku a konjugát streptavidin-křenová peroxidasa byl roztok TBS, 0,2 % BSA, 0,01 % thimerosal. V testu byla použita sada standardů 25; 10; 5;



Obr. 3. Standardní křivka A-FABP ELISA

2,5; 1 a 0,25  $\mu\text{g l}^{-1}$ , připravená naředěním rekombinantního lidského A-FABP. Sérové vzorky byly ředěny 10 $\times$  podle schématu 1 díl vzorku + 9 dílů ředícího roztoku.

Popsaným způsobem byly testovány všechny kombinace, které plynou z možnosti použití králíčí a kozí specifické protilátky v sandwich ELISA testu (data nejsou prezentována). Všechny kombinace poskytly srovnatelné výsledky, proto byla vybrána ekonomicky nejvýhodnější varianta, která navíc minimalizuje riziko případné křížové reaktivity: na desku byla vázána kozí specifická protilátka a pro detekci byla používána biotinem značená králíčí specifická protilátka.

#### Klinické testování testu ELISA

Bylo vyšetřeno 67 neobézních osob bez známek metabolického syndromu a 71 jedinců s metabolickým syndromem. U všech byly vyhodnoceny základní antropologické údaje (BMI – Body Mass Index), změřena hodnota krevního tlaku, v séru byly stanoveny koncentrace insulínu, cholesterolu, HDL cholesterolu, LDL cholesterolu, triacylglycerolů, glukosy, kyseliny močové, adiponektinu a A-FABP. Z hodnot koncentrace insulínu a glukosy byl vypočten index Quicki<sup>2</sup>.

### Výsledky a diskuse

#### Funkční charakteristika testu ELISA

Test ELISA měřil také rekombinantní A-FABP pořízený z nezávislého zdroje (Abnova) a naopak neměřil rekombinantní proteiny E-FABP (epiteliální isoforma FABP, Biovendor), H-FABP (srdeční isoforma FABP, Hytest), I-FABP (intestinální isoforma FABP, R&D Systems) a L-FABP (jaterní isoforma FABP, Abnova), leptin (Biovendor), receptor leptinu (RDI), adiponektin (Biovendor), resistin (Biovendor), CRP (Biovendor) a interleukin-6 (DPC). V testu ELISA nebyla zjištěna žádná křížová reaktivita v sérech následujících zvířat: králik, koza, ovce, prase, myš, kůň, křeček, slepice, tur a krysa. Výsledky testů tak ukazují na jeho specifitu pro lidský A-FABP.

Pro ověření funkčnosti A-FABP ELISA byla testována také správnost a přesnost metody. Správnost metody byla ověřena metodou standardního přídatku a byla zjišťována výtěžnost, vyjádřená jako poměr získané/očekávané hodnoty koncentrace A-FABP. Sérové vzorky od 2 pacientů byly obohaceny o +10, +20 a +30  $\mu\text{g A-FABP l}^{-1}$ . Průměrná hodnota výtěžnosti byla 88,8 %. V testu linearitě byly testovány další 2 sérové vzorky, které byly sériově ředěny 10 $\times$ , 20 $\times$ , 40 $\times$  a 80 $\times$ , přičemž průměrná hodnota výtěžku byla 107,1 %.

Přesnost metody byla testována jako opakovatelnost výsledků u 3 sérových vzorků a vyjádřena jako variační koeficient v sérii (n=8) i reprodukovatelnost mezi sériemi měření (n=3). Hodnota variačního koeficientu (CV) byla

ve všech případech < 7 %.

Mez stanovitelnosti metody, představující nejnižší stanovitelnou koncentraci A-FABP, byla 0,1  $\mu\text{g l}^{-1}$  (tato hodnota je vyjádřením koncentrace A-FABP, odpovídající absorbanci vypočítané podle vzorce: průměrná hodnota absorbance slepého vzorku (n=8) + 3 $\times$  směrodatná odchylka průměru slepého vzorku). Mez detekce (CV < 10 %), byla 1  $\mu\text{g l}^{-1}$  (vzorky s hodnotami A-FABP vyššími měly hodnoty CV < 10 %).

#### Klinické testování testu ELISA

Při klinickém testování stanovení A-FABP bylo zjištěno, že osoby s metabolickým syndromem měly vyšší hodnoty A-FABP než osoby bez něj (mediány 42,4 vs 23,7  $\mu\text{g l}^{-1}$ ;  $P < 0,01$ ) a hodnoty A-FABP korelovaly s insulínem ( $r = 0,34$ ,  $P < 0,01$ ), glukózou ( $r = 0,21$ ,  $P < 0,01$ ), triglyceridy ( $r = 0,4$ ;  $P < 0,01$ ), BMI ( $r = 0,57$ ;  $P < 0,01$ ), HDL ( $r = -0,32$ ;  $P < 0,01$ ) a Quicki ( $r = -0,23$ ;  $P < 0,01$ ). Rozdíly mezi pacienty s metabolickým syndromem a bez něj přetrvávaly i po korekci koncentrace A-FABP na hodnoty indexu Quicki nebo antropologická data (Body Mass Index – BMI) a difference zůstávaly statisticky významné ( $P < 0,01$ ).

V naší studii byl potvrzen předpoklad, že pacienti s metabolickým syndromem mají vyšší hodnoty A-FABP než osoby bez něj; tyto změny jsou nezávislé na tělesné konstituci, hodnotách glykémie či insulinémie. První výsledky tedy podporují nedávno publikovanou hypotézu, že A-FABP by mohl být nezávislým ukazatelem metabolického syndromu.

### Závěr

Byla navržena a validována diagnostická souprava (ELISA) na stanovení sérové koncentrace A-FABP. Základní analytické charakteristiky testu splňují podmínky pro použití v laboratořích klinické biochemie a navíc v současné době byla ukončena externí validace pro získání CE značky (IVD).

#### LITERATURA

- Xu A., Wang Y., Xu Y. J., Stejskal D., Tam S., Zhang J., Wat N. M. S., Wong W. K., Lam K. S. L.: Clin. Chem., v tisku.
- Damcott C. M., Moffett S. P., Feingold E., Barmada M. M., Marshall J. A., Hamman R. F., Ferrell R. E.: Metabolism 53, 303 (2004).
- Llaverias G., Noe V., Penuelas S., Vazquez-Carrera M., Sanchez R. M., Laguna J. C., Ciudad C. J., Alegret M.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 318, 265 (2004).
- Yokoyama H., Emoto M., Fujiwara S.: Diabetes Care 26, 2426 (2003).

5. Scheja L., Makowski L., Uysal K. T., Wiesbrock S. M., Shimshek D. R., Meyers D. S., Morgan M., Parker R. A., Hotamisligil G. S.: *Diabetes* 48, 1987 (1999).
6. Maeda K., Cao H., Kono K., Gorgun C. Z., Furuhashi M., Uysal K. T., Cao Q., Atsumi G., Malone H., Krishnan B., Minokoshi Y., Kahn B. B., Parker R. A., Hotamisligil G. S.: *Cell Metabolism* 1, 107 (2005).

**D. Stejskal<sup>a</sup>, M. Karpíšek<sup>b</sup>, and P. Kollár<sup>b</sup>**  
(<sup>a</sup>*Department of Laboratory Medicine, Hospital, Šternberk*, <sup>b</sup>*Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno*): **Assessment by a New ELISA Method of Clinical Relevance of Serum Concentration of Adipocyte Fatty Acid Binding Protein in Patients with Metabolic Syndrome Diagnosis**

Development, composition, validation and clinical relevance of the first ELISA method for measurement of adipocyte fatty acid binding protein (A-FABP) concentration in serum is presented. First results of clinical testing confirm the hypothesis on the possible use of A-FABP as a marker of metabolic syndrome.

**Proděkan chemické sekce Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze**

**upozorňuje na přijímací řízení do magisterského studia  
v následujících oborech:**

**analytická chemie, anorganická chemie, biofyzikální chemie, biochemie,  
fyzikální chemie, jaderná chemie, makromolekulární chemie,  
modelování chemických vlastností nano- a biostruktur, organická chemie,  
učitelství chemie pro střední školy jednooborové a dvouoborové,  
klinická a toxikologická analýza.**

Studium bude zahájeno 1. 10. 2007. Podmínkou přijetí je absolvování bakalářského studia. Přihlášky a podrobné informace jsou na adrese: PŘF UK, studijní oddělení, Albertov 6, 128 43 Praha 2, tel. 221 951 162, 221 951 163. Přihlášky se přijímají do 28. 2. 2007.

**Další informace o chemických katedrách na PŘF UK v Praze lze nalézt na  
[www.natur.cuni.cz](http://www.natur.cuni.cz)**