

Oznaczanie testem ELISA poziomu DBP w surowicy klaczy po porodzie*)

JAN P. MADEJ, JACEK BORKOWSKI*, JANUSZ BORATYŃSKI**, WOJCIECH NOWACKI

Zakład Prewencji i Immunologii Weterynaryjnej Katedry i Kliniki Rozrodu, Chorób Przeżuwaczy oraz Ochrony Zdrowia Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

*Katedra Fizjologii i Biochemii AWF, al. Paderewskiego 35, 51-612 Wrocław

**Zakład Onkologii Doświadczalnej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław

Madej J. P., Borkowski J., Boratyński J., Nowacki W.

DBP level in the serum of mares after delivery assessed by ELISA

Summary

The vitamin D-binding protein (DBP), also known as Gc-globulin, plays a role as vitamin D and its metabolites carrier; actin scavenger, a precursor of macrophage activating factor (DBP-MAF), binds fatty acids located on the surface of many cell types and enhances chemotactic activity of C5 and C5a des Arg. In the authors' studies, in order to assess DBP level in mares sera, the ELISA test was developed and standardized. The aim of this study was likewise to compare the level of Gc protein in sera of mares after delivery as compared to non-pregnant mares. The sera derived from 77 full blood mother-mares taken at 36-48 h after delivery, sera of 6 mares that had not taken part in reproduction and sera of 3 geldings the Wielkopolska breed. The authors demonstrated that two days after delivery the DBP concentration in mother-mares sera was significantly higher ($p = 0.001291 < \alpha = 0.05$) than in non-pregnant mares. It was also proved that DBP level in mother-mares sera had no relation to age or number of deliveries.

Keywords: vitamin D-binding protein, DBP, Gc globulin, mare, perinatal period, ELISA

Białko wiążące witaminę D (DBP – vitamin D-binding protein), znane także jako globulina Gc, pełni rolę nośnika witaminy D i jej pochodnych, zmiatacza aktywny, jest prekursorem czynnika aktywacji makrofagów – DBP-MAF (macrophage activating factor), wiąże kwasy tłuszczowe, lokalizuje się na powierzchni wielu komórek oraz wzmacnia aktywność chemotaktyczną składników C5a i C5a des Arg dopełniacza (12, 21, 36, 41).

Poziom surowiczego DBP podlega zmianom zarówno w przebiegu procesów fizjologicznych, jak również podczas dysfunkcji poszczególnych narządów czy układów. Obserwuje się charakterystyczne zmiany poziomu białka Gc w surowicy wykazujące rytm dobowy. Rano obserwowano niskie stężenia surowiczego DBP, po czym jego poziom gwałtownie wzrastał, przechodząc w godzinach przedpołudniowych w fazę plateau, która utrzymywała się do wieczora. Rytm dobowy DBP jest związany z rytmem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oraz z poziomem albumin w surowicy krwi (28). Poziom

surowiczego DBP rośnie podczas ciąży u kobiet i po antykoncepcji (1, 3). Wykazano, że estrogenizacja powoduje wzrost tego parametru nawet o 50% (12, 13). Jego poziom maleje w przebiegu procesów martwiczych (urazy) (7, 8), w chorobach wątroby, np. w piorunującym uszkodzeniu wątroby (fulminant hepatic failure) u ludzi (35), w marskości wątroby (2), w zespole nerczycowym (20, 41), w przebiegu szoku septycznego spowodowanego endotoksynami (20) oraz podczas ograniczenia w diecie białka i energii (32, 36). Wielokierunkowe działanie DBP wskazuje na niezwykłą rolę tego białka w utrzymaniu homeostazy organizmu.

W dostępnym piśmiennictwie istnieją skromne informacje dotyczące białka Gc u koni. Znany jest jego polimorfizm, wykorzystywany na dużą skalę w określaniu ojcostwa u koni oraz zmienności genetycznej danej populacji (6, 26, 27, 34, 38). Większość prac dotyczy jednak cech jakościowych tego białka, bez oznaczania jego poziomu w surowicy czy wydzielinach organizmu. Znajomość poziomu białka wiążącego witaminę D w surowicy koni wydaje się jeszcze bardziej interesująca w świetle badań Breidenbach i wsp. (4), którzy wykazali, że stężenie kalcydiolu i $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w surowicy koni jest znacznie niższe

*) Badania finansowane ze środków na naukę w latach 2006-2007 jako projekt badawczy nr 2P06K 03030 oraz z projektu pt. Drugi program stypendialny dla doktorantów Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Projekt współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Społecznego oraz budżet państwa w ramach Zintegrowanego Programu Operacyjnego Rozwoju Regionalnego.

niż u większości innych ssaków i ptaków, natomiast zdolność DBP do wiązania kalcydiolu nie odbiega znacznie od wartości tych parametrów u innych ssaków. Średnie stężenie kalcytriolu (55 ± 24 pmol/L, $n = 19$) jest u koni również znacznie niższe niż u innych ssaków. Jednocześnie autorzy ci twierdzą, że u tego gatunku, w przeciwieństwie do innych, witamina D wydaje się nie odgrywać głównej roli w utrzymaniu prawidłowego poziomu wapnia i nieorganicznego fosforu.

Brak informacji na temat poziomu DBP w surowicy koni, ze szczególnym uwzględnieniem klaczy w okresie okołoporodowym skłonił autorów do podjęcia badań o tej tematyce. Jednocześnie brak komercyjnych testów mogących posłużyć do oznaczania stężenia białka Gc konia w surowicy spowodował konieczność opracowania do tego celu testu ELISA w oparciu o samodzielnie uzyskane przeciwciała. Informacje wskazujące na wzrost poziomu surowiczego DBP u kobiet w trakcie ciąży zdecydowały o wyborze materiału badawczego ukierunkowanego głównie na ten stan fizjologiczny klaczy.

Celem przedstawionych badań było opracowanie i wystandaryzowanie testu immunoenzymatycznego ELISA służącego do określania poziomu DBP w surowicy koni i porównanie poziomu białka Gc w surowicach klaczy po porodzie oraz nie będących w ciąży.

Materiał i metody

Użyto następujących odczynników: komercyjny preparat DBP człowieka (G-C Globulin) – MP Biomedicals Inc. (Solon, OH, USA), kompletny i niekompletny adiuwant Freund, Cyanogen bromide-activated (CNBr) Sepharose 4B, koniugat ExtrAvidin-HRP, Tween 20, kazeina (z mleka krowiego), ester N-hydroxy-bursztynylowy biotyny, TEMED, siarczan dodecyłu sodu (SDS) – Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), DEAE celuloza typ DE52 – Whatman (Brantford, Wielka Brytania), nitroceluloza (Protran® – BA85 wielkość porów $0,45 \mu\text{m}$) – Schleicher&Schuell Inc. (Keene, USA), płytki do testu ELISA (F96-MaxiSorp) – Nunc GmbH (Wiesbaden, Niemcy), agar noble – Difco (Detroit, Michigan, USA), glicyna, bufor fosforanowy, NaCl, H_2SO_4 , H_2O_2 , o-fenylendiamina, akrylamid, bisakrylamid, tris, metanol oraz pozostałe odczynniki – POCH (Gliwice, Polska).

Krew od klaczy matek pełnej krwi angielskiej w wieku 5-22 lat pobierano rano z żyły szyjnej zewnętrznej (*v. jugularis externa*) w 36-48 h po wyźrebieniu. W sumie zebrano 77 surowice klaczy. Klacze matki przebywały na terenie stajni matek od grudnia roku przed wyźrebieniem do lipca-listopada roku następnego, czyli do momentu odsadzenia źrebiąt. Po tym okresie klacze były przeprowadzane do stajni ogólnych, a po zaźrebieniu wracały do stajni matek. W okresie od kwietnia do października klacze przebywały na pastwisku. Konie były żywione ziarnem owsa i sianem łąkowym, a uzupełnienie diety w okresie zimowym stanowiły: marchew, otręby pszenne oraz kukurydza. W czasie prowadzonych badań klacze były klinicznie zdrowe i pozostawały pod stałą opieką lekarsko-weterynaryjną.

Ponadto pobrano krew od 6 klaczy nie będących w ciąży oraz od 3 wałachów rasy wielkopolskiej w wieku 7-14 lat, których surowice po równoobjętościowym zmieszaniu stanowiły standard w teście ELISA.

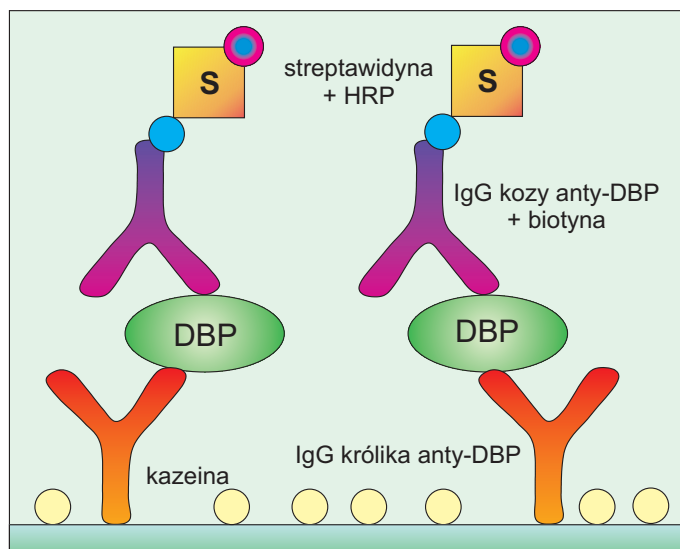
Wykrzepioną w temperaturze pokojowej krew wirowano 10 min., $2000 \times \text{g}$. Uzyskaną klarowną surowicę porcjowano i przechowywano w temp. -20°C . Białko całkowite w surowicach oznaczono metodą biuretową (29).

Celem uzyskania surowic odpornościowych, będących źródłem poliklonalnych przeciwciał anty-DBP człowieka, podjęto hiperimmunizację zwierząt (koza i królik) komercyjnym preparatem DBP człowieka w ilości: u kozy 100 μg /dawkę, u królika 20 μg /dawkę. Na immunizację uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej. Antygen zawieszony w roztworze soli fizjologicznej mieszało w stosunku 1 : 1, odpowiednio, z kompletnym lub niekompletnym adiuwantem Freund. Antygen podawano podskórnie co 2 tygodnie. Miano uzyskiwanych swoistych przeciwciał okresowo sprawdzano przy użyciu testu podwójnej immunodyfuzji (ID). Króliki skrwawiano po uzyskaniu w tym teście miana surowicy 1 : 64.

Obecność w uzyskanej surowicy przeciwciał anty-DBP człowieka oraz ich reaktywność krzyżową z surowicą konia wykazano metodą podwójnej immunodyfuzji (ID) oraz za pomocą western-blottingu. Test immunodyfuzji podwójnej przeprowadzono w żelu agarowym o stężeniu 1,2% w buforze weronalowym pH 8,2 na szkiełkach podstawowych (11). Stosując metodę SDS-PAGE wybrane antygeny rozdzielano w 7,5% żelu poliakrylamidowym buforowanym Tris-HCl, z buforem elektrodowym Tris-glicyna. Rozdzielone w polu elektrycznym białka przenoszono na błonę nitrocelulozową metodą półsuchą w komorze graficznej von Keutz (Reiskirchen, Niemcy) (18).

Poliklonalne monowalentne przeciwciała klasy IgG anty-DBP człowieka uzyskano z surowic immunizowanych zwierząt wysalaniem siarczanem amonu (37) oraz na kolumnie powinowactwa z immobilizowanym białkiem Gc człowieka. Złoże do kolumny stanowiła agarozą aktywowana bromocjanem, a procedurę wiązania ligandu (DBP) wykonano zgodnie z instrukcją zalecaną przez producenta (Sigma-Aldrich). W chromatografii powinowactwa IgG były wiązane do żelu zrównoważonego PBS, a następnie kolumna była płukana roztworami o wysokiej i niskiej sile jonowej. Immunoglobuliny o powinowactwie do białka Gc eluowano buforem glicyna-HCl o pH 2,2 a następnie dializowano do 0,05 M buforu węglanowego pH 8,5. Swoiste przeciwciała kozie poddano następnie wiązaniu z estrem N-hydroxy-bursztynylowym biotyny.

Poziom DBP w badanych surowicach oznaczano testem ELISA, wykorzystując reakcję krzyżową przeciwciał IgG anty-DBP człowieka z białkiem Gc konia (ryc. 1). Dołki wypełniano 100 μl roztworu króliczych poliklonalnych monowalentnych przeciwciał IgG anty-DBP człowieka o stężeniu $2,2 \times 10^{-3}$ g/L w 0,1 M buforze węglanowym, pH 9,6. Płytki inkubowano przez noc w temp. 4°C . Po każdym z poniższych etapów dołki trzykrotnie płukano buforem PBS o pH 7,4 z dodatkiem 0,1% Tween 20. Nieopłaszczony miejsca na płycie blokowano 0,1% roztworem kazeiny w buforze węglanowym, pH 9,6 w ilości 200 μl /dołek. Blokowanie przeprowadzano łagodnie mieszając zawartość



Ryc. 1. Schemat wykrywania DBP w surowicy konia testem ELISA

dołków na kołysce laboratoryjnej 1 h w temp. 37°C. Badane surowice rozcieńczano 1 : 20 000 w roztworze 0,1% kazeiny w PBS. Ze względu na niedostępność do badań czystego DBP konia, standard stanowiła pula surowic koni rozcieńczana 1 : 10 000, 1 : 20 000 i 1 : 40 000. Antygen nakładano w ilości 100 µl/dołek i inkubowano na kołysce 1 h w temp. 37°C. W kolejnym etapie nakładano biotynylowane kozie przeciwciała klasy IgG anty-DBP człowieka w ilości 100 µl/dołek. Przeciwciała rozcieńczano w 0,1% roztworze kazeiny w PBS i inkubowano na kołysce 1 h w temp. 37°C. Po odpłukaniu na płytce nakładano streptawidynę skoniugowaną z peroksydazą chrzanową w zalecanym przez producenta rozcieńczeniu 1 : 1000 w ilości 100 µl/dołek. Inkubowano na kołysce 1 h w temp. 37°C. Jako substratu użyto o-fenilenodiaminy rozpuszczonej w ilości 5 mg/10 ml w 0,05 M buforze cytrynianowym, pH 5,0, do której tuż przed nałożeniem na płytke w ilości 100 µl/dołek, dodawano 10 µl 30% H₂O₂. Reakcję barwną przerywano po 5 min. 1 M kwasem siarkowym w ilości 100 µl/dołek. Pomiaru absorbancji dokonywano na czytniku płytek ELISA BioTek EL340 (Winooski, Vermont, USA) przy długości fali λ 490 nm. Do sterowania czytnikiem i wstępnego opracowania danych użyto programu KC3 firmy BioTek Instruments.

Podjęto szereg prób izolacji białka Gc konia w oparciu o tworzenie precypitujących kompleksów immunologicznych – przeciwciała anty-DBP człowieka : DBP konia. Metodą tą nie udało się jednak uzyskać w pełni oczyszczonego białka. Technika otrzymywania końskiego DBP na kolumnie powinowactwa z poliklonalnymi IgG anty-DBP człowieka okazała się zbyt mało wydajna. Chromatografia powinowactwa na immobilizowanej aktynie (14) również nie dała zadowalających rezultatów. W związku z tym jako standardu użyto puli surowic, powstałej z połączenia równych objętości próbek surowicy uzyskanych od dziewięciu zdrowych koni. W puli tej wykazano obecność obu izotypów DBP występujących u tych zwierząt. Ze względu na brak możliwości wyrażenia otrzymanych wyników w jednostkach układu SI, wprowadzono własną tzw. jednostkę

końską (EqU – equus unit), gdzie: 1 EqU = ilość DBP w 1 × 10⁻¹⁰ L puli surowic koni.

Uzyskane wyniki poziomu DBP wyrażone w EqU/L podzielono przez stężenie białka całkowitego (BC) w gramach na litr (g/L), uzyskując współczynnik DBP/BC w (EqU/g). W obliczeniach statystycznych posługiwano się tym współczynnikiem.

Wyniki otrzymane w teście ELISA poddano analizie statystycznej przy pomocy programu Statistica 7.1. Ponieważ badane zmienne nie miały rozkładów normalnych, istotności różnic uzyskanych wyników zostały oszacowane za pomocą testów nieparametrycznych (w przypadku zmiennych zależnych – test rangowanych znaków Wilcozona, w przypadku zmiennych niezależnych – test U Manna-Whitneya oraz Kruskala-Wallis).

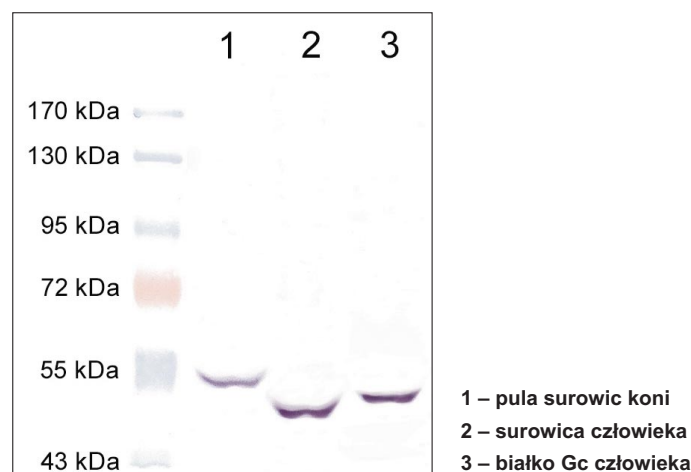
Poszukując odpowiedzi na pytanie, czy przebyta ciąża i poród ma wpływ na poziom surowiczego DBP u klaczy, za pomocą testu U Manna-Whitneya porównywano istotność różnic pomiędzy stężeniem tego białka w surowicy klaczy matek (36–48 h po porodzie) i klaczy nie biorących udziału w rozrodzie (ryc. 3).

Badano również, czy poziom DBP w surowicy matki zmienia się z wiekiem (ryc. 4). Z uwagi na niską liczebność, dla celów obliczeń statystycznych, populację klaczy matek podzielono na 4 grupy wiekowe. Istotność różnic oszacowano za pomocą testu Kruskala-Wallis.

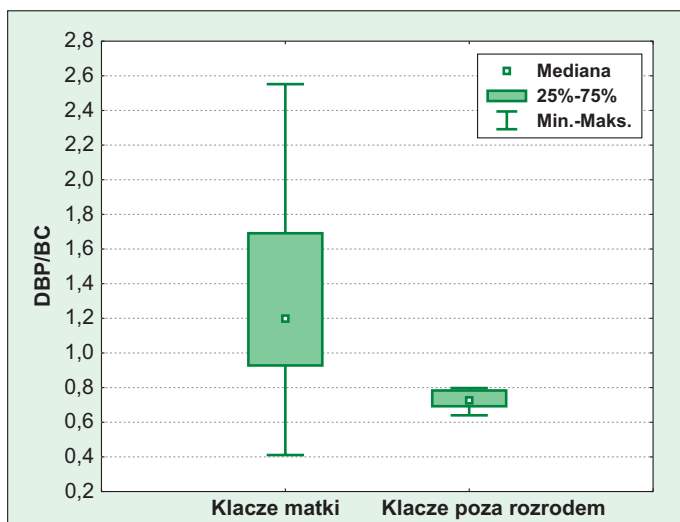
Analizowano, jak zmienia się poziom DBP w surowicy klaczy matek wraz z liczbą porodów. Istotność różnic oszacowano za pomocą testu Kruskala-Wallis.

Wyniki i omówienie

W wyniku hiperimmunizacji zwierząt uzyskano surowice zawierające przeciwciała anty-DBP człowieka. Miana tych surowic oznaczone w teście immunodyfuzji podwójnej wynosiły: dla surowicy króliczej 1 : 64, a dla surowicy koziej 1 : 8. Metodą SDS-PAGE wraz z western-blottingiem wykazano, że uzyskana we własnym zakresie poliklonalna surowica anty-DBP człowieka reaguje krzyżowo z białkiem surowicy konia o zbliżonej ruchliwości elektroforetycznej do białka Gc człowieka (ryc. 2).



Ryc. 2. Obraz western-blottingu surowicy konia i człowieka oraz białka Gc człowieka



Ryc. 3. Poziom DBP w surowicy klaczy-matek i klaczy nie biorących udziału w rozrodzie

Poziom DBP w surowicy został wyrażony w 1×10^{10} EqU/L lub jako stosunek DBP/BC w 1×10^{10} EqU/g.

Wykazano, że poziom DBP w surowicy klaczy matek oraz klaczy nie biorących udziału w rozrodzie różni się istotnie ($p = 0,001291 < \alpha = 0,05$; n matek = 77, n klaczy = 6) (ryc. 3).

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w poziomie surowiczego DBP klaczy matek pomiędzy poszczególnymi grupami wiekowymi ($p = 0,59 > \alpha = 0,05$; $n = 70$) (ryc. 4).

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w poziomie surowiczego DBP klaczy matek w zależności od ilości porodów ($p = 0,75 > \alpha = 0,05$; $n = 71$).

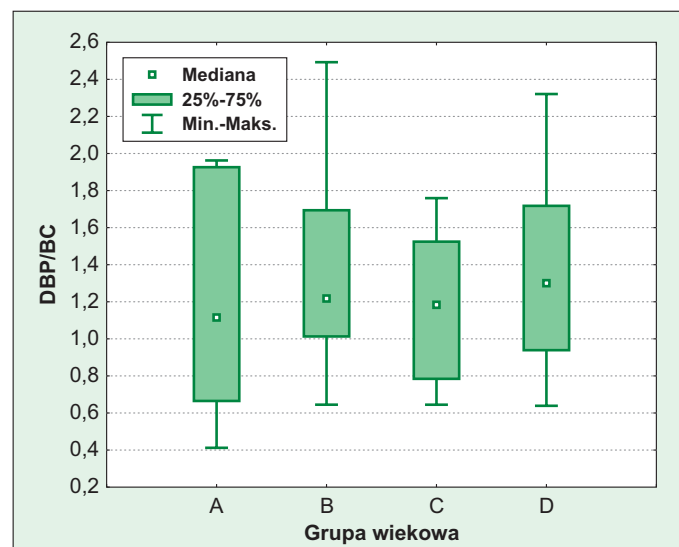
Białko Gc jest filogenetycznie konserwatywne, o czym świadczy badane u wielu gatunków duże podobieństwo w sekwencji aminokwasowej. Badania prowadzone przez Yang i wsp. (43) dotyczące podobieństwa genu dla białka Gc wykazały, że wydedukowana na podstawie sekwencji nukleotydów homologia kwasów nukleinowych w układzie mysz–człowiek wynosi 78%, a mysz–szczur aż 91%. Znana jest również reaktywność krzyżowa przeciwciał anty-DBP człowieka z surowicami różnych gatunków zwierząt (24, 31). W badaniach własnych (22) przy użyciu testu immunodifuzji podwójnej oraz SDS-PAGE stwierdzono szereg reakcji krzyżowych pomiędzy przeciwciałami anty-DBP człowieka a białkiem Gc obecnym w surowicy różnych gatunków ssaków, w tym u koni. Fakt ten wykorzystano przygotowując test ELISA.

Z dostępnego piśmiennictwa (5) wynika, że tylko około 5% surowiczego białka Gc u ludzi bierze udział w transporcie witaminy D i jej metabolitów. Tak znaczna ilość wolnego DBP w surowicy krwi może stanowić swego rodzaju zabezpieczenie organizmu w sytuacji, kiedy dochodzi do gwałtownego uwalniania aktywny w procesach rozpadowych o różnej etiologii (7, 8).

Dostępne piśmiennictwo podaje szereg testów służących do ilościowego oznaczania DBP: test ELISA (16, 19), turbidymetria (15), immunoelektroforeza rakietkowa (9), test radialnej immunodifuzji (RID) (30, 31), nefelometria. W badaniach własnych zdecydowano się zastosować test ELISA opracowany w oparciu o reakcję krzyżową Gc konia z uzyskanymi poliklonalnymi przeciwciałami anty-DBP człowieka. Wiarygodność swoistości reakcji krzyżowej potwierdzono przy zastosowaniu natywnej oraz denaturacyjnej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (PAGE i SDS-PAGE) połączonych z western blottingiem. W SDS-PAGE wykazano (ryc. 2), że uzyskane we własnym zakresie przeciwciała swoście reagują z końskim białkiem o masie ok. 54 kD i ruchliwości elektroforetycznej zbliżonej do komercyjnej formy białka Gc człowieka. Przy zastosowaniu PAGE (materiał przygotowywany do publikacji) wykazano w puli surowic koni obecność obu opisywanych izoform (F i S) DBP (10, 17, 33, 40).

Źródłem zastosowanych w western blottingu przeciwciał swoście wykrywających antygen była królicza surowica anty-DBP człowieka. Reakcja krzyżowa pomiędzy zastosowanymi przeciwciałami i DBP konia umożliwiła wyznakowanie wszystkich znanych izoform DBP w surowicy konia. Można zatem przyjąć, iż test ELISA z zastosowaniem tych przeciwciał, jest dobrym narzędziem do wykrywania białka Gc u tego gatunku.

W teście ELISA wykorzystano poliklonalne monowalentne przeciwciała klasy IgG anty-DBP człowie-



Ryc. 4. Poziom DBP w surowicy klaczy matek w zależności od wieku

ka. Są to przeciwciała swoiste tylko wobec białka Gc wyprodukowane przez wiele klonów komórek plazmatycznych. Przeważającą klasę przeciwciał produkowanych w odpowiedzi wtórnej na antygen stanowią IgG, stąd wysalaniem siarczanem amonu pozyskiwano właśnie te immunoglobuliny. Mając świadomość, że pełna surowica odpornościowa zawiera ograniczoną ilość swoistych przeciwciał oraz może wykazywać niepożądane oddziaływania z badanym materiałem, zdecydowano się na uzyskanie wysokooczyszczonych przeciwciał anty-DBP człowieka metodą chromatografii powinowactwa na immobilizowanym białku Gc człowieka. Otrzymano czyste przeciwciała IgG swoście wykrywające DBP człowieka. Zastosowanie takich przeciwciał daje widoczną reakcję krzyżową z DBP konia. Wykorzystanie biotynylowanych kozich przeciwciał anty-DBP człowieka, zwiększyło czułość testu i ograniczyło wpływ oddziaływań nieswoistych (poziom tła).

Jednym z parametrów monitorowania stanu zdrowia matek był pomiar stężenia białka całkowitego (BC). Za wartość referencyjną tego parametru u dorosłych koni przyjmuje się 60-78 g/L (42), 66-82 g/L (23), 57-77 g/L (25). W badaniach własnych poziom białka całkowitego w surowicach klaczy matek wynosił $67,5 \pm 7,63$ g/L, natomiast u klaczy nie uczestniczących w rozrodzie $71,53 \pm 3,95$ g/L. Dane wyrażone w EqU/L mogą być obciążone błędem wynikającym z różnego stężenia BC w badanych próbkach. Celem ich zunifikowania zdecydowano się wyrazić je jako stosunek DBP/BC wyrażony w (EqU/g). Takie podejście sprawia, że określone stężenie DBP wyraża jego ilość w puli białka całkowitego, eliminując błąd wynikający z różnic poziomu BC u poszczególnych osobników. Uzyskujemy zatem informację, jak zmienił się poziom białka Gc w stosunku do pozostałych białek surowicy krwi. Interpretując wyniki w oparciu o współczynnik DBP/BC należy mieć na uwadze, że w przypadku hiperproteinemii otrzymamy wyniki заниżone, natomiast podczas hipoproteinemii – zawyżone. W badaniach własnych wymienione ograniczenia nie miały znaczącego wpływu na wyniki, ponieważ wszystkie konie biorące udział w doświadczeniu miały poziom BC odpowiadający normom.

W niniejszym opracowaniu starano się odpowiedzieć na pytanie, czy poziom białka Gc w surowicy klaczy po porodzie różni się od wartości tego parametru u klaczy nie będących w ciąży ani w okresie okołoporodowym. Analiza statystyczna zebranych wyników wykazała, że poziom DBP w surowicach klaczy-matek pobieranych 36-48 h po porodzie był istotnie wyższy niż u klaczy nieżrebných. Obserwowano zatem wyraźny wpływ ciąży i porodu na stężenie białka Gc w surowicy klaczy. Wyniki te są zgodne z piśmiennictwem, gdzie stwierdzono, że u kobiet poziom DBP w surowicy rośnie podczas ciąży (1, 20, 41).

Krew klaczy matek była pobierana w 36-48 h po wyżrebieniu, stąd oznaczany poziom DBP wynika

z wyjątkowego stanu fizjologicznego. Także u kobiet w ciąży stwierdzono wzrost poziomu białka Gc we krwi. Bouillon i wsp. (3) wykazali, że poziom DBP w surowicy wzrasta z 333 ± 58 mg/L do 488 ± 90 mg/L u kobiet przyjmujących estro-progestageny jako środki antykoncepcyjne. Ponadto stwierdzili, że pod koniec ciąży stężenie surowiczego DBP (616 ± 84 mg/L) było znacząco wyższe niż u kobiet nie będących w ciąży (266 ± 41 mg/L). Według Bikle i wsp. (1) u kobiet w ciąży średni poziom DBP (576 ± 128 µg/dl) jest znacząco wyższy niż u kobiet nie będących w ciąży ($p < 0,001$). Wyniki badań własnych również wskazują na wpływ okresu okołoporodowego na poziom białka Gc u koni. Analiza statystyczna wykazała, że poziom surowiczego DBP u klaczy matek jest znacząco wyższy niż u klaczy nie uczestniczących w rozrodzie (ryc. 3).

Wykazano, że stężenie białka Gc w surowicy klaczy matki utrzymuje się na stałym poziomie w przedziale wiekowym od 5 do 22 lat (ryc. 4). Wynik ten jest zgodny z badaniami dotyczącymi globuliny Gc u ludzi, które wskazują, że stężenie DBP u osób w podeszłym wieku nie różni się od tego u młodych dorosłych (39).

Z przeprowadzonych badań wynika również, że poziom DBP w surowicy klaczy matek nie zmienia się wraz z ilością porodów, co jest logicznym uzupełnieniem poprzednich obserwacji.

Podsumowanie

W badaniach własnych wykazano, że test ELISA przygotowany w oparciu o reakcję krzyżową poliklonalnych przeciwciał IgG anty-DBP człowieka z białkiem Gc konia, jest dobrą metodą do określania poziomu tego białka w surowicy krwi koni. Przeprowadzone badania wskazują, że w okresie okołoporodowym poziom DBP w surowicy klaczy matek jest istotnie wyższy niż u klaczy nie biorących udziału w rozrodzie. Poczynione obserwacje wydają się potwierdzać wpływ zmienionej regulacji hormonalnej w organizmie klaczy w okresie perinatalnym na poziom białka DBP w surowicy. Wykazano również, że poziom DBP w surowicy klaczy matki nie zmienia się wraz z wiekiem oraz liczbą porodów.

Piśmiennictwo

1. Bikle D. D., Gee E., Halloran B., Haddad J. G.: Free 1,25-dihydroxyvitamin D levels in serum from normal subjects, pregnant subjects, and subjects with liver disease. *J. Clin. Invest.* 1984, 74, 1966-1971.
2. Bouillon R., Auwerx J., Dekeyser L., Fevery J., Lissens W., De-Moor P.: Serum vitamin D metabolites and their binding protein in patients with liver cirrhosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1984, 59, 86-89.
3. Bouillon R., Van Assche F. A., Van Baelen H., Heyns W., De Moor P.: Influence of the vitamin D-binding protein on the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D3. Significance of the free 1,25-dihydroxyvitamin D3 concentration. *J. Clin. Invest.* 1981, 67, 589-596.
4. Breidenbach A., Schlumbohm Ch., Harmeyer J.: Peculiarities of vitamin D and of the calcium and phosphate homeostatic system in horses. *Vet. Res.* 1998, 29, 173-186.
5. Cooke N. E., Haddad J. G.: Vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Endocrinol. Rev.* 1989, 10, 294-307.

6. Cooke N. E., McLeod J. F., Wang X., Ray K.: Vitamin D binding protein: genomic structure, functional domains, and mRNA expression in tissues. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 1991, 40, 787-793.
7. Dahl B., Schiødt F. V., Kiaer T., Ott P., Bondesen S., Tygstrup N.: Serum Gc-globulin in the early course of multiple trauma. *Crit. Care. Med.* 1998, 26, 285-289.
8. Dahl B., Schiødt F. V., Rudolph S., Ott P., Kiaer T., Heslet L.: Trauma stimulates the synthesis of Gc-globulin. *Intensive Care Med.* 2001, 27, 394-399.
9. Dahl B., Schiødt F. V., Nielsen M., Kiaer T., Williams J. G., Ott P.: Admission level of Gc-globulin predicts outcome after multiple trauma. *Injury* 1999, 30, 275-281.
10. Gahne B., Juneja K.: Polymorphic post-albumin of cattle and horse plasma identified as vitamin D binding protein (Gc protein). *Anim. Blood Grps Biochem. Genet.* 1978, 9, 37-40.
11. Goldschmidt-Clermont P. J., Galbraith R. M., Emerson D. L., Marsot F., Nel A. E., Arnaud P.: Distinct sites on the G-actin molecule bind group-specific component and deoxyribonuclease I. *Biochem. J.* 1985, 228, 471-477.
12. Gomme P. T., Bertolini J.: Therapeutic potential of vitamin D-binding protein. *Trends Biotechnol.* 2004, 22, 340-345.
13. Haddad J. G.: Plasma vitamin D-binding protein (Gc-globulin): multiple tasks. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 1995, 53, 579-582.
14. Haddad J. G., Kowalski M. A., Sanger J. W.: Actin affinity chromatography in the purification of human, avian and other mammalian plasma proteins binding vitamin D and its metabolites (Gc globulins). *Biochem. J.* 1984, 218, 805-810.
15. Hamashima Y., Kanazawa T., Hirata A., Yamai Y., Fujihara H., Sekine K., Nagao K.: Measurement of vitamin D-binding protein in pleural fluids and sera by means of a turbidimetric immunoassay measuring system. *Clin. Chem. Acta* 2002, 321, 23-28.
16. Jorgensen C. S., Christiansen M., Norgaard-Pedersen B., Ostergaard E., Schiødt F. V., Laursen I., Houen G.: Gc globulin (vitamin D-binding protein) levels: an inhibition ELISA assay for determination of the total concentration of Gc globulin in plasma and serum. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2004, 64, 157-166.
17. Juneja R. K., Gahne B., Sandberg K.: Genetic polymorphism of the vitamin D binding protein and another post-albumin protein in horse serum. *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.* 1978, 9, 29-36.
18. Laemmli U. K.: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227, 680-685.
19. Lauridsen A. L., Aarup M., Christensen A. L., Jespersen B., Brixen K., Nexø E.: Sensitive automated ELISA for measurement of vitamin D-binding protein (Gc) in human urine. *Clin. Chem.* 2005, 51, 1016-1018.
20. Lee W., Galbraith R.: The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity. *N. Engl. J. Med.* 1992, 326, 1335-1341.
21. Madej J. P., Boratyński J., Nowacki W.: Budowa i rola DBP (Vitamin D-Binding Protein) w stanach fizjologii i patologii u zwierząt i ludzi. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 987-991.
22. Madej J. P., Boratyński J., Nowacki W.: Similarity of Vitamin D-Binding Protein (DBP) between Various Animal Species in Double Immunodiffusion and Western Blotting. *EJPAU* 2007, 10 (3).
23. Mollereau H., Porcher Ch., Nicolas E.: Vade-mecum du vétérinaire. Editions Vigot, Paris 1978.
24. Ogata M., Nakasono I., Iwasaki M., Kubo S., Suyama H.: Comparative immunological and electrophoretic analysis of Gc protein in sera from various animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 1988, 90, 193-199.
25. Parraga M. E., Carlson G. P., Thurmond M.: Serum protein concentration in horses with severe liver disease: a retrospective study and review of the literature. *J. Vet. Intern. Med.* 1995, 9, 154-161.
26. Pikula R., Tomaszewska-Guszkiewicz K., Smugała M., Gronet D.: Porównanie genetycznego polimorfizmu białek krwi ogierów różnych ras koni. *Zesz. Nauk. AR Szczecin* 1997, 177, 163-171.
27. Pikula R., Tomaszewska-Guszkiewicz K., Smugała M., Stępień J.: The use of blood protein polymorphism for determining the genetic distance between half-bred stallions. *Anim. Sci. Papers Rep.* 1997, 15, 5-14.
28. Rejnmark L., Lauridsen A. L., Vestergaard P., Heickendorff L., Andreasen F., Mosekilde L.: Diurnal rhythm of plasma 1,25-dihydroxyvitamin D and vitamin D-binding protein in postmenopausal women: relationship to plasma parathyroid hormone and calcium and phosphate metabolism. *Eur. J. Endocrinol.* 2002, 146, 635-642.
29. Richterich R.: Chemia kliniczna. PZWL, Warszawa 1971.
30. Rząsa A., Lawin A.: Globulina Gc – nowy wskaźnik w monitorowaniu zdrowia świń. *Zesz. Nauk. Przegl. Hod.* 2004, 72, 285-293.
31. Rząsa A., Nowacki W., Stefaniak T., Nikolajczuk M.: Globulina Gc u świń. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 193-195.
32. Safadi F. F., Thornton P., Magiera H., Hollis B. W., Gentile M., Haddad J. G., Liebhaber S. A., Cooke N. E.: Osteopathy and resistance to vitamin D toxicity in mice null for vitamin D binding protein. *J. Clin. Invest.* 1999, 103, 239-251.
33. Sandberg K., Juneja K.: Close linkage between the albumin and Gc loci in the horse. *Anim. Blood Grps Biochem. Genet.* 1978, 9, 169-173.
34. Sasimowski E., Nogaj A., Kolstrung R., Pietrzak S., Nogaj J.: Polimorfizm niektórych białek osocza w populacji kuców felińskich. *Rocz. Nauk. Zoot.* 2000, 27, 31-41.
35. Schiødt F. V., Ott P., Bondesen S., Tygstrup N.: Reduced serum Gc-globulin concentrations in patients with fulminant hepatic failure: association with multiple organ failure. *Crit. Care Med.* 1997, 25, 1366-1370.
36. Speeckaert M., Huang G., Delanghe J. R., Taes Y.: Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. *Clin. Chim. Acta.* 2006, 372, 33-42.
37. Ślopek S. (red.): Immunologia praktyczna. PZWL, Warszawa 1970.
38. Tomaszewska-Guszkiewicz K., Smugała M., Pikula R.: Polymorphism of Gc and Pa systems and occurrence of haplotypes Al and Gc loci in polish ponies („Tarpan horses”). *Adv. Agr. Sci.* 1994, 3, 45-48.
39. Toss G., Soerbo B.: D-binding protein concentration in serum: Relations to age, sex, malnutrition, inflammation and 25-OH-D levels. *Proc 6. Workshop on Vitamin D. Merano (Italy), 17-22.03.1985.*
40. Weghe A. Van de, Van Zeven A., Bouquet Y.: The vitamin D binding protein in domestic animals. *Comp. Biochem. Physiol. B* 1982, 73, 977-982.
41. White P., Cooke N.: The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein. *Trends Endocrinol. Metab.* 2000, 11, 320-327.
42. Winnicka A.: Wartości referencyjne podstawowych badań laboratoryjnych. Wyd. SGGW, Warszawa 2002.
43. Yang F., Bergeron J. M., Linehan L. A., Lalley P. A., Sakaguchi A. Y., Bowman B. H.: Mapping and conservation of the group-specific component gene in mouse. *Genomics* 1990, 7, 509-516.

Adres autora: lek. wet. Jan P. Madej, ul. S. Jaracza 69/31, 50-305 Wrocław; e-mail: jan_madej@interia.pl