

# Fatty acid-binding protein as plasma marker for tissue injury

## Citation for published version (APA):

Pelsers, M. M. A. L. (2004). *Fatty acid-binding protein as plasma marker for tissue injury*. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20040623mp>

## Document status and date:

Published: 01/01/2004

## DOI:

[10.26481/dis.20040623mp](https://doi.org/10.26481/dis.20040623mp)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

---

## Summary

Reduction of patient morbidity and mortality, but also of hospital costs, are major goals in human health care research. A proper and rapid diagnosis of the status of the patient, either by the general practitioner or at the hospital, is therefore crucial. Besides anamnesis and medical history, blood parameters are becoming more and more important to properly diagnose the status of the patient. Especially in the case of management of patients with acute tissue injury, these so-called biochemical markers have become important diagnostic and prognostic parameters. Because of the general finding that 'time saves tissue', the sooner tissue injury is detected, the better patient treatment can be implemented and the more tissue can be saved. The routine application of biochemical markers eventually will lead to a reduction in morbidity and mortality, and also to a reduction in hospital costs as patients with non-disease-specific symptoms can be sent home safely.

One of the promising new markers for tissue injury detection is cytoplasmic fatty acid-binding protein (FABP). This small (15 kD) protein is involved in cellular long-chain fatty acid metabolism and is abundantly expressed in tissues with an active fatty acid metabolism like heart and liver. After cell damage, cellular proteins are released into the interstitium and will diffuse through endothelial clefts into the circulation. Because these clefts differ in size, small cytoplasmic proteins like FABP diffuse more rapidly through the clefts and appear earlier in the blood than large proteins.

This thesis describes the use of different types of cytoplasmic FABP for the detection of tissue injury in patients with myocardial injury, chronic heart failure, unstable angina, skeletal muscle injury, kidney toxicity and transplantation, liver transplantation, intestinal injury and brain injury, as is briefly outlined in [Chapter 1](#).

In [Chapter 2](#), a general review is presented on the current status of different FABP types, in comparison with established blood markers, for the detection of several organ related tissue injuries. Assay development, point-of-care testing and clinical studies are evaluated. Especially in the field of myocardial injury it is shown that heart-type FABP (H-FABP) is the superior marker for the sensitive and early detection of acute myocardial injury (AMI). Within 6 h after onset of symptoms, H-FABP shows a significantly higher specificity and sensitivity than the currently used early marker myoglobin (Mb). Because cardiac troponins T and I are specific but rather late markers for detection of AMI, H-FABP as early marker and cTnT or cTnI as late marker would be the ideal combination to cover the complete diagnostic window for AMI. A new approach to detect myocardial injury more rapidly is to increase the frequency of blood sampling by measuring H-FABP both in the admission sample and 1 h after admission. Several studies showed that the rise in H-FABP plasma concentration, even below clinical reference value, already indicates the progression of an AMI. This sensitive detection of myocardial injury by H-FABP may also be applied in patients with unstable angina and chronic heart failure and here H-FABP outperforms troponin due to its high tissue content and low normal value.

In [Chapter 3](#) the development of a rapid and sensitive immunoassay for human H-FABP is described. This assay is based on the use of high affinity monoclonal capture and detector antibodies (mAbs) recognizing different epitope groups on the protein molecule.

The simultaneous incubation of the tissue/plasma/serum sample with the (immobilized) capture antibody and the (conjugated) detector antibody, allowed a total performance time of only 45 min. The low intra- and inter-assay variation and detection limit of the assay permit an accurate determination of H-FABP in healthy individuals as well as the detection of micro-necrosis in patients with unstable angina or heart failure (see below). The measuring range (at 25-fold dilution) of up to 300 µg/L includes >90% of reported H-FABP concentrations in AMI. As a result, the immunoassay is excellently suitable for determination of H-FABP in blood from patients entering the coronary care unit of the hospital for the early assessment or exclusion of myocardial injury.

Because fatty acid metabolism is an important subject of research, [Chapter 4](#), evaluates the applicability of the human H-FABP ELISA in different animal studies. Cross-reactivity of the selected mAbs was measured with recombinant and purified H-FABPs from different species. The assay was then applied in tissue and plasma samples to study either fatty acid metabolism or the use of H-FABP as diagnostic marker for heart and skeletal muscle injury. The mAbs recognize H-FABP in most species tested, with the exception of duck, woodpigeon and chicken. Cross-reactivity compared to purified human H-FABP ranged from 5% to 66% among horse, dog, cattle, mouse, rat and goose. Variations in H-FABP tissue content, due to changes in fatty acid metabolism, were induced by development, hibernation, extensive flight, and streptozotocin induced diabetes. Diagnostic use of H-FABP as plasma marker was shown for skeletal muscle injury in racehorses and for detection of experimental myocardial injury in mice.

From these studies it can be concluded that H-FABP is a well-conserved protein during evolution and the newly developed immunoassay for human H-FABP can be applied for several animal model systems, because cross-reactivity of the monoclonal anti-human H-FABP antibodies in different species is rather high.

In order to investigate the clinical application of a new biochemical marker, first a reference range and a reference value (also termed cut-off value or upper reference limit) need to be established so as to properly compare different studies and interpret clinical data. In [Chapter 5](#), the influence of age, sex and biological variation on normal plasma H-FABP and Mb concentrations in healthy individuals is extensively evaluated.

Median plasma concentrations of H-FABP and Mb were significantly lower in women than in men, but showed an increase during aging. This effect of aging was more prominent in the plasma concentration of H-FABP than that of Mb. For the within-day biological variation, a significant increase was seen in H-FABP plasma concentration during the night. This effect was due to a decreased nocturnal glomerular filtration rate. The same trend was seen for Mb but this did not reach statistical significance. Time of day, age and sex do influence the reference value of both H-FABP and Mb. From these data, we suggest an upper reference value of 6 µg/L for H-FABP and 60 µg/L for Mb.

In [Chapter 6](#) we compared the sensitivity, specificity and prognostic value of H-FABP and cTnT for minor myocardial injury during CHF and UAP.

Admission plasma samples were obtained from 62 patients with CHF and 23 patients with UAP. According to plasma concentrations of H-FABP and cTnT, patients were subdivided into four groups. In CHF, plasma cTnT was elevated in 28 patients, while plasma H-FABP was elevated in 42 patients. Interestingly, only 3 patients had a normal H-FABP level together with an elevated cTnT level, while 17 patients showed

---

increased plasma H-FABP, despite a normal plasma cTnT concentration. These 17 patients (29%) would normally not be treated as having myocardial injury. This finding was confirmed in the group with UAP, where 6 patients (26%) had elevated H-FABP levels with normal cTnT levels. Kidney function did not influence the relative differences between H-FABP and cTnT for detection of myocardial injury.

When we compared the prognostic value of both markers for the prediction of recurrent cardiac events within 90 days, H-FABP had a significantly better negative predictive value than cTnT. Patients with plasma H-FABP concentration below the reference value had 19% chance of a recurrent cardiac event, while patients with a plasma cTnT below the reference value had a 43% chance of a recurrent cardiac event. Taken together, in this chapter we show that (i) minor myocardial cell necrosis is detectable in a significant proportion of patients with CHF, (ii) H-FABP is a more sensitive marker for detection of minor myocardial injury than cTnT, (iii) H-FABP is a significantly better prognostic marker than cTnT.

H-FABP is also expressed, although to a lower extent, in skeletal muscle. In [Chapter 7](#), we evaluated H-FABP, Mb and creatine kinase (CK) as plasma marker for the early detection of exercise induced skeletal muscle injury after 20 min of downhill running, which is known to induce eccentric muscle injury. Mb and H-FABP concentrations were already significantly elevated at 30 min, but CK not until 2 h after exercise. Whereas plasma Mb and H-FABP decreased to normal levels within 24 h, CK activity remained elevated for 48 h. The Mb over H-FABP ratio in plasma after exercise was 15, which excludes H-FABP release from myocardial injury. In this chapter we show that both H-FABP and Mb are more useful than CK for the early detection and monitoring of injury during repeated exercise bouts. In addition, the Mb over H-FABP ratio in the plasma identifies the type of muscle injured.

Continuing further exploring the application of H-FABP as tissue injury marker, we turned to the field of kidney injury by evaluating (i) nephrotoxicity and (ii) ischemic injury of non-heart-beating donor (NHBD) kidneys.

In [Chapter 8](#), kidney injury is evaluated in rats, induced either by administration of mercuric chloride, cyclosporin or gentamicin. Histopathology and urine marker concentrations clearly indicate that mercuric chloride induced a broad nephrotoxic effect, while cyclosporin induced a modest damage primarily to the ascending and distal tubules.

Gentamicin administration induced relatively the most severe injury as indicated by significantly elevated urinary levels of LDH, total protein, H-FABP and GST. Damage to the proximal convoluted tubules was shown by significantly elevated urinary levels of  $\alpha$ -GST. Other more distal regions of the nephron were also affected as shown by severely elevated levels of H-FABP and  $\mu$  GST.

This chapter shows that the patterns of urinary markers are different for the three nephrotoxins used in this study and that these patterns appear to reflect the location and degree of injury. Both plasma and urinary H-FABP levels are suitable markers for detection of kidney distal tubular injury. In future studies, next to H-FABP, it would be of interest to study L-FABP as marker for detection of injury to the proximal kidney tubules because this protein is located in the proximal tubular cells.

In [Chapter 9](#), we studied the use of H-FABP as viability marker for ischemic injured NHBD kidneys. Alanine amino-peptidase (Ala-AP) and H-FABP were investigated as

alternative biochemical tissue injury markers to total GST activity (tGST) in tissue perfusate samples from 74 kidneys from controlled (intensive care department; withdrawal of treatment) and uncontrolled (accident and emergency department) NHBDs. During perfusion, a parallel response was seen for each of the three markers in the perfusates of controlled and uncontrolled NHBD kidneys over the 4-h perfusion period. The levels of all markers were significantly higher in uncontrolled versus controlled donors and in discarded versus transplanted kidneys. Unfortunately, no correlation was found between pre-transplant biomarker concentrations and long-term renal function, as determined by creatinine clearance rate.

In this chapter we show that tGST, Ala-AP and H-FABP represent comparable pre-transplant indicators of immediate kidney viability and short-term kidney-function, with H-FABP tending to be the most sensitive marker. Although the biomarkers do not predict the efficacy of renal function in the longer term, the use for short-term screening of kidney function does lead to a survival rate of NHBD kidneys which is sufficient to serve as an important source to match the increasing waiting lists.

Another type of FABP with multiple tissue expression is L-FABP. This protein is abundantly expressed in liver and is rapidly released from damaged hepatocytes. In [Chapter 10](#), we compared serum L-FABP with GST and ALT as markers for the early detection of hepatocellular damage associated with acute rejection episodes in a population of liver transplant recipients. A reference range and reference value for L-FABP in plasma were established in a healthy donor population and showed no age or sex differences. In contrast, a circadian rhythm with elevated early morning levels was observed.

Routine daily samples from liver transplant recipients, who had sustained episodes of acute allograft rejection, showed that a significant (>50%) increase in serum L-FABP concentration occurred in association with all acute rejection episodes, whereas  $\alpha$ -GST increased in 95% and ALT in 76% of all episodes. L-FABP increased on average 1.0 day earlier than serum ALT and on average 0.3 days earlier than  $\alpha$ -GST. L-FABP increased on average 1.5 days earlier than the day treatment was started.

These novel data are the first application of L-FABP as a sensitive means of detecting acute hepatocellular damage with comparable sensitivity as  $\alpha$ -GST, currently regarded the most sensitive biochemical marker of acute liver injury.

Intestinal-type fatty acid-binding protein (I-FABP) has been proposed as plasma marker for the detection of acute intestinal injury. However, intestinal mucosa also expresses L-FABP. In [Chapter 11](#), the tissue distribution of I-FABP and L-FABP is investigated in segments of the human intestine along the duodenal to colonal axis and the potential of both proteins to serve as plasma marker for the diagnosis of intestinal injury is studied. FAT/CD36 was measured to compare membrane fatty acid uptake with the cytoplasmic fatty acid transport proteins. Plasma reference values were established in normal healthy individuals.

We show a similar pattern of tissue distribution of I-FABP, L-FABP, H-FABP and FAT/CD36 along the duodenal to colonal axis with highest tissue contents found in the jejunum but in each intestinal segment a >40-fold higher content of L-FABP than of I-FABP. Accordingly, besides I-FABP, also L-FABP is a useful plasma marker for the detection of intestinal injury, especially in patients undergoing intestinal surgery.

---

The latest development in the clinical utility of FABP is the detection of brain injury. In [Chapter 12.](#), we have investigated the tissue distribution of B-FABP and H-FABP in segments of the human brain and the potential of either protein to serve as a plasma marker for the diagnosis of brain injury. B-FABP and H-FABP were measured in autopsy samples of the brain, and in serum samples from patients with mild traumatic brain injury and depressed patients undergoing bilateral electroconvulsive therapy. The marker proteins S100B and NSE were measured for comparison. Reference values of B-FABP and H-FABP were established in normal healthy individuals.

In this chapter we show that B- FABP and H-FABP have a different pattern of tissue content with highest contents found in the frontal lobe and pons, respectively. However, in each part of the brain, the content of H-FABP is at least 10 times higher than that of B-FABP. The patient studies indicate that B-FABP and H-FABP are more sensitive markers for minor brain injury than the currently used markers S100B and NSE.

In [Chapter 13](#) of this thesis, we present a general discussion on the use of FABP as serum/plasma marker for the detection of tissue injury. Rapid release from damaged cells and diffusion into the circulation make FABP a prominent early marker. Especially the combination of their high concentration tissue contents and low normal plasma values provides the possibility of a rapid rise above the respective reference values and, thus, an early indication of the appearance of tissue injury. However, improvement of patient treatment by measuring early biochemical markers requires their rapid analysis in plasma by point-of-care testing. Here bedside testing by handheld devices or decreased measurement time by more rapid test-systems would allow a more rapid identification of the patient status, which is important especially in the field of acute coronary syndromes.

Future research on the clinical utility of FABP mainly should focus on three aspects. First, prognostic value. Especially in patients with chronic heart failure, in which continuous low-grade cell damage is reported, H-FABP shows a significant better negative predictive value than cTnT for the appearance of recurrent events (see [Chapter 6](#)). Second, serial measurements of marker proteins will increase the sensitivity and specificity of the markers as a relative increase, independent of absolute plasma values, already can indicate tissue injury, even when plasma values are below the reference value. This observation will allow the clinician to start treatment as early as possible, which is not only important for myocardial injury (see [Chapter 2](#)), but also for detection of rejection injury of kidney- or liver transplants, intestinal diseases and brain injury due to stroke or mild trauma. The third focus is to effectively monitor the plasma values of biochemical markers and to allow serial measurements by on-line monitoring. Changes in the release pattern of FABP in the patient plasma can be measured with biosensors, allowing not only detection of tissue injury, but also estimation of the extent of damage, monitoring patients who are prone to develop tissue injury and for risk stratification.

As a final conclusion of this thesis we would like to state that the application of FABP as tissue injury marker has great potential for many clinical purposes.

## Samenvatting

Het terugdringen van niet alleen de morbiditeit en mortaliteit, maar ook van ziekenhuiskosten, zijn belangrijke doelstellingen in gezondheidszorgonderzoek. Een goede en snelle diagnose van de status van een patiënt, hetzij door de huisarts, of in het ziekenhuis, is daarom belangrijk. Behalve anamnese en medisch verleden, worden bloedparameters hierbij steeds belangrijker. Vooral bij de beoordeling van patiënten met acute weefselschade, zijn zogenaamde biochemische markers belangrijke diagnostische en vaak ook prognostische parameters gebleken. Omdat in het algemeen geldt dat een eerder gestarte behandeling leidt tot minder weefselschade, 'tijd spaart weefsel', zal sneller aantonen van weefselschade door middel van routinematig gebruik van biochemische markers, resulteren in een betere behandeling van de patiënt, en uiteindelijk een verminderde morbiditeit en mortaliteit. Tevens zullen ziekenhuiskosten verminderen omdat patiënten met niet ziekte-gerelateerde klachten veilig naar huis kunnen.

Een van de veelbelovende nieuwe markers voor het aantonen van weefselschade is het cytoplasmatisch vetzuurbindend eiwit (in het Engels fatty acid-binding protein, afgekort FABP). Dit relatief kleine (15 kD) eiwit is betrokken bij het metabolisme van langketenige vetzuren en komt in overmaat voor in weefsels met een actief vetzuurmetabolisme, zoals hart en lever. Na het optreden van celschade, komen cellulaire eiwitten in het interstitium terecht, en zullen daarna diffunderen door openingen in het endotheel, waarna ze in de bloedbaan terechtkomen. Omdat deze openingen in het endotheel qua grootte verschillen, kunnen kleine eiwitten zoals FABP sneller door de vaatwand diffunderen dan grote eiwitten, en verschijnen hierdoor dus ook sneller in de bloedbaan.

In dit proefschrift wordt de toepassing beschreven van verschillende typen FABP voor het aantonen van weefselschade bij patiënten met een acuut myocard infarct (AMI), chronisch hartfalen, onstabiele angina, skeletspierschade, nier-toxiciteit en nier-transplantatie, levertransplantatie, darmschade of hersenschade, zoals in het kort in hoofdstuk 1 is weergegeven.

Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van de huidige status van verschillende FABP-typen, in vergelijking met huidige bloedmarkers, voor het specifiek meten van weefselschade. Verder worden in dit hoofdstuk de ontwikkeling van assays, point-of-care testen, en klinische studies geëvalueerd. Vooral op het gebied van hartschade is gebleken dat het hart-type FABP (H-FABP) de meest vroege marker is voor het aantonen van een AMI. Binnen 6 uur na het optreden van klachten, is H-FABP significant specifiek en gevoeliger dan de momenteel gebruikte vroege marker myoglobine (Mb). Omdat de cardiale troponines T (cTnT) en I (cTnI) specifiek zijn maar relatief laat (na ongeveer 6 uur) een infarct kunnen bevestigen of uitsluiten, zou één van deze troponines samen met H-FABP een ideale combinatie vormen om het zogenoemde 'diagnostic window' van AMI te dekken. Om hartschade sneller te kunnen aantonen zou men vaker bloed kunnen afnemen, bijvoorbeeld bij binnenkomst en 1 uur na binnenkomst van de patiënt. Verschillende studies hebben aangetoond dat een stijging van de plasma concentratie van

---

H-FABP, zelfs indien geen van de concentraties boven de klinische referentie waarde uitstijgt, al een beginnend infarct aan kan geven.

In hoofdstuk 3 wordt de ontwikkeling van een snelle en gevoelige immunoassay (ELISA) voor de bepaling van humaan H-FABP beschreven. Deze assay is gebaseerd op het gebruik van hoogaffine monoklonale catcher- en detector antilichamen die verschillende epitopen op het eiwit molecuul herkennen. Door gelijktijdige incubatie van het te onderzoeken monster (weefsel, serum/plasma) met het plaatgebonden catcher antilichaam en het gelabelde detector antilichaam, is een assaytijd van slechts 45 min mogelijk. De lage intra- en interassay variatie en de lage detectielimiet van de assay maken een nauwkeurige bepaling mogelijk van H-FABP bij zowel gezonde individuen (normaal waarde), als bij patiënten met onstabiele angina (UAP) of chronisch hartfalen (CHF) (micronecrose, zie hierna). Het meetbereik (bij een 25-maal verdunning) tot 300 µg/L omvat >90% van alle gerapporteerde H-FABP concentraties in AMI patiënten. Daarom is deze immunoassay uitermate geschikt voor de kwantificering van H-FABP in bloed van patiënten die de Eerste Hart Hulp van een ziekenhuis binnenkomen, waarbij hartschade bevestigd dan wel uitgesloten moet worden.

Omdat het vetzuurmetabolisme een belangrijk onderwerp van onderzoek is, wordt in hoofdstuk 4 de toepasbaarheid van de humane H-FABP ELISA bekeken in verscheidene proefdierenstudies. De kruisreactiviteit van de geselecteerde monoklonale antilichamen werd gemeten met behulp van recombinante- en gezuiverde H-FABP's van verschillende diersoorten. De assay werd toegepast op weefsel en plasma monsters om ofwel het vetzuurmetabolisme, ofwel het gebruik van H-FABP als diagnostische marker voor harten- en skeletspierschade te onderzoeken. De monoklonale antilichamen herkennen H-FABP in het gros van de onderzochte diersoorten, behalve bij de eend, houtduif en kip. Vergeleken met gezuiverd humaan H-FABP varieerde de kruisreactiviteit van 5% tot 66% tussen paarden, honden, rundvee, muizen, ratten en ganzen. Variaties in de weefselinhoud van H-FABP, door veranderingen in vetzuurmetabolisme, waren het gevolg van verschillen in ontwikkelingsstadium, winterslaap, lange-afstands vluchten, en ziekten (bv. diabetes). Het diagnostische gebruik van H-FABP als plasma marker voor skeletspierschade werd aangetoond in racepaarden, en voor het aantonen van experimenteel geïnduceerde hartschade in muizen. Uit dit onderzoek werd geconcludeerd dat H-FABP tijdens de evolutie goed geconserveerd is, en dat de nieuw ontwikkelde immunoassay voor H-FABP voor verschillende diermodellen bruikbaar is.

Om de toepasbaarheid van een nieuwe biochemische marker te kunnen bepalen, moet allereerst een referentiebereik en een referentiewaarde (ook wel cut-off waarde of upper reference waarde genoemd) worden bepaald. Zo kunnen ook verschillende studies en de daarbij behorende klinische gegevens correct vergeleken en geïnterpreteerd worden. In hoofdstuk 5 wordt de invloed van leeftijd, geslacht en biologische variatie op de normale H-FABP en Mb plasmawaarden in gezonde individuen bestudeerd.

De gemiddelde plasmawaarden van beide markers zijn significant lager in vrouwen dan in mannen. Verder bleek dat de plasma concentratie van de markers hoger werd bij een toename van de leeftijd, en dat dit effect meer prominent was bij H-FABP dan bij Mb. Voor de variatie binnen één dag werd een significant verhoogde H-FABP plasma concentratie gedurende de nacht aangetoond. Dit effect wordt toegeschreven aan een verminderde glomerulaire filtratiesnelheid. Dezelfde trend werd gevonden voor Mb,



maar hier was geen sprake van statistisch significante verschillen. De tijd van de dag, leeftijd en geslacht beïnvloeden de referentie waarde van zowel H-FABP als Mb. Naar aanleiding van deze data stellen we een referentie waarde voor van 6 µg/L voor H-FABP en 60 µg/L voor Mb.

Het gebruik van H-FABP in vergelijking met cTnT voor het aantonen van minimale hartschade in patiënten met CHF en UAP wordt beschreven in hoofdstuk 6. Recente studies tonen aan dat progressieve verslechtering van de kamerfunctie in patiënten met CHF geassocieerd kan worden met het optreden van continue hartschade. Veel patiënten met CHF of UAP kunnen echter niet goed worden gediagnostiseerd omdat de huidige biochemische plasma markers niet gevoelig genoeg zijn.

Bij 62 patiënten met CHF en bij 23 patiënten met UAP werden bij binnenkomst bloedmonsters genomen. Naar aanleiding van de daarin gemeten H-FABP en cTnT plasma concentraties, werden de patiënten onderverdeeld in vier groepen. Bij de CHF patiënten was plasma cTnT in 28 patiënten verhoogd, terwijl plasma H-FABP verhoogd was in 42 patiënten. Belangrijk is dat slechts 3 patiënten een normaal H-FABP en een verhoogde cTnT waarde hadden, terwijl 17 patiënten (27%) een verhoogde H-FABP met een normale cTnT plasma concentratie hadden. Deze 27% zou doorgaans niet behandeld worden voor hartschade. Dit resultaat werd ook gevonden in de groep van UAP patiënten, waar 6 patiënten (26%) een verhoogde H-FABP concentratie gecombineerd met een onveranderde cTnT waarde hadden. Dit verschil tussen H-FABP en cTnT voor het aantonen van geringe hartschade werd niet beïnvloed door de nierfunctie.

Bij het vergelijken van de prognostische waarde van beide markers voor het voorspellen van nieuwe hartproblemen binnen 90 dagen, bleek dat H-FABP een significant betere negatief voorspellende waarde had dan cTnT. Patiënten met een H-FABP plasma concentratie onder de referentie waarde hadden 19% kans om opnieuw hartklachten te krijgen, terwijl patiënten met een cTnT plasma waarde onder de referentie waarde deze kans 43% was. Samengevat blijkt dat (i) geringe hartschade aantoonbaar is in het merendeel van de patiënten met CHF, (ii) H-FABP, ten opzichte van cTnT, een gevoeliger marker is voor het aantonen van deze hartschade, (iii) H-FABP een significant betere prognostische marker is dan cTnT.

Omdat H-FABP, alhoewel in mindere mate, ook tot expressie komt in skelet spieren, hebben we in hoofdstuk 7 onderzocht of H-FABP ook bruikbaar is voor het vroeg aantonen van skeletspierschade. Plasma concentraties van H-FABP, Mb en creatine kinase (CK) werden gemeten in gezonde sportdocenten na een 20 minuten durende looptest, die excentrische spierschade veroorzaakt. Mb en H-FABP waren binnen 30 minuten significant verhoogd in plasma, terwijl CK pas 2 uur na de training verhoogd was. De Mb en H-FABP concentraties bereikten weer normale waarden binnen 24 uur, terwijl de CK waarden verhoogd bleven gedurende 48 uur. De verhouding van Mb over H-FABP in plasma bedroeg 15 hetgeen uitsluit dat H-FABP afkomstig is uit de hartspier. In dit hoofdstuk hebben we aangetoond dat zowel Mb als H-FABP beter bruikbaar zijn dan CK voor het snel aantonen en monitoren van schade geïnduceerd door fysieke training. Bovendien geeft de verhouding van Mb over H-FABP aan welk spiertype beschadigd is.

---

In de speurtocht naar verdere toepasbaarheid van H-FABP als marker voor weefsel schade, werd het veld van nierschade betreden. Zowel de niertoxiciteit als de ischemische schade bij non-heart-beating donor (NHBD) nieren werden geëvalueerd.

Hoofdstuk 8 beschrijft de studie waarin aan ratten kwikchloride, cyclosporine of gentamicine werd toegediend. Histopathologie en urine concentraties van glutathion-S-transferase, totaal eiwit, en van lactaat dehydrogenase toonden aan dat kwikchloride vooral in het distale deel van de tubulus schade had veroorzaakt. Ook werd de nierfunctie sterk beïnvloedt, wat bleek uit een toegenomen urine volume (verminderde water opname, verhoogde creatinine- en ureum plasmawaarden). Distaal gelegen H-FABP was niet verhoogd in de urine; wellicht komt H-FABP eerder in de bloedbaan terecht dan in urine. Helaas waren er geen bloedmonsters beschikbaar om deze hypothese te bevestigen.

Bij cyclosporine bleek dat de schade in eerste instantie vooral in het distale deel van de tubulus was toegebracht. Dit werd bevestigd door een sterke toename van de urinewaarden van het distaal gelocaliseerde  $\mu$ -GST. Distaal gelegen H-FABP was verminderd in urine na behandeling van cyclosporine, wat veroorzaakt kan worden door een veranderde uitstortroute, zoals eerder gesuggereerd. De door cyclosporine geïnduceerde nierschade bleek gering (relatief weinig toename in plasma ureum concentratie en urine volume).

Gentamicine gaf de meeste nierschade, aangetoond door de significant verhoogde urinewaarden van LDH, totaal eiwit, H-FABP en GST. De hoge  $\alpha$ -GST concentratie in urine geeft schade aan de proximale tubulus aan. Andere meer distaal gelegen delen van de nieren waren ook beschadigd, aangetoond door sterk verhoogde waarden van H-FABP en  $\mu$ -GST.

Dit hoofdstuk geeft aan dat de patronen van urine markers verschillen tussen de drie toxines, en dat de patronen de localisatie en mate van schade aangeven. Zowel plasma als urinewaarden van H-FABP zijn geschikte parameters voor de detectie van nierschade aan de distale tubulus. In toekomstige studies zou het L-FABP als proximale schade marker bestudeerd kunnen worden.

In hoofdstuk 9, staat de studie beschreven waarin het gebruik van H-FABP als viabiliteits marker voor ischemische NHBD nieren wordt bestudeerd. Gedurende machine perfusie van NHBD nieren wordt door middel van flow karakteristieken en ischemie markerwaarden de viabiliteit van deze waardevolle bron van transplantatie nieren onderzocht.

Alanine amino-peptidase (Ala-AP) en H-FABP werden vergeleken met totale GST activiteit (tGST) in perfusaat monsters van 74 nieren van gecontroleerde (intensive care afdeling, behandeling gestopt) en ongecontroleerde (ongeluk en eerste hulp) NHBDs. Tijdens de 4 uur durende perfusie vertoonden de drie bovengenoemde markers een vergelijkbaar verloop bij beide typen nieren. Alle markerwaarden waren in de niet-gecontroleerde groep significant hoger dan in de gecontroleerde groep, en ook in de niet-versus wel transplanteerbare nieren. Een significante correlatie werd gevonden tussen tGST, Ala-AP en H-FABP. Er werd echter geen correlatie gevonden tussen markerconcentraties voor de transplantatie en de nierfunctie op lange termijn, welke bepaald kan worden door de snelheid van creatinineklaringen.

In dit hoofdstuk beschrijven we tGST, Ala-AP en H-FABP als zijnde vergelijkbare parameters voor het bepalen van directe nier-viabiliteit en de nierfunctie op korte termijn. Hierbij lijkt H-FABP de meest gevoelige marker te zijn. Alhoewel de markers niet de efficiëntie van de nierfunctie op de lange termijn kunnen voorspellen,

lijdt een screening van de nierfunctie op korte termijn tot een verbeterde overlevingskans van NHBD nieren, zodat op deze manier het probleem van groeiende wachtlijsten aangepakt zou kunnen worden.

Een ander type FABP dat in meerdere weefsels tot expressie komt is het L-FABP. Dit eiwit is in overmaat aanwezig in de lever en komt snel vrij bij schade aan levercellen. In [hoofdstuk 10](#) beschrijven we de studie waarin serum L-FABP wordt geëvalueerd als marker voor het aantonen van levercelschade in relatie met afstotingsperioden bij transplantatie patiënten. De gevoeligheid van L-FABP werd vergeleken met de huidige markers  $\alpha$ -GST en alanine aminotransferase (ALT). Een referentieberek en referentiewaarde voor L-FABP werd bepaald in een gezonde donorpopulatie, waaruit bleek dat er geen verschillen waren tussen leeftijd en geslacht. Het circadische ritme bleek wel te verschillen, in de nacht werden namelijk verhoogde waarden gemeten.

Uit de dagelijkse samples van transplantatie patiënten met biopt bevestigde acute afstotingsreacties geanalyseerd bleek dat L-FABP serum concentratie significant (>50%) verhoogd was tijdens alle afstotings episodens, terwijl  $\alpha$ -GST tijdens 95% van de episodens en ALT in 76% van alle episodens verhoogd was. L-FABP was gemiddeld 1.0 dag eerder verhoogd dan ALT en gemiddeld 0.3 dagen eerder dan  $\alpha$ -GST. L-FABP was gemiddeld 1.5 dag eerder verhoogd, dan de dag waarop de behandeling werd gestart.

Deze studie geeft voor het eerst de toepasbaarheid aan van L-FABP als gevoelige marker voor acute levercelschade.

Het intestinaal-type, I-FABP, zou een marker kunnen zijn voor het aantonen van acute darmschade, ware het niet dat ook L-FABP in de darmwand tot expressie komt. Daarom is er gekeken naar de weefselverdeling van I- en L-FABP in segmenten van de humane darm van duodenum naar colon ([zie hoofdstuk 11](#)). Verder werd de mogelijke functie van beide eiwitten als plasma marker voor de diagnose van darmschade bestudeerd. Het plasmamembraaneiwit vetzuurtranslocase (FAT/CD36) werd gemeten om de vetzuuropname te kunnen vergelijken met de localisatie van cytoplasmatische vetzuurtransporteiwitten. Plasma referentiewaarden werden bepaald in gezonde individuen.

Er is een vergelijkbare weefselverdeling van I-FABP, L-FABP, H-FABP en FAT/CD36, van duodenum naar colon, met de hoogste waarde in het jejunum, maar voor L-FABP geldt dat deze waarde ten opzichte van het I-FABP > 40 keer hoger is. Tevens concluderen we dat naast I-FABP, ook het L-FABP gerekend kan worden tot een geschikte plasma marker voor de detectie van darmschade.

De laatste ontwikkeling op het gebied van klinische toepasbaarheid van FABP is het aantonen van hersenschade ([hoofdstuk 12](#)). Alhoewel het gebruik van serum markers bij hersenschade nog niet een standaard klinische methode is, zijn er wel enkele markers bekend die als zodanig gebruikt zouden kunnen worden, namelijk S100B, neuron specifiek-enolase (NSE), myeline basaal eiwit, en het glial fibrillaire eiwit. Wij hebben de weefselverdeling van B-FABP en H-FABP in verschillende delen van de hersenen onderzocht, en de klinische toepasbaarheid bij hersenschade. Beide eiwitten werden gemeten in autopsiemonsters, in serum monsters van patiënten met milde hersenschade en van depressieve patiënten die bilaterale electroconvulsieve therapie ondergingen. Ter vergelijking werden ook de markereiwitten S100B en NSE gemeten. Referentiewaarden voor B-FABP en H-FABP werden bepaald in gezonde individuen.

---

Verskillende weefselwaarden van het B-FABP en H-FABP werden gevonden in de frontale-, temporale-, occipitale kwab, striatum, pons en cerebellum, waarbij de weefselwaarde H-FABP significant hoger was dan van B-FABP. B-FABP was niet aantoonbaar in het serum van gezonde individuen. Bij 68% van de patiënten met milde hersenschade waren de B-FABP serumwaarden verhoogd en in 70% van deze patiënten was het H-FABP verhoogd. S100B was slechts in 45% en NSE in 51% van deze patiënten verhoogd. In de studie betreffende de electroconvulsieve therapie was B-FABP in 6% van alle samples verhoogd, en H-FABP in 17% van alle samples. S100B was slechts in 0.4% van alle samples in deze studie verhoogd.

Uit bovengenoemde studies blijkt dat zowel B-FABP als H-FABP gevoeliger markers zijn voor hersenschade dan S100B en NSE.

In hoofdstuk 13, wordt de algemene discussie weergegeven over het gebruik van FABP als serum/plasma marker voor het aantonen van weefselschade. Snelle uitstort vanuit beschadigde cellen en snelle diffusie naar de circulatie maken van FABP een veelbelovende marker.

De kwaliteiten van een vroege marker zijn afhankelijk van de kwantificeringsmethode. Een snelle analyse verbetert namelijk de mogelijkheid tot behandeling van een patiënt. ‘Bedside’ testen en snelle testsystemen verkorten de meettijd, waardoor het diagnostiseren van de patiënt versneld kan worden, wat vooral van belang is bij mensen met acute coronaire syndromen.

Vervolgonderzoek naar de klinische toepasbaarheid van FABP zal zich grotendeels richten op drie aspecten. Ten eerste op de prognostische waarde van FABP. Uit de hartfalenstudie (hoofdstuk 6), bleek al dat H-FABP een betere voorspellende waarde had dan het cTnT. Ten tweede zullen opeenvolgende metingen van markereiwitten in de bloedbaan de sensitiviteit en specificiteit van een marker vergroten. Onafhankelijk van de plasmawaarde op zich, kan een stijging van de concentratie onder de referentiewaarde al een indicatie zijn van zich ontwikkelende schade. Dit stelt een arts in staat de behandeling eerder te starten. Ten derde zou het onderzoek gericht moeten zijn op het continue kunnen meten van de markers met biosensoren. Hierdoor is niet alleen het snel aantonen van schade mogelijk, maar kan er ook een schatting gemaakt worden van de hoeveelheid schade, en bestaat er de mogelijkheid tot het monitoren van patiënten die een vergroot risico hebben op het ontwikkelen van weefselschade.

Naar aanleiding van het onderzoek beschreven in dit proefschrift concluderen we dat voor diverse klinische doelen het gebruik van FABP als marker van weefselschade van grote waarde zal zijn.