Thesis Title The Quantitative Analysis of Chondroitin Sulfate Epitopes and Hyaluronan as Diagnostic Markers for Degenerative Joint Diseases by ELISA Technique

Author

Ms. Peraphan Pothacharoen

M.Sc.

Biochemistry

Examining Committee:

Assistant Professor Dr. Prachya Kongtawelert Chairman
Lecturer Dr. Siriwan Ongchai Member
Associate Professor Rujapa Nimsung Member
Associate Professor Dr. Viboon Rattanapanone Member

ABSTRACT

Joint diseases affect hundreds of millions of patients throughout the world. Osteoarthritis is the most common joint disease in term of years lived with disability.

Joint tissue, particularly articular cartilage undergoes various degree of structure degradation in osteoarthritis. Change in joint space width assessed by radiography remains the gold standard, but it allows late detection of joint tissue damage. Alternatively, specific and sensitive immunological assays that recognize nonspecific proteoglycan fragments generated by destruction enzymes and fragments contain glycosaminoglycans have been developed. According to the specific of each antibody, the assay may reflect proteoglycan destruction.

The propose of this study was to develop the assay for a native chondroitin sulfate epitope (WF6), an unsaturated chondroitin sulfate epitope (3B3), and hyaluronan level in normal human serum and in serum from rheumatoid arthritic (RA) and osteoarthritic (OA) patients in order to evaluate their potentials as a good diagnostic assay for joint diseases. Human serum samples were obtained form agematched of normal, RA and OA patients. A competitive immunoassay with monoclonal antibody 3B3 was developed to analyze the human serum after digestion

with chondroitinase ABC to detect 3B3(+) epitope. For undigested serum samples were also assay by competitive immunoassay with monoclonal antibody WF6 which recognizes native epitopes in chondroitin 6 sulfate. Serum hyaluronan was also determined using an ELISA based assay with biotinylated hyaluronan binding proteins. Assay conditions for human serum samples were developed for chondroitin sulfate epitopes using monoclonal antibodies 3B3 and WF6 and for hyaluronan by using hyaluronan binding proteins.

The concentration of hyaluronan was increased in many RA patients, but not in OA patients. The mean level of 3B3(+) epitope was very high in RA serum, but it was also well above normal in OA serum. WF6 epitope also showed increases in patients with joint diseases, but it was most increased in OA serum and less increased in RA serum. The combination of these cartilage molecular markers shows that they can reflect the cartilage destruction and may offer as useful tests for diagnostic joint diseases.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การตรวจวัคปริมาณ คอนครอยติน ซัลเฟค อิพิโทป และ ไฮยาลูโรแนน

ในการวินิจฉัยโรคข้อเสื่อม โคยวิธี ELISA

ชื่อผู้เขียน

นางสาวพีรพรรณ โปธาเจริญ

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

 ผศ. คร. ปรัชญา คงทวีเลิศ
 ประชานกรรมการ

 อ. คร. ศิริวรรณ องค์ไชย
 กรรมการ

 รศ. รุจาภา นิ่มสังข์
 กรรมการ

 รศ. คร. วิบูลย์ รัตนาปนนท์
 กรรมการ

บทคัดย่อ

โรคข้อ เป็นโรคที่มีผู้เจ็บป่วยกันมากทั่วโลกโรคหนึ่ง และที่พบได้บ่อยก็คือ โรคข้อเสื่อม (osteoarthritis) ซึ่งนับเป็นโรคที่เป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุข อันเนื่องจากความเจ็บป่วยเกิดขึ้นเป็นระยะเวลานานและทำให้เกิด ความสูญเสียทางสมรรถภาพทางร่างกาย

ในโรคข้อเสื่อมนั้น เนื้อเยื่อของข้อ โคยเฉพาะอย่างยิ่งกระดูกอ่อนหุ้มข้อ (articular cartilage) เป็นโครง สร้างที่มีการถูกทำลาย แม้จะสามารถตรวจพบการเปลี่ยนแปลงใค้จากภาพถ่ายรังสี แต่มักจะพบเมื่อมีการทำลาย ไปมากแล้ว คังนั้นการตรวจพบในระยะเริ่มแรกเมื่อมีการถูกทำลายของข้อจึงเป็นประโยชน์ การตรวจหาชิ้นส่วน ของโปรตีโอกลัยแคน (proteoglycan) ภายในกระดูกอ่อนที่ถูกทำลายโคยเอนไซม์ รวมถึงชิ้นส่วนที่มี กลัยโคชามิโนกลัยแคน (glycosaminoglycan) ติดอยู่ สามารถทำได้โคยวิธีทางภูมิกุ้มกัน โดยใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดี (monoclonal antibody) ที่สามารถขับได้อย่างจำเพาะกับชิ้นส่วนของโปรตีโอกลัยแคน ทำให้เราสามารถทราบถึง การเกิดการทำลายเหล่านั้นได้

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ ค้องการที่จะพัฒนาวิธีการตรวจหาสารสำคัญในกระดูกอ่อน (cartilage molecular marker) อัน ได้แก่ native chondroitin sulfate epitope, unsaturated chondroitin sulfate epitope and ไฮ ยาลูโรแนน (hyaluronan) ในซีรั่มของคนปกติ, ของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม และโรคข้อรูมาตอยค์ ที่อยู่ในช่วงอายุใกล้ เคียงกัน และค้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (competitive immunoassay) ที่ได้พัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าใน การที่จะวิเคราะห์หา unsaturated chondroitin sulfate epitope ค้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดี 3B3 ค้องทำการย่อย ซีรั่มก่อนค้วยเอนไซม์ chondroitinase ABC ในการวิเคราะห์ด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 ที่จำเพาะต่อ native epitope ใน chondroitin 6-sulfate นั้นสามารถทำได้จากซีรั่มโดยตรง ส่วนการวิเคราะห์หาไฮยาลูโรแนนนั้น อาศัย ELISA based assay โดย HABPs ที่ติดฉลากด้วยใบโอติน (biotinylated hyaluronan binding proteins)

จากระดับความเข้มข้นของ ไฮยาลูโรแนน, native chodroitin sulfate eptiope epitope; WF6 epitope และ unsaturated chondroitin sulfate epitope; 3B3(+) epitope ที่มีอยู่ในซีรั่ม พบว่ามีความแตกต่างกันในผู้ป่วยโรคข้อ เสื่อม (OA) และโรคข้อรูมาตอยค์ (RA) เมื่อเทียบกับคนปกติ โคยพบว่า ระดับของ ไฮยาลูโรแนนนั้น สูงในซีรั่มผู้ ป่วย RA แต่ไม่สูงในซีรั่ม OA เมื่อเทียบกับคนปกติ นอกจากนั้น ค่าเฉลี่ยของ 3B3(+) epitope ยังสูงอย่างมากใน ซีรั่มผู้ป่วย RA และสูงขึ้นเล็กน้อยในซีรั่ม OA ส่วน WF6 epitope นั้นมีค่าสูงขึ้นในผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม เมื่อเทียบกับ ระดับในคนปกติ โดยจะพบสูงในซีรั่มผู้ป่วย OA และสูงขึ้นเล็กน้อยในซีรั่มของผู้ป่วย RA จากการศึกษาเปรียบ เทียบระดับของสารสำคัญในกระจูกอ่อนเหล่านี้ พบว่าสามารถที่จะใช้เป็นประโยชน์ในการช่วยบ่งชี้การเสื่อม สลายของกระจูกอ่อน นอกจากนั้น ยังสามารถที่จะใช้เป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคข้อเสื่อมได้อีกด้วย