

Thesis Title	The Development of a Simple Method for Hyaluronan Determination Using Biotinylation Technique	
Author	Miss Wannarat Yingsang	
M.Sc.	Biochemistry	
Examining Committee		
Assistant Professor	Dr. Prachya Kongtawelert	Chairman
Assistant Professor	Worawit Louthrenoo	Member
Assistant Professor	Ong-ard Praisontarangkul	Member
Associate Professor	Rujapa Nimsung	Member

ABSTRACT

Hyaluronan (HA) is an endogeneous polysaccharide which is found mainly in connective tissues and is cleared from the circulation by liver endothelial cell (LEC). This present study, the concentration of hyaluronan was measured by application of an ELISA technique using biotinylated hyaluronan binding protein (B- HABP) derived from cartilage proteoglycan core protein.

The hyaluronan binding protein (HABP) was prepared from shark and bovine cartilage by the following steps: proteoglycan (PG) aggregate extraction, trypsin digestion, affinity chromatography on HA -sepharose. HABP was characterized by SDS/PAGE and immunoblotting method. Its showed that the purified bovine HABP, G1-domain and shark HABP had protein fragment, specific

to hyaluronan.

An enzyme - linked anti biotinylated HABP assay which was based on the inhibition system was carried out in polystyrene tube as described. The principle of the method depended on the specific binding of HA to the HABP. The remaining uncomplex-biotinylated HABP were determined by addition of alkaline phosphatase conjugated mouse-anti biotin. The amount of anti-biotin bound to the plate was quantitated by monitoring the amount of the occurring colored product formed during a final incubation with substrate for alkaline phosphatase. The HA in sample was quantified by comparing their inhibition capacity in the assay against a standard inhibition curve obtained by using highly purified HA. An obtained calibration curve was suitable for HA concentration up to 10,000 ng/ml with a sensitivity of 10 ng/ml. Intra - assay had coefficient of variation (CV) of 6.25% and inter - assay had CV of 21.35%. An analytical mean of recovery was 96.05% for an addition test.

Serum levels of HA in patients with rheumatoid arthritis(RA), patients with osteoarthritis (OA) and patients with different liver diseases, measured by this developed method, were compared with level in healthy subjects. It was found that the mean \pm SD of HA level in healthy subjects was 47.35 \pm 30.21 ng/ml, cirrhosis was 7958.43 \pm 4916.47 ng/ml, hepatoma was 1036.65 \pm 1157.86 ng/ml, hepatitis was 332.35 \pm 228.37 ng/ml, rheumatoid arthritis was 335.68 \pm 321.35 ng/ml and osteoarthritis was 216.1 \pm 121.43

ng/ml. The mean serum HA level in most groups was significantly increase compared to the HA level in healthy person ($P \leq 0.0001$) and the highest serum HA levels was found in patients with cirrhosis.

In conclusion, the enzyme-linked anti biotinylated HA assay is economical and appropriate for determination of serum HA. It should be a useful marker in clinical diagnosis, monitoring and follow up of patients, especially in liver cirrhosis and cloud be indicated a role of the liver in elimination of HA from circulation.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาวิธีการตรวจวัดไฮยาลูโรแนน
 อย่างง่าย โดยเทคนิคการติดฉลากด้วยไบโอดีน
 ชื่อผู้เขียน นางสาว วรรณรัตน์ ยิ่งสังข์
 วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ชีวเคมี
 คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ	ประธานกรรมการ
ผศ.น.พ. วรวิทย์ เล่าห์เรณู	กรรมการ
ผศ.น.พ. องอาจ ไพรสณทราราม	กรรมการ
รศ. รุจภา นิมสังข์	กรรมการ

บทคัดย่อ

ไฮยาลูโรแนนเป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งส่วนมากพบอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและจะถูกกำจัดออกจากระบบไหลเวียนโดย endothelial cell ที่ตับ การวิจัยนี้ตรวจวัดระดับความเข้มข้นของไฮยาลูโรแนนโดยอาศัยวิธีการที่ดัดแปลงจาก เทคนิคเอ็นไซม์อิมมูโนเอสเสย์ โดยใช้ hyaluronan binding protien (HABP) ซึ่งได้จากส่วนของ proteoglycan (PG) ของกระดูกอ่อน

HABP เตรียมได้จากกระดูกอ่อนฉลามหรือกระดูกอ่อนวัว ดั้งขั้นตอนต่อไปนี้คือ การสกัด proteoglycan aggregate จากกระดูกอ่อน แล้วจึงตามด้วยการย่อย PG ด้วยเอ็นไซม์ทรिพซิน และเทคนิค affinity chromatography โดยใช้ HA-Sepharose ที่มีความจำเพาะจับได้กับ HABP เมื่อทำ SDS-PAGE และ immunoblotting ประกอบกัน ปรากฏว่า HABP,G1-domain ที่เตรียมได้จากกระดูกวัว และ HABP ที่เตรียมได้

กระดุกอ่อนฉลาด มีโปรตีนที่จับได้อย่างจำเพาะกับไฮยาลูโรแนน

ผู้วิจัยได้เตรียมน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับการตรวจวัดปริมาณไฮยาลูโรแนน จากสารที่กล่าวมาข้างต้น โดยอาศัยหลักการเอ็นไซม์ลิงค์แอนติไบโอดีนไฮยาลูโรแนนเอสเสย์ แบบ "inhibition" ซึ่งจะทำในหลอดพลาสติกโพลีสไตรีน ดังนั้นส่วนที่ไม่จับกับไฮยาลูโรแนนในซีรัม จะถูกตรวจวัดโดยจะจับกับไฮยาลูโรแนนที่เคลือบอยู่บนผิวของเพลต แล้วจึงเติมสารคอนจูเกต ระหว่างอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับแอนติไบโอดีน แล้วจึงตรวจหาปริมาณของแอนติไบโอดีนที่จับอยู่บนเพลต โดยการวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นภายหลังเมื่อเติมสับสเตรตของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ปริมาณไฮยาลูโรแนนในซีรัมสามารถคำนวณได้ โดยการเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับกราฟมาตรฐานที่ได้มา โดยการใชไฮยาลูโรแนนที่มีความบริสุทธิ์มาก จากกราฟมาตรฐานที่ได้พบที่มีความเหมาะสมในการตรวจวัดหาความเข้มข้นของไฮยาลูโรแนนในซีรัมได้ถึง 10000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความไวในการตรวจสอบเท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์ทางคุณภาพการตรวจวัด พบว่าได้ค่า CV ของ intra-assay เท่ากับ 6.25 เปอร์เซ็นต์ (จำนวน 24 ราย) และ CV ของ inter-assay มีค่าเท่ากับ 21.35 เปอร์เซ็นต์ (จำนวน 15 ราย) ค่าเฉลี่ยของ recovery โดยวิธีการเติมลงไปเท่ากับ 96.05 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาระดับไฮยาลูโรแนนในซีรัมของผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม และผู้ป่วยโรคตับชนิดต่างๆ โดยวิธีการตรวจวัดดังกล่าวเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีสุขภาพดี พบว่าระดับไฮยาลูโรแนนในซีรัมของคนปกติมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 47.48 ± 30.21 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ผู้ป่วยโรคตับแข็งเท่ากับ 7958.43 ± 4916.47 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ผู้ป่วยที่มีเนื้องอกที่ตับเท่ากับ 1036.65 ± 1157.86 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ผู้ป่วยโรคข้ออักเสบเท่ากับ 332.35 ± 228.37 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์เท่ากับ 335.68 ± 321.35 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม

เท่ากับ 216.1 ± 121.43 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาดังกล่าวพบว่า ในซีรัมของผู้ป่วยโรคตับและโรคข้อ มีค่าเฉลี่ยปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.0001$) โดยพบปริมาณไฮยาลูโรแนนสูงสุดในผู้ป่วยโรคตับแข็ง

ชุดน้ำยาที่เตรียมขึ้นนี้ใช้ง่ายและมีความเหมาะสมในการตรวจวัดไฮยาลูโรแนนในซีรัม ดังนั้นจึงควรนำมาใช้ในการตรวจวัดไฮยาลูโรแนนทางคลินิก ในการวินิจฉัย ติดตามและพยากรณ์โรคของผู้ป่วยต่อไป โดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคตับแข็ง นอกจากนี้ยังสามารถดูบทบาทของตับในการกำจัดไฮยาลูโรแนน ออกจากระบบไหลเวียนโลหิตได้