

**Thesis Title** Quantitation of Serum Hyaluronan Binding Proteins as a Diagnostic Marker for Degenerative Joint Disease

**Author** Mr. Tanongsak Sassa-deepang

**M.Sc.** Biochemistry

**Examining Committee:**

Asst. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert	Chairman
Dr. Siriwan Ongchai	Member
Assoc. Prof. Rujapa Nimsung	Member
Assoc. Prof. Dr. Viboon Rattanapanone	Member

**ABSTRACT**

The major clinical manifestations of rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA) are degraded cartilage, synovium, and bone tissue, resulting in severe mobility impairment. Specific and sensitive biochemical markers reflecting abnormalities of cartilage, synovium, and bone tissues is useful for the investigation and monitoring of OA/RA. The hyaluronan-binding proteins (HABPs) would represent candidate biochemical markers.

According to the specificity of antibody, a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed using monoclonal antibody recognize HABPs epitope in sera. Assay conditions for human sera samples were developed for this epitope using monoclonal antibody 1H8. Serum hyaluronan-binding protein (HABPs) was determined using a this assay. A quantitation of HABPs was compared with the amount of HA in the same serum samples.

The developed competitive ELISA using mAb 1H8 has sensitivity in the range of 10-10000 ng/ml. It was found that, the coefficient of variation of intra- and inter-assay were 9.69% (n=12) and 17.58% (n=20), respectively, and the percentage of

recovery was 119.20% (n=7) by addition of known amount of HABPs to pooled serum.

Using the newly developed method, the concentration of HABPs was significantly increased both in OA and RA serum compared with healthy sera (p=0.0001 and p=0.049 respectively). The average concentration of HABPs in RA (668.02±1834.70 ng/ml) was higher than OA (78.31±58.77ng/ml) and wells above normal in healthy sera (26.58±37.52). HABPs concentrations were compared with HA concentration in same sample, and it was found that there were no correlation between concentration of HABPs and HA in healthy (r=0.231), OA (0.000), and RA samples (r=0.019). However, A quantitation of the HABPs may be useful as a complement joint disease marker that depend on the degree of joint inflammation in OA and RA.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การตรวจวัดปริมาณของโปรตีนยึดจับไฮยาลูโรแนนในซีรัมเพื่อใช้เป็นสารบ่งชี้สำหรับการวินิจฉัยโรคข้อเสื่อม	
ชื่อผู้เขียน	ว่าที่ร้อยตรีทงศักดิ์ สัสดีแพง	
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต	สาขาวิชาชีวเคมี	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		
	ผศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ	ประธานกรรมการ
	ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย	กรรมการ
	รศ. รุจามา นิมสังข์	กรรมการ
	รศ. ดร. วิบูลย์ รัตนปานนท์	กรรมการ

#### บทคัดย่อ

ลักษณะที่ปรากฏให้เห็นเด่นชัดของอาการโรคข้อเสื่อมอักเสบ (rheumatoid arthritis) และโรคข้อเสื่อม (osteoarthritis) คือมีความผิดปกติและเสื่อมสลายของกระดูกอ่อน, น้ำไขข้อ, และเนื้อเยื่อกระดูก ซึ่งเป็นผลให้ความเสียหายเกิดขึ้นในขณะมีการเคลื่อนไหว ความจำเพาะและสารบ่งชี้ทางชีวเคมีสามารถสะท้อนให้เห็นถึงความผิดปกติของกระดูกอ่อน, น้ำไขข้อ, และเนื้อเยื่อกระดูก จึงสามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยและติดตามโรคข้อเสื่อมทั้งสองชนิดนี้ได้ ส่วนบริเวณโปรตีนยึดจับสามารถแสดงถึงการเป็นสารบ่งชี้ทางชีวเคมีได้ เช่น โปรตีนไกลัยแคน TSG-6, สารที่ยึดจับกับไฮยาลูโรแนน SHAP-HA complex เป็นสารชีวโมเลกุลอีกตัวหนึ่งที่สามารถจับได้กับไฮยาลูโรแนนและนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้โรคข้อ. ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์โดยตรงกับระดับการติดเชื้อของโรคข้อเสื่อมอักเสบได้

เนื่องจากแอนติบอดีมีความจำเพาะจึงสามารถนำมาใช้ในวิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยาเพื่อตรวจวัดปริมาณโปรตีนยึดจับไฮยาลูโรแนนในเลือดได้ วิธีการจะถูกพัฒนาขึ้นโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1H8 แล้วนำมาทำการตรวจวัดโปรตีนยึดจับไฮยาลูโรแนนในเลือดผู้ป่วยและคนปรกติ ปริมาณของโปรตีนยึดจับไฮยาลูโรแนนที่ได้จะถูกนำมาเปรียบเทียบกับปริมาณของไฮยาลูโรแนนในตัวอย่างเลือดเดียวกัน

จากการวิจัยพบว่า วิธีการตรวจวัดด้วย ELISA ที่ถูกพัฒนาโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1H8 มีความไวในการตรวจวัดที่ระดับความเข้มข้น 10-10,000 ng/ml มีค่า Coefficient of variation ของ intra- และ inter- assay เท่ากับ 9.69% (n = 12) และ 17.58% (n = 20) ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ย recovery เท่ากับ 119.20% (n = 7)

เมื่อนำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในการตรวจวัดระดับของ HABPs พบว่า ระดับความเข้มข้นของ HABPs เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในน้ำเลือดของผู้ป่วยทั้งโรคข้อเสื่อม (OA) และข้ออักเสบ (RA) เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี ( $p = 0.0001$  และ  $p = 0.049$  ตามลำดับ) ค่าเฉลี่ยของระดับ HABPs ในน้ำเลือดของผู้ป่วย RA มีค่าเท่ากับ  $668.02 \pm 1834.70$  ng/ml ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าระดับ HABPs ที่ตรวจพบในน้ำเลือดของผู้ป่วย OA ( $78.31 \pm 58.77$  ng/ml) และ สูงกว่าระดับ HABPs ที่ตรวจพบในน้ำเลือดผู้ที่มีสุขภาพดี ( $26.58 \pm 37.52$  ng/ml). เมื่อนำความเข้มข้นของ HABPs มาทำการเปรียบเทียบกับระดับของ HA ในตัวอย่างน้ำเลือดเดียวกันด้วยวิธีการทางสถิติ พบว่าความเข้มข้นของ HABPs และ HA ไม่มีความสัมพันธ์กันทั้งในกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี ( $r = 0.231$ ), ผู้ป่วย OA ( $r = 0.000$ ) และผู้ป่วย RA ( $r = 0.019$ ) อย่างไรก็ตาม, การตรวจวัดปริมาณของ HABPs อาจมีประโยชน์ใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการวินิจฉัยโรคข้อเสื่อมและโรคข้อเสื่อมอักเสบได้ แต่ควรใช้ร่วมกับสารบ่งชี้ทางชีวเคมีอื่นๆด้วย