Thesis Title Application of Fluorescence-ELISA Based Assay for Hyaluronan (HA) Determination in Cancer Serum

Author Mr. Thanapong Poolmas

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory:

Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert — Chairperson

Assist. Prof. Dr. Siriwan Ong-Chai — Member

ABSTRACT

Cancer is a major human health problem in Thailand. Its high prevalence causes high incidence of death in both male and female. Several studies have discovered tumor markers that play significant roles in identification the stage of cancer. These tumor markers' investigation important in prevention of cancer. Hyaluronan (HA) is one of bio-marker which has been reported to associate with tumor growth and metastasis. Hence, this study aimed to develop the method determining HA by fluorescence-ELISA based assay for cancer diagnosis as a medical research tool. Proteoglycans were extracted from chicken cartilage and proteins were removed by trypsin. Hyaluronan binding proteins (HABPs) were isolated and purified by aqueous solution, affinity column chromatography and the purity was confirmed by SDS-PAGE, respectively. Prepared HABPs were conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) by affinity bioconjugation. From histological study, the untreated hyaluronidase cells and tissues showed the fluorescent signal when stained with FITC-HABP, but cells and tissues were pretreated hyaluronidase, which enzyme could be degraded hyaluronan before stained with FITC-HABP, showed decreasing in fluorescent signal. Fluorescence-ELISA based assay was developed using FITC-HABP (conjugated FITC-HABP) and applied to determine HA in human serum samples.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

The fluorescence-ELISA could determined HA concentration in range of 10 – 10,000 ng/ml. It was found that, the coefficient of variation of intra- and inter assay were 6.51% (n = 20) and 11.01 % (n = 28), respectively. The percentage of recovery was 119.782 % (n = 6) by standard addition of HA to pooled serum. In the present study, comparison of fluorescence assay with the conventional ELISA assay. The later technique used B-HABP and developed signal for determined HA concentration using anti-biotin peroxidase conjugate's activity. It was found that fluorescence-ELISA technique was not significantly different from the conventional ELISA test *($p>0.05$)*, coefficient of correlation (r) was 0.87. Moreover, when this fluorescence based assay was applied to quantify HA in cancer and normal serum samples, it was found that the range of HA levels in cancer patients were 2.14 - 3349.22 ng/ml (mean ± SD = 305.25 ± 352.90 ng/ml). It increased more than normal subjects, which were 2.14 - 238.02 ng/ml (mean ± SD = 34.79 ± 49.40 ng/ml), *($p< 0.01$).* Further, cancer serum samples were separated to three groups, including cervix, CEA positive, and other cancer. The range of HA levels in cervix cancer were 12.96 - 636.12 ng/ml (mean ± SD = 181.99 ± 135.80 ng/ml), CEA positive were 133.26 - 1237.88 ng/ml (mean ± SD = 418.90 ± 300.87 ng/ml) and other cancer were 86.97 - 3349. 22 ng/ml (mean ± SD = 66.09 ± 512.33 ng/ml). Therefore, this developed fluorescence-ELISA technique that detected HA concentration in serum, may be useful to use as a complementally diagnostic test in cancer.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การประยุกต์ใช้เทคนิควิธีฟลูออเรสเซนต์-อีไลซ่า
เพื่อตรวจวัดไฮยาลูโลแนน ในซีรัมผู้ป่วยโรคมะเร็ง

ชื่อผู้เขียน นายธนพงษ์ พูลมาศ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการสอบที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ	ประธานกรรมการ
ผศ. ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย	กรรมการ

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย เป็นโรคที่พบได้บ่อยและยังเป็นสาเหตุของการเสียชีวิต ทั้งในหญิงและในชาย จากหลายการศึกษาพบว่า สารบ่งชี้โรคมะเร็งมีบทบาทสำคัญในการแสดงถึงความรุนแรงของโรคมะเร็ง การสำรวจค้นคว้าสารบ่งชี้โรคมะเร็งจึงมีความสำคัญและนำไปสู่การป้องกันการเกิดโรคมะเร็งต่อไปได้ ไฮยาลูโลแนน (hyaluronan, HA) เป็นสารบ่งชี้โรคมะเร็งชนิดหนึ่งซึ่งพบว่ามีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (metastasis) ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดไฮยาลูโลแนนโดยวิธีฟลูออเรสเซนต์-อีไลซ่า เพื่อการวินิจฉัยโรคมะเร็งและเป็นเครื่องมือวิจัยทางการแพทย์ โปรติโอไกลแคน (proteoglycan) สกัดจากกระดูกอ่อนของไก่แล้วย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน จากนั้นนำมาแยกให้ได้โปรตีน hyaluronan binding proteins (HABPs) ที่บริสุทธิ์ด้วยวิธี aqueous extraction, affinity column chromatography และทดสอบหาความบริสุทธิ์ด้วยวิธี sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ตามลำดับ นำ HABPs ที่เตรียมได้มาติดฉลากด้วยสารเรืองแสง florescein isothiocyanate (FITC) ด้วยเทคนิค affinity bioconjugation จากการศึกษา histological study พบว่ากลุ่มของเซลล์และเนื้อเยื่อที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์ไฮยาลูโลนิเดส (hyaluronidase) จะมีการเรืองแสงเมื่อย้อมด้วย FITC-HABP แต่ในกลุ่มเซลล์และเนื้อเยื่อที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ดังกล่าว (ซึ่งมีฤทธิ์สลายไฮยาลูโลแนน) ก่อนนำไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ย้อมด้วย FITC-HABP การเรืองแสงจะลดลงอย่างเห็นได้ชัด เทคนิคฟลูออเรสเซนต์-อีไลซ่าถูกพัฒนาขึ้นโดยใช้ FITC-HABP และนำไปประยุกต์ใช้ตรวจวัดไฮยาลูโลแนนในซีรัม พบว่าสามารถตรวจวัดปริมาณไฮยาลูแนนได้ที่ระดับความเข้มข้น 10-10,000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, % CV) ของ intra และ inter assay เท่ากับ 6.51 % (n = 20) และ 11.01 % (n = 28) ตามลำดับ เมื่อเติมไฮยาลูโลแนนที่ทราบความเข้มข้นลงในซีรัมตัวอย่างพบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์ recovery เท่ากับ 119.782 % (n = 6) ในการศึกษาครั้งนี้ยังได้ทำการเปรียบเทียบเทคนิคฟลูออเรสเซนต์-อีไลซ่ากับเทคนิคอีไลซ่าแบบดั้งเดิมซึ่งใช้สารสกัด HABPs ที่ติดฉลากด้วยสารไบโอตินมาใช้ในการตรวจวัดไฮยาลูโลแนน และทำการขยายสัญญาณในการตรวจวัดโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ peroxidase พบว่าเทคนิควิธีฟลูออเรสเซนต์-อีไลซ่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเทคนิคอีไลซ่าแบบดั้งเดิม *($p>0.05$)* และมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.87 ยิ่งไปกว่านี้เมื่อนำเทคนิควิธีฟลูออเรสเซนต์-อีไลซ่าไปประยุกต์ใช้ตรวจวัดไฮยาลูโลแนนในซีรัมของผู้ป่วยโรคมะเร็งและคนปกติ พบว่าระดับไฮยาลูโลแนนในซีรัมของผู้ป่วยโรคมะเร็งมีค่าพิสัยเท่ากับ 2.14 - 3349.22 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่าเท่ากับ 305.25 ± 352.90 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) สูงกว่าซีรัมคนปกติที่มีค่าพิสัยของระดับไฮยาลูโลแนนเท่ากับ 2.14 - 238.02 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่าเท่ากับ 34.79 ± 49.40 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) อย่างมีนัยสำคัญ *($p<0.01$)* เมื่อทำการจัดแบ่งผู้ป่วยโรคมะเร็งออกเป็นสามกลุ่มได้แก่ กลุ่มมะเร็งปากมดลูก กลุ่มที่มีค่า CEA เป็นบวกและกลุ่มมะเร็งอื่นๆ พบว่าค่าพิสัยของระดับไฮยาลูโลแนนในผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูกมีค่าเท่ากับ 12.96 - 636.12 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่าเท่ากับ 181.99 ± 135.80 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) ผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ให้ค่า CEA เป็นบวกมีค่าพิสัยของระดับไฮยาลูโลแนนเท่ากับ 133.26 - 1237.88 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่าเท่ากับ 418.90 ± 300.87 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) และผู้ป่วยโรคมะเร็งชนิดอื่นๆมีค่าพิสัยเท่ากับ 386.97 - 3349.22 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 66.09 ± 512.33 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) ดังนั้นการพัฒนาเทคนิควิธีฟลูออเรสเซนต์-อีไลซ่าในการตรวจวัดระดับความเข้มข้นของไฮยาลูโลแนในซีรัมครั้งนี้ น่าจะมีความเหมาะสมเพียงพอที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved