

Stanovení kyseliny hyaluronové

P. Petrová

Úvod

Kyselina hyaluronová (HA) je hlavní složkou pojivových tkání. Je syntetizována fibroblasty a dalšími specializovanými buňkami pojivových tkání (např. hvězdicovými buňkami jater). Eliminace probíhá zčásti lokálně, větší část je odstraněna lymfatickým systémem a zbytek vstupuje do krevního oběhu, kde je odstraněn jaterními endoteliálními buňkami. Zvýšené hodnoty kyseliny hyaluronové proto nacházíme během poklesu jaterní clearance v důsledku fibrózy nebo cirhózy, kdy s progresí onemocnění stoupají hladiny. Měření koncentrací HA je možné použít také na sledování efektu antivirové nebo antifibrotické terapie.

Zvýšené sérové hodnoty nalézáme i během její nadměrné syntézy (např. u onemocnění kloubů), kdy koncentrace HA koreluje se stupněm zánětu a synoviální proliferace.

Některé malignity (mezoteliom a Wilmsův tumor) produkují HA nebo faktory působící produkci HA a jsou provázeny vysokými hladinami v séru. U ca. prostaty a prsu se zdá, že hladiny HA korelují se stupněm onemocnění a mohly by být použity ke sledování progresu onemocnění a účinnosti terapie.

Zvýšené hladiny nacházíme také u zánětlivých procesů jako psoriáza a také u septických stavů.

Hladiny HA jsou signifikantně vyšší u diabetiků a korelují s hladinou plazmatické glukózy a s výskytem diabetické mikroangiopatie.

Sérové hladiny jsou ovlivněny věkem, pohlavím, příjmem potravy a fyzickou aktivitou.

Materiál a metody

Kyselinu hyaluronovou (HA) stanovujeme soupravou HYAL-ELISA firmy Cisbio Bioassays na ELISA automatu Evolis (Bio-Rad). Souprava obsahuje sadu kalibrátorů A-F, připravených k použití a 2 hladiny kontrolního materiálu. Rozsah stanovení je 0 – 1000 µg/l, analytická citlivost 2,7 µg/l.

Jedná se o sendvičový typ stanovení. Kalibrátory, kontrolní materiál a vzorky se po naředění 50x dilučním pufrem inkubují v jamkách mikrotitrační destičky, potažených vazebním proteinem pro HA (HABP). Po inkubaci a promytí se do jamek přidá konjugát (HABP HRP). Následuje druhá inkubace, promytí a přidání substrátu (tetrametylbendidin).

Po další inkubaci je přidán STOP roztok (1M HCl). Absorbance je měřena při 450 nm s referenčním filtrem 590 – 650 nm (v případě absorbance >3,0 u kalibrátoru F při 405 nm). Analýza trvá na ELISA automatu Evolis přibližně 4,0 hodiny.

Ke stanovení používáme vzorky séra odebrané na lačno.

Výsledky

Tabulka 1: Opakovatelnost

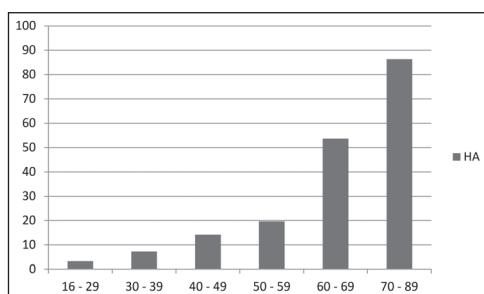
Intra-assay (n=7)	Průměr (µg/l)	SD (µg/l)	CV (%)
Vzorek 1	91,5	4,1	4,4
Vzorek 2	370,1	23,1	6,2

Tabulka 2: Mezilehlá preciznost

Inter-assay (n=7)	Průměr (µg/l)	SD (µg/l)	CV (%)
Vzorek 1	73,2	5,5	7,5
Vzorek 2	428,8	41,9	9,8

Celkem jsme vyšetřili hladinu kyseliny hyaluronové u 159 pacientů FNOL. 136 vyšetření bylo z II. interní kliniky gastroenterologické a hepatologické. Ostatní vyšetření byla ordinována náhodně různými pracovišti. Nejčastější diagnózou byla dg. K76 – Jiné nemoci jater (44%), dále B18 – Chronická virová hepatitida (17%) a K74 – Fibróza a cirhóza jater (9,4%). K dalším diagnózám patřily dyspepsie, nemoci žlučníku, žlučových cest a slinivky břišní, pneumokonióza a další. Koncentrace kyseliny hyaluronové se pohybovala od <2,7 do >1000 µg/l. Věk pacientů byl od 16 do 89 let, soubor obsahoval celkem 79 mužů a 80 žen. Hladinu HA nad cut-off hodnotou 90 µg/l mělo 30 pacientů (15 mužů a 15 žen).

Tabulka 3: Medián HA (µg/l) v jednotlivých věkových skupinách



Tabulka 4 : Věkové složení a rozložení hodnot HA

věk	HA (µg/l)	medián HA (µg/l)
16 – 29 (n=18)	<2,7 – 157,5	3,2
30 – 39 (n=21)	<2,7 – 318,9	7,2
40 – 49 (n=32)	<2,7 – 508,9	14,1
50 – 59 (n=41)	<2,7 – 471	19,6
60 – 69 (n=35)	<2,7 - >1000	53,6
70 – 89 (n=12)	7 - >1000	86,3

Tabulka 5: Hladiny HA v závislosti na diagnóze

Diagnóza	n	HA (µg/l)	medián HA (µg/l)	pacienti s H > 90 (n-%)
B18 (chron. vir. hepatitida)	27	<2,7 ->1000	23,2	6 -22,2 %
K73 +74 (chron. zánět jater, fibróza a cirhóza jater)	2+15	10,5 - >1000	128,6	9 -52,9 %
K 76 (jiné nemoci jater)	70	<2,7 – 504,7	16,4	13 -18,6 %
ostat. dg. související s nemocemi tráv. soustavy	18	<2,7 – 230,2	12,7	2 -11,1 %
ostat.dg. nesouvisející s nemocemi tráv. soustavy	25	<2,7 – 86,3	15,4	0

Závěr

Jaterní fibróza je závažný stav postižení jaterního parenchymu se zmnožením vazivové tkáně. Proto je zjištění stupně postižení jater velmi důležité. Je jednoznačné, že pacienti s diagnózou fibrózy a cirhózy jater mají nejvyšší hodnoty. Stanovení HA tak může lékaři pomoci ve sledování progresu onemocnění.

Literatura

- Adams L. A., Bulsara M., Rossi E., DeBoer B, Speers D., George J. et al.: Hepascore: An accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. Clin. Chem., 2005, 51, 1867-1873.
- Stickel F, Poeschl G., Schuppan D., Conradt C., Strenge-Hesse A., Fuchs FS et al.: Serum hyaluronate correlates with histological progression in alcoholic liver disease. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 2003, 15(9), 945-950.
- Färkkilä M, Rautiainen H, Kärkkäinen P, Karvonen AL, Nurmi H, Niemelä O.: Serological markers for monitoring disease progression in noncirrhotic primary biliary cirrhosis on ursodeoxycholic acid therapy. Liver Int. 2008, 28(6), 787-797.
- Schneiderka P.: Markery jaterní fibrózy, Klin. Biochem. Metab., 16(37), 2008, 1, 14-18.
- Khan J. A., Khan F. A., Dilawar M., Ijaz A., Khan N. A., Mehmood T.: Serum hyaluronic acid as a marker of hepatic fibrosis., J. Coll. Physicians Surg. Pak., 2007, 17(6), 323-326.
- Fraser J. R. E., Gibson P. R.: Mechanism by which food intake elevates circulating levels of hyaluronan in humans. Journal of Internal Medicine, 2005, 258, 460-466.