การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนในซิโนวิโอไซต์จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

นายเอกณรงค์ สินธุวานนท์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

EXPRESSION OF CHONDROGENIC GENES IN SYNOVIOCYTES FROM KNEE OSTEOARTHRITIS PATIENTS

Mr.Eknarong Sintuwanon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Genetics
Department of Botany
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2012
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของ
กระดูกอ่อนในซิโนวิโอไซต์จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

โดย นายเอกณรงค์ สินธุวานนท์

สาขาวิชา พันธุศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ)

....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต)

....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.เพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ)

....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค)

เอกณรงค์ สินธุวานนท์ : การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนในซิโนวิโอไซต์จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม . (EXPRESSION OF CHONDROGENIC GENES IN SYNOVIOCYTES FROM KNEE OSTEOARTHRITIS PATIENTS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ, 62 หน้า.

โรคข้อเสื่อม (osteoarthritis, OA) เป็นโรคในกลุ่มอาการข้ออักเสบ (arthritis) จัดเป็นโรคกระดูกที่พบได้บ่อยในประชากรสูงอายุทั่วไปการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปและการเสื่อมของกระดูกอ่อนเป็นปัจจัยในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ในงานวิจัยนี้ใช้ชีวสารสนเทศน์ในการคัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนจากฐานข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและคนปกติ ผลจากไมโครอาร์เรย์ พบว่ายีน *EBP IMPAD1 PPAPDC1B* และ *FIBIN* มีแนวโน้มที่จะมี ระดับ การแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากนั้นได้ยืนยันผลระดับการแสดงออกในซิโนวิโอไซต์ชนิดบีด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าการแสดงออกของยีน *EBP IMPAD1* และ *PPAPDC1B* ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม (N=33) และกลุ่มควบคุม (N=5) มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ยีน *FIBIN* ซึ่งได้ออกแบบไพรเมอร์โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดโพรบที่จำเพาะต่อยีนค่าการจับของโพรบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มควบคุมมีค่าแตกต่างกันมากกว่า 5 เท่า พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.0228) ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งผลมีความสอดคล้องกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยชีวสารสนเทศน์ เมื่อการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน *FIBIN* ด้วยเทคนิค pyrosequencing และวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ด้วยสถิติแบบ Pearson correlation พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ระหว่างระดับการแสดงออก และการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์การแสดงออกที่เปลี่ยนไปของยีน *FIBIN* อาจเป็นกลไกที่ซิโนวิโอไซต์ชนิดบีใช้ในการซ่อมแซมกระดูกอ่อนที่เกิดการเสียหายของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม หรืออาจเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเกิดกระดูกงอกในข้อเข่าของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ซึ่งเป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีอาการรุนแรงขึ้น และนำไปสู่สภาวะทุพลภาพ อย่างไรก็ตามกลไกของยีน *FIBIN* ที่มีต่อโรคข้อเข่าเสื่อมยังไม่แน่ชัด ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกการทำงานของยีน *FIBIN* เพื่ออาจใช้ในการพัฒนาการรักษาที่มีความจำเพาะต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมได้

ภาควิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา พันธุศาสตร์ ลายมือชื่อ อที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2555

5272689923 : MAJOR GENETICS
KEYWORDS : EXPRESSION / CHONDROGENIC GENES / OSTEOARTHRITIS

EKNARONG SINTUWANON : EXPRESSION OF CHONDROGENIC GENES IN SYNOVIOCYTES FROM KNEE OSTEOARTHRITIS PATIENTS. ADVISOR : ASST. PROF. RACHANEEKORN TAMMACHOTE, Ph.D., 62 pp.

Knee osteoarthritis (knee OA) is the most prevalent form of arthritis in the elderly people. It is characterized by the loss of articular cartilage. Changes in gene expressions and degradation of cartilage are important factors of knee osteoarthritis. In this study, bioinformatics was used to select chondrogenic genes that are differentially expressed between normal controls and knee OA patients from the microarray database. Genes that show statistically different expression data are *EBP, IMPAD1, PPAPDC1B* and *FIBIN*. In this study, type B synoviocytes from knee OA patients and normal controls were used to study differential expression of these genes. Gene expression levels were confirmed by real-time PCR technique. The results showed no significant differences of mRNA expressions of *EBP IMPAD1* and *PPAPDC1B genes* between the knee OA patients (N=33) and normal controls (N=5). The expression results of *FIBIN* gene, whose differences in binding capacity value of the probes between the two groups are more than 5 times, showed that there were significant differences of the mRNA expressions between the two groups (p = 0.0228), which was consistent with microarray data. . However, methylation status in the promoter region of the gene, analyzed by pyrosequencing, showed no significant correlation between the two sample groups (p> 0.05). Changes in the *FIBIN* expressions may be one of the mechanismsthat type B synoviocytes use for repairing loss of cartilage in knee OA patients or may be the cause of osteophyte formation which leads to more severe knee OA. The mechanism of *FIBIN* gene in knee OA pathogenesis remains unclear. Therefore, further study of *FIBIN* gene function is needed and may help developing therapeutic agents that are specific to knee OA.

Department : Botany Student's Signature
Field of Study : Genetics Advisor's Signature
Academic Year : 2012

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์.ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำตลอดการทำวิทยานิพนธ์ ช่วยตรวจสอบ และแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งประกอบด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์ ประธานกรรมการ, อาจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต กรรมการภายในสาขาวิชาพันธุศาสตร์, อาจารย์ ดร.เพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ กรรมการภายในสาขาพันธุศาสตร์ และรองศาสตราจารย์ ดร.บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค อาจารย์ประจำภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย ที่ให้ข้อคิดเห็น และคำแนะนำ รวมถึงความกรุณาในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ชูพงศ์ อิทธิวุฒิ ที่ให้ความรู้เรื่องวิธีที่ใช้ในการศึกษาการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอที่ผ่านกระบวนการ bisulfite treatment และสละเวลาในการทำ pyrosequencing จนงานวิจัยสำเร็จ

ขอขอบคุณนิสิต ป.โท และ ป.เอก ทุกคนในห้องปฏิบัติการทางอณูพันธุศาสตร์ของมนุษย์ ห้อง 306 ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือในการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อนริส สินธุวานนท์ และคุณแม่รักชนก สินธุวานนท์ ที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อระดับปริญญาโท รวมทั้งคอยให้ความรัก และกำลังใจสำหรับการทำงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คุณงามความดี และประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวมาแล้วในข้างต้น

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... จ

กิตติกรรมประกาศ .... ฉ

สารบัญ .... ช

สารบัญตาราง .... ญ

สารบัญรูป .... ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญ 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

ขอบเขตของการวิจัย 3

ข้อจำกัดในการวิจัย 3

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

วิธีดำเนินการวิจัย 4

ลำดับขั้นตอนในการวิจัย 5

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6

โรคข้อเสื่อม 6

อาการของโรคข้อเข่าเสื่อม 9

องค์ประกอบของข้อเข่า 10

แนวทางการศึกษาการแสดงออก และการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีนในโรคข้อเข่าเสื่อม 12

การรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม และความสำคัญของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ 14

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 16

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย 16

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย 17

วิธีดำเนินการวิจัย 18

หน้า

1. ขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ 19

2. การคัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อน 19
2.1 คัดเลือกโดยอาศัยค่าความแตกต่างกันทางสถิติเท่านั้น 20
2.2 คัดเลือกโดยอาศัยความแตกต่างกันทางสถิติประกอบกับการวิเคราะห์ค่าการจับกันของโพรบ 20
3. การเตรียมตัวอย่างซิโนวิโอไซต์ชนิดบีที่ใช้ในการวิจัย 20
3.1 การเริ่มต้นเลี้ยงซิโนวิโอไซต์ชนิดบีจากน้ำข้อเข่า 20
3.2 การเพาะเลี้ยงซิโนวิโอไซต์ชนิดบี 21
4. การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนในซิโนวิโอไซต์ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม 22
4.1 การสกัดอาร์เอ็นเอ 22
4.2 Reverse transcriptionpolymerase chain reaction (RT-PCR) 23
4.3 Real-time PCR 23
4.3.1 การออกแบบไพรเมอร์ 23
4.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของปฏิกริยา (Efficiency) 24
4.3.3 การวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน 26
5. ศึกษาการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม 27
5.1 การสกัดดีเอ็นเอ 27
5.2 Bisulfite converted treatment 27
5.3 ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน 28
5.4 Pyrosequencing 28
6. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออก และการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน 30
บทที่ 4 ผลการศึกษา 31
1. ขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ 31
2. การคัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อน 31

หน้า

2.1 โดยอาศัยค่าความแตกต่างกันทางสถิติเท่านั้น 31
2.2 โดยอาศัยค่าความแตกต่างกันทางสถิติประกอบกับการวิเคราะห์ค่า

การจับกันของโพรบ 32
3. ตัวอย่างซิโนวิโอไซต์ชนิดบีที่ใช้ในการวิจัย 33
4. การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนในซิโนวิโอไซต์ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม 35
4.1 ยีนที่ถูกคัดเลือกโดยอาศัยค่าความแตกต่างกันทางสถิติเท่านั้น 35
4.2 ยีนที่ถูกคัดเลือกโดยอาศัยค่าความแตกต่างกันทางสถิติประกอบกับการวิเคราะห์ค่าการจับกันของโพรบ 38
5. ศึกษาการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม 41
5.1 ตำแหน่งโพรโมเตอร์ของยีน *FIBIN* 41
5.2 Hot start PCR 42
5.3 Pyrosequencing 42
6. ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออก และการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน 43
บทที่ 5 อภิปราย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ 45
อภิปรายผลการทดลอง 45
ผลสรุปผลการวิจัย 47
ข้อเสนอแนะ 48
รายการอ้างอิง 49
ภาคผนวก 53
ภาคผนวก ก 54
ภาคผนวก ข 56
ภาคผนวก ค 57
ภาคผนวก ง 59
ภาคผนวก จ 60
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 62

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับ real-time PCR และความเข้มข้นที่ใช้ในปฏิกริยา 24

2 สารประกอบปฏิกริยา real-time PCR 26

3 สารประกอบปฏิกริยา HS-PCR 29

4 สภาวะในการทำ HS-PCR 30

5 ผลการคัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนโดยอาศัยค่าความแตกต่างทางสถิติเท่านั้น 32

6 ผลการคัดเลือกโดยอาศัยค่าความแตกต่างกันทางสถิติประกอบกับการวิเคราะห์ค่าการจับที่แตกต่างกันของโพรบ 33

7 ค่าการจับของโพรบของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อน และยีนควบคุม 56

8 ค่า Ct ที่ได้จากการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนและยีนควบคุม ด้วยเทคนิค real-time PCR 57

9 อัตราการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของ *FIBIN* ที่ CpG ตำแหน่งต่าง ๆ 60

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1 ลักษณะของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม 10

2 โครงสร้างของข้อเข่า 11

3 ข้อมูลการแสดงออกของยีนในกลุ่มคนปกติ และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม 19

4 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ 29

5 ซิโนวิโอไซต์ชนิดบีที่ถูกเลี้ยงด้วย DMEM 34

6 ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงซิโนวิโอไซต์ 34

7 สภาวะในการทำ real-time PCR เพื่อศึกษาการแสดงออกของ *IMPAD1 EBP* และ *PPAPDC1B* 35

8 ค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยาในการทำ real-time PCR ของยีน *IMPAD1* 36

9 ค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยาในการทำ real-time PCR ของยีน *EBP* 36

10 ค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยาในการทำ real-time PCR ของยีน *PPAPDC1B* 37

11 ค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยาในการทำ real-time PCR ของยีน *GAPDH* 37

12 การแสดงออกของยีนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนในซิโนวิโอไซต์ชนิดบีของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ถูกคัดเลือกโดยอาศัยค่าความแตกต่างกันทางสถิติเท่านั้น 38

13 สภาวะในการทำ real-time PCR เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *FIBIN* 39

14 ค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยาในการทำ real-time PCR ของยีน *FIBIN* 39

15 ค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยาในการทำ real-time PCR ของยีน *GAPDH* 40

16 การแสดงออกของยีนของ *FIBIN* ที่ถูกคัดเลือกโดยอาศัยค่าความแตกต่างกันทางสถิติประกอบการวิเคราะห์ค่าการจับที่แตกต่างกันของโพรบ 40

17 ตำแหน่งโพโมเตอร์ของยีน *FIBIN* 41

18 ตำแหน่ง CpG ที่อยู่บริเวณจุดเริ่มต้นของโพรโมเตอร์ยีน *FIBIN* 41

19 ผลการสังเคราะห์ *FIBIN* จาก bisulfite converted DNA ที่อุณหภูมิ 54 56 58 และ 60 องศาเซลเซียสในการทำ gradient PCR 42

20 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *FIBIN* 43

21 อัตราการเกิดเมทิลเลชันที่ตำแหน่ง CpG บนโพรโมเตอร์ของ *FIBIN* 43

รูปที่ หน้า

22 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน และการเกิดเมทิเลชันบนโพรโมเตอร์ของ *FIBIN* 44

23 เอกสารผ่านการอนุมัติการวิจัยในมนุษย์โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ภาษาไทย 54

24 เอกสารผ่านการอนุมัติการวิจัยในมนุษย์โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ภาษาอังกฤษ 55

25 ผลการทำ HS-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อโพรโมเตอร์ของ *FIBIN* เพื่อส่งตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์บนกลุ่มตัวอย่างโรคข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มควบคุม 59

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

โรคข้อเสื่อม (osteoarthritis, OA) เป็นโรคในกลุ่มอาการข้ออักเสบ (arthritis) (Valdes *et al*., 2006) จัดเป็นโรคกระดูกที่พบได้บ่อยในประชากรสูงอายุทั่วไป เป็นสาเหตุของสภาวะทุพพลภาพอันดับที่ 8 โดยพบในชาวอเมริกันกว่า 27 ล้านคน (Lawrence *et al*., 2008) การเสื่อมมักเกิดขึ้นบริเวณกระดูกอ่อนของข้อต่อในร่างกาย เช่น เข่า สะโพก มือ เท้า หรือแม้แต่กระดูกสันหลัง (Valdes *et al*., 2006) ซึ่งส่งผลต่อสุขภาพร่างกาย สุขภาพจิต และนำไปสู่ปัญหาทางด้านการเงิน เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายสูงในการรักษา (Michaud *et al*., 2006) ถึงแม้ในปัจจุบันจะยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด ของการ เกิดโรค แต่เชื่อว่าเกิดขึ้นจากหลายปัจจัยทั้งปัจจัยทางพันธุกรรม ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับ การเกิดโรคข้อ เข่าเสื่อมถึง 40 % และปัจจัยอื่นๆ โดยพบว่าความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมีความสัมพันธ์กับ อายุที่เพิ่มขึ้นน้ำหนักตัวที่สูงขึ้น และพบมากในกลุ่มประชากรเพศหญิง (Spector and MacGregor, 2004)

สำหรับข้อเสื่อมที่บริเวณเข่านั้น มีงานวิจัยพบว่าเกี่ยวข้องกับโครงสร้างหลายชนิดในข้อเข่ารวมถึง น้ำไขข้อ (synovial fluid) ซึ่งประกอบด้วยเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) และเซลล์ในเยื่อบุรอบข้อ (synovial membrane) ซึ่งมีการแสดงออกของยีนในการ ควบคุมกระบวนการต่างๆ ภายในข้อเข่า (El Hajjaji *et al*., 2005) และมีซิโนวิโอไซต์ ชนิดบี (type B synoviocyte) ที่ยังไม่ทราบชัดเจนว่าเป็นเซลล์ที่มาจากที่ใด แต่คาดว่าเป็นเซลล์ที่หลุดออกมาจากเยื่อบุรอบข้อ และยังไม่ทราบถึงหน้าที่ และบทบาทซึ่งมีผลต่อโรคข้อเข่าเสื่อมอย่างชัดเจน แต่จากการศึกษาซิโนวิโอไซต์ ชนิดบีที่สกัดจากน้ำไขข้อพบว่าเป็นเซลล์ที่มีชีวิต และมีลักษณะเป็นเซลล์เกี่ยวพัน (fibroblast) เหมือนกับเซลล์ในเยื่อบุรอบข้อ (Scanu *et al*., 2007) ดังนั้นเป็นไปได้ว่าซิโนวิโอไซต์ที่พบในน้ำไขข้ออาจเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

เนื่องด้วยสาเหตุหนึ่งของโรคข้อเสื่อมที่เกิดจากปัจจัยทางด้านพันธุกรรมดังนั้นจึงมีการศึกษาหาความแตกต่าง ระหว่าง ผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม และคนปกติทั้งในระดับ genome transcriptome และ proteome ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือด้านชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics) โดยนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบ คำนวณ และประเมินผลข้อมูลที่ได้ เพื่อหายีนที่คาดว่าจะมี ความเกี่ยวข้อง

กับโรคข้อเสื่อม จากนั้นทำการยืนยันความเกี่ยวข้องของยีนนั้น ๆ โดยนำมาศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการ (Graeber and Eisenberg, 2001)

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมเปรียบเทียบกับคนปกติในเซลล์กระดูกอ่อนโดยการใช้ไมโครอาร์เรย์ (microarray) และวิเคราะห์ผลด้วยชีวสารสนเทศ พบว่าระดับการแสดงออกของยีนในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม แตกต่างจากคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แบ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก (bone formation) 7 ยีน และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์คอลลาเจน (collagen encoding) 4 ยีน โดยไม่พบการกลายเกิดขึ้นที่ยีนดังกล่าว (Karlsson *et al.*, 2010) ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) ที่เป็นกระบวนการสำคัญในการควบคุมความสมดุลของกระบวนการสร้าง (anabolism) และสลาย (catabolism) ภายในเซลล์ จากการศึกษาการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน interleukin-1 beta (*IL1B*) ในเซลล์กระดูกอ่อนของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม และคนปกติ พบว่าในคนปกติ *IL1B* มีดีเอ็นเอเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ เพื่อควบคุมให้การแสดงออกของยีนในกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลาย (catabolic gene) เช่น ยีนที่สร้างโปรตีนกลุ่ม matrix metalloproteinase (MMP) และ aggrecanase (ADAMTS-4 และ ADAMTS-5) เป็นไปอย่างเหมาะสม ในขณะที่โพรโมเตอร์ของ ยีน *IL1B* ในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมเกิดดีเอ็นเอดีเมทิลเลชัน (DNA demethylation) ส่งผลให้ระดับการแสดงออกของเอนไซม์ย่อยสลายสูงขึ้น ซึ่งกลายเป็นความผิดปกติของระดับการแสดงออก และส่งผลให้เกิดความผิดปกติของความสมดุลระดับเซลล์ (Hashimoto *et al.*, 2009) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าถึงแม้ยีนจะไม่เกิดการกลายขึ้น แต่หากเกิดความผิดปกติที่การควบคุมการแสดงออกของยีน จะทำให้เกิดการแสดงออกที่หรือน้อยเกินไป เช่น ความผิดปกติที่กระบวนการหลังการถอดรหัส และโพรโมเตอร์เมทิลเลชัน ทำให้การทำงานของโปรตีนหรือระดับการแสดงออกของโปรตีนที่ผิดไปจากเดิม ซึ่งจะนำไปสู่การเกิดความผิดปกติในร่างกายจนก่อให้เกิดโรค (Garcia-Blanco *et al.*, 2004)

สาเหตุที่กล่าวมาข้างต้นอาจทำให้เกิดความผิดปกติในการสร้างโปรตีน หรือองค์ประกอบที่สำคัญในกระบวนการสร้างกระดูกอ่อน เป็นผลทำให้กระดูกอ่อนบริเวณข้อบางลงจนไม่สามารถทำหน้าที่ลดแรงกลที่เกิดขึ้นระหว่างกระดูกข้อต่อทั้งสองชิ้นนำไปสู่อาการอักเสบ ปวดบวม ข้อติด หากมีการเสื่อมมากขึ้นของกระดูกอ่อน ผู้ป่วยจะมีอาการเจ็บปวดมากขึ้น บางครั้งอาจเกิดการเสียรูปแบบของข้อต่อจนผู้ป่วยอาจไม่สามารถใช้ชีวิตประจำวันได้ตามปกติ (Valdes *et al.*, 2006) ดังนั้นการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มควบคุมในซิโนวิโอไซต์ชนิดบีครั้งนี้อาจเป็นข้อมูลพื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับสาเหตุการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมของผู้ป่วยในประเทศ

ไทย ซึ่งเมื่อทราบสาเหตุที่แน่ชัดของการเกิดโรคจะทำให้สามารถนำไปใช้รักษาโรคข้อเข่าเสื่อมได้ต่อไปในอนาคต นอกจากนี้ยังเป็นการศึกษาการแสดงออกของยีนในซิโนวิโอไซต์ ชนิดบีเพื่อให้ทราบว่ามีการแสดงออกไปในทิศทางใดในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกในซิโนวิโอไซต์ ชนิดบีจากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

ขอบเขตของการวิจัย

เลี้ยงซิโนวิโอไซต์ชนิดบีที่ได้จากน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และผู้ป่วยเอ็นไขว้หน้าขาด เพื่อใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนด้วยเทคนิค real-time PCR จากนั้นยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มควาบคุมที่ระดับความเชื่อมั่นมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ จะถูกวิเคราะห์การเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีนด้วยเทคนิค pyrosequencing และวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างระดับการแสดงออกกับการเปลี่ยนแปลงของเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน

ข้อจำกัดในการวิจัย

เนื่องจากงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูกอ่อนในซิโนวิโอไซต์ชนิดบีที่พบในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ซึ่งปริมาณตั้งต้นของซิโนวิโอไซต์ชนิดบีในน้ำไขข้อมีปริมาณน้อยมาก ผู้วิจัยจึงต้องทำการเลี้ยงเซลล์เพื่อเพิ่มปริมาณของซิโนวิโอไซต์ชนิดบีในห้องปฏิบัติการ แต่ไม่เกิน passage ที่ 3 เพื่อป้องกันการแสดงออกเปลี่ยนไปจนแตกต่างจากการแสดงออกของเซลล์ที่อยู่ในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

- ซิโนวิโอไซต์ชนิดบี คือ เซลล์ชนิดเกี่ยวพัน (fibroblast) ที่พบในน้ำไขข้อมีหน้าที่สำคัญในการสร้าง extracellular matrix (ECM) และ hyarulonic acid ซึ่งเป็นสารหล่อลื่นภายในข้อเข่า
- real-time PCR คือ เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนซึ่งมีความแม่นยำสูง สามารถใช้แยกความแตกต่างในการแสดงออกของยีนที่มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยได้ โดยอาศัยการใช้สารเรืองแสง (fluorescence reporter)ไปจับที่บริเวณ PCR product ทำให้สามารถวัดปริมาณของ PCR product ที่เกิดขึ้นได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

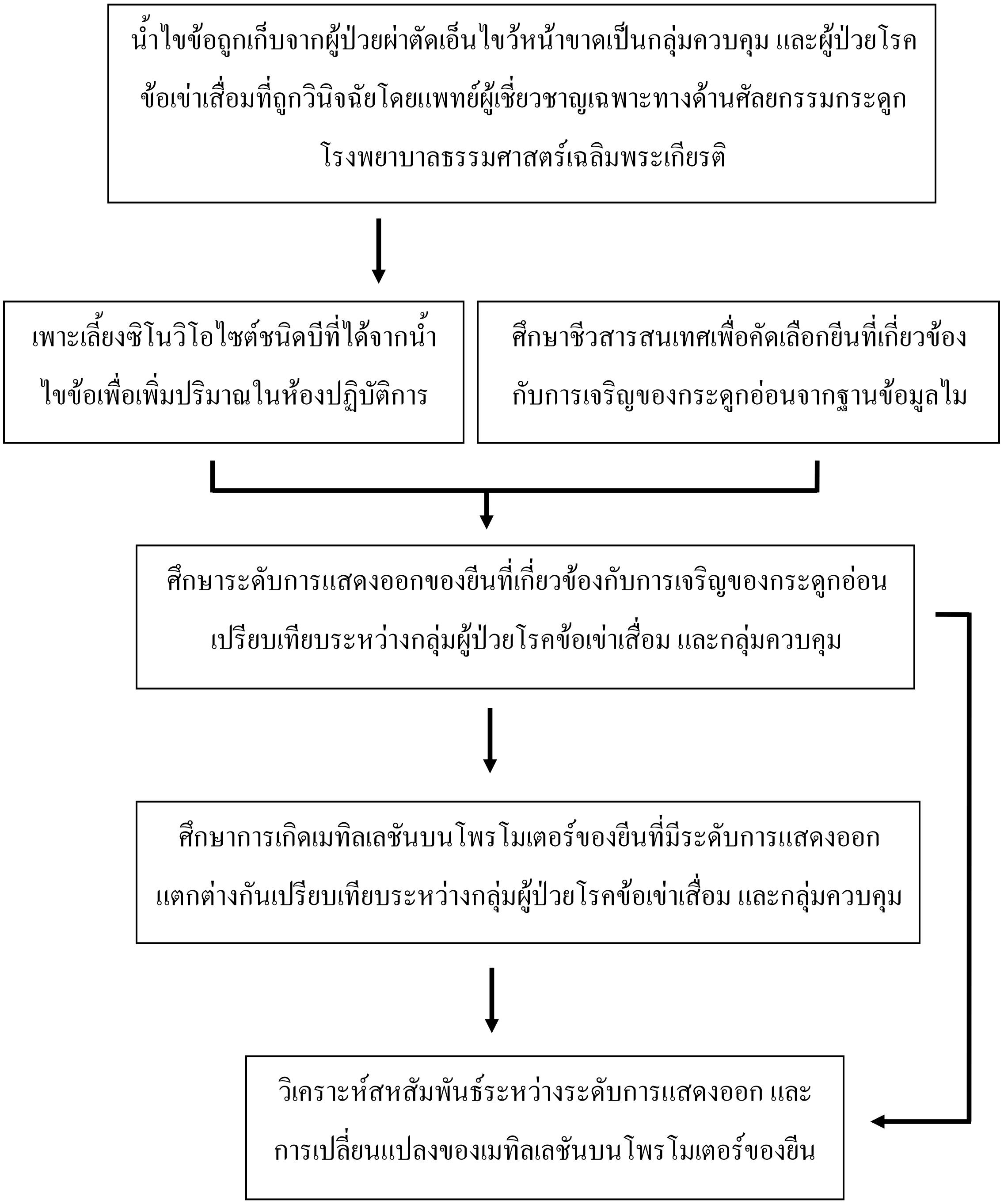
1. ทราบลักษณะการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนในซิโนวิโอไซต์ชนิดบีที่พบในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม
2. สามารถนำผลการวิจัยไปเป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพ (biomarker) เพื่อร่วมใช้ในการวินิจฉัยโรคข้อเข่าเสื่อมระยะเริ่มต้น ในผู้ป่วยยังที่ไม่แสดงอาการของโรคอย่างชัดเจน

วิธีดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยเรื่องนี้ แบ่งออกเป็น 6 ส่วน คือ

1. ขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ
2. การศึกษาชีวสารสนเทศเพื่อหายีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนจากการแสดงออกของยีนในเซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์เยื่อบุรอบข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม
3. เพาะเลี้ยงซิโนวิโอไซต์ชนิดบีที่พบในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และผู้ป่วยเอ็นไขว้หน้าขาดเป็นกลุ่มควบคุม
4. การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนของซิโนวิโอไซต์ชนิดบีที่พบในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม
    - 4.1 สกัดอาร์เอ็นเอจากซิโนวิโอไซต์ชนิดบี และทำ reverse transcription
    - 4.2 ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนด้วยเทคนิค real-time PCR
    - 4.3 วิเคราะห์การแสดงออกของยีนเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มควบคุมด้วยวิธีการทางสถิติ
5. ศึกษาการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีนที่มีระดับการแสดงออกแตกต่างกันเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มควบคุม
    - 5.1 สกัดดีเอ็นเอจากซิโนวิโอไซต์ชนิดบี และทำ bisulfite treatment
    - 5.2 ศึกษาการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีนด้วยเทคนิค pyrosequencing
    - 5.3 วิเคราะห์การเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีนเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มควบคุม
6. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออก และการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน

ลำดับขั้นตอนในการวิจัย



El Hajjaji, H., Cole, A. A. and Manicourt, D. H., 2005. Chondrocytes, synoviocytes and dermal fibroblasts all express PH-20, a hyaluronidase active at neutral pH. *Arthritis Res Ther* 7(4): R756-768.

Garcia-Blanco, M. A., Baraniak, A. P. and Lasda, E. L., 2004. Alternative splicing in disease and therapy. *Nat Biotechnol* 22(5): 535-546.

Graeber, T. G. and Eisenberg, D., 2001. Bioinformatic identification of potential autocrine signaling loops in cancers from gene expression profiles. *Nat Genet* 29(3): 295-300.

Hashimoto, K., Oreffo, R. O., Gibson, M. B., Goldring, M. B. and Roach, H. I., 2009. DNA demethylation at specific CpG sites in the IL1B promoter in response to inflammatory cytokines in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 60(11): 3303-3313.

Karlsson, C.*, et al.*, 2010. Genome-wide expression profiling reveals new candidate genes associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 18(4): 581-592.

Lawrence, R. C.*, et al.*, 2008. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum* 58(1): 26-35.

Michaud, C. M.*, et al.*, 2006. The burden of disease and injury in the United States 1996. *Popul Health Metr* 4: 11.

Scanu, A.*, et al.*, 2007. [Synoviocyte cultures from synovial fluid]. *Reumatismo* 59(1): 66-70.

Spector, T. D. and MacGregor, A. J., 2004. Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage* 12 Suppl A: S39-44.

Valdes, A. M.*, et al.*, 2006. Reproducible genetic associations between candidate genes and clinical knee osteoarthritis in men and women. *Arthritis Rheum* 54(2): 533-539.

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคข้อเสื่อม

โรคข้อเสื่อม (osteoarthritis, OA) เป็นโรคพหุปัจจัย (multifactorialdisease) ซึ่งเกิดเฉพาะข้อชนิดที่มีเยื่อหุ้ม (synovial joint) ในปัจจุบันยังคงไม่ทราบถึงสาเหตุ และกลไกในการเกิดโรคอย่างชัดเจนจากการศึกษาในประชากรชาวอเมริกันพบว่าโรคข้อเข่าเสื่อมเป็นสาเหตุของสภาวะทุพพลภาพอันดับที่ 8ของโลก และพบในชาวอเมริกันกว่า 27 ล้านคน (Lawrence *et al.*, 2008) ส่วนมากอยู่ในช่วงอายุ 55-64 ปี ซึ่งอายุเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการแสดงอาการของโรคข้อเข่าเสื่อมถึง 44.8 % และโอกาสในการเกิดโรคจะเพิ่มมากขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะหลัง 50 ปีขึ้นไปซึ่งความเสื่อมสามารถเกิดในหลายข้อพร้อมกัน (Murphy *et al.*, 2008) นอกจากอายุแล้วยังมีปัจจัยอื่นที่อาจส่งผลให้เกิดการเสื่อมของข้อ เช่น น้ำหนัก

จากการศึกษาในกลุ่มประชากรที่มีน้ำหนักตัวสูงอายุระหว่าง 25-34 ปี เปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติในช่วงอายุเดียวกัน พบว่าอุบัติการณ์ของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมไม่มีความแตกต่างกัน แต่ในกลุ่มประชากรที่มีน้ำหนักตัวมากอายุระหว่าง 55-64 ปีพบว่าอุบัติการณ์ของการเกิดโรคสูงกว่ากลุ่มคนปกติในช่วงอายุเดียวกัน (Rodriguez-Fontenla *et al.*, 2012) โดยจากอุบัติการณ์การเกิดโรคพบว่ามีจำนวนผู้ป่วยเพศชายซึ่งมีน้ำหนักมากเพิ่มขึ้น 0.37 % ต่อปี ในขณะที่จำนวนผู้ป่วยเพศหญิงซึ่งมีน้ำหนักมากเพิ่มขึ้น 1.02 % ต่อปี (Losina *et al.*, 2012) ด้วยเหตุนี้จึงเชื่อว่าการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในคนที่มีน้ำหนักสูงอาจเกิดจากสาเหตุอื่นเข้ามาเกี่ยวข้องเช่น เพศ

จากการศึกษาในกลุ่มประชากรช่วงอายุตั้งแต่ 55 ปีขึ้นไปพบว่าในเพศหญิงมีอุบัติการณ์การเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ความรุนแรงของโรคและจำนวนของบริเวณที่เกิดการเสื่อมมากกว่าเพศชายคาดว่าเกี่ยวข้องกับฮอร์โมนเอสโตรเจนซึ่งทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการซ่อมแซม และเจริญเติบโตของกระดูกอ่อน (chondrogenesis) ทั้งในเพศหญิง และชาย (Cho *et al.*, 2010) เนื่องจากในหญิงสูงอายุจะเข้าสู่วัยหมดประจำเดือน และเกิดภาวะการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน จึงอาจนำไปสู่การเกิดโรคข้อเสื่อม (Losina *et al.*, 2012) จากการศึกษาอัตราการเกิดโรคข้อเสื่อมในหนูพบว่าเอสโตรเจนสามารถป้องกันการเกิดโรคข้อเสื่อม ในขณะที่เมื่อระดับของเอสโตรเจนลดลง จะทำให้การทำงานของเทสโทสเทอโรน

(testosterone) และโพรเจสเทอโรน (progesterone) ซึ่งปีนตัวเร่งให้เกิดข้อเสื่อมในหนูทำงานได้มากขึ้น (Schmidt *et al.*, 2005)

นอกจากนั้นประวัติการบาดเจ็บที่ข้อเข่ายังส่งผลให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคถึง 56.8 % เนื่องจากการบาดเจ็บทำให้เกิดการหย่อนหรือหลวมของข้อแบบเรื้อรัง จากนั้นหินปูนจะเข้ามาเกาะที่บริเวณหมอนรองกระดูกทำให้เกิดอาการข้อติด และอักเสบในเวลาต่อมา ซึ่งนำไปสู่การเกิดโรคข้อเสื่อม (Murphy *et al.*, 2008) ถึงแม้ไม่เคยมีประวัติการบาดเจ็บมาก่อน แต่หากใช้งานข้อต่อบ่อยครั้งจะส่งผลให้เกิดความเสื่อมได้เร็วกว่าปกติ เช่น นักกีฬา หรืออาชีพที่ต้องทำงานใช้ร่างกายอย่างหนัก ซึ่งโดยทั่วไปในบริเวณข้อจะมีความคงทนอยู่ในระดับหนึ่งในภาวะการใช้งานทั่วไปหรือหากการใช้งานนั้นไม่เกินกว่าช่วงความคงทนทางกายวิภาคปกติ แม้ว่าจะเป็นงานที่รุนแรงหรือเป็นการทำงานอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานก็อาจไม่สามารถทำให้เกิดความเสียหายบริเวณข้อได้ โดยระดับความคงทนของข้อต่อร่างกายจะมีความแตกต่างกันในแต่ละบุคคล ซึ่งความระดับความคงทนของข้อต่อที่แตกต่างกันนั้นอาจเกิดจากพหุสัณฐานทางพันธุกรรม (Evcik *et al.*, 2006) เนื่องจากในจีโนมของมนุษย์ทุก 100-300 คู่เบส จะพบ single nucleotide polymorphism (SNP) อย่างน้อย 1 ตำแหน่ง (Ke *et al.*, 2008) ดังนั้นการเกิดโรคข้อเสื่อมอาจมีปัจจัยทางพันธุกรรมเข้ามาเกี่ยวข้อง

ได้มีการศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวนมาก รวมทั้งการศึกษาในแฝดร่วมไข่ (homozygotic twins) พบว่า มีความเกี่ยวข้องทางพันธุกรรมของการเกิดโรคข้อเสื่อมมีค่าประมาณ 35-60% โดยเฉพาะโรคข้อเข่าเสื่อม มีความเกี่ยวข้องทางพันธุกรรมสูงถึง 40 % (Spector and MacGregor, 2004) คาดว่ามีมากกว่า 80 ยีน และมี SNP อย่างน้อย 25,000 ตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเป็นข้อเข่าเสื่อม (Stern *et al.*, 2003) เช่น SNP ในยีน *estrogen receptor-beta* (*ER-beta*) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณในการเริ่มต้นกระบวนการซ่อมแซมกระดูกอ่อนผิวข้อ มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในชาวเกาหลี (Lee *et al.*, 2013) SNP ที่ตำแหน่ง 5’-untranslated region (5’-UTR) ในยีน *growth differentiation factor 5* (*GDF5*) ซึ่งทำหน้าที่สำคัญในการสร้างและซ่อมแซมกระดูกอ่อนผิวข้อ มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเสื่อมในชาวเอเชียและยุโรป (Southam *et al.*, 2007) และ SNP ในยีน *asporin* (*ASPN*) ซึ่งมีหน้าที่ในการสังเคราะห์ ECM ที่เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในชาวจีนและญี่ปุ่น (Iida *et al.*, 2006)

การเกิดพหุสัณฐานในยีนในระดับดีเอ็นเออาจส่งผลต่อการทำงานในระดับการแสดงออก หรือทำให้โปรตีนเกิดความผิดปกติ และนำไปสู่การเสื่อมสภาพของกระดูกอ่อนผิวข้อ (articular cartilage)

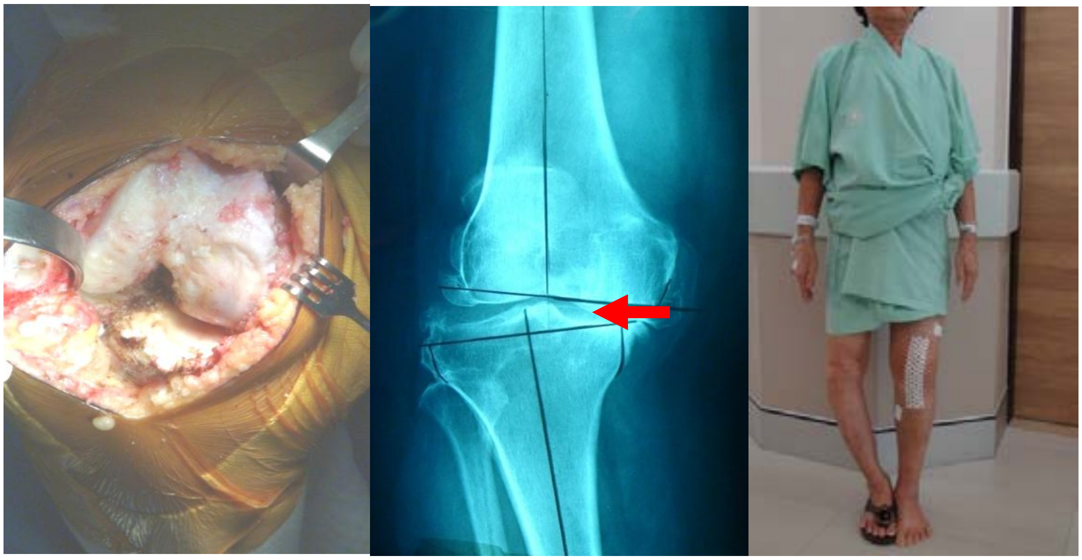
จากการศึกษาการแสดงออกของยีนในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมเปรียบเทียบกับคนปกติในเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) โดยไมโครอาร์เรย์ (microarray) และวิเคราะห์ผลด้วยชีวสารสนเทศ (bioinformatics) พบว่าระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม แตกต่างจากในกลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แบ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก (bone formation) 7 ยีน และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์คอลลาเจน (collagen encoding) 4 ยีน โดยไม่พบการกลายเกิดขึ้นที่ยีนดังกล่าว (Karlsson *et al.*, 2010) ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป็นกระบวนการสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนในสิ่งมีชีวิต โดยการเติมหมู่เมทิลที่ตำแหน่งไซโตซีน (cytosine) บนลำดับ CpG ของสายดีเอ็นเอ ให้กลายเป็นเมทิลไซโตซีน (5-methylcytosine, ^{me}C) โดยปกติบริเวณโพรโมเตอร์ของยีนจะมีลำดับ CpG เป็นองค์ประกอบมากกว่า 30 % ซึ่งจะเรียกบริเวณดังกล่าวว่า CpG island การเติมหมู่เมทิลบน CpG island นั้นจะเหนี่ยวนำให้ methyl-CpG-binding domain containing protein (MBD) เข้ามาจับยังบริเวณดังกล่าวจากนั้น DNA methyltransferase (DNMT) จะเข้ามาจับกับ MBD จนเป็น complex ที่บริเวณของโพรโมเตอร์ ส่งผลให้ transcription factor (TF) ไม่สามารถเข้ามาจับเพื่อเริ่มต้นกระบวนการถอดรหัส (transcription) ได้ (Barter *et al.*, 2012) จากการศึกษาการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน *interleukin-1 beta* (*IL1B*) ในเซลล์กระดูกอ่อนโดยเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม และคนปกติ พบว่าในคนปกติยีน *IL1B* มีดีเอ็นเอเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ เพื่อควบคุมให้เกิดการแสดงออกของยีนในกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลาย (catabolic gene) เช่น ยีนที่สร้างโปรตีนกลุ่ม matrix metalloproteinase (MMP) และ aggrecanase (ADAMTS-4 และ ADAMTS-5) เป็นไปอย่างเหมาะสม ในขณะที่บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *IL1B* ในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมเกิดดีเอ็นเอดีเมทิลเลชัน ส่งผลให้ระดับการแสดงออกของเอนไซม์ย่อยสลายสูงขึ้น ซึ่งกลายเป็นความผิดปกติของระดับการแสดงออก และส่งผลให้เกิดความผิดปกติของความสมดุลระดับเซลล์ (Hashimoto *et al.*, 2009) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าถึงแม้ยีนจะไม่เกิดการกลายขึ้น แต่หากเกิดความผิดปกติที่การควบคุมการแสดงออกของยีน ทำให้เกิดการแสดงออกที่มากหรือน้อยเกินไป เช่น ความผิดปกติที่กระบวนการหลังการถอดรหัส และโพรโมเตอร์เมทิลเลชัน ทำให้การทำงานของโปรตีนหรือระดับการแสดงออกของโปรตีนที่ผิดไปจากเดิม ซึ่งจะนำไปสู่การเกิดความผิดปกติในร่างกายจนก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ (Garcia-Blanco *et al.*, 2004)

อาการของโรคข้อเข่าเสื่อม

การศึกษาโรคข้อเข่าเสื่อมเริ่มตั้งแต่ปี ค.ศ.1920 โดยเริ่มศึกษาในผู้ป่วยที่มาพบแพทย์เพื่อรักษาอาการปวดข้ออย่างรุนแรง เมื่อการศึกษาขยายวงกว้างออกไปพบว่าผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมในระยะเริ่มต้นมากกว่า 15 % ที่ถูกวินิจฉัยจากภาพรังสีไม่มีความเจ็บปวด หรือแสดงอาการให้เห็นถึงความผิดปกติ (Rodriguez-Fontenla *et al.*, 2012)

ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมในระยะแรกจะเกิดกระดูกงอก (osteophyte) ขนาดเล็ก แต่ยังคงเหลือพื้นที่ว่างระหว่างข้อเข่า มีรอยแตกขนาดเล็กบนกระดูกอ่อนผิวข้อ และมีอาการบวมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่บริเวณ extracellular matrix (ECM) ทำให้เกิดความไม่เรียบขึ้นที่กระดูกอ่อน ระยะต่อมาจะพบกระดูกงอกบริเวณขอบข้ออย่างชัดเจน เริ่มมีการสูญเสียกระดูกอ่อนผิวข้อ (ดังรูป 1ก) ทำให้อาจเกิดเสียงดังขณะขยับข้อเนื่องจากพื้นที่ว่างระหว่างข้อต่อเริ่มน้อยลง เมื่อเข้าสู่ระยะที่ 3 พื้นที่ระหว่างข้อต่อลดลงไปอย่างมาก ผู้ป่วยเริ่มแสดงอาการข้อติด มีความเจ็บปวดในขณะที่ยืดหรืองอเข่า เนื่องจากกระดูกอ่อนที่คอยป้องกันการชนกันของกระดูกซึ่งมีเส้นประสาทอยู่เป็นจำนวนมากลดน้อยลง ทำให้เกิดการอักเสบที่บริเวณข้อเข่า และสุดท้ายจะสูญเสียพื้นที่ทั้งหมดระหว่างข้อต่อ (ดังรูป 1ข) เนื่องจากสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อ ผู้ป่วยมีอาการข้อยึด ไม่สามารถยืดหรืองอเข่า มีการอักเสบในข้อเข่าอย่างรุนแรง ผู้ป่วยจะเจ็บปวดขณะที่พยายามเคลื่อนไหว ในผู้ป่วยบางรายอาจไม่สามารถใช้ชีวิตประจำวันตามปกติได้ และเมื่ออาการรุนแรงมากขึ้น จะเกิดการบิดงอของข้อเข่า และเสียรูปแบบของข้อต่อ (Kim *et al.*, 2011) (ดังรูป 1ค)



(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 1 ลักษณะของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

(ก) การผ่าตัดเปลี่ยนผิวข้อของกระดูกอ่อนที่ไม่สามารถลดแรงกลระหว่างข้อเข่าได้

(ข) ลูกศรสีแดงแสดงถึงการสูญเสียช่องว่างภายในข้อเข่าเนื่องจากการสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อ

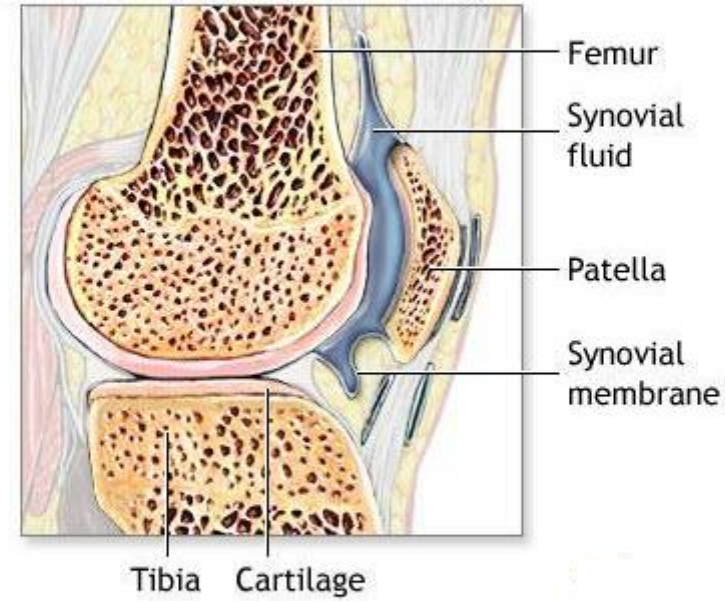
(ค) ผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงจะเกิดการบิดงอของข้อเข่าจนทำให้เสียรูปแบบของข้อต่อ

(รูปถ่ายโดย รศ.นพ.ณัฐพล ธรรมโชติ)

องค์ประกอบของข้อเข่า

หัวเข่าเป็นข้อชนิดที่มีเยื่อหุ้มประกอบด้วยเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์กระดูกอ่อน ที่รวมตัวกันเป็นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนผิวข้อทำหน้าที่ในการลดแรงกลระหว่างข้อเข่า ป้องกันความเสียหายที่เกิดจากการกระทบกันของกระดูกข้อต่อ และเซลล์ในเยื่อบุรอบข้อ (synovial membrane) ซึ่งทำหน้าที่ในการสร้างน้ำข้อเข่า (knee synovial fluid) ดังรูปที่ 2 เพื่อลดแรงเสียดทานในระหว่างเสียดสีกันของกระดูกอ่อนผิวข้อ โดยองค์ประกอบของเยื่อบุรอบข้อประกอบด้วย ซิโนวิโอไซต์ชนิดเอ (type A synoviocyte หรือ synovial macrophage หรือ macrophage-like synoviocyte) ซึ่งเป็นมาโครฟาจแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทำหน้าที่ในการเลือกผ่านการเข้าออกของสารภายในข้อเข่า (Edwards, 2000) สามารถตรวจสอบได้ด้วยแอนติบอดี CD14 และ CD68 ซึ่งจำเพาะต่อแอนติเจนในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นกระบวนการอักเสบ (Hunyadi *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2007) และซิโนวิโอไซต์ชนิดบี (type B synoviocyte หรือ synovial fibroblast หรือ fibroblast-like synoviocyte) เป็นเซลล์ชนิดไฟโบรบลาสเนื่องจากมีลักษณะเป็นรูปกระสวย มีเพียง 1 นิวเคลียสในเซลล์ มีการเรียงตัวไปในทิศทางเดียวกันใน

เยื่อบุรอบข้อ (Edwards, 2000) และสามารถตรวจสอบได้ด้วยแอนติบอดี CD44 VCAMP-1 (CD54) CD55 CD90 (Thy-1) และ cadherin-11 ที่มีความจำเพาะต่อการกระตุ้นการสังเคราะห์ ECM ซึ่งเป็นหน้าที่เฉพาะของเซลล์เกี่ยวพัน (Rokhlin and Cohen, 1996; Lee *et al.*, 2012)



รูปที่ 2 โครงสร้างของข้อเข่า

(http://arthritis.about.com/od/arthritisbyanatomy)

ในเยื่อบุรอบข้อจะมีซิโนวิโอไซต์ชนิดบีมากถึง 95 % และมีซิโนวิโอไซต์ชนิดเอประมาณ 3 % ในขณะที่อีกประมาณ 2 % เป็นเซลล์ของหลอดเลือด (blood vessel) (Edwards, 2000) ทั้งเซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์ในเยื่อบุรอบข้อต่างมีการแสดงออกของยีนในการควบคุมกระบวนการต่างๆ ภายในข้อเข่า (El Hajjaji *et al.*, 2005) ได้แก่กระบวนการในการสร้าง (anabolism) โดยอาศัย anabolic factor ต่าง ๆ เช่น transforming growth factor-β (TGF-β) bone morphogenic proteins (BMPs) cartilage-derived morphogenic proteins (CDMPs) insulin-like growth factor (IGFs) connective-tissue growth factor (CTGF) hepatocyte growth factor (HGF) และ fibroblast growth factor (FGF) ซึ่งจัดอยู่ใน growth factor family มีหน้าที่สำคัญในการสร้าง ซ่อมแซม และกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ของกระดูกอ่อน นอกจากนั้นยังมีกระบวนการสลาย (catabolism) โดยอาศัย catabolic factor ซึ่งส่วนใหญ่เป็น protease เช่น collagenase gelatinasemembrane-type MMP (MT-MMP) adamalysin (ADAM และตระกูล ADAMTS) serine protease และ thiol protease เพื่อกำจัดส่วนที่เกิดการเสียหายไประหว่างการเคลื่อนที่ของข้อเข่า หรือเพื่อลดความหนืดของน้ำในข้อเข่า โดยความสมดุลของกระบวนการสร้าง และสลาย

ภายในข้อเข่าที่ถูกควบคุมด้วยเซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์เยื่อบุรอบข้อจะทำหน้าที่รักษาสภาพข้อเข่าให้อยู่ในสภาวะปกติ (Martel-Pelletier *et al.*, 2008)

จากการศึกษาซิโนวิโอไซต์ในน้ำข้อเข่านั้น ยังไม่ทราบชัดเจนว่าเป็นเซลล์ที่มาจากที่ใด แต่คาดว่าเป็นเซลล์ที่หลุดออกมาจากเยื่อบุรอบข้อ และยังไม่ทราบถึงหน้าที่ และบทบาทซึ่งมีผลต่อโรคข้อเข่าเสื่อมอย่างชัดเจน แต่เมื่อสกัดซิโนวิโอไซต์จากน้ำไขข้อเพื่อนำมาศึกษาพบว่าเป็นเซลล์ที่ยังคงมีชีวิต และมีลักษณะของเซลล์เป็นเซลล์เกี่ยวพันเหมือนกับซิโนวิโอไซต์ชนิดบีในเยื่อบุรอบข้อ เนื่องจากมีแอนติเจน CD90 CD55 และ intracellular prolyl-4-hydroxylase (Scanu *et al.*, 2007) ดังนั้นเป็นไปได้ว่าซิโนวิโอไซต์ชนิดบีที่พบในน้ำไขข้ออาจเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

แนวทางการศึกษาการแสดงออก และการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีนในโรคข้อเข่าเสื่อม

ชีวสารสนเทศเป็นศาสตร์ที่ใช้ในการบริหารจัดการข้อมูลทางด้านชีววิทยา ซึ่งมีขนาดของข้อมูลเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว และส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการวิจัยทางด้านจีโนมที่มีเป้าหมายหลักในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดในจีโนมมนุษย์ ชีวสารสนเทศจึงถูกพัฒนามาเพื่อจัดเก็บข้อมูล จัดระบบฐานข้อมูล สืบค้นข้อมูล รวมไปจนถึงวิเคราะห์ข้อมูล ซึ่งทำให้สะดวกต่อการทำวิจัยในปัจจุบัน (Graeber and Eisenberg, 2001; Giacomelli and Nicolini, 2006; Fan *et al.*, 2008) เช่น การวิเคราะห์จากฐานข้อมูลไมโครอาร์เรย์

ไมโครอาร์เรย์เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน เพราะสามารถวิเคราะห์การแสดงออกของยีนจำนวนมากภายในเซลล์ในเวลาเดียวกัน (high throughput screen) จึงสามารถใช้เปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีนระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์ของผู้ป่วย โดยข้อมูลที่ได้รับจากไมโครอาร์เรย์มีจำนวนมาก (Yoo *et al.*, 2011) ดังนั้นจึงต้องอาศัยเทคนิคชีวสารสนเทศเพื่อเข้ามาช่วยในการวิเคราะห์ข้อมูล เช่น จากการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนในเยื่อบุข้อด้วยวิธีไมโครอาร์เรย์เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมกับกลุ่มประชากรควบคุม จากนั้นวิเคราะห์ผลการแสดงออกผ่านเทคโนโลยีชีวสารสนเทศ พบว่า 542 ยีน จากทั้งหมด 33,000 ยีน มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นมากกว่า 95 % โดย 314 ยีน จาก 542 ยีน มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเมื่อเทียบกับกลุ่มคนปกติ และอีก 228 ยีนมีการแสดงออกลดลง (Del Rey *et al.*, 2012) ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มยีนตามหน้าที่และการทำงานออกเป็นประเภทต่าง ๆ รวมถึงยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กระดูกอ่อน (chondrogenic gene) เช่น chondrosarcoma เซลล์กระดูกอ่อน และรวมไปถึงเซลล์เกี่ยวพัน บริเวณต่าง ๆ โดยจากการศึกษาพบว่า mesenchymal stem cell (MSC) และ

เซลล์ที่พัฒนามาจาก MSC มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อน ซึ่งยีนดังกล่าวมีหน้าที่สำคัญในการสังเคราะห์ และซ่อมแซมกระดูกอ่อนเมื่อเกิดการเสียหายอันเนื่องมาจากแรงกลภายในข้อต่อของร่างกาย ความผิดปกติของยีนในกลุ่มนี้อาจเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม เนื่องจากความเสียหายของกระดูกอ่อนในข้อเข่าจะเกิดการสะสม และเกิดการสูญเสียคุณสมบัติทางกายภาพจนไม่สามารถรับแรงกลได้ตามปกติ (Gyurjan *et al.*, 2007) ตัวอย่างของยีนที่เกิดความผิดปกติแล้วอาจเป็นสาเหตุของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ได้แก่

ยีน *inositol monophosphatase domain containing 1* (*IMPAD1*) หรือ *joints abnormal with splitting* (*JAWS*) มีการศึกษาพบว่า ในหนูปรับแต่งพันธุกรรมให้เกิดความผิดปกติของ *IMPAD1* มีกระดูกในส่วนต่าง ๆ ตามร่างกายสั้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกันหนูปกติ ดังนั้นคาดว่ายีน *IMPAD1* มีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ ซ่อมแซมและการจัดรูปแบบของกระดูกอ่อน (Sohaskey *et al.*, 2008)

ยีน *emopamilbinding protein* (*EBP*) ทำหน้าที่ในการขนส่งโปรตีนภายในเซลล์ในกระบวนการสังเคราะห์กระดูกอ่อนในมนุษย์ เมื่อยีนเกิดความผิดปกติทำให้เกิดโรค chondrodysplasiapunctata (CDP) ซึ่งผู้ป่วยจะมีลักษณะผมร่วง นิ้วมือ นิ้วเท้าสั้น และเกิดอาการเสื่อมตามข้อตั้งแต่อายุยังน้อย (Ikegawa *et al.*, 2000) ดังนั้นการแสดงออกที่เปลี่ยนไปของ *EBP* อาจทำให้เกิดโรคข้อเสื่อม

ยีน *phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1B* (*PPAPDC1B*) ทำหน้าที่เป็น tumor suppressor ยับยั้งการทำงานของยีน *dual specificity phosphatase 22* (*DUSP22*) ซึ่งเป็นยีนที่สำคัญต่อการแบ่งเซลล์ซึ่งถูกควบคุมด้วย estrogen receptor pathway จากการศึกษาพบว่าหากเกิดความเสียหายที่ยีนนี้พบว่ามีอัตราการเกิดมะเร็งเต้านมมากขึ้น (Bernard-Pierrot *et al.*, 2008) และหาก มีการแสดงออกของยีนนี้มากเกินไปในกระดูกอ่อนจะยับยั้งการแบ่งเซลล์ และไม่สามารถซ่อมแซมกระดูกอ่อนส่วนที่เสียหายได้

ยีน *fin-bud initiation in zebrafish homolog* (*FIBIN*) เป็นยีนที่ทำหน้าที่สำคัญในการพัฒนาของรยางค์ในระยะตัวอ่อนของสัตว์มีกระดูกสันหลัง และมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการเจริญเติบโตของรยางค์ในร่างกาย โดยจะแสดงออกลดลงเมื่อมีอายุมากขึ้น หากเกิดความผิดปกติที่ยีน *FIBIN* จะทำให้ตัวอ่อนมีลักษณะผิดปกติบริเวณข้อต่อ (Lakner *et al.*, 2011)

การแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนไปอาจเกิดจากกลไกการยับยั้งกระบวนการถอดรหัสของยีนผ่านการเติมหมู่เมทิลเลชันที่ CpG island บนโพรโมเตอร์ของยีน หรืออาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของโครมาทิน (chromatin remodeling) ทำให้ TF ไม่สามารถเข้ามาจับที่โพรโมเตอร์เพื่อเริ่มกระบวนการถอดรหัสได้ ดังนั้นการศึกษาการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน จะแยกระหว่างเมทิลไซโตซีน และไซโตซีน โดยใช้ bisulfite conversion ซึ่งไซโตซีนที่ไม่มีการเติมหมู่เมทิล จะเกิดกระบวนการ deamination และถูกเปลี่ยนเป็นยูราซิล (Uracil, U) ในขณะที่เมทิลไซโตซีนจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง ดังนั้นสายดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการ bisulfite conversion (bisulfite converted DNA) จะสามารถนำไปวิเคราะห์การเติมหมู่เมทิลเลชันได้ด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น methylation specific-PCR (MSP-PCR) combined bisulfite restriction analysis (COBRA) (Grunau *et al.*, 2001) methylquan real-time PCR (Dugast-Darzacq and Grange, 2009) และ pyrosequencing (Imagawa *et al.*, 2011; Yoon *et al.*, 2013; Migheli *et al.*, 2013)

pyrosequencing เป็นเทคนิคที่มีความละเอียดสูง สามารถใช้ในการบอกอัตราส่วนของการเกิดเมทิลเลชัน และอันเมทิลเลชันได้อย่างแม่นยำ เนื่องจากในปฏิกริยาของ pyrosequencing จะเติม deoxynucleotide triphosphate (dNTP) ทีละ 1 ตัว ถ้า dNTP นั้นสามารถจับคู่กับสายดีเอ็นเอต้นแบบ ได้ DNA polymerase จะนำ dNTP เข้าต่อกับสายดีเอ็นเอ และปลดปล่อย pyrophosphate (PPi) ในปริมาณที่เท่ากับจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ทำปฏิกริยา จากนั้น เอนไซม์ ATP sulfurylase จะเปลี่ยน PPi ให้เป็น adenosine triphosphate (ATP) โดยจะรวมเข้ากับ adenosine phosphosulfate (APS) ซึ่ง ATP จะกระตุ้นให้เอนไซม์ luciferase เปลี่ยน luciferin ให้กลายเป็น oxyluciferin และปล่อยแสงออกมาในปริมาณที่เป็นสัดส่วนกับปริมาณของ ATP ซึ่งจะสามารถตรวจจับแสงที่ปลดปล่อยออกมาให้อยู่ในรูป Pyrogram โดยความสูงของ peak จะเป็นสัดส่วนกับจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ DNA polymerase ต่อสายดีเอ็นเอ ดังนั้นจะสามารถบอกอัตราส่วนระหว่างเมทิลเลชัน และอันเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีนได้ (Yoon *et al.*, 2013)

การรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม และความสำคัญของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ

เนื่องจากโรคข้อเข่าเสื่อมจะสามารถตรวจพบเมื่อผู้ป่วยมาพบแพทย์ด้วยอาการปวดข้ออย่างรุนแรง หรือเกิดการเสียรูปแบบข้อต่อ จนเกิดการบิดงอจนไม่สามารถใช้ชีวิตประจำวันตามปกติได้ ในบางครั้งอาจต้องใช้ผลการถ่ายภาพรังสีควบคู่กับการวินิจฉัยโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญเพื่อยืนยันการเป็นโรคข้อเข่าเสื่อม และทำการรักษาเพื่อบรรเทาอาการเจ็บปวด เช่น การเพิ่มมวลกล้ามเนื้อเข้ามาเป็นตัวรับ

น้ำหนักแทนกระดูกข้อต่อโดยกายภาพบำบัดหรือเต้นแอโรบิคการลดน้ำหนัก การประคบร้อน (heating) (Keysor *et al.*, 2003) และการใช้ยาแก้อักเสบ (anti-inflammatory drug) หรือยาชา (anesthetic drug) แต่ความเสื่อมบนกระดูกอ่อนผิวข้อจะยังคงอยู่ซึ่งการรักษาให้หายขาดในปัจจุบันมีเพียงวิธีเดียว คือ การผ่าตัด ซึ่งแบ่งเป็น การผ่าตัดเปลี่ยนข้อเทียมเพียงส่วนเดียว (unicompartmental knee arthroplasty, UKA) สำหรับผู้ป่วยที่มีกระดูกอ่อนผิวข้อเสื่อมสภาพเพียงด้านเดียวของเข่า หรือ การผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมทั้งหมด (total knee arthroplasty, TKA) (Liu *et al.*, 2011) ซึ่งส่งผลต่อสุขภาพร่างกาย สุขภาพจิต และนำไปสู่ปัญหาทางด้านการเงิน เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายสูงในการรักษา (Michaud *et al.*, 2006) ดังนั้นหากสามารถตรวจพบโรคข้อเข่าเสื่อมในระยะเริ่มต้น อาจหลีกเลี่ยงปัจจัยต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดการเสื่อมของข้อเข่า และยืดระยะเวลาในการเกิดโรคออกไปได้ ดังนั้นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarkers) จึงมีบทบาทสำคัญในการทำนายโรคข้อเข่าเสื่อมตั้งแต่ยังไม่แสดงอาการ

ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ คือสารชีวโมเลกุลที่เกิดจากกระบวนการระดับโมเลกุลของร่างกาย ดังนั้นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพจะสะท้อนถึงกระบวนการในการเกิดโรค ทำให้สามารถจำแนกผู้ป่วยออกจากคนปกติได้ และยังมีประโยชน์ต่อการเลือกยา หรือพัฒนายาเพื่อให้เหมาะสมกับความผิดปกติในระดับโมเลกุลของผู้ป่วย ซึ่งทำให้การรักษามีประสิทธิภาพมากขึ้น (Tseng *et al.*, 2009)

Barter, M. J., Bui, C. and Young, D. A., 2012. Epigenetic mechanisms in cartilage and osteoarthritis: DNA methylation, histone modifications and microRNAs. *Osteoarthritis Cartilage* 20(5): 339-349.

Bernard-Pierrot, I., *et al.*, 2008. Characterization of the recurrent 8p11-12 amplicon identifies PPAPDC1B, a phosphatase protein, as a new therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res* 68(17): 7165-7175.

Cho, H. J., Chang, C. B., Yoo, J. H., Kim, S. J. and Kim, T. K., 2010. Gender differences in the correlation between symptom and radiographic severity in patients with knee osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* 468(7): 1749-1758.

Del Rey, M. J., *et al.*, 2012. Transcriptome analysis reveals specific changes in osteoarthritis synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis* 71(2): 275-280.

Dugast-Darzacq, C. and Grange, T., 2009. MethylQuant: a real-time PCR-based method to quantify DNA methylation at single specific cytosines. *Methods Mol Biol* 507: 281-303.

Edwards, J. C., 2000. Fibroblast biology. Development and differentiation of synovial fibroblasts in arthritis. *Arthritis Res* 2(5): 344-347.

El Hajjaji, H., Cole, A. A. and Manicourt, D. H., 2005. Chondrocytes, synoviocytes and dermal fibroblasts all express PH-20, a hyaluronidase active at neutral pH. *Arthritis Res Ther* 7(4): R756-768.

Evcik, D., Kuru, I., Maralcan, G. and Evcik, E., 2006. [Relationship between the mechanical and anatomic axis and orientation angles of the knee joint and functional capacity of patients with osteoarthritis]. *Acta Orthop Traumatol Turc* 40(1): 38-43.

Fan, J., *et al.*, 2008. Gene-expression profiling in Chinese patients with colon cancer by coupling experimental and bioinformatic genomewide gene-expression analyses: identification and validation of IFITM3 as a biomarker of early colon carcinogenesis. *Cancer* 113(2): 266-275.

Garcia-Blanco, M. A., Baraniak, A. P. and Lasda, E. L., 2004. Alternative splicing in disease and therapy. *Nat Biotechnol* 22(5): 535-546.

Giacomelli, L. and Nicolini, C., 2006. Gene expression of human T lymphocytes cell cycle: experimental and bioinformatic analysis. *J Cell Biochem* 99(5): 1326-1333.

Graeber, T. G. and Eisenberg, D., 2001. Bioinformatic identification of potential autocrine signaling loops in cancers from gene expression profiles. *Nat Genet* 29(3): 295-300.

Grunau, C., Clark, S. J. and Rosenthal, A., 2001. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res* 29(13): E65-65.

Gyurjan, I., Jr., *et al.*, 2007. Gene expression dynamics in deer antler: mesenchymal differentiation toward chondrogenesis. *Mol Genet Genomics* 277(3): 221-235.

Hashimoto, K., Oreffo, R. O., Gibson, M. B., Goldring, M. B. and Roach, H. I., 2009. DNA demethylation at specific CpG sites in the IL1B promoter in response to inflammatory cytokines in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 60(11): 3303-3313.

Hunyadi, J., Simon, M., Jr., Kenderessy, A. S. and Dobozy, A., 1993. Expression of monocyte/macrophage markers (CD13, CD14, CD68) on human keratinocytes in healthy and diseased skin. *J Dermatol* 20(6): 341-345.

Iida, A., Kizawa, H., Nakamura, Y. and Ikegawa, S., 2006. High-resolution SNP map of ASPN, a susceptibility gene for osteoarthritis. *J Hum Genet* 51(2): 151-154.

Ikegawa, S., *et al.*, 2000. Novel and recurrent EBP mutations in X-linked dominant chondrodysplasia punctata. *Am J Med Genet* 94(4): 300-305.

Imagawa, K., *et al.*, 2011. The epigenetic effect of glucosamine and a nuclear factor-kappa B (NF-kB) inhibitor on primary human chondrocytes--implications for osteoarthritis. *Biochem Biophys Res Commun* 405(3): 362-367.

Karlsson, C., *et al.*, 2010. Genome-wide expression profiling reveals new candidate genes associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 18(4): 581-592.

Ke, X., Taylor, M. S. and Cardon, L. R., 2008. Singleton SNPs in the human genome and implications for genome-wide association studies. *Eur J Hum Genet* 16(4): 506-515.

Keysor, J. J., *et al.*, 2003. Critical review of arthritis self-management strategy use. *Arthritis Rheum* 49(5): 724-731.

Kim, J. S., *et al.*, 2007. Distribution of CD14+ and CD68+ macrophages in the placental bed and basal plate of women with preeclampsia and preterm labor. *Placenta* 28(5-6): 571-576.

Kim, K. W., *et al.*, 2011. Association between comorbid depression and osteoarthritis symptom severity in patients with knee osteoarthritis. *J Bone Joint Surg Am* 93(6): 556-563.

Lakner, J., Seyer, C., Hermsdorf, T. and Schoneberg, T., 2011. Characterization of the expression, promoter activity and molecular architecture of fibin. *BMC Biochem* 12: 26.

Lawrence, R. C., *et al.*, 2008. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum* 58(1): 26-35.

Lee, D. H., Sonn, C. H., Han, S. B., Oh, Y., Lee, K. M. and Lee, S. H., 2012. Synovial fluid CD34(-) CD44(+) CD90(+) mesenchymal stem cell levels are associated with the severity of primary knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 20(2): 106-109.

Lee, S. W., *et al.*, 2013. The single nucleotide polymorphism (SNP) of the estrogen receptor-beta gene, rs1256049, is associated with knee osteoarthritis in Korean population. *Knee*.

Liu, J., *et al.*, 2011. [Management of extension apparatus in total knee arthroplasty of osteoarthritis]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 25(1): 33-37.

Losina, E., *et al.*, 2012. Lifetime risk and age of diagnosis of symptomatic knee osteoarthritis in the US. *Arthritis Care Res (Hoboken)*.

Martel-Pelletier, J., Boileau, C., Pelletier, J. P. and Roughley, P. J., 2008. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22(2): 351-384.

Michaud, C. M., *et al.*, 2006. The burden of disease and injury in the United States 1996. *Popul Health Metr* 4: 11.

Migheli, F., *et al.*, 2013. Comparison study of MS-HRM and pyrosequencing techniques for quantification of APC and CDKN2A gene methylation. *PLoS One* 8(1): e52501.

Murphy, L., *et al.*, 2008. Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 59(9): 1207-1213.

Rodriguez-Fontenla, C., Lopez-Golan, Y., Calaza, M., Pombo-Suarez, M., Gomez-Reino, J. J. and Gonzalez, A., 2012. Genetic risk load and age at symptom onset of knee osteoarthritis. *J Orthop Res* 30(6): 905-909.

Rokhlin, O. W. and Cohen, M. B., 1996. Soluble forms of CD44 and CD54 (ICAM-1) cellular adhesion molecules are released by human prostatic cancer cell lines. *Cancer Lett* 107(1): 29-35.

Scanu, A., *et al.*, 2007. [Synoviocyte cultures from synovial fluid]. *Reumatismo* 59(1): 66-70.

Schmidt, M., Weidler, C., Naumann, H., Anders, S., Scholmerich, J. and Straub, R. H., 2005. Androgen conversion in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synoviocytes--androstenedione and testosterone inhibit estrogen formation and favor production of more potent 5alpha-reduced androgens. *Arthritis Res Ther* 7(5): R938-948.

Sohaskey, M. L., Yu, J., Diaz, M. A., Plaas, A. H. and Harland, R. M., 2008. JAWS coordinates chondrogenesis and synovial joint positioning. *Development* 135(13): 2215-2220.

Southam, L., *et al.*, 2007. An SNP in the 5'-UTR of GDF5 is associated with osteoarthritis susceptibility in Europeans and with in vivo differences in allelic expression in articular cartilage. *Hum Mol Genet* 16(18): 2226-2232.

Spector, T. D. and MacGregor, A. J., 2004. Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage* 12 Suppl A: S39-44.

Stern, A. G., *et al.*, 2003. Association of erosive hand osteoarthritis with a single nucleotide polymorphism on the gene encoding interleukin-1 beta. *Osteoarthritis Cartilage* 11(6): 394-402.

Tseng, S., Reddi, A. H. and Di Cesare, P. E., 2009. Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP): A Biomarker of Arthritis. *Biomark Insights* 4: 33-44.

Yoo, H. J., *et al.*, 2011. Gene expression profile during chondrogenesis in human bone marrow derived mesenchymal stem cells using a cDNA microarray. *J Korean Med Sci* 26(7): 851-858.

Yoon, H. Y., *et al.*, 2013. Pyrosequencing Analysis of APC Methylation Level in Human Prostate Tissues: A Molecular Marker for Prostate Cancer. *Korean J Urol* 54(3): 194-198.

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. ไมโครปิเปต : P2 (0.1-2μl), P20 (5-20 μl), P100 (20-100 μl), P1000 (0.1-1 มิลลิลิตร) (Gilson, France)
2. ทิป : 10 μl, 200 μl, 1,000 μl(Gilson, France)
3. หลอดชนิด Microcentrifuge : 0.2 ml และ 1.5 ml (Bionline, UK)
4. ขวดดูแรน : 50 ml, 100 ml (Duran, Germany)
5. กระบอกตวง 100 ml และ 1,000 ml (Pyrex®, USA)
6. แท่นวางหลอด (rack) (Autopack, USA)
7. ขวดรูปชมพู่ : 250 ml (Pyrex®, USA)
8. พาราฟิล์ม (Parafilm M, USA)
9. กระดาษฟลอยด์ (Aro, Chaina)
10. ปิเปตดูดจ่ายสารอัตโนมัติ (Costar®, USA)
11. เครื่องวอร์เท็กซ์ (WiseMix®, Korea)
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงรุ่น Mikro120 (Hettichzentrifugen, Germany)
13. เครื่อง Polymerase chain reaction (PCR) รุ่น T gradient (Biometra®, Germany)
14. เครื่อง Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) รุ่น CFX96™ (Bio-Rad, USA)
15. เครื่องอิเล็กโทรโฟริซิสรุ่น MiniRun GE-100 (Bioer, Chaina)
16. ถาดสำหรับเตรียมเจล พร้อมหวี (Bioer, Chaina)
17. เครื่องถ่ายภาพเจล (Bio-Rad, USA)
18. ตู้เย็น 4 ºC (Sharp, Japan)
19. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 ºC (Sanden Inter Cool, Thailand)
20. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 ºC (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, USA)
21. วอเตอร์บาธรุ่น SWB-10C-1 (Major Science, Taiwan)
22. จานเลี้ยงเซลล์แบบ 12 หลุม (Costar®, USA)

23. ฟลาสก์เลี้ยงเซลล์ : T25, T75 (Costar®, USA)

24. ปิเปตแบบฆ่าเชื้อ (Costar®Stripipette) : 5 ml, 10 ml, 25 ml (Costar®, USA)

25. สไลด์นับเซลล์ (Haemocytometer)

26. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow)

27. ตู้เลี้ยงเซลล์ (CO_2 incubator) (Thermo Scientific, USA)

28. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับรุ่น Motic AE2000 (Motic, Germany)

29. ตู้นึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ

30. เครื่องไมโครเวฟรุ่น R-219 (Sharp, Japan)

31. เครื่องชั่งดิจิทอลรุ่น Pioneer™ (OHAUS®, USA)

32. ช้อนตักสาร (Pyrex®, USA)

33. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (nano drop) (Thermo Scientific, USA)

34. Optical, 8-CAP Strip, FLAT (Bio-Rad, USA)

35. Tube, Strip-8, Lo-Pro White (Bio-Rad, USA)

36. Conical Tube: 15 ml, 50 ml (Kartell, Italy)

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารเคมีทั่วไป

    1.1 Agarose, molecular glade (ISC BioExpress, Spain)

    1.2 Absolute ethanol (Merck, Germany)

    1.3 Ethidiumbromind (Bio Basic inc, USA)

    1.4 Boric acid (Research organics, USA)

    1.5 Trisaminomerthane (Research organics, USA)

    1.6 EDTA (Research organics, USA)

    1.7 100 base pair DNA ladder (Biolab, Thailand)

2. สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR

    2.1 5x PCRBIO reaction buffer (PCRBiosystems, UK)

    2.2 5 U/µl PCRBIO HS *Taq*DNA Polymerase (PCRBiosystems, UK)

    2.3 Oligonucleotide primer (Biodesign, Thailand)

3. สารเคมีที่ใช้เลี้ยงเซลล์

   3.1 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (GIBCO, USA)

   3.2 Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO, USA)

   3.3 100x Pen-Strep (GIBCO, USA)

   3.4 Basic Fibroblast Growth Factor (FGF) (Invitrogen, USA)

   3.5 Trypsin-EDTA (GIBCO, USA)

   3.6 Phosphate Buffered Saline (PBS) (GIBCO, USA)

   3.7 Tryphan blue (GIBCO, USA)

4. ชุดสารเคมีสำเร็จรูปที่ใช้ในงานวิจัย

   4.1 innuPREB Blood DNA Mini Kit (AnalytikJena, Germany)

   4.2 innuPREB RNA Mini Kit (AnalytikJena, Germany)

   4.3 SsoFast™EvaGreen®Supermix (Bio-Rad, USA)

   4.4 SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA)

   4.5 EZ DNA Methylation Gold™ Kit (ZYMO RESEARCH, USA)

วิธีการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยเรื่องนี้แบ่งออกเป็น 6 ส่วน คือ

1. ขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ
2. การคัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนโดยใช้เทคนิคชีวสารสนเทศ
3. การเตรียมตัวอย่างซิโนวิโอไซต์ชนิดบีที่ใช้ในการวิจัย
4. ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนในซิโนวิโอไซต์ชนิดบีของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม
5. ศึกษาการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนในซิโนวิโอไซต์ชนิดบีของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม
6. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออก และการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน

1. ขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ

ดำเนินงานเอกสารสำหรับขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ โดยนำเสนอโครงร่างงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ซึ่งประกอบด้วยความสำคัญ วิธีการ และการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต รวมถึงข้อพิจารณาด้านจริยธรรมการวิจัย เพื่อให้งานวิจัยมีมาตรฐานเป็นที่ยอมรับในระดับสากล และเป็นการให้เคารพในความเป็นมนุษย์ ซึ่งอาสาสมัครจะได้รับทราบถึงวิธีการ ประโยชน์ของโครงการวิจัย และตัดสินใจเข้าร่วมหรือไม่เข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจ ซึ่งข้อมูลส่วนตัวที่ได้จะถูกเก็บรักษาเป็นความลับ เพื่อป้องกันการละเมิดสิทธิส่วนบุคคล

2. การคัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนโดยใช้เทคนิคชีวสารสนเทศ

การคัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนนำมาจากผลการทดลองไมโครอาร์เรย์ในฐานข้อมูล GEO DataSets ของเว็บไซต์ NCBI โดยใช้คำค้นหาในฐานข้อมูล คือ “Osteoarthritis” and “*Homo sapiens*” จากนั้นนำข้อมูลผลการแสดงออกของยีนระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มคนปกติ เปิดด้วยโปรแกรม Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA) โดยรวมข้อมูลการแสดงออก (GPL) กับข้อมูลโพรบ (GSE) เพื่อให้ทราบว่าค่าดังกล่าวเป็นค่าการแสดงออกของยีนใด ดังรูปที่ 3 จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกด้วยสถิติ *t* test โดยแบ่งการวิเคราะห์เป็น 2 วิธี ดังนี้

		Normal					OA					
5		Normal					OA					
6–7	Gene symbol	GSM303524	GSM303530	GSM303532	GSM303534	Average	GSM30335	GSM303359	GSM303361	GSM303363	GSM303377	Average
8	PRPF8	4338.18	4441.62	4658.78	3923.25	**4340.4575**	5491.56	4315.35	6084.78	5759.1	3804.78	**5284.29**
9	CAPNS1	23669.9	21214	20932	19527.8	**21335.925**	22116.8	28597.5	27677.1	16904.2	19971.9	**20825.3**
10	RPL35	23631	21076.8	20320.1	25761.5	**22697.35**	28151	61834.3	31303.5	26360.8	17188.9	**31493.2**
11	RPL28	28948.6	27609.2	26177	27839.1	**27643.475**	30643.8	52800.6	31381.5	32244.1	23849.2	**33821.6**
12	EIF4G2	16327.5	17863.4	19487.6	18285.3	**17990.95**	21726.9	14281.6	16651.5	16693.4	15364.4	**16759.9**
13	EIF3D	10953.2	8996.68	8963.19	10148.2	**9765.3175**	14367.8	15801.9	14729.3	12952.5	7791.55	**14112.18**
14	PARK7	18623.2	14293	13304.8	14513.5	**15183.625**	24163.1	38110.3	21748.2	22081.1	15706	**23718.1**
15	SRP14	20353.9	15336	14857.6	16729.2	**16819.175**	19541.2	27969.4	17890.4	16671.9	18281	**19696.0**
16	GDI2	6869.57	5431.04	5181.35	6843.82	**6081.445**	11520.7	10094.3	8441.11	10166	4928.29	**8849.39**
17	GDI2	21512.4	16417.2	16955.3	18379.2	**18316.025**	26065.1	25242	24875	21950.1	15289.2	**22176.5**
22645	0	38254.7	37159.8	43785.6	36672.7	**38968.2**	20882.9	30471.2	20336.1	20047.3	35138.5	**22509.6**
22646	0	42837.2	36829.7	35670.2	35287.5	**37656.15**	21032.1	30563.2	22059.6	20152.4	32994.4	**22402.6**
22647	0	79.1604	12.7279	41.3633	18.0001	**37.812925**	17.7501	16.395	34.0159	15.3018	18.125	**25.2787**
22648	0	17.8849	20.5469	23.4357	22.9947	**21.21555**	40.666	39.5684	16.8866	39.0434	25.0894	**25.9362**
22649	0	23.0088	66.8013	20.3731	49.0391	**39.805575**	13.6303	22.4732	37.0269	11.8996	78.6133	**37.73432**
22650	0	17.9376	65.697	16.0325	17.1515	**29.20465**	6.10967	40.7314	14.7814	9.56866	9.49035	**15.72663**
22651	0	49.6459	38.966	27.6262	24.8047	**35.2607**	11.0227	33.3626	13.3985	49.5249	113.711	**49.3767**
22652	0	16.7054	13.6016	25.0706	15.6031	**17.745175**	8.28136	24.0412	14.6872	24.5697	15.948	**14.38676**
22653												

รูปที่ 3 ข้อมูลการแสดงออกของยีนกลุ่มคนปกติ และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

2.1 คัดเลือกยีนโดยอาศัยค่าความแตกต่างทางสถิติเท่านั้น

คัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนจากการแสดงออกของยีนในเซลล์กระดูกอ่อน (accession number GPL570 series: GSE16464) ของกลุ่มประชากรผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 10 คน และกลุ่มประชากรปกติจำนวน 4 คน และในเซลล์เยื่อบุรอบข้อ (accession number GPL96 series: GSE12021) ของกลุ่มประชากรผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 10 คน และกลุ่มประชากรปกติ 9 คน โดยจะใช้ยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มประชากรปกติที่ความเชื่อมั่นมากกว่า 99 % จากนั้นคัดเลือกยีนซึ่งเป็นยีนเดียวกันจากทั้ง 2 กลุ่ม เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกในขั้นตอนต่อไป

2.2 คัดเลือกยีนโดยอาศัยค่าความแตกต่างทางสถิติ ประกอบกับการวิเคราะห์ค่าการจับที่แตกต่างกันของโพรบ (probe folding)

คัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนจากการแสดงออกยีนในเซลล์เยื่อบุรอบข้อ (accession number GSE12021) ที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มคนปกติที่ระดับความเชื่อมั่นมากกว่า 99 % จากนั้นคัดเลือกเฉพาะยีนที่มีค่าการจับของโพรบมากกว่า 300 relative fluorescence unit (RFU) และมีค่าการจับของโพรบแตกต่างกันมากกว่า 5 เท่าระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มคนปกติ

3. การเตรียมตัวอย่างซิโนวิโอไซต์ชนิดบีที่ใช้ในการวิจัย

น้ำข้อเข่าถูกเก็บจากการผ่าตัดเปลี่ยนผิวข้อเข่าในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมซึ่งถูกวินิจฉัยโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านศัลกรรมกระดูก จำนวน 24 คนและกลุ่มควบคุมจากการผ่าตัดส่องกล้องรักษาโรคเอ็นไขว้หน้าขาดซึ่งเกิดจากอุบัติเหตุ จำนวน 5 คน จากโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ โดยนำมาสกัดเพื่อเลี้ยงเซลล์ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

3.1 การเริ่มต้นเลี้ยงซิโนวิโอไซต์ชนิดบีจากน้ำข้อเข่า(ดัดแปลงจาก Scanu *et al.*, 2007)

ซิโนวิโอไซต์ชนิดบีจะถูกแยกจากน้ำข้อเข่าภายในตู้ปลอดเชื้อ (การเติมหรือทิ้งสารต่าง ๆ ในการเลี้ยงเซลล์ต้องทำในตู้เขี่ยเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อน) โดยก่อนใช้งานต้องเช็ดทำความสะอาดตู้ปลอดเชื้อด้วย 70 % แอลกอฮอล์ และเปิดแสง UV เป็นเวลา 15 นาที ขั้นแรกลดความหนืดของน้ำข้อเข่าด้วย PBS ในอัตราส่วนน้ำข้อเข่า 1 ส่วน ต่อ PBS 1 ส่วนวอร์เท็กซ์ให้เข้ากัน จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวทิ้ง และเติม DMEM (ประกอบด้วย

FBS เข้มข้น 10 % Pen-Strep เข้มข้น 1 % และ FGF เข้มข้น 4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างตะกอนเซลล์ที่ได้ โดยใช้ปิเปตขนาด P1000 ดูดขึ้นลงเพื่อให้ตะกอนกระจายออกจากกัน นำไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 12 หลุม ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ 1 มิลลิลิตร รวมปริมาตร 2 มิลลิลิตร เอียงจานเลี้ยงเซลล์วนสลับไปมาเพื่อให้เซลล์กระจายทั่วหลุม และนำจานเลี้ยงเซลล์ไปใส่ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีสภาวะความหนาแน่นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากเสร็จการใช้งานทุกครั้งจะเช็ดทำความสะอาดตู้ปลอดเชื้อด้วย 70 % แอลกอฮอล์ และเปิดแสง UV เป็นเวลา 30 นาที (ในระหว่างใช้ตู้ปลอดเชื้อหากต้องนำอุปกรณ์หรือสารเคมีเข้าไปต้องเช็ดด้วย 70 % แอลกอฮอล์เสมอ)

3.2 การเพาะเลี้ยงซิโนวิโอไซต์ชนิดบี

ทำการเปลี่ยนอาหารให้ซิโนวิโอไซต์ชนิดบีที่อยู่ในจานเลี้ยงเซลล์ ทุก ๆ 2-3 วัน โดยใช้ปิเปตขนาด P1000 ดูดอาหารทิ้ง 1 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดเซลล์ที่ไม่สามารถเกาะพื้นผิวได้ ซึ่งไม่ใช่ซิโนวิโอไซต์ชนิดบีที่เป็นเซลล์ชนิดเกี่ยวพัน และใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำจานเลี้ยงเซลล์ไปใส่ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีสภาวะความหนาแน่นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ที่อุณหภูมิ 37 องศาสเซลเซียส ทำซ้ำจนกว่าซิโนวิโอไซต์ชนิดบีจะเต็มก้นหลุม

จากนั้นย้ายเซลล์ไปเลี้ยงต่อในฟลาสก์เลี้ยงเซลล์ขนาดหน้าตัด 25 ตารางเซนติเมตร (T25-Flask) โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมทิ้ง แล้วใส่ PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เอียงจานเลี้ยงเซลล์วนสลับไปมาเพื่อล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS อยู่ออกจนหมด ดูดของเหลวทิ้งด้วยปิเปตขนาด P1000 ทำซ้ำ 1-2 ครั้ง จากนั้นเติม Trypsin-EDTA 200 ไมโครลิตร บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ 5 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดจากก้นหลุม เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 1.8 มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งการทำงานของ Trypsin-EDTA โดยผสมให้เข้ากันโดยดูดขึ้นลงจนกว่าเซลล์จะแยกออกจากกันโดยดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ จากนั้นย้ายเซลล์ที่ได้ไปใส่ T25-Flask ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ 3 มิลลิลิตร รวมปริมาตร 5 มิลลิลิตร เอียงสลับไปมาเพื่อให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันในทิศทางแนวนอน โดยพยายามให้ไม่ให้อาหารขึ้นไปติดด้านบน และบริเวณฝาที่มีกระดาษกรองของฟลาสก์เลี้ยงเซลล์เพื่อป้องกันการปนเปื้อน โดยเซลล์ในชุดนี้นับเป็น passage 1เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2-3 วันโดยดูดอาหารเก่าทั้งหมดทิ้ง และใส่อาหารใหม่ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เมื่อเซลล์มีปริมาณเต็ม T25-Flask จึงย้ายเซลล์ไปเลี้ยงต่อในฟลาสก์เลี้ยงเซลล์ขนาดหน้าตัด 75 ตารางเซนติเมตร (T75-Flask) โดยทำตามขั้นตอนการย้ายเซลล์ข้างต้น แต่ปรับปริมาณสารที่ใช้ในขั้นตอนต่าง ๆ คือ ในขั้นตอนล้างเซลล์ใช้ PBS 3 มิลลิลิตรและในขั้นตอนการทำให้เซลล์หลุดใช้

Trypsin-EDTA 0.5 มิลลิลิตร ซึ่งเซลล์ชุดนี้นับเป็น passage ที่ 2จากนั้นเปลี่ยนอาหารปริมาตร 12 มิลลิลิตร ทุก 2-3 วัน จนเซลล์มีปริมาณเต็มก้นฟลาสก์ จึงย้ายเซลล์ลง T75-Flask จำนวน 3 ฟลาสก์ และนับเป็น passage ที่ 3 ซึ่งจะมีปริมาณเซลล์มากพอที่จะใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน และการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน

4. ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนในซิโนวิโอไซต์ชนิดบีของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

4.1 การสกัดอาร์เอ็นเอ

หลังจากที่ซิโนวิโอไซต์ชนิดบีมีปริมาณมากพอ (passage ที่ 3 มีปริมาณซิโนวิโอไซต์ชนิดบีประมาณ 12 ล้านเซลล์ T75-Flask 1 ฟลาสก์) ในการสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป innuPREB RNA Mini Kit (AnalytikJena, Germany) ขั้นแรกตกตะกอนซิโนวิโอไซต์ชนิดบีตามขั้นตอนการย้ายเซลล์ แต่ไม่ต้องย้ายลงฟลาสก์เลี้ยงเซลล์ โดยนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวทิ้ง จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ RL ปริมาตร 400 ไมโครลิตร บนตะกอนเซลล์ที่ได้เพื่อย่อยเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที ผสมให้เข้ากันโดยใช้วอร์เท็กซ์จนตะกอนเซลล์กระจายออกจากกัน บ่มที่อุณหภูมิห้องอีก 3 นาที จากนั้นนำของเหลวทั้งหมดใส่ใน Spin Filter D ที่ซ้อนอยู่บน Receiver Tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เพื่อกรองจีโนมิกดีเอ็นเอทิ้ง เติม 70 % เอทานอล 400 ไมโครลิตร ลงในของเหลวที่อยู่ใน Receiver Tube ใช้ปิเปตขนาด P1000 ดูดขึ้นลงจนเป็นเนื้อเดียวกัน และย้ายลง Spin Filter R ที่ซ้อนอยู่บน Receiver Tube อันใหม่ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เทของเหลวทิ้ง จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ HS ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงบน Spin Filter R ซึ่งนำมาซ้อนอยู่บน Receiver Tube หลอดเดิมนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทของเหลวทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ LS ปริมาตร 750 ไมโครลิตร บน Spin Filter R ซึ่งซ้อนอยู่บน Receiver Tube หลอดเดิม ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ย้าย Spin Filter R ไปซ้อนกับ Receiver Tube หลอดใหม่ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ย้าย Spin Filter R ซ้อนบน Elution Tube จากนั้นเติม RNase-free water ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงบนตัวกรองของ Spin Filter R โดยตรงเพื่อให้ได้อาร์เอ็นเอในรูปของสารละลาย บ่ม 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จากนั้นนำไปวัดปริมาณของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงเพื่อใช้ในขั้นต่อไป และเก็บสารละลายอาร์เอ็นเอไว้ในตู้ -80 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของอาร์เอ็นเอ

4.2 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

เปลี่ยนสายอาร์เอ็นเอที่ได้ในข้อ 4.1 ให้เป็นดีเอ็นเอคู่สม (complementary DNA, cDNA) โดยชุดสำเร็จรูป SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ ขั้นแรกนำไพรเมอร์ (random hexamers) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ dNTPs Mix ปริมาตร 1 ไมโครลิตรรวมกับสายอาร์เอ็นเอ โดยใช้อาร์เอ็นเอปริมาณ 50 นาโนกรัมต่อปฏิกริยา จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 10 ไมโครลิตร ด้วย DEPC-treated water นำไปให้ความร้อนที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ด้วยเครื่อง PCR จากนั้นแช่น้ำแข็งนาน 1 นาที แล้วเติมสารละลายผสม (ประกอบด้วย RT Buffer 2 ไมโครลิตร $MgCl_2$ 4 ไมโครลิตร DTT 2 ไมโครลิตร RNaseOUT™ 1 ไมโครลิตร และ SuperScript™ III RT 1 ไมโครลิตร) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร รวมปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตขนาด P20 ดูดสารขึ้นลงจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเข้าจับที่อาร์เอ็นเอต้นแบบ ต่อมาเปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 50 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม และขั้นสุดท้ายเปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 85 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ SuperScript™ III RT จากนั้นเติม RNaseH ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และบ่มด้วยเครื่อง PCR ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพื่อกำจัดสายอาร์เอ็นเอ แล้วเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

4.3 Real-time PCR

4.3.1 การออกแบบไพรเมอร์

cDNAของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มควบคุมถูกใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กระดูกอ่อนซึ่งการออกแบบไพรเมอร์อ้างอิงลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายเอ็มอาร์เอ็นเอในยีนที่สนใจจากฐานข้อมูล NCBI และตรวจสอบตำแหน่งจับของชุดโพรบจากข้อมูลชีวสารสนเทศที่ทำให้เกิดการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มคนปกติ จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/) ตามคำแนะนำของคู่มือการใช้น้ำยา SsoFast™EvaGreen® Supermix โดยกำหนดขนาดของผลผลิต PCR ไม่เกิน 200 นิวคลีโอไทด์และขนาดของไพรเมอร์ไม่เกิน 25 นิวคลีโอไทด์ (ไพรเมอร์ดังตารางที่ 1) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคชีวสารสนเทศ และใช้ *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*) เป็นยีนควบคุมจากนั้นนำไพรเมอร์ที่ได้มา

ตรวจสอบความจำเพาะต่อยีน ด้วยโปรแกรม BLAST (www.ncbi.nih.gov) และส่งข้อมูลไพรเมอร์เพื่อสังเคราะห์ที่บริษัท Biodesign (Thailand)

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับ real-time PCR และความเข้มข้นที่ใช้ในปฏิกริยา

ชื่อยีน	**ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (5' → 3')**	**ความเข้มข้น (nM)**	**Accession number**
EBP	F : GAAGACCAAGCCTTCTTATCTC R : TGTAGAATGAAGCGGAGGG	400 400	NM_006579
PPAPDC1B	F : CTCTACCCTATGCTTGTT R : AAGGCTCAGACTTGTTAA	350 350	NM_001102560.1
IMPAD1	F : CTTTCATTATCTTCAGACACTT R : AGCAACCATACTCATTCTT	450 450	NM_017813.4
FIBIN	F : GCTAATTCTTACTCTCACCTT R : TTAGACAGTTCATAGGAATGG	150 150	NM_203371.1
GAPDH	F : GAAGGTGAAGGTCGGAGTC R : GAAGATGGTGATGGGATTTC	250 250	NM_001256799.1

4.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของปฏิกริยา (Efficiency)

การทดสอบประสิทธิภาพของปฏิกริยา PCR คือการพิจารณากราฟมาตราฐาน (standard curve) ที่ได้ ว่าสามารถใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างรอบของ PCR (cycle) ที่ทำให้ได้ปริมาณผลผลิตที่ต้องการ (threshold of product) หรือที่เรียกว่า Ct cycle และความเข้มข้นของสารพันธุกรรมต้นแบบ (template) ในปฏิกริยานั้น โดยคำนวณค่าร้อยละของ efficiency ตามสมการที่ 1 ค่าที่ได้ควรมีค่าใกล้เคียง 100 % ซึ่งจะแสดงว่า ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มขึ้นใกล้เคียงสองเท่า ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR ตามทฤษฏีการเพิ่มปริมาณของผลผลิตแบบเอ็กซ์โพแนนเชียล (exponential)

สมการที่ 1 ร้อยละประสิทธิภาพของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในแต่ละคู่ไพรเมอร์

$$\% \text{ Efficiency} = (10^{-1/slope} - 1) \times 100\%$$

เมื่อ E คือ ประสิทธิภาพของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในแต่ละคู่ไพรเมอร์

Slopeคือ ความชันของกราฟ

ทดสอบประสิทธิภาพของปฏิกริยาโดยการสร้างกราฟมาตรฐานด้วย CFX96™ (Bio-Rad, USA) โดยใช้ cDNA เข้มข้น 1x (กำหนดให้ cDNA จากการทำ RT-PCR โดยใช้ปริมาณอาร์เอ็นเอตั้งต้น 50 นาโนกรัมมีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 1x) นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเป็น 1/2x 1/4x1/8x 1/16x และ 1/32x แต่ละตัวอย่างทำปฏิกิริยา 3 ซ้ำโดยใช้สารตามตารางที่ 2 และใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ตามตารางที่ 1 ในปฏิกิริยา ตั้งโปรแกรมสำหรับขั้นตอนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้

initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาทีเพื่อให้ cDNA แยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์ และเพื่อกระตุ้นการทำงานของ DNA polymerase ใน SsoFast™EvaGreen®Supermix ตามด้วย denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาทีจากนั้น annealing/extension ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสสำหรับ *IMPAD1 EBP* และ *PPAPDC1B* หรืออุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สำหรับ *FIBIN* นาน 5 วินาทีจำนวน 40 รอบ และ meltingphase เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิ 9 5 องศาเซลเซียส โดยเพิ่มอุณหภูมิ 0. 5 องศาเซลเซียสต่อ 1 ขั้นตอน melting phase ซึ่งใช้เวลาขั้นตอนละ 2-5 วินาที เพื่อสร้าง meltcurve สำหรับตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้

วิเคราะห์ค่าประสิทธิภาพของปฏิกริยาด้วยBio-Rad CFX Manager (Bio-Rad, USA) โดยอาศัยค่า ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2) โดย r^2 ควรมีค่าเข้าใกล้ 1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจุดข้อมูลส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กันในแนวเส้นตรงทำให้ค่าประสิทธิภาพของปฏิกริยามีความน่าเชื่อถือยิ่งขึ้น จากนั้นใช้สภาวะที่มีค่าประสิทธิภาพของปฏิกริยาที่อยู่ในช่วงใกล้เคียง 100 % ในการศึกษาการแสดงออกของยีน

ตารางที่ 2 สารประกอบปฏิกริยา real-time PCR

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. SsoFast™EvaGreen®Supermix	10.0	
2. 5 µM Forward primer	เปลี่ยนแปลงตามความเข้มข้น	150-400nM
3. 5 µM Reverse primer	ในตารางที่ 1	150-400 nM
4. Distilled water	ปรับปริมาตรเป็น 20	
5. cDNA	2.0	
รวมปริมาตร	20.0	

4.3.3 การวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน

ศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนแบบ comparative quantification โดยวิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$ เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *IMPAD1 EBP PPAPDC1B* และ *FIBIN* ซึ่งอยู่ในรูป Ct ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มควบคุม โดยขั้นแรกทำการ normalize โดยใช้ค่า Ct ของยีน *GAPDH* ซึ่งเป็น housekeeping gene และคำนวณหาระดับการแสดงออกของยีนในแต่ละตัวอย่าง ตามสมการที่ 2 จากนั้นเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มควบคุม โดยวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วย *z* test ที่ความเชื่อมั่นมากกว่า 95 %

สมการที่ 2 Comparative quantification

$$\text{Fold difference} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$= 2^{-(\Delta Ct\,(test) - \Delta Ct\,(calibrator))}$$

$$= 2^{-[(Ct\,(target,\,test) - Ct\,(ref,\,test)) - (Ct\,(target,\,calibrator) - Ct\,(ref,\,calibrator))]}$$

เมื่อ Ct (target, test) คือ Ct ของยีนเป้าหมายจากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

Ct (ref, test) คือ Ct ของ *GAPDH*จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

Ct (target, calibrator) คือ Ct ของยีนเป้าหมายจากกลุ่มควบคุม

Ct (ref, calibrator) คือ Ct ของ *GAPDH*จากกลุ่มควบคุม

5. ศึกษาการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

5.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตะกอนของซิโนวิโอไซต์ชนิดบีที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป innuPREB Blood DNA Mini Kit (AnalytikJena, Germany) ขั้นแรกละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตร วอร์เท็กซ์จนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นย้ายใส่ใน Lysis Tube วอร์เท็กซ์ 5 วินาที (หรือจนกว่าตะกอนที่ก้น Lysis Tube จะละลาย) บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อให้ Lysis Buffer สามารถทำงานได้ดี จากนั้นเติม Precipitation Buffer ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อกันโดยวอร์เท็กซ์ นาน 10 วินาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด นาน 3 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีน ดูดส่วนที่เป็นของเหลวย้ายลงบนหลอดชนิด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 70 % เอทานอลปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นย้ายลง Spin Filter D ที่ซ้อนอยู่บน Receiver Tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 2นาที เพื่อกรองจีโนมิกดีเอ็นเอ เทของเหลวใน Receiver Tube ทิ้ง และเติม MS Buffer ลงบน Spin Filter D ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ เปลี่ยน Receiver Tube ใหม่ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดนาน 2 นาที เพื่อกำจัดเอทานอล ย้าย Spin Filter D ซ้อนลงบน Elution Tube จากนั้นเติม Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นกรองของ Spin Filter D โดยตรง บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บที่ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

5.2 Bisulfite converted treatment

การศึกษาการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน จะใช้ชุดสารเคมีสำเร็จรูป EZ DNA Methylation Gold™ Kit (ZYMO RESEARCH, USA) โดยจะเปลี่ยนไซโตซีน (cytosine) ทุกตัวที่ไม่มีการเติมหมู่เมทิลให้เป็นยูราซิล (uracil) โดยแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้ ขั้นแรกเติม CT Conversion Reagent ปริมาตร 130 ไมโครลิตร ลงในหลอดชนิด microcentrifuge ขนาด 0.2 มิลลิลิตรต่อปฏิกริยา โดยใช้ดีเอ็นเอ 500 นาโนกรัมต่อปฏิกริยา (ไม่ควรใช้เกิน 2 ไมโครกรัมเนื่องจากจะเปลี่ยนไซโตซีนเป็นยูราซิลได้ไม่สมบูรณ์) และปรับปริมาตรให้เป็น 150 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่น กลับหลอดไปมาเพื่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำใส่เครื่อง PCR โดยขั้นแรกที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อคลายสายดีเอ็นเอ ต่อมาอุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง เพื่อเปลี่ยนไซโตซีนที่ไม่มีการเติมหมู่

เมทิลให้เป็นยูราซิลขั้นที่ 2 เติม M-Binding Buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน Zymo-Spin™IC Columnและซ้อนบน Collection Tube ใส่ตัวอย่างที่ได้จากขั้นแรกลงในคอลัมน์ที่มี M-Binding Buffer กลับหลอดไปมาเพื่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดนาน 30 วินาที เมื่อครบเวลาเทส่วนของเหลวทิ้ง เติม M-Wash Buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ที่ซ้อนอยู่บน Collection Tube ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดนาน 30 วินาที เทของเหลวทิ้ง ต่อมาเติม M-Desulphonation Buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงบนคอลัมน์ที่ซ้อนบน Collection Tube บ่มที่อุณหภูมิห้อง (20-30 องศาเซลเซียส) นาน 15-20 นาที เมื่อครบเวลาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดนาน 30 วินาที เทของเหลวทิ้ง จากนั้นเติม M-Wash Buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงบนคอลัมน์ที่ซ้อนอยู่บน Collection Tube ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดนาน 30 วินาที เพื่อล้างดีเอ็นเอ ทำการล้างด้วย M-Wash Buffer ซ้ำประมาณ 1-2 รอบจากนั้นย้ายคอลัมน์ไปซ้อนบนหลอดชนิด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใส่ M-Elution Buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนตัวกรองของคอลัมน์โดยตรงเพื่อละลายดีเอ็นเอ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดนาน 30 วินาที เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

5.3 ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน

ขั้นแรกนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI วิเคราะห์หาตำแหน่งโพรโมเตอร์ของยีนด้วยโปรแกรม Promoter 2.0 Prediction Server (www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/) เนื่องจากดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ bisulfite converted treatment นิวคลีโอไทด์ไซโตซีนจะถูกเปลี่ยนเป็นยูราซิล จึงต้องทำการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูลให้สอดคล้องกับดีเอ็นเอดังกล่าว โดยเลือกบริเวณที่มี CpG island ซึ่งใกล้กับตำแหน่งโพรโมเตอร์เพื่อเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ไซโตซีนที่ไม่ใช่ CpG ทั้งหมดให้เป็นไทมีน (thymine, T) ตามคำแนะนำของคู่มือการใช้ EZ DNA Methylation Gold™ Kit ใน Bisulfite Primer SeekerProgram (www.zymoresearch.com/tools/bisulfite-primer-seeker) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/) โดยผลผลิต PCR ที่ได้ควรมีขนาดอยู่ในช่วง 50-200 นิวคลีโอไทด์ โดยแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ไซโตซีนบนตำแหน่ง CpG ของ forward primer ด้วย Y (Y=C/T) และแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์กวานีน (guanine, G) บนตำแหน่ง CpGของ reverse primer ด้วย R (R=A/G) ดังรูปที่ 4

5.4 Pyrosequencing

ส่งตรวจเปอร์เซ็นต์การเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ ของยีนเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และในกลุ่มควบคุมด้วยเทคนิค pyrosequencing ที่ iScience Technology co., ltd.

(Thailand) โดยเตรียมสายดีเอ็นเอที่จะใช้ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค hot start PCR (HS-PCR) โดยใช้สารประกอบในการทำ PCR ดังตารางที่ 3 และสภาวะในการทำ PCR ดังตารางที่ 4

```
PRODUCT SIZE: 152

  1 tTttAGtTAtAtAtTttATtTttCGGGAGtAAGGGGAAAtTtCGAGAGGAGGGtAAtAGA

 61 tttAGtATtTTGttAGGGtttCGGAGGAGGGGTTtttCGtTACGttTGTGtCGGAGGAGT

121 TttAGTtAtCGAGCGAGGGGCGtAAGGGTGGGTGtATttTGCGtTGCGGCGGGCGCGtTA
                        >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
181 tttAGACGtTGGTGTGtAGAGttAtATGAAGttTGtTGGGGAtTGGGGGttAGGGAGtAG

241 tAAGttAGtTGGGAtTGAGGCGGACGtTGTtTtAGGGAGACGtTGAtTCGtAAAGAtAtT
                                   <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
301 tttTTttTTGTGttTGGGTAAAAAGTtTttTttTGGGGTtttTGGttATttTGAATATtt

361 AGAATGGTGTTTtTGAAGTTtTTtTGtATGAGTTTtTTtTGttAttTGTGTtAAGGtTAt

>Origin primers from PRIMER3
LEFT PRIMER      CGtAAGGGTGGGTGtATttTG
RIGHT PRIMER     TaCGAaTCAaCGTCTCCCTaAa

>primers were modified before submit to order
LEFT PRIMER      YGtAAGGGTGGGTGtATttTG
RIGHT PRIMER     TaCRAaTCAaCRTCTCCCTaAa
```

รูปที่ 4 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันโพรโมเตอร์ ลูกศรชี้แสดงถึงตำแหน่งเริ่มต้นของโพรโมเตอร์ บริเวณแถบสีเขียวแสดงตำแหน่งที่ไพรเมอร์จับ บริเวณแถบสีเหลืองแสดงตำแหน่ง CpG อักษรตัวพิมพ์เล็กสีฟ้าแสดงการแทนที่ไซโตซีนด้วยไทมีน

ตารางที่ 3 สารประกอบปฏิกิริยา HS-PCR

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 5x PCRBIO Reaction buffer	10.0	1x
2. 10 µM Forward primer	2.0	400 nM
3. 10 µM Reverse primer	2.0	400 nM
4. Distilled water	16	
5. bisulfite converted DNA	20.0	
รวมปริมาตร	50.0	

ตารางที่ 4 สภาวะในการทำ HS-PCR

ขั้นตอน		อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา
Pre-denaturation		95	5 นาที
Denaturation	35 รอบ	95	15 วินาที
Annealing	35 รอบ	56	15 วินาที
Extention	35 รอบ	72	15 วินาที
Final extention		72	5 นาที

6. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออก และการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน

วิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออก และการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน ด้วยสถิติ Pearson correlation โดยใช้โปรแกรม SPSS statistic 17.0 (IBM Corporation, USA) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรคู่หนึ่งว่ามีความสัมพันธ์กันในเชิงเส้นตรงหรือไม่ มีความสัมพันธ์ในทิศทางใด มีค่าความสัมพันธ์เป็นเท่าไร และมีค่าความน่าเชื่อถือเป็นที่ยอมรับได้ทางสถิติหรือไม่

บทที่ 4

ผลการศึกษา

1. ขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ

การวิจัยการแสดงออกของยีนในซิโนวิโอไซต์ผ่านการพิจารณาด้านจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ หนังสือรับรองเลขที่ 057/2555 รหัสโครงการวิจัย MTU-EC-OT-4-049/55

2. การคัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนโดยใช้เทคนิคชีวสารสนเทศ

2.1 คัดเลือกยีนโดยอาศัยค่าความแตกต่างทางสถิติเท่านั้น

การคัดเลือกยีนจากฐานข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ศึกษาการแสดงออกในเซลล์กระดูกอ่อน (accession number GSE16464) ของกลุ่มประชากรผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 10 คน และกลุ่มประชากรปกติจำนวน 4 คนและในเซลล์เยื่อบุรอบข้อ (accession number GSE12021) ของกลุ่มประชากรผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 10 คน และกลุ่มประชากรปกติ 9 คน โดยใช้ชีวสารสนเทศ พบว่ายีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มประชากรปกติที่ค่าความเชื่อมั่น 99 % ในเซลล์กระดูกอ่อนจำนวน 160 ยีน และในเซลล์เยื่อบุรอบข้อจำนวน 952 ยีน เมื่อวิเคราะห์แล้วพบว่า 12 ยีนในเซลล์กระดูกอ่อน และยีนในเยื่อบุรอบข้อ เป็นยีนเดียวกัน และ เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อน 3 ยีน ดังตารางที่ 5 คือ ยีน *emopamil binding protein* (*EBP*) ยีน *inositol monophosphatasedomaincontaining 1* (*IMPAD1*) หรือยีน *joints abnormal with splitting* (*JAWS*) และ ยีน *phosphatidic acid phosphatase domain containing 1B* (*PPAPDC1B*)

ตารางที่ 5 ผลการคัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อน โดยอาศัยค่าความแตกต่างทางสถิติเท่านั้น

จำนวนยีนที่แตกต่างกันที่ค่าความเชื่อมั่นทางสถิติมากกว่า 99%			**ลักษณะการแสดงออก**	
เซลล์กระดูกอ่อน	**เซลล์เยื่อบุรอบข้อ**	**ยีนที่มีการแสดงออกร่วมกัน**		
160 ยีน	**952 ยีน**	**12 ยีน**	**เซลล์กระดูกอ่อน**	**เซลล์เยื่อบุรอบข้อ**
ABCF3	*AASDH*	*C3orf23*	**ลดลง**	**เพิ่มขึ้น**
ACPL2	*ABCB8*	*C9orf9*	**ลดลง**	**ลดลง**
ACTA1	*ABTB1*	*CARS2*	**ลดลง**	**ลดลง**
ADAMDEC1	*ACAD11*	*DPH5*	**ลดลง**	**เพิ่มขึ้น**
ADAMTS8	*ACAP3*	*EBP* *	**เพิ่มขึ้น**	**ลดลง**
ADARB1	*ACBD6*	*FAM45A*	**ลดลง**	**เพิ่มขึ้น**
ADCY1	*ACER3*	*IMPAD1* *	**เพิ่มขึ้น**	**เพิ่มขึ้น**
AGTR1	*ACSS1*	*MAP1LC3A*	**ลดลง**	**ลดลง**
AIDA	*ACTA2*	*MSH6*	**เพิ่มขึ้น**	**ลดลง**
AMOTL1	*ACTG1*	*PPAPDC1B* *	**ลดลง**	**เพิ่มขึ้น**
ANKIB1	*ADAL*	*VEPH1*	**ลดลง**	**ลดลง**
ANKRD1	*ADAM17*	*ZNF688*	**ลดลง**	**ลดลง**
AOF1	*ADAM33*			

หมายเหตุ * คือยีนที่นำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

2.2 คัดเลือกโดยอาศัยค่าความแตกต่างทางสถิติประกอบกับการวิเคราะห์ค่าการจับที่แตกต่างกันของโพรบ

คัดเลือกยีนจากฐานข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ศึกษาการแสดงออกของยีนในเซลล์เยื่อบุรอบข้อโดยใช้ชีวสารสนเทศ พบว่า 952 ยีน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มคนปกติที่ค่าความเชื่อมั่นมากกว่า 99 % หลังจากคัดเลือกเฉพาะยีนที่มีค่าการจับของโพรบมากกว่า 300 RFU จำนวนยีนลดลงเหลือ 836 ยีน และเมื่อคัดเลือกยีนโดยให้มีค่าการจับของโพรบแตกต่างกันมากกว่า 5 เท่าระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มคนปกติ จำนวนยีนลดลงเหลือ 15 ยีน พบว่าเป็นยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มคนปกติ 5 ยีน และมีการแสดงออกลดลง 10

ยีน ดังตารางที่ 6 โดยมียีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อน 1 ยีน คือ ยีน *fin-budinitiation in zebrafishhomolog* (*FIBIN*)

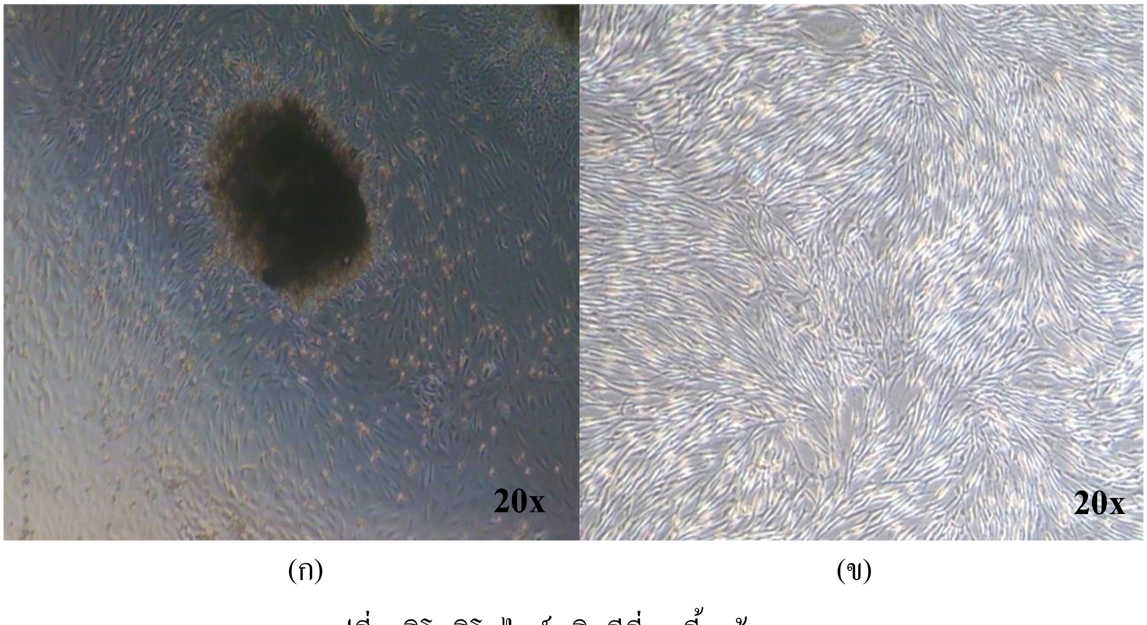
ตารางที่ 6 ผลคัดเลือกโดยอาศัยค่าความแตกต่างทางสถิติประกอบกับการวิเคราะห์ค่าการจับที่แตกต่างกันของโพรบ

จำนวนยีนที่แตกต่างกันที่ค่าความเชื่อมั่น 95%		**การแสดงออกแตกต่างกันมากกว่า 5 เท่า**	
เซลล์เยื่อบุรอบข้อ	**ค่าการจับของโพรบมากกว่า 300 RFU**	**เพิ่มขึ้น**	**ลดลง**
952 ยีน	**836 ยีน**	**5 ยีน**	**10 ยีน**
AASDH	*AASDH*	*FIBIN* *	*ADAMTS10*
ABCB8	*ABCB8*	*HLA-DQA1*	*EMILIN2*
ABTB1	*ABTB1*	*LOC100128501*	*LOC442075*
ACAD11	*ACAD11*	*LOC653071*	*LRRFIP1*
ACAP3	*ACAP3*	*NNMT*	*MALAT1*
ACBD6	*ACBD6*		*NCRNA00084*
ACER3	*ACER3*		*PSME4*
ACSS1	*ACSS1*		*SLC20A1*
ACTA2	*ACTG1*		*THRAP3*
ACTG1	*ADAL*		*YPEL2*

หมายเหตุ * คือยีนที่นำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3. ตัวอย่างซิโนวิโอไซต์ชนิดบีที่ใช้ในการวิจัย

ซิโนวิโอไซต์ชนิดบีที่สกัดจากน้ำข้อเข่าถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ พบว่าใน passage 0 (P0) มีเซลล์ชนิดอื่นที่มีลักษณะกลม ปนอยู่กับซิโนวิโอไซต์ชนิดบีซึ่งเป็นเซลล์เกี่ยวพัน (ดังรูป 5ก) และเมื่อเปลี่ยนอาหารเซลล์ที่ปนเปื้อนดังกล่าวจะถูกกำจัดไปเนื่องจากไม่มีคุณสมบัติในการเกาะพื้นผิว และปริมาณของซิโนวิโอไซต์ชนิดบีจะเพิ่มขึ้นเนื่องจากมี FGF-2 เป็นตัวกระตุ้น (ดังรูปที่ 5ข) จนมากพอที่จะสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน และสกัดดีเอ็นเอเพื่อศึกษาการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน

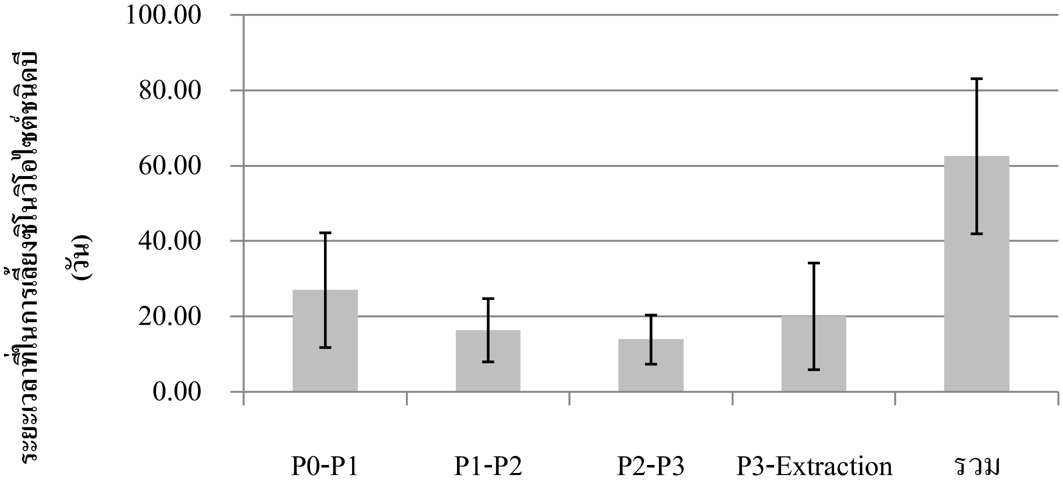


(ก) (ข)

รูปที่ 5 ซิโนวิโอไซต์ชนิดบีที่ถูกเลี้ยงด้วย DMEM

(ก) เซลล์ใน passage 0 (ข) ซิโนวิโอไซต์ชนิดบีใน passage 3

ซิโนวิโอไซต่ชนิดบีใช้ระยะเวลาเฉลี่ยในการเลี้ยงเซลล์ประมาณ 40-80 วัน โดยในช่วง passage 0 ถึง passage 1 จะใช้ระยะในการเลี้ยง 10-45 วัน โดยขึ้นอยู่กับปริมาณของซิโนวิโอไซต์ชนิดบีในน้ำข้อเข่าที่ใช้เริ่มเลี้ยง จากนั้นในแต่ละ passage ระยะเวลาที่ใช้เลี้ยงจะลดลง (ดังรูปที่ 6) เนื่องจากมีเซลล์ตั้งต้นในการเพิ่มปริมาณเป็นจำนวนมาก



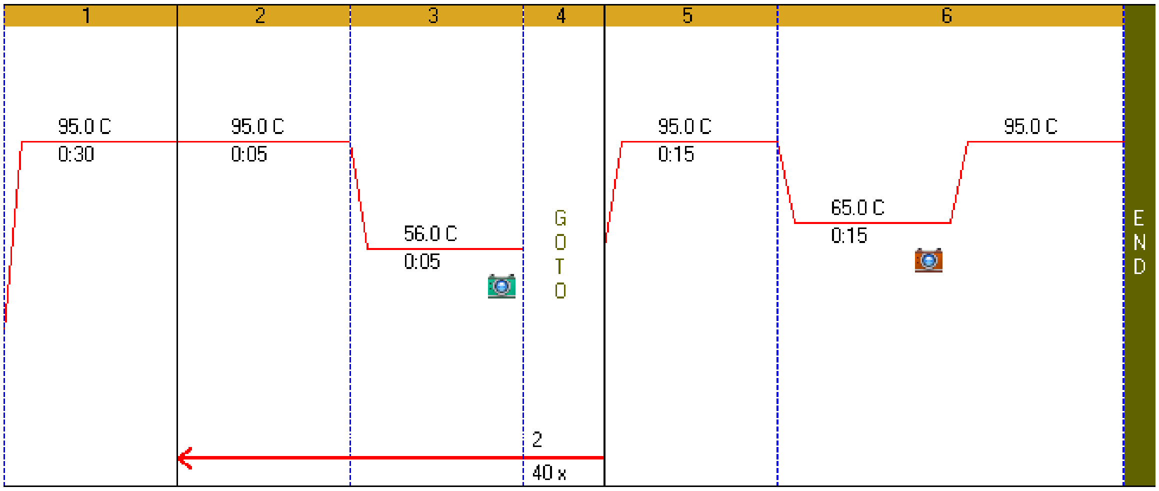
รูปที่ 6 ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงซิโนวิโอไซต์ชนิดบี (N=29)

หมายเหตุ P = passage

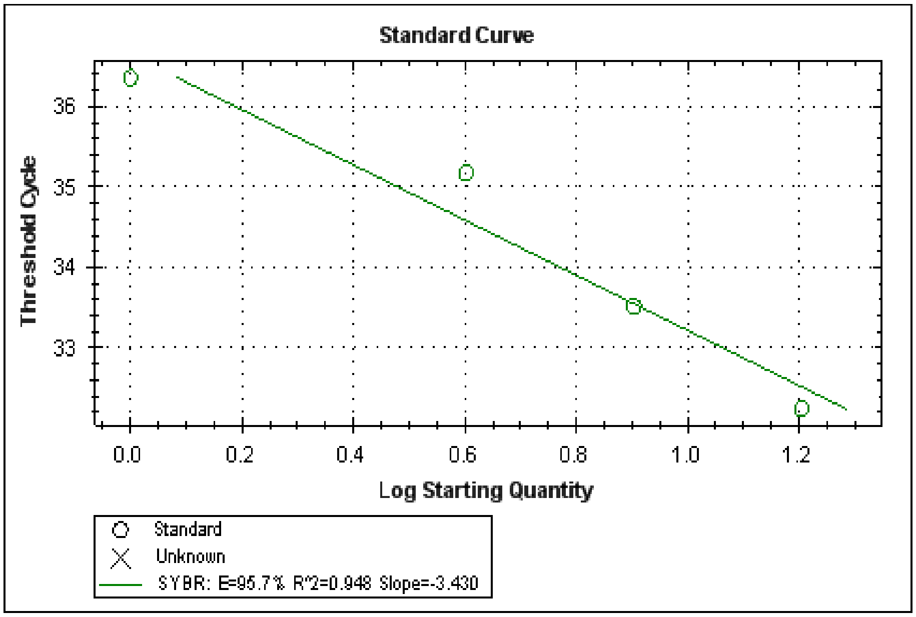
4. ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนในซิโนวิโอไซต์ชนิดบีของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

4.1 ยีนที่ถูกคัดเลือกโดยอาศัยค่าความแตกต่างทางสถิติเท่านั้น

ศึกษาการแสดงออกของ*IMPAD1 EBP* และ *PPAPDC1B* ด้วย real-time PCR ในสภาวะ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ตามด้วย denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที จากนั้น annealing/extension ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส โดยใช้ขั้นตอนในการทำปฏิกริยา PCR จำนวน 40 รอบ และ meltingphase เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส โดยเพิ่มอุณหภูมิ 0.5 องศาเซลเซียสต่อ 1 ขั้นตอน melting phase ซึ่งใช้เวลาขั้นตอนละ 2-5 วินาที เพื่อสร้าง meltcurve สำหรับตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ ดังรูปที่ 7 ซึ่งมีค่าประสิทธิภาพของปฏิกริยา 95.7 % 96.5 % และ 93.5 % (ดังรูปที่ 8 9 และ10) ตามลำดับ โดยใช้ *GAPDH* ซึ่งมีค่าประสิทธิภาพของปฏิกริยา 95.2 % (ดังรูปที่ 11) เป็นยีนควบคุม



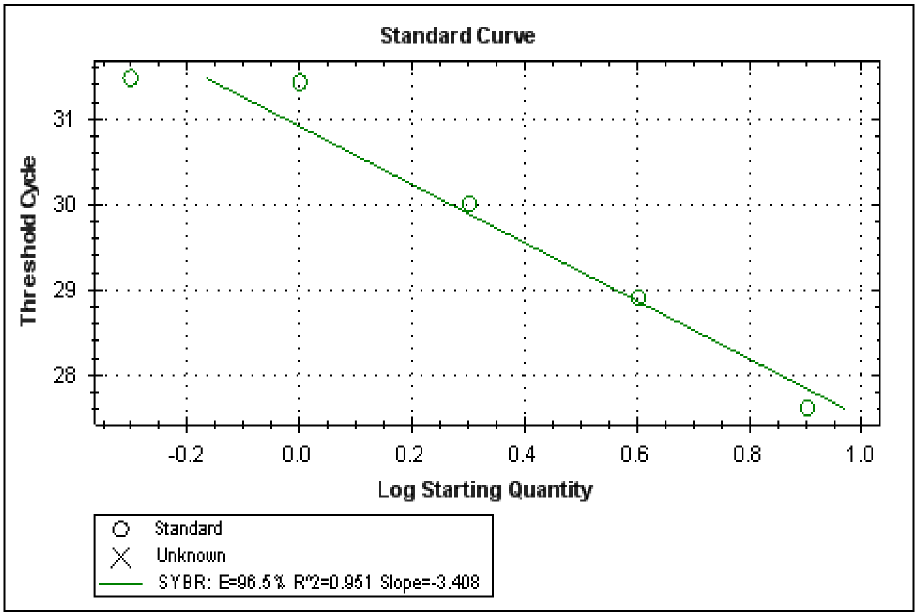
รูปที่ 7 สภาวะในการทำ real-time PCR เพื่อศึกษาการแสดงออกของ *IMPAD1 EBP* และ *PPAPDC1B* โดยใช้ CFX96™ (Bio-Rad, USA)



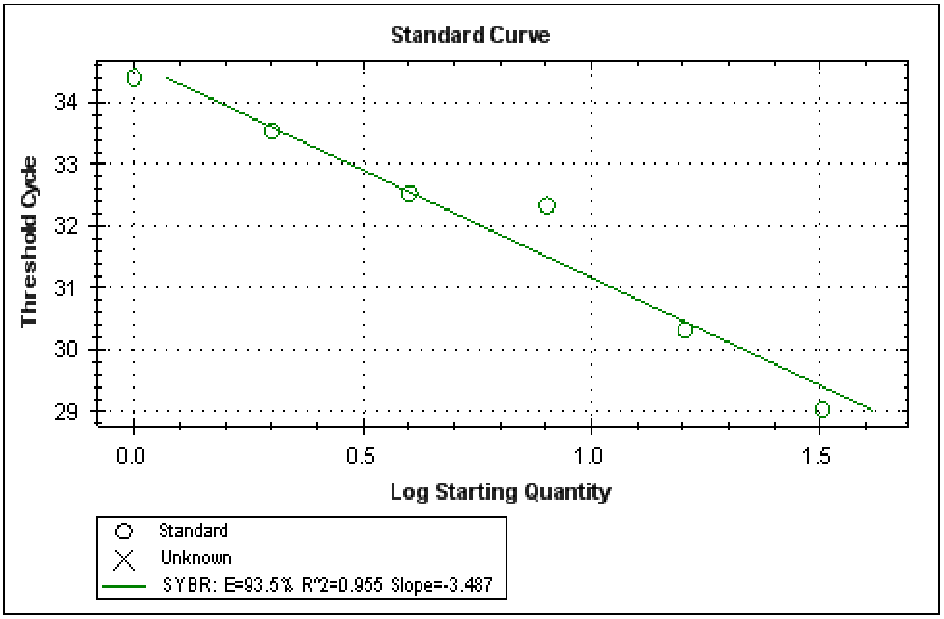
รูปที่ 8 ค่าประสิทธิภาพของปฏิกริยาในการทำ real-time PCR ของยีน *IMPAD1*

แกน x คือ Ct cycle แกน y คือ ความเข้มข้นของ cDNA ที่ใช้ในปฏิกริยา

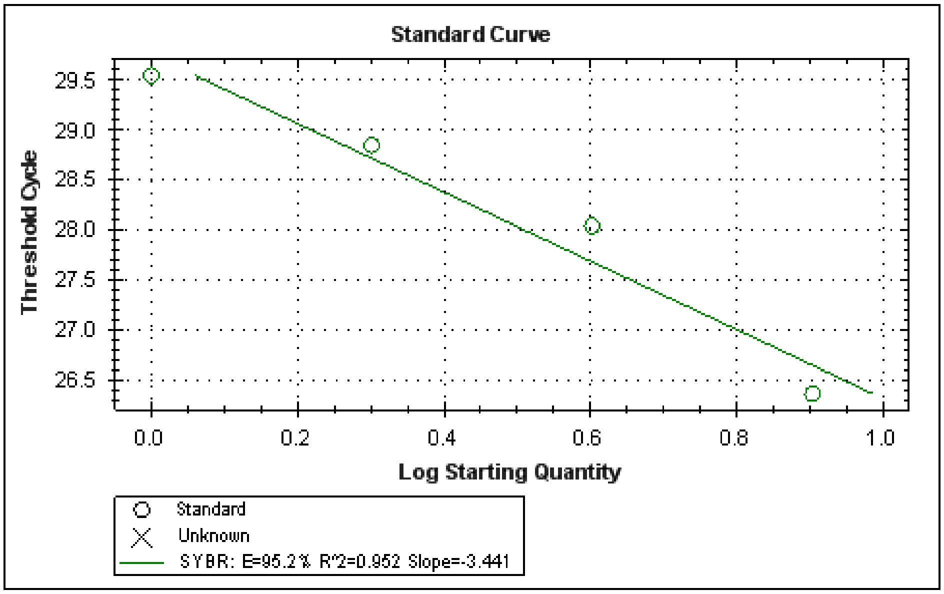
E = ค่าประสิทธิภาพของปฏิกริยา PCR



รูปที่ 9 ค่าประสิทธิภาพของปฏิกริยาในการทำ real-time PCR ยีน *EBP*

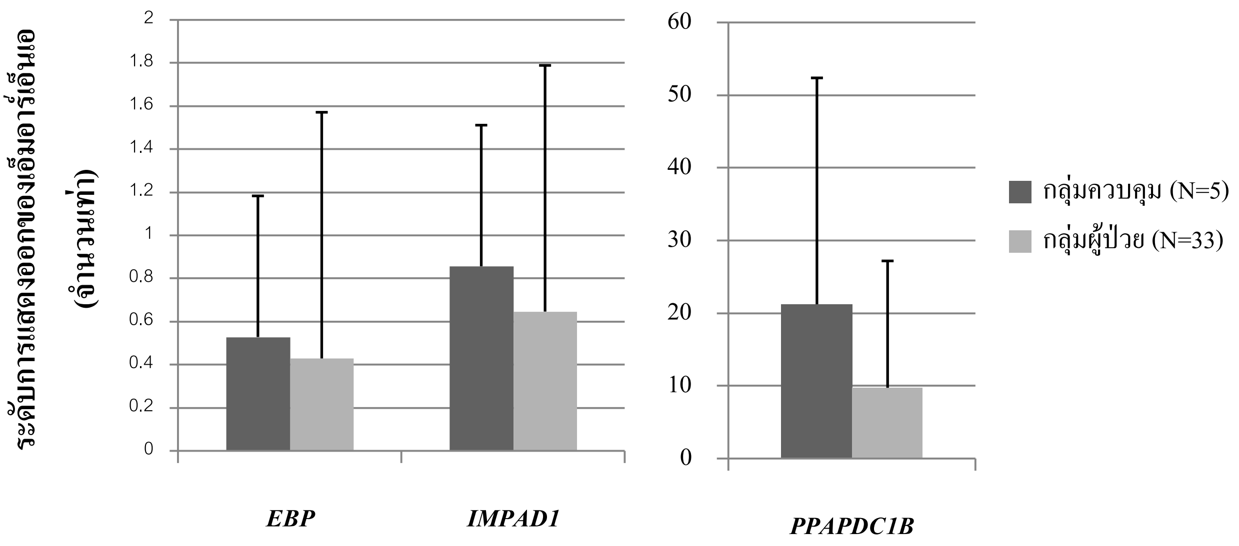


รูปที่ 10 ค่าประสิทธิภาพของปฏิกริยาในการทำ real-time PCR ยีน *PPAPDC1B*



รูปที่ 11 ค่าประสิทธิภาพของปฏิกริยาในการทำ real-time PCR ยีน *GAPDH*

จากการศึกษาพบว่าการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนซึ่งถูกคัดเลือกโดยอาศัยค่าความแตกต่างทางสถิติเพียงอย่างเดียว ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 33 คน และกลุ่มควบคุมจำนวน 5 คน ทั้ง *EBP IMPAD1* และ *PPAPDC1B* (*p* value = 0.6913 0.2456 และ 0.2046 ตามลำดับ) ดังรูปที่ 12



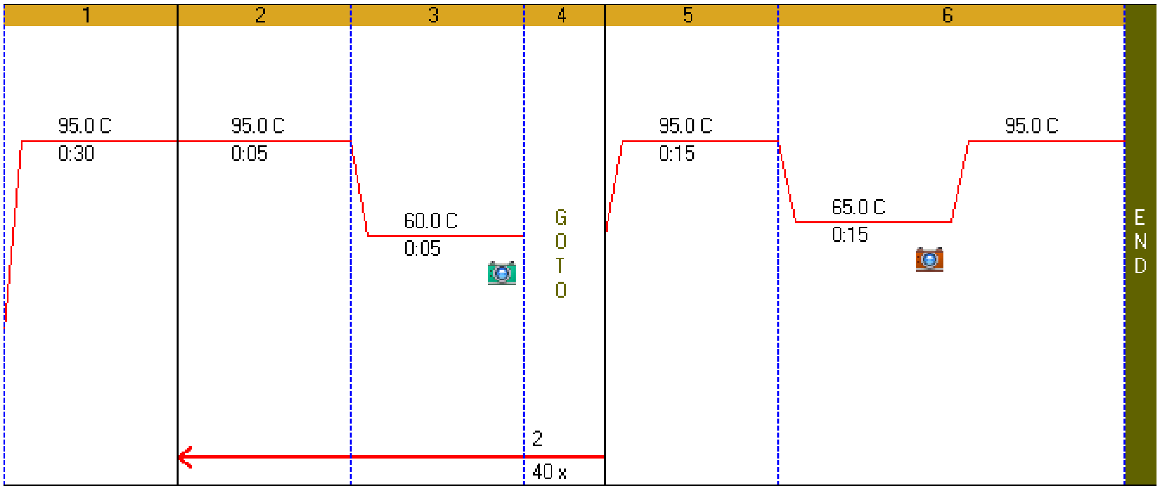
(ก) (ข)

รูปที่ 12 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนในซิโนวิโอไซต์ชนิดบีของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ถูกคัดเลือกโดยอาศัยค่าความแตกต่างทางสถิติเท่านั้น

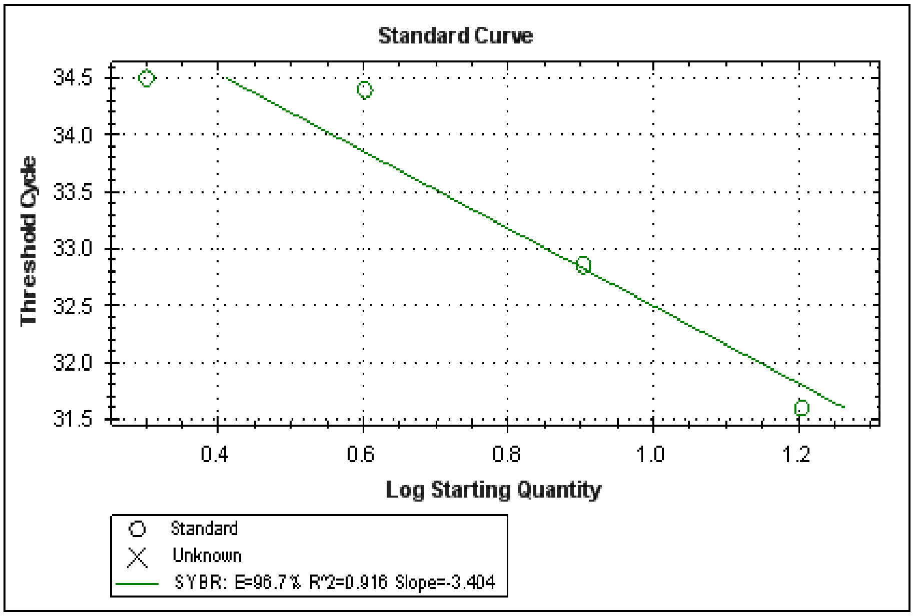
(ก) การแสดงออกของยีน *EBP* และยีน *IMPAD1* (ข) การแสดงออกของยีน *PPAPDC1B*

4.2 ยีนที่ถูกคัดเลือกโดยอาศัยค่าความแตกต่างทางสถิติประกอบกับการวิเคราะห์ค่าการจับที่แตกต่างกันของโพรบ

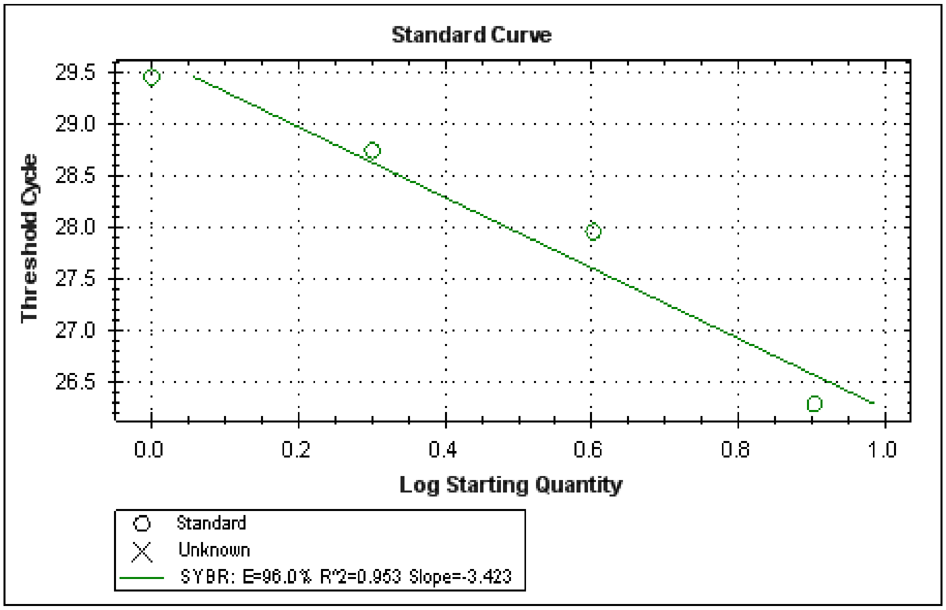
ศึกษาการแสดงออกของ *FIBIN* ด้วย real-time PCR ในสภาวะ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ตามด้วย denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที จากนั้น annealing/extension ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้ขั้นตอนในการทำปฏิกริยา PCR จำนวน 40 รอบ และ meltingphase เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิ 9 5 องศาเซลเซียส โดยเพิ่มอุณหภูมิ 0. 5 องศาเซลเซียสต่อ 1 ขั้นตอน melting phase ซึ่งใช้เวลาขั้นตอนละ 2-5 วินาที เพื่อสร้าง meltcurve สำหรับตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ดังรูปที่ 13 ซึ่งมีค่าประสิทธิภาพของปฏิกริยา 93.5 % (ดังรูปที่ 14) ตามลำดับ โดยใช้ *GAPDH* ซึ่งมีค่าประสิทธิภาพของปฏิกริยา 96 % (ดังรูปที่ 15) เป็นยีนควบคุม



รูปที่ 13 สภาวะในการทำ real-time PCR เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *FIBIN*

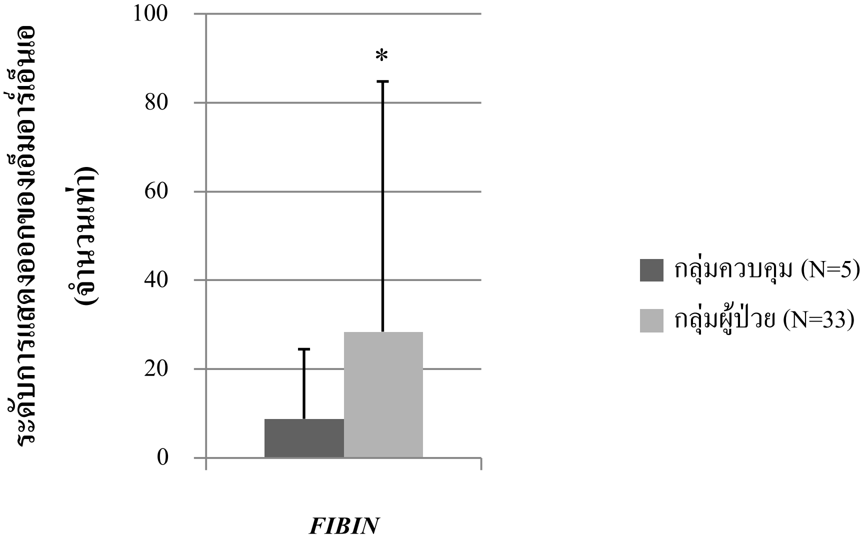


รูปที่ 14 ค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยาในการทำ real-time PCR ยีน *FIBIN*



รูปที่ 15 ค่าประสิทธิภาพของปฏิกริยาในการทำ real-time PCR ยีน *GAPDH*

จากการศึกษาพบว่าการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนซึ่งถูกคัดเลือกโดยอาศัยค่าความแตกต่างทางสถิติประกอบกับการวิเคราะห์ค่าการจับที่แตกต่างกันของโพรบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นมากกว่า 95 % (p value = 0.0228) โดยกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม (N=33) มีการแสดงออกของ *FIBIN* เพิ่มขึ้น (28.3311 ±56.3876) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (N=5) (8.7004 ± 15.6900) ดังรูปที่ 16

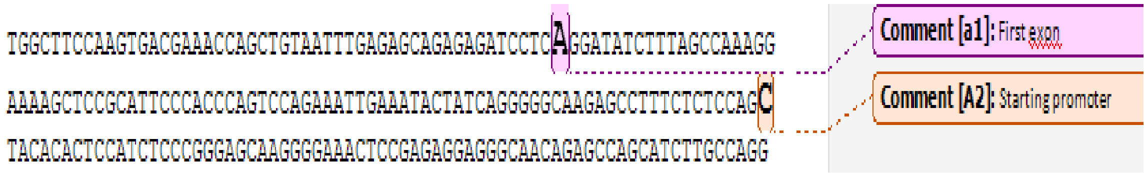


รูปที่ 16 การแสดงออกของ *FIBIN* ในซิโนวิโอไซต์ชนิดบีของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ถูกคัดเลือกโดยอาศัยค่าความแตกต่างทางสถิติประกอบกับการวิเคราะห์ค่าการจับที่แตกต่างกันของโพรบ

5. ศึกษาการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

5.1 ตำแหน่งโพรโมเตอร์ของยีน *FIBIN*

การวิเคราะห์ตำแหน่งของโพรโมเตอร์ ยีน *FIBIN* ด้วยโปรแกรม Promoter 2.0 Prediction Server พบจุดเริ่มต้นขอนโพรโมเตอร์อยู่ที่ตำแหน่ง +199 ดังรูปที่ 17 โดยในช่วง 350 นิวคลีโอไทด์จากจุดเริ่มต้นของโพรโมเตอร์ มี CpG 19 ตำแหน่ง ซึ่งไพรเมอร์ที่ออกแบบด้วย ด้วยโปรแกรม Primer3 สามารถใช้ศึกษาตำแหน่ง CpG ที่ติดกับ forward primer ได้ 5 ตำแหน่ง ดังรูปที่ 18



รูปที่ 17 ตำแหน่งโพรโมเตอร์ของยีน *FIBIN*

แถบสีชมพู คือ นิวคลีโอไทด์แรกของ exon ที่ 1

แถบสีส้ม คือ จุดเริ่มต้นของโพรโมเตอร์ที่วิเคราะห์จากโปรแกรม Promoter 2.0 Prediction Server

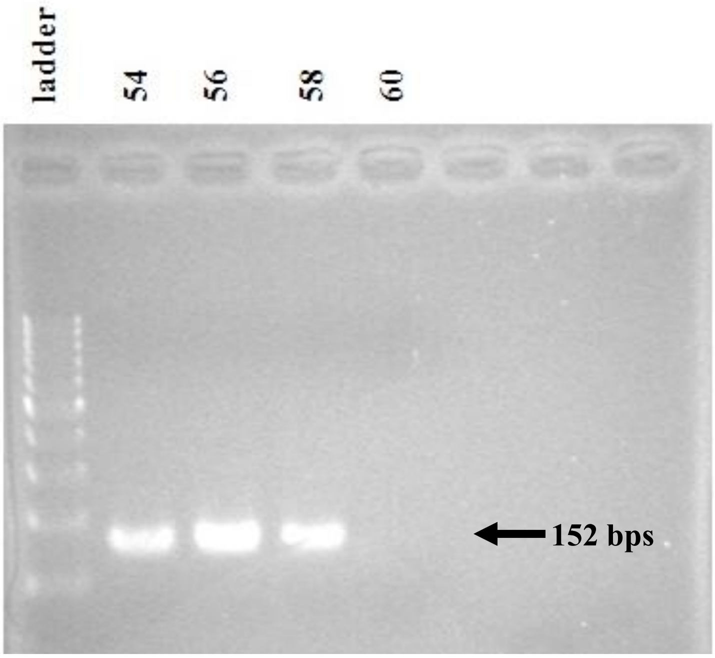
```
PRODUCT SIZE: 152, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 3.00

  1 tTttAGtTAtAtAtTttATtTttCGGGAGtAAGGGGAAAtTtCGAGAGGAGGGtAAtAGA

 61 GttAGtATtTTGttAGGGtttCGGAGGAGGGGTTtttCGtTACGttTGTGtCGGAGGAGT

121 TttAGTtAtCGAGCGAGGGGCGtAAGGGTGGGTGtATttTGCGtTGCGGCGGGCGCGtTA
                        >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
181 tttAGACGtTGGTGTGtAGAGttAtATGAAGttTGtTGGGGAtTGGGGGttAGGGAGtAG

241 tAAGttAGtTGGGAtTGAGGCGGACGtTGTtTtAGGGAGACGtTGAtTCGtAAAGAtAtT
                                   <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
301 tttTTttTTGTGttTGGGTAAAAAGTtTttTttTGGGGTtttTGGttATttTGAATATtt

361 AGAATGGTGTTTtTGAAGTTtTTtTGtATGAGTTTtTTtTGttAttTGTGTtAAGGtTAt
```

รูปที่ 18 ตำแหน่ง CpG ที่อยู่บริเวณจุดเริ่มต้นของโพรโมเตอร์ยีน *FIBIN*

บริเวณแถบสีเขียวแสดงตำแหน่งที่ไพรเมอร์จับ บริเวณแถบสีเหลืองแสดงตำแหน่ง CpG อักษร

5.2 Hot start PCR

เนื่องจากเทคนิค pyrosequencing เป็นเทคนิคที่มีความละเอียดสูง หากสภาวะในการทำ PCR ไม่เหมาะสม อาจเกิด non-specific product ซึ่งจะทำให้ค่าที่ได้เกิดความคลาดเคลื่อน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำ HS-PCR พบว่าสามารถสังเคราะห์ผลผลิต PCR ได้ที่อุณหภูมิ 54 56 และ 58 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถสังเคราะห์ได้ที่ 60 องศาเซลเซียส (ดังรูปที่ 1 9) ดังนั้นจึงใช้อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เพื่อทำ HS-PCR และส่งวิเคราะห์การเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของ *FIBIN* ด้วยเทคนิค pyrosequencing



รูปที่ 19 ผลการสังเคราะห์ยีน *FIBIN* จาก bisulfite converted DNA ที่อุณหภูมิ annealing 54 56 58 และ 60 องศาเซลเซียส ในการทำ gradient PCR

5.3 Pyrosequencing

การศึกษาการเกิดเมทิลเลชันบนไซโตซีนที่ CpG island ซึ่งอยู่ใกล้จุดเริ่มต้นของโพรโมเตอร์ของยีน จำนวน 5 ตำแหน่ง (ดังรูปที่ 20) พบว่า CpG ตำแหน่งที่ 1 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม (N=24) อัตราการเกิดเมทิลเลชันมีแนวโน้มที่ลดลง (p value = 0.0784) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมกลุ่มควบคุม (N=5) (อัตราส่วนการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในกลุ่มควบคุม : กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม = 15.12: 9.88 %) ดังรูปที่ 21 ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

STCTACACACTCCATCTCCCGGGAGCAAGGGGAAACTCCGAGAGGAGGGCAACAGAGCC

AGCATCTTGCCAGGGCCCCGGAGGAGGGGTTCCCCGCTACGCCTGTGCCGGAGGAGTTC

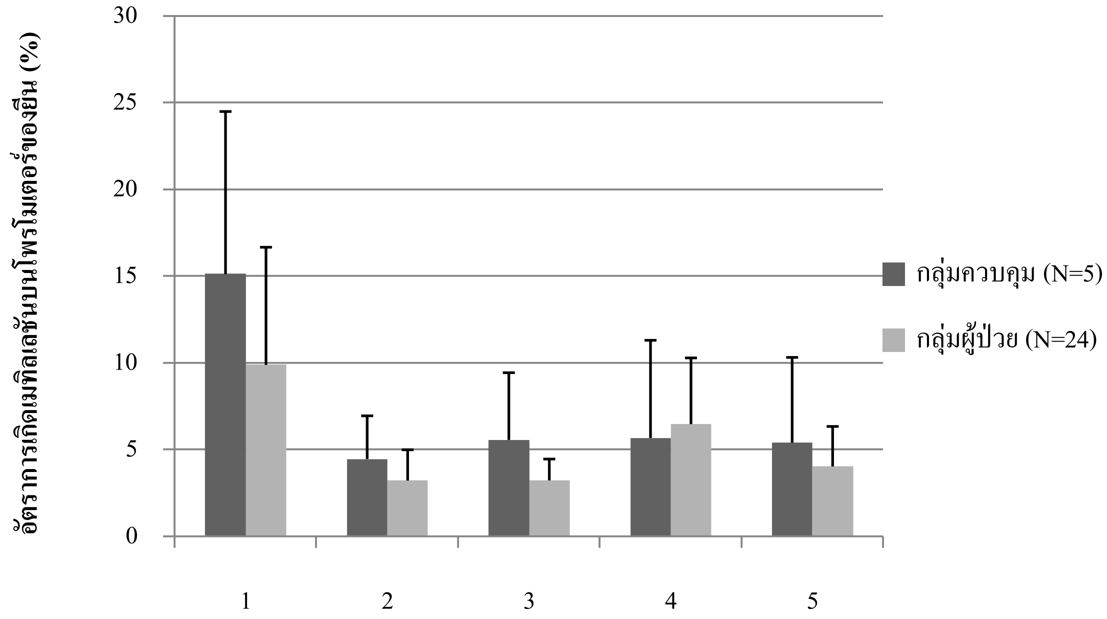
CAGTCACCGAGCGAGGGGCGCAAGGGTGGGTGCATCCTG^{1}CGCTG^{2}CGG^{3}CGGG^{4}CG^{5}CGC

TACCCAGACGCTGGTGTGCAGAGCCACATGAAGCCTGCTGGGGACTGGGGGCCAGGGAG

CAGCAAGCCAGCTGGGACTGAGGCGGACGCTGTCTCAGGGAGACGCTGACTCGCA

รูปที่ 20 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *FIBIN* (NCBI, 2013)

STC แสดงจุดเริ่มต้นของโพรโมเตอร์ และ ^{N}CG หมายถึง CpG ตำแหน่งที่ N

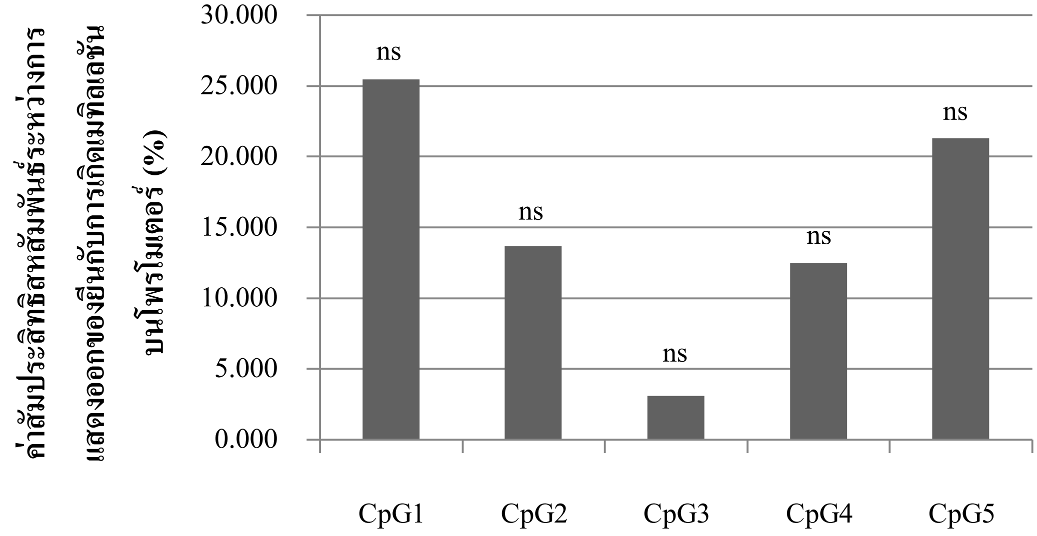


รูปที่ 21 อัตราการเกิดเมทิลเลชันที่ตำแหน่ง CpG บนโพรโมเตอร์ของ *FIBIN*

6. ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออก และการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน

จากการศึกษาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (correlation coefficient) ด้วยสถิติ Pearson correlation ระหว่างค่าการแสดงออก และการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน *FIBIN* ในกลุ่มประชากร 29 คน พบว่าการเกิดเมทิลเลชันที่ตำแหน่ง CpG มีค่า correlationcoefficient บน CpG ตำแหน่งที่ 1 2 3 4 และ 5 = 0.255 0.137 0.031 0.125 และ 0.213 ตามลำดับ (ดังรูปที่ 22) ซึ่งการแสดงออกของ *FIBIN* ที่ศึกษาด้วย real-time PCR ไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน *FIBIN* ใน CpG ตำแหน่งที่ 1 2 3 4 และ 5 (*p* value = 0.182

0.479 0.875 0.519 และ 0.267 ตามลำดับ) ในตัวอย่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม 24 คนและกลุ่มควบคุม 5 คน



รูปที่ 22 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน และการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน *FIBIN*

หมายเหตุ ns = ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ไม่แตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 5

อภิปราย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการทดลอง

จากงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าการใช้ชีวสารสนเทศน์เพื่อคัดเลือกยีนสำหรับนำมาใช้ในการศึกษาการแสดงออก ไม่ควรคำนึงถึงจากค่าความเชื่อมั่นที่ได้จากการวิเคราะห์ เพียงอย่างเดียว เช่น การศึกษาการแสดงออกของ *EBP* ซึ่งถูกคัดเลือกโดยอาศัยเพียงค่าความเชื่อมั่นมากกว่า 99 % (*p* value = 0.004) ด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าการแสดงออกมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มควบคุม (*p* value = 0.6913) เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดโพรบ (231320_at) ไม่มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *EBP* (NM_006579) ดังนั้นผลที่ได้จากไมโครอาร์เรย์อาจเกิดจากผลบวกลวง (false positive result) ที่สามารถเกิดขึ้นได้ เนื่องจากการใช้อุณหภูมิเพียงอุณหภูมิเดียวในขั้นตอนการไฮบริไดซ์ (hybridization) ในการทำไมโครอาร์เรย์ ซึ่งทำให้โพรบเกิดการจับแบบไม่จำเพาะจากนั้นสัญญาณสีฟลูออเรสเซนต์จะถูกส่งไปที่เครื่องตรวจจับ ทำให้แสดงผลที่เกิดจากการจับกันแบบไม่จำเพาะเกิดขึ้น เมื่อนำยีนที่ผ่านการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศน์มาศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real-time PCR ซึ่งมีความแม่นยำในการตรวจสอบปริมาณของสารพันธุกรรมที่สูง (Dallas *et al.*, 2005) ผลที่ได้จึงไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วย และกลุ่มควบคุม นอกจากนั้นถึงแม้ผลจากไมโครอาร์เรย์จะมีค่าการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ค่าการจับของโพรบมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยระหว่างสองกลุ่มประชากร ยีนที่นำมาใช้ในการศึกษาด้วยเทคนิคที่มีความละเอียดสูงกว่าจึงอาจไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศน์เนื่องจากเทคนิคไมโครอาร์เรย์เป็นการศึกษายีนพร้อมกันเป็นจำนวนมาก (high throughput)ผลการทดลองจึงมีความละเอียดที่ต่ำ ดังนั้นความคลาดเคลื่อนของผลการทดลองจึงมีสูง (Dallas *et al.*, 2005; Khodakov *et al.*, 2008) เช่น ผลที่ได้จากไมโครอาร์เรย์ โดยที่ *IMPAD1* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 1.9 เท่าในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม (*p* value=0.002) และ *PPAPDC1B* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 2.1 เท่าในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม (*p* value = 0.008) แต่เมื่อศึกษาการแสดงออกด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มควบคุม (*p* value = 0.2456 และ 0.2046 ตามลำดับ) ในขณะ *FIBIN* ที่ถูกคัดเลือกด้วยเทคนิคชีวสารสนเทศน์ที่ระดับความเชื่อมั่นมากกว่า 99 % (*p* value = 0.004) ซึ่งมีค่าการแสดงออกเพิ่มขึ้น 5.1 เท่า ใน

กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่ามีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p* value = 0.0228) โดยกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นประมาณ 3.26 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่ง ผลการแสดงออกที่ศึกษาด้วยเทคนิค real-time PCR ไปในทิศทางเดียวกับผล การแสดงออกของยีนจากฐานข้อมูลไมโครอาร์เรย์ ที่วิเคราะห์โดยใช้ชีวสารสนเทศน์

การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม อาจเกิดจากการตอบสนองต่อการเสียหายของกระดูกอ่อนผิวข้อ ยีน *FIBIN* จึงพยายามที่จะซ่อมแซมกระดูกอ่อนโดยการกระตุ้นกระบวนการสังเคราะห์กระดูกอ่อน หรือ อาจเป็นสาเหตุที่สำคัญในการทำให้เกิดกระดูกงอกในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม เนื่องจากยีน *FIBIN* ที่มีความสำคัญในการพัฒนารยางค์ของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังในระยะตัวอ่อน (Lakner *et al.*, 2011) การแสดงออกของยีน *FIBIN* พบมากในสมองส่วนซีรีบรัม กล้ามเนื้อกระดูก และเนื้อเยื่อส่วน mesoderm โดยเฉพาะ MCS ที่จะพัฒนากลายเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เช่น เซลล์กระดูกอ่อน เซลล์ซิโนวิโอไซต์ชนิดบี ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดเกี่ยวพันโดยสังเคราะห์โปรตีนที่มีการอนุรักษ์สูงโดยมีความแตกต่างกันน้อยกว่า 10 % ใน ปลาม้าลาย หนู และมนุษย์ กรดอะมิโนตัวที่ 1-8 ทำหน้าที่เป็น cleavage signal peptide แอสพาราจีนตำแหน่งที่ 30 (Asn^{30}) ที่จะถูกเติมหมู่น้ำตาล (glycosylation) และกรดอะมิโนซิสเทอีนตำแหน่งที่ 52 และ 64 (Cys^{52}และ Cys^{64}) 2 ตำแหน่งที่จะทำหน้าที่ในการสร้างพันธะ disulfide เพื่อรวมตัวกันเป็น complex โดยมีหน้าที่สำคัญในระบบการสังเคราะห์โปรตีนและส่งออกนอกเซลล์ (biosynthetic-secretorysystem) หากเกิดความผิดปกติที่ *Fibin* ทำให้เกิดเกิดการกุดของครีบในปลาม้าลาย และเกิดการกุดของแขนขาในหนู (Wakahara *et al.*, 2007)

จากการศึกษาสหสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออก และการเกิดเมทิลเลชันบนโพโมเตอร์ของ *FIBIN* ตำแหน่ง CpG ที่ 1 2 3 4 และ 5 ไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p* value = 0.182 0.479 0.875 0.519 และ 0.267 ตามลำดับ) ซึ่งอาจเกิดจากกระบวนการอื่น เช่น การหายไปของ small non-coding RNA หรือ miRNA คือ กระบวนการที่สำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยการทำลายอาร์เอ็นเอเป้าหมาย โดยทั่วไป miRNA มีขนาด 20-23 นิวคลีโอไทด์ซึ่งมีความจำเพาะต่อ mRNA เมื่อเข้าไปจับจะกลายเป็น RNA-inducedsilencing complex (RISC) ซึ่งจะหยุดการสังเคราะห์โปรตีนหรืออาจเกิดการทำลายอาร์เอ็นเอสายคู่ด้วยกระบวนการต้านไวรัสของร่างกาย หากเกิดความผิดปกติที่ intergenic region ของ miRNA อาจทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนดังกล่าว (Barter *et al.*, 2012) เช่น การสูญเสียการทำงานของ miRNAในกระบวนการของเอนไซม์ dicer ในกระดูกอ่อน

ของหนูในระยะตัวอ่อน ซึ่งทำให้หนูเกิดการตายภายในระยะเวลา 7 วัน ซึ่งเอนไซม์ dicer ทำให้กระบวนการเจริญของกระดูก และกระดูกอ่อนถูกยับยั้ง เมื่อ miRNA หายไป ทำให้การพัฒนาของกระดูกในตัวอ่อนหนูหยุดชะงัก (Guo *et al.*, 2010) เป็นต้น

นอกจากนั้นตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาไม่สามารถคัดเลือกอายุ น้ำหนัก และส่วนสูงให้มีค่าใกล้เคียงกันได้ ดังนั้นอาจมีปัจจัยอื่นที่ทำให้การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนแตกต่างกันระหว่างสองกลุ่มตัวอย่าง โดยปัจจัยดังกล่าวอาจไม่เกี่ยวข้องกับสาเหตุในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม เช่น จากการศึกษาปริมาณโปรตีนของ *COMP* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่นมากกว่า 95 % ระหว่างกลุ่มผู้ที่มีน้ำหนักตัวเกินมาตรฐาน และกลุ่มคนที่มีน้ำหนักปกติ (Andersson *et al.*, 2006) ดังนั้นหากนำมาใช้ศึกษาในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่มีน้ำหนักตัวเกินมาตรฐานจะไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่มีน้ำหนักตัวเกินมาตรฐาน

สรุปผลการวิจัย

การคัดเลือกยีนที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนจากฐานข้อมูลไมโครอาร์เรย์โดยใช้ชีวสารสนเทศน์ ไม่ควรคำนึงถึงเพียงค่าความเชื่อมั่นที่ได้จากการวิเคราะห์ แต่ควรวิเคราะห์ประกอบกับค่าการจับที่แตกต่างกันของโพรบ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน โดยพบว่าการแสดงออกของ *EBP IMPAD1* และ *PPAPDC1B* ซึ่งถูกคัดเลือกโดยอาศัยค่า *p* value เพียงอย่างเดียว ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มควบคุม (*p* value = 0.6913 0.2456 และ 0.2046 ตามลำดับ) ในขณะที่ *FIBIN* ที่ถูกคัดเลือกโดยอาศัยค่า *p* value ประกอบกับการวิเคราะห์ค่าการจับที่แตกต่างกันของโพรบ มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (*p* value = 0.0228) ซึ่งผลการแสดงออกที่ได้ไปในทิศทางเดียวกับผลการแสดงออกของยีนจากฐานข้อมูลไมโครอาร์เรย์โดยใช้ชีวสารสนเทศน์และจากการศึกษาการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีอัตราการเกิด เมทิลเลชันลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งมีความสอดคล้องกับระดับการแสดงออกที่ศึกษาด้วยเทคนิค real-time PCR โดยจากการศึกษาค่าสหสัมพันธ์พบว่าไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างการแสดงออก และการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของ *FIBIN* โดยการแสดงออกที่เปลี่ยนไปอาจเกิดจากปัจจัยอื่น เช่น กระบวนการควบคุมการถอดรหัส การเปลี่ยนแปลงของ miRNA การเปลี่ยนแปลงของ acetylation บนโพรโมเตอร์ของยีน หรืออาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ chromatin remodeling เป็นต้น การแสดงออกที่เปลี่ยนไปของ *FIBIN* อาจมีบทบาท

สำคัญในการทำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ซึ่งจะนำไปสู่ความเข้าใจกลไกในการเกิดโรคที่มากขึ้น เพื่อใช้พัฒนายาที่มีความจำเพาะต่อสาเหตุการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม นอกจากนั้นยังสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อใช้คัดกรองผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมในระยะเริ่มต้นเพื่อหลีกเลี่ยงปัจจัยต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดการเสื่อมของข้อเข่า และยืดระยะเวลาในการเกิดโรคออกไปได้

ข้อเสนอแนะ

ควรเลือกกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาที่มีอายุ และค่าดัชนีมวลกาย (body mass index,BMI)ที่ใกล้เคียงกัน เพื่อหลีกเลี่ยงผลการวิจัยที่เกิดจากปัจจัยอื่นซึ่งไม่ใช่ผลที่ต้องการอย่างแท้จริง นอกจากนั้นจำนวนของกลุ่มตัวอย่างควรมีจำนวนเหมาะสมกับสถิติที่ใช้เพื่อให้สามารถลดความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากปริมาณตัวอย่างอันเนื่องมาจากการวิเคราะห์ด้วยสถิติ และมีความน่าเชื่อถือในระดับที่สามารถยอมรับได้

เซลล์ซิโนวิโอไซต์ชนิดบีที่ได้จากน้ำไขข้อควรทำการสกัดเพื่อเลี้ยงเซลล์ภายใน 24 ชั่วโมง เนื่องจากเมื่อเซลล์ออกจากร่างกาย จะทำให้สภาพแวดล้อมเปลี่ยนไป ซึ่งอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับการแสดงออกของยีน และผลที่ได้อาจมีค่าแตกต่างไปจากการแสดงออกปกติในร่างกาย

พัฒนาเทคนิคในการศึกษาอัตราการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีนด้วยเทคนิค real-time PCR เพื่อลดระยะเวลา และค่าใช้จ่ายในการทำ pyrosequencing โดยใช้เทคนิค MethyQuant real-time PCR (Dugast-Darzacq and Grange, 2009) และศึกษาการแสดงออกในระดับโปรตีนของ *FIBIN* เพิ่มเติม ด้วยการทำ western blot เพื่อดูการแสดงออกในระดับโปรตีน และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอที่ได้ศึกษาไป ซึ่งความเข้าในเพิ่มเติมในระดับการแสดงออกของโปรตีนอาจทำให้ทราบถึงกลไกการทำงานของ *FIBIN* ในระดับโปรตีนของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ซึ่งหากไม่สอดคล้องกับข้อมูลการแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ อาจเกิดจากความผิดปกติที่กระบวนการหลังการแปลรหัส (post-translation) ซึ่งอาจทราบถึงกลไกที่สำคัญในการทำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

Andersson, M. L., Thorstensson, C. A., Roos, E. M., Petersson, I. F., Heinegard, D. and Saxne, T., 2006. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) increase temporarily after physical exercise in patients with knee osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord* 7: 98.

Barter, M. J., Bui, C. and Young, D. A., 2012. Epigenetic mechanisms in cartilage and osteoarthritis: DNA methylation, histone modifications and microRNAs. *Osteoarthritis Cartilage* 20(5): 339-349.

Dallas, P. B., *et al.*, 2005. Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR -- how well do they correlate? *BMC Genomics* 6: 59.

Dugast-Darzacq, C. and Grange, T., 2009. MethylQuant: a real-time PCR-based method to quantify DNA methylation at single specific cytosines. *Methods Mol Biol* 507: 281-303.

Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S. and Bartel, D. P., 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466(7308): 835-840.

Khodakov, D. A., Zakharova, N. V., Gryadunov, D. A., Filatov, F. P., Zasedatelev, A. S. and Mikhailovich, V. M., 2008. An oligonucleotide microarray for multiplex real-time PCR identification of HIV-1, HBV, and HCV. *Biotechniques* 44(2): 241-246, 248.

Lakner, J., Seyer, C., Hermsdorf, T. and Schoneberg, T., 2011. Characterization of the expression, promoter activity and molecular architecture of fibin. *BMC Biochem* 12: 26.

Wakahara, T., *et al.*, 2007. Fibin, a novel secreted lateral plate mesoderm signal, is essential for pectoral fin bud initiation in zebrafish. *Dev Biol* 303(2): 527-535.

รายการอ้างอิง

Andersson, M. L., Thorstensson, C. A., Roos, E. M., Petersson, I. F., Heinegard, D. and Saxne, T., 2006. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) increase temporarily after physical exercise in patients with knee osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord* 7: 98-102.

Barter, M. J., Bui, C. and Young, D. A., 2012. Epigenetic mechanisms in cartilage and osteoarthritis: DNA methylation, histone modifications and microRNAs. *Osteoarthritis Cartilage* 20: 339-349.

Bernard-Pierrot, I*., et al.*, 2008. Characterization of the recurrent 8p11-12 amplicon identifies PPAPDC1B, a phosphatase protein, as a new therapeutic target in breast cancer. *Cancer Research* 68: 7165-7175.

Cho, H. J., Chang, C. B., Yoo, J. H., Kim, S. J. and Kim, T. K., 2010. Gender differences in the correlation between symptom and radiographic severity in patients with knee osteoarthritis. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 468: 1749-1758.

Dallas, P. B*., et al.*, 2005. Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR -- how well do they correlate? *BMC Genomics* 6: 59-68.

Del Rey, M. J*., et al.*, 2012. Transcriptome analysis reveals specific changes in osteoarthritis synovial fibroblasts. *Annals of the Rheumatic Diseases* 71: 275-280.

Dugast-Darzacq, C. and Grange, T., 2009. MethylQuant: a real-time PCR-based method to quantify DNA methylation at single specific cytosines. *Methods in Molecular Biology* 507: 281-303.

Edwards, J. C., 2000. Fibroblast biology. Development and differentiation of synovial fibroblasts in arthritis. *Arthritis Research and Therapy* 2: 344-347.

El Hajjaji, H., Cole, A. A. and Manicourt, D. H., 2005. Chondrocytes, synoviocytes and dermal fibroblasts all express PH-20, a hyaluronidase active at neutral pH. *Arthritis Research and Therapy* 7: 756-768.

Evcik, D., Kuru, I., Maralcan, G. and Evcik, E., 2006. Relationship between the mechanical and anatomic axis and orientation angles of the knee joint and functional capacity of patients with osteoarthritis. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica* 40: 38-43.

Fan, J*., et al.*, 2008. Gene-expression profiling in Chinese patients with colon cancer by coupling experimental and bioinformatic genomewide gene-expression analyses: identification and validation of IFITM3 as a biomarker of early colon carcinogenesis. *Cancer* 113: 266-275.

Garcia-Blanco, M. A., Baraniak, A. P. and Lasda, E. L., 2004. Alternative splicing in disease and therapy. *Nature Biotechnology* 22: 535-546.

Giacomelli, L. and Nicolini, C., 2006. Gene expression of human T lymphocytes cell cycle: experimental and bioinformatic analysis. *Journal of Cellular Biochemistry* 99: 1326-1333.

Graeber, T. G. and Eisenberg, D., 2001. Bioinformatic identification of potential autocrine signaling loops in cancers from gene expression profiles. *Nature Genetics* 29: 295-300.

Grunau, C., Clark, S. J. and Rosenthal, A., 2001. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Research* 29: E65-65.

Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S. and Bartel, D. P., 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466: 835-840.

Gyurjan, I., Jr.*, et al.*, 2007. Gene expression dynamics in deer antler: mesenchymal differentiation toward chondrogenesis. *Molecular Genetics and Genomics* 277: 221-235.

Hashimoto, K., Oreffo, R. O., Gibson, M. B., Goldring, M. B. and Roach, H. I., 2009. DNA demethylation at specific CpG sites in the IL1B promoter in response to inflammatory cytokines in human articular chondrocytes. *Arthritis and Rheumatism* 60: 3303-3313.

Hunyadi, J., Simon, M., Jr., Kenderessy, A. S. and Dobozy, A., 1993. Expression of monocyte/macrophage markers (CD13, CD14, CD68) on human keratinocytes in healthy and diseased skin. *The Journal of Dermatology* 20: 341-345.

Iida, A., Kizawa, H., Nakamura, Y. and Ikegawa, S., 2006. High-resolution SNP map of ASPN, a susceptibility gene for osteoarthritis. *Journal of Human Genetics* 51: 151-154.

Ikegawa, S.*, et al.*, 2000. Novel and recurrent EBP mutations in X-linked dominant chondrodysplasia punctata. *American Journal of Medical Genetics* 94: 300-305.

Imagawa, K.*, et al.*, 2011. The epigenetic effect of glucosamine and a nuclear factor-kappa B (NF-kB) inhibitor on primary human chondrocytes--implications for osteoarthritis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 405: 362-367.

Karlsson, C.*, et al.*, 2010. Genome-wide expression profiling reveals new candidate genes associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 18: 581-592.

Ke, X., Taylor, M. S. and Cardon, L. R., 2008. Singleton SNPs in the human genome and implications for genome-wide association studies. *European Journal of Human Genetics* 16: 506-515.

Keysor, J. J.*, et al.*, 2003. Critical review of arthritis self-management strategy use. *Arthritis and Rheumatism* 49: 724-731.

Khodakov, D. A., Zakharova, N. V., Gryadunov, D. A., Filatov, F. P., Zasedatelev, A. S. and Mikhailovich, V. M., 2008. An oligonucleotide microarray for multiplex real-time PCR identification of HIV-1, HBV, and HCV. *Biotechniques* 44: 241-248.

Kim, J. S*., et al.*, 2007. Distribution of CD14+ and CD68+ macrophages in the placental bed and basal plate of women with preeclampsia and preterm labor. *Placenta* 28: 571-576.

Kim, K. W*., et al.*, 2011. Association between comorbid depression and osteoarthritis symptom severity in patients with knee osteoarthritis. *The Journal of Bone and Joint Surgery America Volume* 93: 556-563.

Lakner, J., Seyer, C., Hermsdorf, T. and Schoneberg, T., 2011. Characterization of the expression, promoter activity and molecular architecture of fibin. *BMC Biochemistry* 12: 26.

Lawrence, R. C*., et al.*, 2008. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis and Rheumatism* 58: 26-35.

Lee, D. H., Sonn, C. H., Han, S. B., Oh, Y., Lee, K. M. and Lee, S. H., 2012. Synovial fluid CD34(-) CD44(+) CD90(+) mesenchymal stem cell levels are associated with the severity of primary knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 20: 106-109.

Lee, S. W*., et al.*, 2013. The single nucleotide polymorphism (SNP) of the estrogen receptor-beta gene, rs1256049, is associated with knee osteoarthritis in Korean population. *The Knee* 1: 1-5.

Liu, J*., et al.*, 2011. Management of extension apparatus in total knee arthroplasty of osteoarthritis. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 25: 33-37.

Losina, E*., et al.*, 2012. Lifetime risk and age of diagnosis of symptomatic knee osteoarthritis in the US. *Arthritis Care and Research (Hoboken)* 10: 1-34

Martel-Pelletier, J., Boileau, C., Pelletier, J. P. and Roughley, P. J., 2008. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Practic and Research Clinical Rheumatology* 22: 351-384.

Michaud, C. M*., et al.*, 2006. The burden of disease and injury in the United States 1996. *Population Health Metrics* 4: 11.

Migheli, F*., et al.*, 2013. Comparison study of MS-HRM and pyrosequencing techniques for quantification of APC and CDKN2A gene methylation. *PLOS ONE* 8: 52501-52507.

Murphy, L*., et al.*, 2008. Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 59: 1207-1213.

Rodriguez-Fontenla, C., Lopez-Golan, Y., Calaza, M., Pombo-Suarez, M., Gomez-Reino, J. J. and Gonzalez, A., 2012. Genetic risk load and age at symptom onset of knee osteoarthritis. *Jornal of Orthopaedic Research* 30: 905-909.

Rokhlin, O. W. and Cohen, M. B., 1996. Soluble forms of CD44 and CD54 (ICAM-1) cellular adhesion molecules are released by human prostatic cancer cell lines. *Cancer Letters* 107: 29-35.

Scanu, A.*, et al.*, 2007. Synoviocyte cultures from synovial fluid. *Reumatismo* 59: 66-70.

Schmidt, M., Weidler, C., Naumann, H., Anders, S., Scholmerich, J. and Straub, R. H., 2005. Androgen conversion in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synoviocytes--androstenedione and testosterone inhibit estrogen formation and favor production of more potent 5alpha-reduced androgens. *Arthritis Research and Therapy* 7: 938-948.

Sohaskey, M. L., Yu, J., Diaz, M. A., Plaas, A. H. and Harland, R. M., 2008. JAWS coordinates chondrogenesis and synovial joint positioning. *Development* 135: 2215-2220.

Southam, L.*, et al.*, 2007. An SNP in the 5'-UTR of GDF5 is associated with osteoarthritis susceptibility in Europeans and with in vivo differences in allelic expression in articular cartilage. *Human Molecular Genetics* 16: 2226-2232.

Spector, T. D. and MacGregor, A. J., 2004. Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage* 12: S39-44.

Stern, A. G.*, et al.*, 2003. Association of erosive hand osteoarthritis with a single nucleotide polymorphism on the gene encoding interleukin-1 beta. *Osteoarthritis Cartilage* 11: 394-402.

Tseng, S., Reddi, A. H. and Di Cesare, P. E., 2009. Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP): A Biomarker of Arthritis. *Biomarker Insights* 4: 33-44.

Valdes, A. M.*, et al.*, 2006. Reproducible genetic associations between candidate genes and clinical knee osteoarthritis in men and women. *Arthritis and Rheumatism* 54: 533-539.

Wakahara, T.*, et al.*, 2007. Fibin, a novel secreted lateral plate mesoderm signal, is essential for pectoral fin bud initiation in zebrafish. *Developmental Biology* 303: 527-535.

Yoo, H. J.*, et al.*, 2011. Gene expression profile during chondrogenesis in human bone marrow derived mesenchymal stem cells using a cDNA microarray. *Journal of Korean Medical Science* 26: 851-858.

Yoon, H. Y.*, et al.*, 2013. Pyrosequencing Analysis of APC Methylation Level in Human Prostate Tissues: A Molecular Marker for Prostate Cancer. *Korean Journal of Urology* 54: 194-198.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การขออนุมัติผ่านจริยธรรมโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ

คณะอนุกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ชุดที่ 1 คณะแพทยศาสตร์

หนังสือรับรองเลขที่	**057/2555**
โครงการวิจัยเรื่อง	การแสดงออกของยีนในซิโนวิโอไซต์จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม: Expression of genes in synoviocytes from knee osteoarthritis patients
รหัสโครงการวิจัย	MTU-EC-OT-4-049/55
ผู้วิจัย	1. อาจารย์ ดร. รัชนีกร ธรรมโชติ 2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ณัฐพล ธรรมโชติ 3. นายเอกณรงค์ สินธุวานนท์ 4. นายธารนภ ศุภัคสถาพรพันธุ์
หน่วยงานที่รับผิดชอบ	โครงการจัดตั้งภาควิชาศัลยศาสตร์ออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โทร. 02-926-9775

เอกสารที่รับรอง

1. แบบเสนอโครงร่างการวิจัย ฉบับที่ 2 วันที่ 13 มิถุนายน 2555
   - แบบคำชี้แจงอาสาสมัคร (Patient or subject information sheet)
   - ใบยินยอมของอาสาสมัคร (Consent form)

คณะอนุกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ชุดที่ 1 คณะแพทยศาสตร์ ได้พิจารณาอนุมัติด้านจริยธรรมการทำวิจัยในคนให้ดำเนินการวิจัยข้างต้นได้ ตามมติที่ประชุมครั้งที่ 5/2555 วันที่ 25 พฤษภาคม 2555

ระยะเวลาที่อนุมัติ 3 ปี

กำหนดส่งรายงานความก้าวหน้า **1 ปี วันที่ 18 มิถุนายน 2556**

ลงชื่อ...
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ไวพจน์ จันทร์วิเมลือง)
ประธานคณะอนุกรรมการ

ลงชื่อ...
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ทิพาพร ธาระวานิช)
อนุกรรมการและเลขานุการ

อนุมัติ ณ วันที่ 19 มิถุนายน 2555

รูปที่ 23 เอกสารผ่านการอนุมัติการวิจัยในมนุษย์โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติภาษาไทย

Human Research Ethics Committee of Thammasat University (No.1 : Faculty of Medicine)

Number of COA	057/2555
Project No	MTU-EC-OT-4-049/55
Title of Project:	Expression of genes in synoviocytes from knee osteoarthritis patients
Principal Investigator	1. Rachaneekorn Tammachote, Ph.D. 2. Assistant Prof. Nattapol Tammachote, M.D. 3. Mr. Eknarong Sintuwanon 4. Mr. Thannop Supaksathapronpun
Study Center	Department of Botany. Faculty of Science Chulalongkorn University.
Responsible Department	Faculty of ,Orthopedics Thammasat University, Pathumthani 12120, Thailand Tel. 02-926-9775

Document Reviewed

1. Protocol version 2: dated June 13, 2012.
   - Patient or subject information sheet
   - Consent form

This document is a record of review and approval / acceptance of a clinical study protocol. The Human Research Ethics Committee of Thammasat University (No.1 : Faculty of Medicine) has approved the above study and the following documents for use in the study at the **EC meeting on May 25, 2012**

Approval period ....3.......... years

Progress report deadline ....**June 18, 2013**..................................

Signed : ....

(Assistant Prof. Thipaporn Tharavanij, M.D.)

Secretary of the Human Research Ethics Committee of Thammasat University (No.1 : Faculty of Medicine)

Signed:..

(Associate Prof. Waipoj Chanvimalueng, M.D.)

Chairman of the Human Research Ethics Committee of Thammasat University (No.1 : Faculty of Medicine)

Date of Approval ....**June 19, 2012**.........

รูปที่ 24 เอกสารผ่านการอนุมัติการวิจัยในมนุษย์โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติภาษาอังกฤษ

ภาคผนวก ข

ผลการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนจากการวิเคราะห์ด้วยชีวสารสนเทศน์จากฐานข้อมูลไมโครอาร์เรย์

ตารางที่ 7 ค่าการจับของโพรบของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อน และยีนควบคุม

ยีน	**รหัสโพรบ**	**เซลล์เยื่อบุรอบข้อ**			
		ค่าการจับของโพรบ		***p* value**	**การแสดงออก**
		กลุ่มคนปกติ	**กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม**		
EBP	231320_at	146.76	198.16	0.004	เพิ่มขึ้น 1.4 เท่า
	223568_s_at	982.11	1509.07	0.046	เพิ่มขึ้น1.5เท่า
IMPAD1	222654_at	1013.68	1963.56	0.002	เพิ่มขึ้น 1.9 เท่า
	224744_at	699.323	1016.3675	0.204	ไม่แตกต่างกัน
PPAPDC1B	223569_at	360.87	629.33	0.015	เพิ่มขึ้น 1.7 เท่า
	226150_at	776.92	1638.9	0.008	เพิ่มขึ้น 2.1 เท่า
FIBIN	226769_at	1771.15	6199.11	0.053	ไม่แตกต่างกัน
	231001_at	175.3	886.92	0.004	เพิ่มขึ้น 5.1เท่า
GAPDH	AFFX-HUMGAPDH/M33197_3_at	28724	32267.57	0.483	ไม่แตกต่างกัน
	AFFX-HUMGAPDH/M33197_5_at	18302.625	23181.2	0.137	ไม่แตกต่างกัน

ภาคผนวก ค

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อน ด้วยเทคนิคreal-time PCR

ตารางที่ 8 ค่า Ct ที่ได้จากการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อน และยีนควบคุม ด้วยเทคนิค real-time PCR

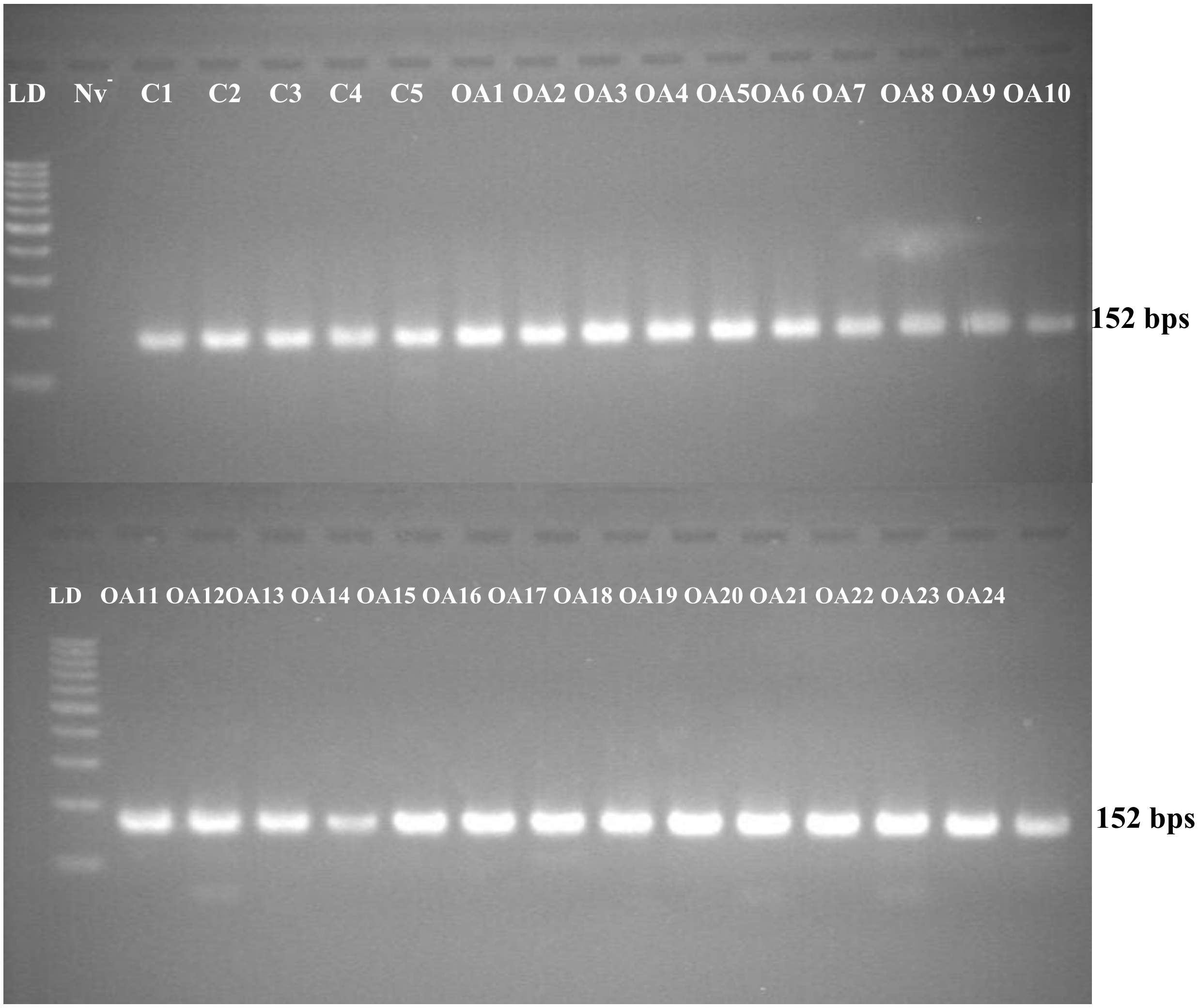
รหัส ตัวอย่าง	ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อน (Ct cycle)				ยีนควบคุม	
	IMPAD1	***PPAPDC1B***	***EBP***	***FIBIN***	***GAPDH56***	***GAPDH60***
C1	32.1	29.72	32.15	33.19	27.02	24.82
C2	27.52	29.58	30.09	31.86	19.17	18.98
C3	33.42	29.04	32	39.78	27.4	23.8
C4	27.53	29.02	30	33.63	21.24	20.25
C5	29.92	31.73	30.92	34.79	22.28	22.1
OA1	28.11	29.15	30.18	38.58	19.16	25.29
OA2	28.53	29.53	30.53	35.5	20.72	21.9
OA3	34.66	32.94	35.26	36.67	26.84	26.68
OA4	27.03	29.64	28.98	39.72	18.81	25.78
OA5	31.99	30.55	31.61	33.48	24.07	24.51
OA6	27.73	30.34	30.32	36.02	19.27	18.56
OA7	31.77	31.02	32.47	30.62	24.48	24.29
OA8	32.37	32.42	33.47	33.29	25.76	25.63
OA9	32.63	32.39	33.14	33.81	25.7	25.45
OA10	29.07	31.85	30.44	33.77	20.6	20.43

ตารางที่ 8 (ต่อ) ค่า Ct ที่ได้จากการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนและยีนควบคุม ด้วยเทคนิค real-time PCR

รหัสตัวอย่าง	ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อน (Ct cycle)				ยีนควบคุม	
	IMPAD1	*PPAPDC1B*	*EBP*	*FIBIN*	*GAPDH56*	*GAPDH60*
OA11	31.93	29.25	32.86	37	27.16	24.96
OA12	31	29.67	30.67	35.67	25.94	22.63
OA13	31.92	29.41	32.7	37.14	26.71	27.98
OA14	32.45	29.36	37.69	36.52	26.83	26.41
OA15	32.34	27.83	28.64	35.81	26.24	24.78
OA16	27.99	25.16	29.04	37	22.58	21.92
OA17	27.34	26.13	28.81	37.44	22.65	23.55
OA18	33.34	31.61	32.28	33.7	25.41	28.54
OA19	32.59	32.17	34.48	34.2	24.97	25.17
OA20	32.2	31.21	31.74	31.63	24.19	24.03
OA21	30.42	30.94	30.97	32.71	23.01	23
OA22	32.05	31.3	32.29	31.47	23.96	24.26
OA23	29.47	30.66	32.02	34.62	21.36	21.57
OA24	32.31	31.36	31.83	32.07	23.81	24.91
OA25	32.21	31.06	31.76	35.91	24.98	25.09
OA26	33.51	33.09	34.2	36.73	26.16	27.49
OA27	29.57	30.65	29.04	36.15	21.22	20.74
OA28	30.97	31.68	30.82	34.12	23.55	23.5
OA29	31.19	31.27	31.63	36.02	24.46	25.63
OA30	30.96	31.29	31.23	35.82	23.8	23.9
OA31	35	32.29	35.19	36.88	28.1	28.48
OA32	33.05	32.22	33.29	37.09	26.08	28.75
OA33	31.33	30.45	30.19	35.14	23.53	23.72

ภาคผนวก ง

ผลการทำ HS-PCR เพื่อส่งตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของ *FIBIN* ด้วยเทคนิค pyrosequencing



รูปที่ 25 ผลการทำ HS-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อโพรโมเตอร์ของ *FIBIN* เพื่อส่งตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์บนกลุ่มตัวอย่างโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มควบคุม

ภาคผนวก จ

ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีนด้วยเทคนิคpyrosequencing

ตารางที่ 9 อัตราการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของ *FIBIN* ที่ CpG ตำแหน่งต่าง ๆ โดยตำแหน่งที่ 2 และ 7 เป็น internal control เพื่อตรวจสอบความสมบูรณ์ในขั้นตอน bisulfite treatment

ตัวอย่าง	การเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีนบริเวณCpG (%)						
	1	2	3	4	5	6	7
C1	8.6	3.88	1.86	2.08	2.32	2	1.43
C2	21.75	4.05	7.17	10.83	11.2	13.19	5.46
C3	17.94	7.74	5.78	3.4	3.54	4.88	3.78
C4	22.99	5.73	2.37	3.31	4.23	5.29	3.49
C5	4.3	8.45	5.22	5.89	6.11	3.87	4.64
OA1	10.4	3.84	2.26	2.24	1.79	1.37	1.68
OA2	13.94	0	1.97	2.04	5.56	5.02	5.25
OA3	6.81	1.83	7.55	6.07	6.63	6.21	1.84
OA4	9.79	3.02	1.53	3.44	5.22	2.87	3.13
OA5	11.21	4.83	3.77	3.32	11.31	7.21	4.88
OA6	10.59	0	0	1.78	7.4	5.89	6.05
OA7	5.61	4.28	3.08	3.62	7.23	3.25	2.21
OA8	7.43	2.66	3.09	1.78	7.77	4.11	6.07
OA9	14.58	5.65	2.13	3.14	10.5	5.3	4.07
OA10	20.6	15.42	2.32	2.36	2.4	6.39	7.54
OA11	3.69	2.13	2.68	2.07	26.45	4.77	1.56
OA12	29.98	9.24	2.08	3.55	9.17	8.12	7.25

ตารางที่ 9 (ต่อ) อัตราการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของ *FIBIN* ที่ CpG ตำแหน่งต่าง ๆ โดยตำแหน่งที่ 2 และ 7 เป็น internal control เพื่อตรวจสอบความสมบูรณ์ในขั้นตอน bisulfite treatment

ตัวอย่าง	**การเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีนบริเวณ CpG (%)**						
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
OA13	5.52	3.6	3.35	5.22	15.61	5.9	3.06
OA14	9.97	4.53	2.26	2.42	3.13	3.56	3.3
OA15	5.6	0	3.67	3	2.36	0	0
OA16	3.65	2.32	1.24	2.14	1.31	1.38	1.77
OA17	4.77	2.06	3.9	1.88	2.35	2.04	1.66
OA18	2.9	2.88	1.56	3.06	2.1	1.28	2.64
OA19	5.64	3.52	3.17	2.25	0	0	1.85
OA20	7.6	5.65	4.94	5.53	8.91	6.83	4.51
OA21	6.42	5.78	7.22	4.31	4.04	2.89	3.47
OA22	24.49	6.04	3.14	4.53	4.35	5.99	4.8
OA23	10.99	4.37	4.87	4.18	5.82	3.3	3.19
OA24	4.94	3.58	5.23	3.3	3.7	2.77	2.98

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล นายเอกณรงค์ สินธุวานนท์

วันเดือนปีเกิด 17 กันยายน พ.ศ. 2529

สถานที่เกิด กรุงเทพมหานคร

ที่อยู่ปัจจุบัน 11/119 หมู่บ้านชลาธร ถนนศิริสุข แขวงสีกัน เขตดอนเมือง กรุงเทพมหานคร 10210

เบอร์โทรศัพท์ 082-397-9947

ประวัติการศึกษา ระดับอุดมศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา (วท.บ.ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ประจำปีการศึกษา 2552

ประวัติเผยแพร่ผลงาน ร่วมเสนอผลงานวิชาการในหัวข้อเรื่อง การคัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกอ่อนโดยการใช้ชีวสารสนเทศน์เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในซิโนวิโอไซต์จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ในการประชุมวิชาการระดับชาติสวนดุสิต: วันนักวิจัยวิทยาศาสตร์ 2013