

การแสดงผลของยีนที่ควบคุมการแปลรหัสในซีโนไวรัสจากผู้ป่วย
โรคข้อเข่าเสื่อม

นายธารนภ สุภักศสถาพรพันธุ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่เข้าบริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
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 TRANSLATIONAL CONTROL GENES IN SYNOVIOCYTES FROM
KNEE OSTEOARTHRITIS PATIENTS

Mr. Thannop Supaksathapronpun

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

การแสดงออกของยีนที่ควบคุมการแปลรหัสใน
ซีโนไวโอไซด์จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

โดย

นายธารนภ สุภักศสถาพรพันธุ์

สาขาวิชา

พันธุศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ)

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

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุษบา ฤกษ์อำนาจโชค)

ชารนภ สุภัคสถาพรพันธุ์ : การแสดงออกของยีนที่ควบคุมการแปลรหัสในซิโนวิโอไซต์จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม. (EXPRESSION OF TRANSLATIONAL CONTROL GENES IN SYNOVIOCYTES FROM KNEE OSTEOARTHRITIS PATIENTS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก : ผศ.ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ, 54 หน้า.

โรคข้อเข่าเสื่อม เกิดจากการเสื่อมสลายไปของกระดูกอ่อนผิวข้อ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปในซิโนวิโอไซต์ จากการศึกษาข้อมูลไมโครอาร์เรย์ โดยใช้เทคโนโลยีชีวสารสนเทศเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในเอ็นนูซอระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม (n=10) และกลุ่มควบคุม (n=9) พบว่ามีอย่างน้อย 4,816 ยีน มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากนั้นจึงเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการถอดรหัสและแปลรหัส ได้แก่ *ATF3* *DPH5* *eIF4G2* และ *SBP2* มาศึกษาระดับการแสดงออกของแต่ละยีนด้วยวิธี real-time PCR เพื่อใช้เปรียบเทียบและยืนยันผลที่ได้จากไมโครอาร์เรย์ โดยใช้ตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากน้ำไขข้อ และซิโนวิโอไซต์ในน้ำไขข้อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งได้จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม 10 ราย และกลุ่มควบคุม 5 ราย จากผล real-time PCR พบว่า ระดับการแสดงออกของ *eIF4G2* *DPH5* และ *SBP2* จากตัวอย่างน้ำไขข้อ มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) โดย *DPH5* *eIF4G2* และ *SBP2* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในผู้ป่วย ซึ่ง *eIF4G2* และ *SBP2* มีทิศทางการแสดงออกสวนทางกับข้อมูลที่ได้จากไมโครอาร์เรย์ ส่วน *ATF3* ที่ได้จากน้ำไขข้อพบที่มีการแสดงออกไม่แตกต่างกันระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมกับกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$) ในระดับที่การแสดงออกของ *ATF3* ที่ได้จากตัวอย่างเพาะเลี้ยงเซลล์ มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในผู้ป่วย ($P < 0.01$) ซึ่งตรงข้ามกับผลของไมโครอาร์เรย์ ที่ *ATF3* มีการแสดงออกลดลง แต่ *DPH5* *eIF4G2* และ *SBP2* จากตัวอย่างซิโนวิโอไซต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ กลับมีการแสดงออกไม่แตกต่างกันระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมกับกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$) ความแตกต่างของข้อมูลที่ได้จากการทำ real-time PCR จากตัวอย่างน้ำไขข้อ และซิโนวิโอไซต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ กับไมโครอาร์เรย์ คาดว่าอาจเกิดจากความแตกต่างของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา รวมถึงผลบวกวงที่อาจเกิดขึ้นในไมโครอาร์เรย์

ภาควิชา..... วิทยาศาสตร์..... ลายมือชื่อนิติ.....
สาขาวิชา..... พันธุศาสตร์..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา..... 2555.....

5372259823 : MAJOR GENETICS

KEYWORDS : MICROARRAY / REAL-TIME PCR / SYNOVIOCYTES / KNEE OA

THANNOP SUPAKSATHAPRONPUN : EXPRESSION OF TRANSLATIONAL CONTROL GENES IN SYNOVIOCYTES FROM KNEE OSTEOARTHRITIS PATIENTS.

ADVISOR : ASST. PROF. RACHANEEKORN TAMMACHOTE, Ph.D., 54 pp.

Knee osteoarthritis (knee OA) is caused by degradation of articular cartilage partly due to gene expression in synoviocytes. From microarray data, bioinformatics analysis was performed to compare gene expression between synovial membrane from knee OA patients (n=10) and from control group (n=9). The result showed that at least 4,816 genes were statistically significantly different. Genes involved in transcriptional and translational processes were investigated. *ATF3*, *DPH5*, *eIF4G2* and *SBP2* genes were selected to study the gene expression with real-time PCR and validate the microarray result. RNA samples were extracted from fresh synovial fluid and from cultured synoviocytes. These samples were obtained from 10 knee OA patients and 5 controls. The real-time PCR result revealed that the gene expression of *eIF4G2*, *DPH5* and *SBP2* from synovial fluid were statistically different between the two groups ($P < 0.05$) and also had higher expression level in the patients, but *eIF4G2* and *SBP2* results contradicted to the data from microarray. *ATF3* expression levels from synovial fluid were not significantly different between the two groups ($P > 0.05$). However *ATF3* from cultured cells was statistically different; the patients had a higher level of expression ($P < 0.01$) as opposed to lower level in the microarray result. While *DPH5*, *eIF4G2* and *SBP2* from cultured synoviocytes showed no significant difference ($P > 0.05$). The inconsistent results from the real-time PCR from synovial fluid and cultured synoviocytes as well as microarray, may arise from the heterogeneity of the samples and possible false positive result in microarray.

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

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ ตลอดช่วยตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องในวิทยานิพนธ์ จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ประกอบด้วย ผศ.ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์ ประธานกรรมการ อาจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต กรรมการภายในสาขาพันธุศาสตร์ และ รศ.ดร.บุษบา ฤกษ์อำนาจโชค ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ข้อเสนอแนะและข้อคิดเห็นต่าง ๆ รวมทั้งกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ศ.นพ.ดร.วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุญาตให้ทำวิจัยในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางเวชพันธุศาสตร์ รวมทั้งอนุเคราะห์สารเคมีและอุปกรณ์ต่าง ๆ ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผศ.นพ.ดร.อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้โอกาสใช้พื้นที่ รวมถึงอุปกรณ์และสารเคมีในห้องปฏิบัติการนาโนชีวเวชศาสตร์ ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเฉลิมพล ศรีจอมทอง และบุคคลากรทุกท่านในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางเวชพันธุศาสตร์ ที่ให้ความเมตตาช่วยเหลือ ตลอดจนคำปรึกษาในการทำงานวิจัย

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ทุกท่าน โดยเฉพาะคุณครูท่านแรกในชีวิต และคณาจารย์ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ คอยชี้แนะ และให้ความช่วยเหลือ จนสามารถประพันธ์วิทยานิพนธ์ลุล่วงผ่านไปด้วยดี ดังนั้น ผู้วิจัยขอมอบคุณความดีและประโยชน์ อันพึงบังเกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ให้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่านที่กล่าวมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตการวิจัย.....	2
ข้อจำกัดในการวิจัย.....	3
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
วิธีดำเนินการวิจัย.....	4
ลำดับขั้นตอนในการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
โครงสร้างข้อเช่า.....	6
โรคข้อเสื่อม.....	7
การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน.....	9
ยีนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้.....	9
แนวทางรักษาและสารบ่งชี้ทางชีวภาพในผู้ป่วยโรคข้อเช่าเสื่อม.....	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	13
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	13
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	14
โปรแกรมที่ใช้ในงานวิจัย.....	15
วิธีดำเนินการวิจัย.....	15
1. การจัดทำเอกสารขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ.....	15

	หน้า
2. การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคโนโลยีชีวสารสนเทศ.....	15
3. การเก็บตัวอย่างน้ำไขข้อ เพาะเลี้ยงเซลล์ และสกัดอาร์เอ็นเอ	16
3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์.....	16
3.1.1 การเริ่มต้นเลี้ยงเซลล์ชิโนไวรัสจากตัวอย่างน้ำไขข้อ	16
3.1.2 วิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ชิโนไวรัส.....	16
3.2 การสกัดอาร์เอ็นเอ.....	17
3.2.1 การเตรียมตัวอย่างชิโนไวรัสจากน้ำไขข้อสำหรับการ	
การสกัดอาร์เอ็นเอ.....	17
3.2.2 การเตรียมตัวอย่างชิโนไวรัสจากการเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับ	
การสกัดอาร์เอ็นเอ.....	17
3.2.3 วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอ.....	17
4. การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน	18
4.1 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).....	18
4.2 real-time PCR.....	18
4.3 วิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$	21
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	22
1. การขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์	
โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ.....	22
2. การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคโนโลยีชีวสารสนเทศ.....	22
3. ตัวอย่างน้ำไขข้อ และชิโนไวรัสจากน้ำไขข้อที่ผ่าน	
การเพาะเลี้ยงเซลล์.....	23
4. ผลการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน.....	25
4.1 ประสิทธิภาพปฏิกิริยาพีซีอาร์ของแต่ละคู่ไพรเมอร์.....	25
4.2 ผลการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี real-time PCR.....	28
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	31
อภิปรายผลการวิจัย.....	31
สรุปผลการวิจัย.....	33
ข้อเสนอแนะ.....	34
รายการอ้างอิง.....	35
ภาคผนวก.....	41

	หน้า
ภาคผนวก ก.....	42
ภาคผนวก ข.....	43
ภาคผนวก ค.....	44
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	54

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ real-time PCR amplification.....	20
2 องค์ประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน <i>DPH5 eIF4G2 SBP2</i> และ <i>GAPDH</i>	20
3 องค์ประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน <i>ATF3</i>	21
4 สรุปผลการทดลอง real-time PCR.....	29
5 ข้อมูลกลุ่มตัวอย่างในไมโครอาร์เรย์.....	43
6 ข้อมูล real-time PCR จากตัวอย่างน้ำไขข้อ.....	44
7 ข้อมูล real-time PCR จากซิโนวิโอไซต์ในน้ำไขข้อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์.....	49

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการนำเสนอผลการวิจัย.....	5
2 ตัวอย่างน้ำไขข้อจากผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม.....	23
3 ซิโนไวรัสที่ได้จากน้ำไขข้อ.....	24
4 กราฟมาตรฐานของ <i>GAPDH</i> ที่อุณหภูมิ annealing/extension 56 องศาเซลเซียส.....	25
5 กราฟมาตรฐานของ <i>GAPDH</i> ที่อุณหภูมิ annealing/extension 60 องศาเซลเซียส.....	26
6 กราฟมาตรฐานของ <i>ATF3</i> ที่อุณหภูมิ annealing/extension 60 องศาเซลเซียส.....	26
7 กราฟมาตรฐานของ <i>DPH5</i> ที่อุณหภูมิ annealing/extension 56 องศาเซลเซียส.....	27
8 กราฟมาตรฐานของ <i>eIF4G2</i> ที่อุณหภูมิ annealing/extension 56 องศาเซลเซียส.....	27
9 กราฟมาตรฐานของ <i>SBP2</i> ที่อุณหภูมิ annealing/extension 56 องศาเซลเซียส.....	28
10 ผลการแสดงออกของยีนระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม (n=10) กับกลุ่มควบคุม (n=5) ด้วยวิธี real-time PCR.....	30
11 เอกสารรับรองการอนุมัติด้านจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.....	42

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

โรคข้อเข่าเสื่อม (knee osteoarthritis, knee OA; MIM165720) เป็นโรคข้อที่พบได้มากในผู้สูงอายุ (Wang *et al.*, 2010) พยาธิสภาพของโรคเกิดจาก กระดูกอ่อนผิวข้อซึ่งทำหน้าที่รองรับแรงกระแทกนั้น มีการเสื่อมสลายไป ส่งผลให้ผู้ป่วยมีอาการเจ็บปวดข้อเข่าขณะเคลื่อนไหวข้อ จนบางรายที่มีอาการรุนแรงไม่สามารถเดินได้ และนำไปสู่ภาวะทุพพลภาพ (Schuelert *et al.*, 2011) สาเหตุของการเกิดโรคนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด คาดว่าเกิดจากความไม่สมดุลระหว่างการเสื่อมสลายและการซ่อมแซมผิวกระดูกอ่อน โดยมีปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น อายุ การเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมน รวมถึงปัจจัยทางพันธุกรรมเข้ามาเกี่ยวข้อง (Shi *et al.*, 2008) อาทิเช่น single nucleotide polymorphism (SNP) ในยีน *estrogen receptor alpha (ESR1)* และ ยีน *vitamin D receptor (VDR)* พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างความเสี่ยงในการเป็นโรคข้อเข่าเสื่อมกับการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ (Tammachote, 2011) นอกจากนี้ มีรายงานว่า การแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปในเซลล์ซินโอไวโอไซต์ (synovocyte) ก็มีบทบาทสำคัญในพยาธิกำเนิดของโรค (Bramlage *et al.*, 2006)

เซลล์ซินโอไวโอไซต์ ทำหน้าที่ในการสร้างน้ำไขข้อ ซึ่งช่วยในการหล่อลื่นผิวข้อ (Wang *et al.*, 2011) เมื่อเซลล์ซินโอไวโอไซต์เกิดการอักเสบ จะผลิตเอนไซม์ย่อยสลายกระดูกอ่อน และไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบชนิดต่าง ๆ อาทิเช่น matrix metalloproteinase (MMP) tumor necrosis factor- α (TNF- α) และ interleukin-1 β (IL-1 β) เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะกระจายอยู่ในน้ำไขข้อ และกระตุ้นให้เกิดการย่อยสลายกระดูกอ่อนเพิ่มขึ้น จนทำให้กระดูกอ่อนผิวข้อถูกทำลาย (Mototani *et al.*, 2008) ดังนั้นการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปในเซลล์ซินโอไวโอไซต์ อาจเป็นสาเหตุนำไปสู่การลุกลามของโรคข้อเข่าเสื่อมได้

ดังที่กล่าวมาข้างต้นว่ามียีนจำนวนมากที่อาจเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเสื่อม ไมโครอาร์เรย์ (microarray) จึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับการถอดรหัส เพราะสามารถวิเคราะห์การแสดงออกของยีนจำนวนมากที่มีอยู่ในเซลล์ได้ในเวลาเดียวกัน และสามารถเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์ของผู้ป่วย (Zhang *et al.*, 2012) เนื่องจากข้อมูลที่ได้จากไมโครอาร์เรย์มีจำนวนมากจึงจำเป็นต้องอาศัยเทคโนโลยีชีวสารสนเทศ (bioinformatics) ช่วยในการวิเคราะห์ประมวลผลข้อมูล และจัดกลุ่มตามรูปแบบการแสดงออกอย่างเป็นระบบ ก่อนจะนำข้อมูลที่ได้ไปศึกษาเพิ่มเติมโดยวิธี real-time PCR เพื่อยืนยันผล (validation) ที่ได้ เนื่องจาก real-time PCR สามารถตรวจวัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นจริง ณ ขณะนั้น โดยอาศัยการตรวจจับสัญญาณจากสารเรืองแสง ที่เกิดขึ้นในแต่ละรอบของปฏิกิริยา ทำให้มีความแม่นยำและความ

ถูกต้องสูง ส่งผลให้ real-time PCR เป็นที่นิยมนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเออย่างแพร่หลาย (Chuaqui *et al.*, 2002; Khodakov *et al.*, 2008)

การวิจัยครั้งนี้ จึงมุ่งเน้นศึกษาและตรวจสอบรูปแบบการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ ที่วิเคราะห์ได้จากไมโครอาร์เรย์ด้วยวิธี real-time PCR ในยีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมการถอดรหัสและการแปลรหัส ได้แก่ ยีน *homo sapiens activating transcription factor 3 (ATF3)* ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (TF) ควบคุมการทำงานของยีนอื่น ๆ (Zhou *et al.*, 2011) ยีน *diphthine synthase 5 (DPH5)* เกี่ยวข้องกับการดัดแปลงโมเลกุลของโปรตีนภายหลังการแปลรหัส (posttranslational modification) ซึ่งช่วยเพิ่มเสถียรภาพของการสังเคราะห์สายพอลิเพปไทด์ (Webb *et al.*, 2008) ยีน *eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2 (eIF4G2)* ผลิตโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบตั้งต้นของขั้นตอนการแปลรหัสในเซลล์ยูคาริโอต ถ้า eIF4G2 มีการแสดงออกลดลงพบว่า จะชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ (Welnowska *et al.*, 2009) และยีน *SECIS binding protein 2 (SBP2)* ที่มีส่วนในการสังเคราะห์ selenoprotein เช่น thioredoxin reductase 1 (TNXR1) ซึ่งทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จาก oxidative stress (Dumitrescu *et al.*, 2010; Du *et al.*, 2012) เป็นต้น ดังนั้นความผิดปกติที่เกิดขึ้นในยีนดังกล่าว อาจมีผลกระทบต่อสรีระและสัณฐานของเซลล์ในวงกว้าง เพราะกระบวนการควบคุมการถอดรหัสและการแปลรหัส เป็นกระบวนการสำคัญที่มีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนของยีนอื่น ๆ (Scheper *et al.*, 2007) และอาจเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการถอดรหัสและการแปลรหัสในเซลล์ซิโนไวโอไซต์จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

ขอบเขตการวิจัย

นำข้อมูลการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีไมโครอาร์เรย์ จากฐานข้อมูล NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ในส่วน GEO DataSet มาประมวลผลโดยใช้เทคโนโลยีชีวสารสนเทศ เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มประชากรควบคุม จากนั้น เลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมการถอดรหัสและการแปลรหัส มาศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี real-time PCR เพื่อยืนยันผลที่ได้จากการประมวล โดยใช้ตัวอย่างเซลล์ซิโนไวโอไซต์ที่ได้จากน้ำไขข้อและการเพาะเลี้ยงเซลล์

ข้อจำกัดในงานวิจัย

เนื่องจากข้อจำกัดในการเก็บตัวอย่างน้ำไขข้อที่ได้จากกลุ่มประชากรควบคุม ส่งผลให้งานวิจัยชิ้นนี้มีความแตกต่างของประชากรในกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ในเรื่องอายุ เพศ รวมถึงปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาระหว่างกลุ่ม

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

- เทคโนโลยีชีวสารสนเทศ หมายถึง การนำวิทยาการทางคอมพิวเตอร์มาประยุกต์ใช้ในการรวบรวม สืบค้น และการวิเคราะห์แปรผลข้อมูลทางอณูชีววิทยา เพื่อทำนายผลการทดลอง หรือดูแนวโน้มผลที่จะเกิดขึ้น รวมถึงการสร้างแบบจำลอง เพื่อใช้ตอบโจทย์ทางชีววิทยา
- ไมโครอาร์เรย์ เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ศึกษาการแสดงออกของยีน เริ่มจากนำดีเอ็นเอหรือยีนที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์มาติดเรียงลงบนแผ่นไมโครอาร์เรย์ จากนั้นจึงนำสายคอมพลิเมินทารีดีเอ็นเอ (cDNA) ที่สังเคราะห์จากเอ็มอาร์เอ็นเอ มาติดฉลากด้วยสีเรืองแสง แล้วนำมาไฮบริดซ์เข้ากับแผ่นไมโครอาร์เรย์ชิพ ก่อนนำแผ่นไมโครอาร์เรย์ชิพไปล้างและเข้าเครื่องอ่าน โดยตำแหน่งที่สายคอมพลิเมินทารีดีเอ็นเอเข้าคู่สมกับยีนดีเอ็นเอบนแผ่นไมโครอาร์เรย์ จะมีความเข้มข้นสีต่างไปจากเดิม จึงสามารถใช้ตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีนได้จากสีที่เปลี่ยนไป
- Real-time PCR เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจากพีซีอาร์แบบดั้งเดิม สามารถใช้ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นได้ในทันที และไม่ต้องรอให้กระบวนการเสร็จสิ้น โดยการใช้สารเรืองแสง เช่น EvaGreen เป็นต้น ในการวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบปฏิกิริยา
- GEO DataSet เป็นส่วนหนึ่งในฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) ที่เปิดให้บริการข้อมูลในส่วนการแสดงออกของยีน อาทิ ข้อมูล ไมโครอาร์เรย์ เป็นต้น

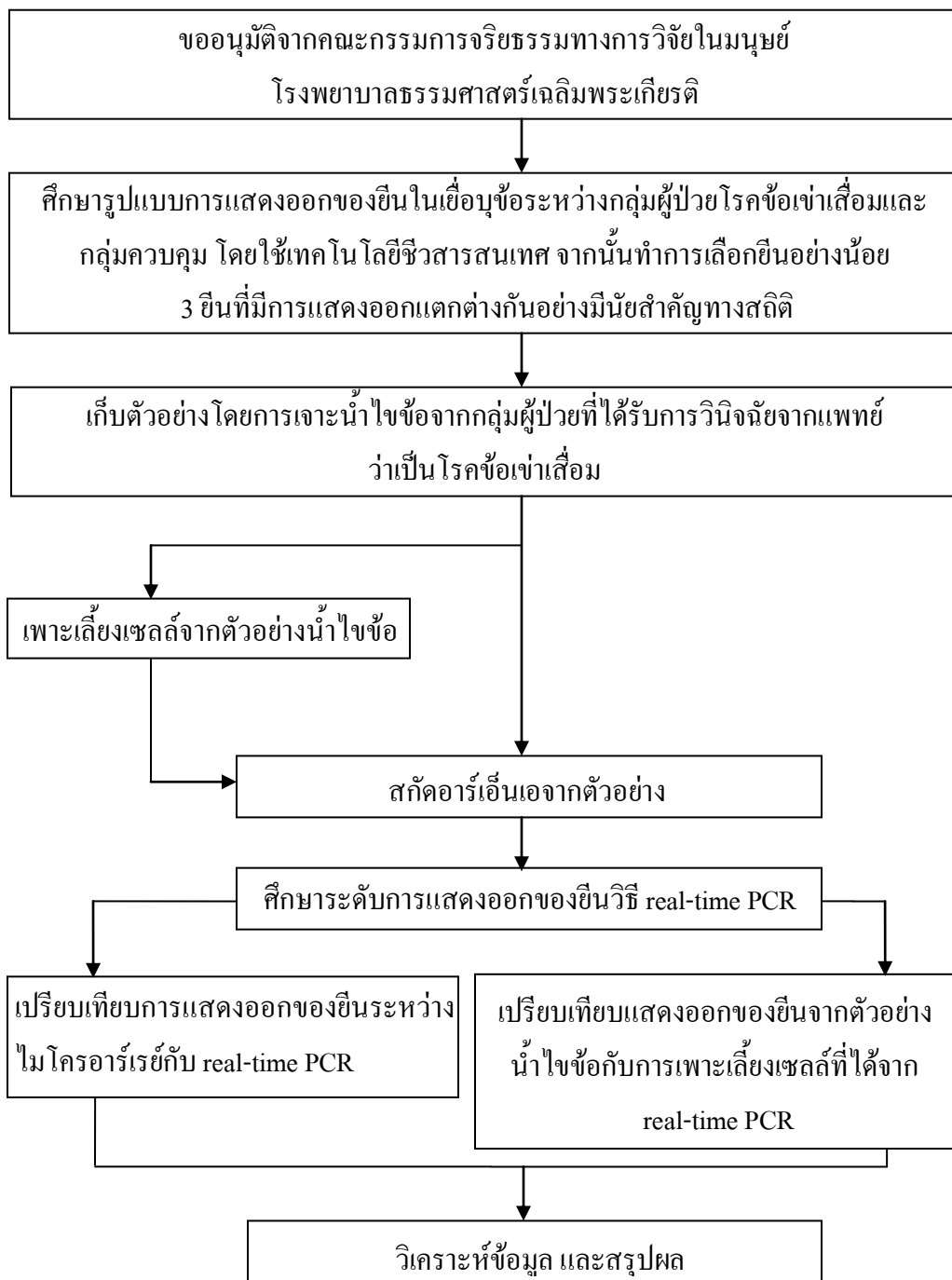
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีนในเซลล์ชิโนไวโอไซต์ระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและคนปกติ จะทำให้ทราบถึงรูปแบบการแสดงออกของยีน และอาจเป็นการค้นพบสารบ่งชี้ทางชีวภาพชนิดใหม่ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการวินิจฉัยและพยากรณ์โรค ทำให้เข้าใจพยาธิกำเนิดโรคข้อเข่าเสื่อมมากขึ้น รวมถึงนำมาประยุกต์ใช้เป็นองค์ความรู้พื้นฐานในการพัฒนาวิธีการรักษาให้มีความจำเพาะกับพันธุกรรมในผู้ป่วยแต่ละราย อันจะเป็นประโยชน์ต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. เขียนเอกสารขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์ เฉลิมพระเกียรติ
2. ศึกษาการแสดงออกของยีนในเยื่อรอบข้อที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มควบคุม โดยใช้เทคโนโลยีชีวสารสนเทศจากนั้นทำการเลือกยีนทั้งหมด 4 ยีน เพื่อทำการทดลองในขั้นต่อไป
3. เก็บตัวอย่างโดยการเจาะน้ำไขข้อจากกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นโรคข้อเข่าเสื่อม 10 ราย และกลุ่มควบคุมที่เข้ารักษาเอ็นไขว้หน้าเข่าขาด 5 ราย มาสกัดอาร์เอ็นเอ หรือ เพาะเลี้ยงเซลล์ ก่อนสกัดอาร์เอ็นเอ
4. ศึกษาระดับการแสดงออกของยีนระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มควบคุมด้วยวิธี real-time PCR
5. วิเคราะห์ข้อมูล และสรุปผล

ลำดับขั้นตอนในการวิจัย



รูปที่ 1 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการนำเสนอผลการวิจัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โครงสร้างข้อเข่า

ข้อเข่าเป็นข้อชนิดที่มีเยื่อหุ้มข้อ (synovial joint) ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในร่างกาย ทำหน้าที่รองรับน้ำหนักและควบคุมการเคลื่อนไหวของร่างกาย ขณะกำลังยืนหรือเดิน โดยโครงสร้างภายในข้อเข่าประกอบด้วย ส่วนปลายของกระดูกต้นขา (femur) และส่วนบนกระดูกหน้าแข้ง (tibia) ยึดอยู่ร่วมกันด้วยเส้นเอ็น โดยบริเวณส่วนปลายกระดูกแข็งทั้งสองด้าน ยังพบกระดูกอ่อนผิวข้อ (articular cartilage) ปกคลุมอยู่ด้วย (Moskowitz *et al.*, 2001)

กระดูกอ่อนผิวข้อที่พบในข้อเข่า เป็นกระดูกอ่อนชนิดไฮยาลายน์ (hyaline cartilage) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ปราศจากเส้นประสาท หลอดเลือดและระบบน้ำเหลือง มีสีขาว พื้นผิวเรียบเป็นมัน มีความยืดหยุ่นสูง จึงช่วยลดแรงกระแทกและแรงเสียดทานที่เกิดขึ้น ขณะเคลื่อนไหวข้อเข่าได้เป็นอย่างดี (Kheir and Shaw, 2009) โดยกระดูกอ่อนผิวข้อประกอบด้วย ส่วนของเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) และ extracellular matrix (ECM)

เซลล์กระดูกอ่อนอาศัยอยู่ในช่อง (lacuna) ที่แทรกอยู่ใน ECM ของกระดูกอ่อนผิวข้อ โดยมีรูปร่างและลักษณะแตกต่างกันไปตามแต่ละบริเวณที่เซลล์อาศัยอยู่ เซลล์กระดูกอ่อนเจริญมาจากเซลล์มีเซนไคมอล (mesenchymal cell) ทำหน้าที่สร้างไซโตไคน์และสารโมเลกุลขนาดใหญ่ชนิดต่าง ๆ เช่น transforming growth factor- β (TGF- β) interleukin-1 (IL-1) และคอลลาเจน (collagen) เป็นต้น เพื่อควบคุมปริมาณ ECM ให้เหมาะสมต่อแรงที่กดลงบนผิวข้อ (Lee *et al.*, 2004)

ECM คือ สารจำพวกคาร์โบไฮเดรตและโปรตีน ซึ่งเป็นสารที่เซลล์กระดูกอ่อนสร้างและปลดปล่อยออกมารอบเซลล์กระดูกอ่อน มีองค์ประกอบสำคัญ คือ น้ำ เป็นส่วนประกอบถึงร้อยละ 65 ถึง 80 และสารโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรติโอไกลแคน (proteoglycan) ซึ่งให้คุณสมบัติยืดหยุ่นแก่เนื้อเยื่อ และคอลลาเจนที่ช่วยให้กระดูกอ่อนคงรูป แข็งแรง และทนทานต่อแรงดึง โดยเฉพาะคอลลาเจนชนิดที่ 2 ซึ่งพบเป็นองค์ประกอบหลักใน ECM และถ้ามีความผิดปกติเกิดขึ้นกับคอลลาเจนชนิดนี้ จะส่งผลให้มีการสร้างกระดูกอ่อนผิวข้อน้อยลง หรือไม่มีการสร้างเลย (Kheir and Shaw, 2009)

จากที่กล่าวมา จะเห็นได้ว่ากระดูกอ่อนผิวข้อทำหน้าที่เปรียบเสมือนกันชน ป้องกันมิให้กระดูกแข็งมากระทบเสียดสีระหว่างที่มีการเคลื่อนไหวข้อ เนื่องจากบริเวณส่วนปลายกระดูกแข็งมีเส้นประสาทอยู่เป็นจำนวนมาก เพราะฉะนั้น ถ้าปราศจากกระดูกอ่อนผิวข้อแล้ว เมื่อปลายกระดูกแข็งมาชนกัน จะทำให้เกิดอาการปวดข้อ (Moskowitz *et al.*, 2001)

นอกจากนี้บริเวณช่องเขายังล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้มข้อ (synovial membrane) ซึ่งภายในบรรจุน้ำไขข้อ (synovial fluid) โดยเยื่อหุ้มข้อมีลักษณะเป็นใยพังผืดที่เหนียวแน่น ประกอบด้วยเซลล์ซิโนวิโอไซต์

(synoviocyte) ทำหน้าที่สร้างน้ำไขข้อ ซึ่งช่วยในการหล่อลื่นข้อเข่า เนื่องจากน้ำไขข้อประกอบด้วยกรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid) จำนวนมาก จึงทำให้น้ำไขข้อมีความข้นหนืด (Wang *et al.*, 2011)

โรคข้อเสื่อม

โรคข้อเสื่อม (osteoarthritis, OA) เป็นโรคข้อที่พบจำเพาะกับข้อชนิดที่มีเยื่อหุ้มข้อ เช่น ข้อสะโพก และข้อเข่า เป็นต้น (Ikeda *et al.*, 2002) โดยลักษณะอาการของโรค คือ เจ็บปวดข้อเวลาใช้งาน มีเสียงลั่นในข้อขณะขยับข้อ และมีอาการข้อฝืดเมื่อหยุดใช้ข้อเป็นเวลานาน ในกรณีที่มีอาการรุนแรง รูปร่างข้อจะเปลี่ยนไปจากเดิม เกิดสภาพข้อวิรูป (deformity) ซึ่งส่งผลให้พิสัยการเคลื่อนไหวข้อลดลง และอาจนำไปสู่ภาวะทุพพลภาพ (Abhishek and Doherty, 2013)

จากการศึกษา พบว่าทั่วโลกมีผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมมากกว่าร้อยละล้านคน โดยเฉพาะผู้ที่มีอายุมากกว่า 70 ปีขึ้นไปเป็นโรคข้อเสื่อมถึงร้อยละ 40 (Kerkhof *et al.*, 2010) สำหรับประเทศไทยมีอุบัติการณ์ของโรคอยู่ที่ร้อยละ 11.3 และพบในเพศหญิงมากกว่าเพศชายในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 โดยร้อยละ 28.34 ของผู้ป่วยมีอาการข้อเข่าเสื่อม (พงษ์ศักดิ์ วัฒนา, 2548)

ข้อเข่าเสื่อม เกิดจากการเสื่อมสภาพของกระดูกอ่อนผิวข้อ ทำให้กระดูกอ่อนผิวข้อไม่สามารถรองรับแรงกระแทกเวลาเคลื่อนไหวข้อ จึงเกิดรอยแยกขนาดเล็กที่กระดูกอ่อนผิวข้อ เมื่อโรคลุกลาม รอยแยกจะขยายใหญ่ขึ้นและแตกเป็นร่อง เป็นสาเหตุให้กระดูกอ่อนผิวข้อบางลงและหลุดออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ล่องลอยอยู่ในน้ำไขข้อ ซึ่งชิ้นกระดูกอ่อนที่หลุดออกมา อาจก่อให้เกิดการอักเสบแก่เยื่อข้อ (O'Connell, 2000)

เมื่อเยื่อข้ออักเสบ เซลล์ซิโนเวียโอไซต์จะผลิตไซโตไคน์เพื่อใช้ย่อยชิ้นกระดูกอ่อน เช่น matrix metalloproteinase (MMPs) และ tumour necrosis factor α (TNF- α) โดยสารที่หลั่งออกมาจะแพร่กระจายอยู่ในน้ำไขข้อ และยังไปกระตุ้นการทำลายกระดูกอ่อนผิวข้อเพิ่มขึ้น ถ้าโรคยังลุกลามต่อไป กระดูกอ่อนผิวข้ออาจถูกทำลายจนหมด (Mototani *et al.*, 2008) เหลือเพียงกระดูกแข็งที่อยู่ใต้กระดูกอ่อนผิวข้อ ซึ่งมีความหนาตัวของกระดูกเพิ่มขึ้น (sclerosis) และมีกระดูกงอก (osteophyte) ยื่นออกมาบริเวณรอบข้อ เนื่องจากร่างกายมีการสร้างกระดูกใหม่อย่างรวดเร็ว เพื่อรองรับแรงกระแทกที่มากขึ้นและรักษาสภาพของข้อเอาไว้ ทว่ากระดูกที่ยื่นออกมาเป็นเหตุให้รูปร่างข้อเข่าเปลี่ยนแปลงไป ทำให้ขาสั้นลง โกง ไม่สามารถเดินได้ตามปกติ และมีคุณภาพชีวิตที่ลดลง (Migliore *et al.*, 2010)

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่า โรคข้อเข่าเสื่อมเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของกระดูกอ่อนผิวข้อ รวมถึงองค์ประกอบอื่น ๆ รอบข้อ โดยสาเหตุของโรคยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด คาดว่าเกิดจากความไม่สมดุลระหว่างการเสื่อมสลายและซ่อมแซมกระดูกอ่อนผิวข้อ (Wang *et al.*, 2010) ซึ่งมีปัจจัยต่าง ๆ มาเกี่ยวข้องกับสาเหตุ ได้แก่

1. อายุ อุบัติการณ์ของโรคข้อเข่าเสื่อมเพิ่มขึ้นตามอายุ เนื่องจากเมื่ออายุเพิ่มขึ้น จะมีจำนวนเซลล์กระดูกอ่อนน้อยลง จึงสังเคราะห์ ECM ได้ลดลง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและโครงสร้างของกระดูกอ่อนผิวข้อซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการกระจายแรงที่ผ่านทางข้อเข่า (Loeser *et al.*, 2005) อาทิ เกิดการแตกหักของเส้นใยคอลลาเจน และโปรติโอไกลแคนมีจำนวนไกลโคซามิโนไกลแคนส์ (GAG) น้อยลง ส่งผลให้กระดูกอ่อนผิวข้ออุ้มน้ำได้น้อยลงและสูญเสียคุณสมบัติเชิงกล เพราะ GAG สามารถอุ้มน้ำได้และมีลักษณะเป็นเจล จึงช่วยต้านทานต่อแรงกดกระแทก GAG ประกอบด้วยน้ำตาล 2 โมเลกุลย่อยที่ซ้ำกันเรียงต่อกันเป็นสายยาวที่ไม่มีการแตกแขนง โดยหมู่คาร์บอกซิลและหมู่ซัลเฟตในน้ำตาล ส่งผลให้ GAG มีประจุเป็นลบและสามารถดึงดูดสารที่เป็นประจุบวก ทำให้เกิดการออสโมซิสของน้ำ (Kheir and Shaw, 2009) เป็นต้น
2. เพศ จากการศึกษาพบว่า ผู้หญิงหลังวัยหมดประจำเดือนมีโอกาสเป็นโรคข้อเข่าเสื่อมมากกว่าผู้ชาย เพราะ ภาวะขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน ทำให้เซลล์กระดูกอ่อนซึ่งมีตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor) ผลิตไซโตไคน์และมีเมตาบอลิซึมเปลี่ยนไปจากเดิม เนื่องจากเอสโตรเจนช่วยกระตุ้นการสร้างและซ่อมแซมกระดูกอ่อนผิวข้อ (Riancho *et al.*, 2010)
3. ความอ้วน (obesity) น้ำหนักตัวที่มากขึ้น จะเพิ่มปัจจัยเสี่ยงในการเป็นข้อเข่าเสื่อม เนื่องจากข้อเข่าต้องแบกรับแรงกดมากขึ้น ทำให้กระดูกอ่อนผิวข้อเสื่อมสภาพได้เร็วกว่าปกติ (Harding *et al.*, 2012) มีงานวิจัยพบว่า ผู้ที่มีค่าดัชนีมวลกาย (BMI) เกิน 30 kg/m^2 จะมีโอกาสเป็นข้อเข่าเสื่อมเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 4 เท่า เมื่อเทียบกับผู้ที่มีน้ำหนักตัวอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน ซึ่งมีค่า BMI อยู่ระหว่าง 18.5 kg/m^2 ถึง 24.9 kg/m^2 (Lementowski and Zelicof, 2008)
4. ปัจจัยทางพันธุกรรม โรคข้อเข่าเสื่อมเกิดจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมและพันธุกรรมเข้ามามีส่วนร่วมในการเกิดโรค จากการศึกษา twin studies แสดงให้เห็นว่าพันธุกรรมมีส่วนเกี่ยวข้องกับโรคข้อเสื่อมร้อยละ 35 ถึง 60 เฉพาะในข้อเข่ามีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมถึงร้อยละ 40 (Valdes and Spector, 2011) และเป็นการถ่ายทอดพันธุกรรมแบบ polygenic โดยคาดว่ามีความมากกว่า 80 ยีน และ single nucleotide polymorphism (SNP) อย่างน้อย 25,000 ตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเป็นข้อเข่าเสื่อม (Ikegawa, 2007) อาทิ SNP ในยีน *growth differentiation factor 5 (GDF5)* มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดโรคข้อเสื่อมในชาวเอเชียและยุโรป (Shin *et al.*, 2012; Spector *et al.*) ยีน *double von Willebrand factor (DVWA)* มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเป็นโรคข้อเข่าเสื่อมในชาวจีนและญี่ปุ่น (Miyamoto *et al.*, 2008)

นอกจากการเปลี่ยนแปลงในระดับนิวคลีโอไทด์จะมีความสัมพันธ์กับความถี่ในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมแล้ว ยังพบว่ารูปแบบการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนไปในระดับการถอดรหัสอาจเป็นสาเหตุหนึ่งในพยาธิกำเนิดโรค (Lockhart and Winzeler, 2000) เช่น จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *bone morphogenetic proteins 4 (BMP-4)* ซึ่งทำหน้าที่ในการซ่อมแซมกระดูก พบว่า ผู้ป่วยที่เป็นข้อเข่าเสื่อมมีการแสดงออกของโปรตีน BMP-4 ในเยื่อข้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับประชากรควบคุม (Bramlage *et al.*, 2006) หรือ การเติมหมู่เมทิลในบริเวณ CpG islands ที่โปรโมเตอร์ของยีน *superoxide dismutase (SOD)* ส่งผลให้ SOD ที่ทำหน้าที่ในการกำจัด reactive oxygen species (ROS) มีการแสดงออกของโปรตีนลดลงในเซลล์กระดูกอ่อนของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม จึงก่อให้เกิดการสะสม ROS จนเป็นอันตรายต่อกระดูกอ่อนผิวข้อ โดย ROS เป็นสารอนุมูลอิสระที่กระตุ้นให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ (Scott *et al.*, 2010) เป็นต้น

การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน

ไมโครอาร์เรย์ เป็นเทคนิคหนึ่งที่ยอมรับใช้ศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน เพราะสามารถวิเคราะห์การแสดงออกของยีนจำนวนมากภายในเซลล์ได้ในระยะเวลาเดียวกัน และสามารถเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีนระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์ของผู้ป่วย (Chuaqui *et al.*, 2002) ทว่าข้อมูลที่ได้รับจากไมโครอาร์เรย์มีจำนวนมากมหาศาล ดังนั้นจำเป็นต้องอาศัยเทคโนโลยีชีวสารสนเทศ ซึ่งเป็นการผสมผสานและประยุกต์ศาสตร์แขนงต่าง ๆ อาทิ วิทยาการคอมพิวเตอร์ ชีวสถิติ และสารสนเทศ เป็นต้น มาช่วยวิเคราะห์ประมวลผล จัดกลุ่มตามรูปแบบการแสดงออกและหน้าที่ของยีนอย่างเป็นระบบ (Primrose and Twyman, 2003)

จากการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนในเยื่อข้อด้วยวิธีไมโครอาร์เรย์เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมกับกลุ่มประชากรควบคุม และวิเคราะห์ผลผ่านเทคโนโลยีชีวสารสนเทศ พบว่า 542 ยีน จากทั้งหมด 33,000 ยีน มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดย 314 ยีน จาก 542 ยีน มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในผู้ป่วย และอีก 228 ยีนที่เหลือมีการแสดงออกลดลงจากเดิม (Huber *et al.*, 2008) ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มยีนตามหน้าที่และการทำงานออกเป็นประเภทต่าง ๆ รวมถึงกระบวนการควบคุมการถอดรหัสและการแปลรหัส

ยีนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้

ATF3 ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ ซึ่งควบคุมกระบวนการถ่ายทอดรหัสของยีน เพื่อตอบสนองต่อภาวะเครียด ควบคุมการเพิ่มจำนวนและการตายของเซลล์ เป็นต้น (Jang *et al.*, 2012; Hai and Hartman, 2001) สำหรับ ATF3 มีโครงสร้างโมติฟ (motif) แบบลิว-ซีนชิปเปอร์ (leucine zipper) ซึ่งเกิดจากพอลิเพปไทด์แบบ α -helix 2 สาย ที่มีกรดอะมิโนลิวซีน (leucine)

กระจายตัวซ้ำ ๆ มาจับคู่เป็นไดเมอร์ (dimer) รูปร่างคล้ายซิป (zip) โดยหันประจวบออกด้านนอก ทำให้สามารถจับกับสายดีเอ็นเอที่เป็นประจุลบได้ (Hai and Curran, 1991; Oas *et al.*, 1990)

DPH5 เกี่ยวข้องกับกระบวนการ diphthamide biosynthesis ในการดัดแปลงโมเลกุลของโปรตีนภายหลังการแปลรหัส โดยเปลี่ยนกรดอะมิโนฮิสทีดีน (histidine) ในตำแหน่งที่ 715 ของ eukaryotic elongation factor-2 (eEF-2) ให้เป็น diphthamide ซึ่งช่วยเพิ่มเสถียรภาพพันธะเชื่อมระหว่างทีอาร์เอ็นเอที่มีแอนติโคดอนเป็นคู่สมกับโคดอนบนสายเอ็มอาร์เอ็นเอ ขณะสังเคราะห์สายพอลิเพปไทด์ในขั้นตอนการแปลรหัส แต่ถ้าไม่มีการดัดแปลงฮิสทีดีนเป็น diphthamide บน eEF-2 จะเกิดการสังเคราะห์สายพอลิเพปไทด์ที่ผิดปกติออกมา (Webb *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังพบว่า diphthamide ยังทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จาก ribosome-inactivating protein (RIP) ซึ่งจะไปจับไรโบโซมในตำแหน่งเดียวกันกับ eEF-2 และส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการแปลรหัส อันนำไปสู่การตายของเซลล์ (Gupta *et al.*, 2008)

eIF4G2 สังเคราะห์โปรตีน eIF4G2 ซึ่งทำหน้าที่ร่วมกับ eukaryotic initiation factor อื่น ๆ อาทิ eIF4E eIF4A และ eIF3 เป็นต้น รวมกันเป็นองค์ประกอบตั้งต้นเข้าไปจับที่ปลาย 5' ของสายเอ็มอาร์เอ็นเอ แล้วเคลื่อนที่หา AUG ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์โปรตีนของขั้นตอนการแปลรหัส (Welnowska *et al.*, 2009) ถ้า eIF4G2 มีการแสดงออกลดลงพบว่า จะชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ (Lieberman *et al.*, 2009)

SBP2 ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนในกลุ่ม selenoprotein ตัวอย่างเช่น glutathione peroxidase ซึ่งป้องกันเซลล์จากอนุมูลอิสระ เป็นต้น โดย SBP2 จะเข้าจับกับ sec insertion sequence (SECIS) element ซึ่งมีโครงสร้างแบบ stem loop ที่อยู่บริเวณปลาย 3'-untranslated region (3'-UTR) ของสายเอ็มอาร์เอ็นเอแล้ว ชักนำให้ sec-specific elongation factor (EFSec) เข้ามาเกาะกับ SBP2 และนำ sec-specific tRNA (tRNA^{Sec}) มาจับแทน releasing factor (RF) ที่ UGA ซึ่งเป็นรหัสโคดอนหยุดการสังเคราะห์สายพอลิเพปไทด์ ดังนั้นถ้า SBP2 มีการเปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของยีนที่สร้าง selenoprotein เป็นวงกว้าง (Dumitrescu *et al.*, 2010; Kipp *et al.*, 2012)

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่า การเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกของยีนซึ่งทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการถอดรหัสและแปลรหัส จะส่งผลกระทบต่อการสังเคราะห์สายอาร์เอ็นเอและโปรตีนของยีนอื่น ๆ ทำให้รูปร่างและการทำงานของเซลล์เปลี่ยนไป (Scheper *et al.*, 2007) ซึ่งอาจนำไปสู่การเป็นโรคข้อเข่าเสื่อม ดังนั้นการศึกษา รูปแบบการแสดงออกของยีน จะทำให้เข้าใจพยาธิของโรคมากขึ้น รวมถึงใช้เป็นแนวทางพัฒนาการรักษาโรคและอาจเป็นการค้นพบสารบ่งชี้ทางชีวภาพ (biological marker) ชนิดใหม่

นอกจากนี้ในปัจจุบันได้มีการใช้สารบ่งชี้ทางชีวภาพ ซึ่งเป็นสารที่ใช้ชี้วัดสภาพทางชีวภาพที่เกิดขึ้นในร่างกาย

แนวทางรักษาและสารบ่งชี้ทางชีวภาพในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

การรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมสามารถทำได้หลายแนวทาง เพื่อระงับอาการเจ็บปวด ป้องกันการถูกทำลายกระดูกอ่อนผิวข้อ และส่งเสริมการทำงานของข้อเข่าให้เป็นปกติ โดยแบ่งออกเป็นวิธีต่าง ๆ ได้ดังนี้

การรักษาโดยไม่ใช้ยา (nonpharmacological therapy) เป็นวิธีการรักษาที่มีต้นทุนต่ำ ผู้ป่วยสามารถปฏิบัติได้ด้วยตนเองตอนอยู่ที่บ้าน ได้แก่

- การออกกำลังกาย เช่น แอโรบิก ว่ายน้ำ และการเดิน เป็นต้น เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้แก่กล้ามเนื้อ เพิ่มพิสัยการเคลื่อนที่ของข้อเข่า และช่วยลดน้ำหนัก
- การเสริมสันเท้ารูปสามเหลี่ยมทางด้านนอก (lateral wedge insole orthosis) หรือใช้เครื่องช่วยพยุง เช่น ไม้เท้า (cane) เพื่อเป็นการลดแรงที่กระทำผ่านข้อเข่า
- งดเว้นการสวมใส่รองเท้าส้นสูง เนื่องจากรองเท้าส้นสูงจะเพิ่มแรงที่กระทำต่อข้อเข่า
- การปรับเปลี่ยนพฤติกรรมการบริโภค ควรหลีกเลี่ยงอาหารที่มีไขมันอิ่มตัวสูง และรับประทานวิตามินดี เพื่อลดความเสี่ยงในการลุกลามของโรค
- การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมในชีวิตประจำวัน เช่น หลีกเลี่ยงการนั่งพับเพียบ คุกเข่า การเดินขึ้นบันได เป็นต้น เพราะ พฤติกรรมดังกล่าวจะเป็นการเพิ่มแรงกดดันในช่องเข่าเพิ่มขึ้น
- การทำกายภาพบำบัดด้วยความร้อนเพื่อบรรเทาอาการเจ็บข้อเข่า

การรักษาโดยใช้ยา (pharmacologic therapy) โดยมีจุดประสงค์หลักเพื่อบรรเทาอาการปวดข้อ และลดการอักเสบ ยาเหล่านี้ ได้แก่

- ยาแก้อักเสบที่มีไซโคลออกซีจีเนส (nonsteroidal anti-inflammatory drug, NSAID) จะออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) ซึ่งจำเป็นในการสังเคราะห์ prostaglandin ที่ทำให้เกิดการอักเสบและอาการเจ็บปวด ทว่าผู้ป่วยที่ใช้ยา NSAID ต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน จะมีความเสี่ยงต่อการเป็นแผลในกระเพาะ มีเลือดออกในลำไส้ เกิดเลือดผิดปกติ มีการทำงานของไตที่ลดลง และเป็นพิษต่อตับ เป็นต้น นอกจากนี้ยังควรหลีกเลี่ยงการใช้ NSAID กับผู้ป่วยที่มีปัญหาเกี่ยวกับระบบหลอดเลือดหัวใจ เพราะ อาจทำให้อาการทรุดลงกว่าเดิมได้ ดังนั้นการใช้ NSAID ควรได้รับการพิจารณาจากแพทย์และมีการตรวจร่างกายอย่างสม่ำเสมอ
- การฉีดยาสเตียรอยด์เข้าข้อ เพื่อบรรเทาอาการปวดข้อเข่า โดยได้ผลในระยะ 2 ถึง 3 เดือน และไม่ควรฉีดซ้ำเป็นประจำ เนื่องจากยาอาจเร่งการทำลายกระดูกอ่อนผิวข้อได้
- การฉีด hyaluronan เข้าข้อเพื่อระงับอาการปวดและเพิ่มพิสัยการเคลื่อนไหวข้อมากขึ้น โดยมีผลข้างเคียงเพียงเล็กน้อย และอาจเป็นชั่วคราว เช่น เยื่อข้ออักเสบ เป็นต้น

- การใช้ยาทาบรรเทาอาการปวดประเภทพริก (topical capsaicin) capsaicin เป็นสารที่พบในพืชจำพวกพริก โดยทำหน้าที่ยับยั้งการสะสมและลดการสังเคราะห์ substance P ซึ่งไปกระตุ้นปลายประสาทรับความเจ็บปวด

การรักษาโดยวิธีผ่าตัด (surgery) มีหลายวิธี อาทิ การผ่าตัดเปลี่ยนข้อเทียมเพียงส่วนเดียว (unicompartmental knee arthroplasty, UKA) สำหรับผู้ป่วยที่มีกระดูกอ่อนผิวข้อเสื่อมสภาพเพียงด้านเดียวของเข่า หรือ การผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมทั้งหมด (total knee arthroplasty, TKA) เหมาะสมกับผู้ป่วยสูงอายุที่มีอาการเจ็บปวดข้อมากและสูญเสียความสามารถในการเคลื่อนไหวข้อ เป็นต้น โดยการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเทียมมีผลดี คือ ผู้ป่วยสามารถเดินได้ทันที บรรเทาอาการเจ็บปวดได้ไว และสามารถตัดแต่งกระดูกที่ขึ้นผิดปกติได้ระหว่างการผ่าตัด เพื่อแก้ไขความพิการ โดยมีภาวะแทรกซ้อนเพียงเล็กน้อย (Colizza *et al.*, 1995)

นอกจากนี้ในปัจจุบันได้มีการใช้สารบ่งชี้ทางชีวภาพช่วยในการวินิจฉัยโรค โดยสารบ่งชี้ทางชีวภาพ คือ สารที่ใช้วัดสภาพทางชีวภาพที่เกิดขึ้นจริงในร่างกาย ซึ่งสามารถสะท้อนขั้นตอนการดำเนินโรค และความแตกต่างระหว่างพยาธิสภาพในผู้ป่วยกับคนปกติ ดังนั้นจึงทำให้สามารถจำแนกผู้ป่วยได้ละเอียดยิ่งขึ้น รวมถึงใช้ติดตามผลตอบสนองต่อการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตัวอย่างสารบ่งชี้ที่ใช้วัดระดับการทำลายกระดูกอ่อนผิวข้อและการอักเสบในโรคข้อเข่าเสื่อม ได้แก่ matrilin-1 (MATN1) ซึ่งทำหน้าที่จัดเรียงและรักษาโครงสร้าง ECM โดยตามปกติจะไม่ตรวจเจอ MATN1 ในกระดูกอ่อนผิวข้อของคนปกติ แต่จะพบในซีรัมหรือกระดูกอ่อนผิวข้อของผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม หรือ stromelysin-1 (MMP-3) เป็นเอนไซม์ย่อยสลาย ECM ซึ่งมีระดับสูงขึ้นในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม เช่นเดียวกับกับกรดไฮยาลูโรนิก ซึ่งมีระดับสูงขึ้นในซีรัมของผู้ป่วย (Okimura *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2012) เป็นต้น

ดังนั้น การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนที่ได้จากการคัดเลือกรหัสด้วยเทคโนโลยีชีวสารสนเทศ จะทำให้ทราบถึงรูปแบบการแสดงออกของยีนในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของเซลล์ซิโนไวโอไซต์ที่พบในน้ำไขข้อระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและคนปกติ และอาจเป็นการค้นพบสารบ่งชี้ทางชีวภาพชนิดใหม่ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการวินิจฉัยและพยากรณ์โรค ทำให้เข้าใจพยาธิกำเนิดโรคข้อเข่าเสื่อมมากขึ้น รวมถึงนำมาประยุกต์ใช้เป็นองค์ความรู้พื้นฐานในการพัฒนาวิธีการรักษาให้มีความจำเพาะกับพันธุกรรมในผู้ป่วยแต่ละราย อันจะเป็นประโยชน์ต่อไปในอนาคต

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. ไมโครปิเปต : P2 (0.1-2 μ l), P20 (5-20 μ l), P100 (20-100 μ l), P1000 (0.1-1 มิลลิลิตร)
(Gilson, France)
2. ทิป : 10 μ l, 200 μ l, 1,000 μ l (Gilson, France)
3. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ขนาด 0.2 ml และ 1.5 ml (Bioline, 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. ขวดรูปหมัพู่ : 250 ml (Pyrex[®], USA)
8. พาราฟิล์ม (Parafilm M, USA)
9. กระดาษฟลอยด์ (Aro, China)
10. ปิเปต บอย (Costar[®], USA)
11. เครื่องวอร์เท็กซ์ (WiseMix[®], Korea)
12. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich zentrifugen, Germany)
13. เครื่อง Polymerase chain reaction (PCR) (Biometra[®], Germany)
14. StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems[®], USA)
15. ถาดสำหรับเตรียมเจล พร้อมหัว (Bioer, China)
16. เครื่องอิเล็กทรอนิกส์ โพรไฟริซิส (Bioer, China)
17. เครื่องถ่ายภาพเจล (BIO-RAD, USA)
18. ตู้เย็น 4 °C (Sharp, Japan)
19. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 °C (Sanden Inter Cool, Thailand)
20. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 °C (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, USA)
21. วอเตอร์ บาธ (Major Science, Taiwan)
22. งานเลี้ยงเซลล์แบบ 12 หลุม (Costar[®], USA)
23. ฟลาสก์เลี้ยงเซลล์ : T25, T75 (Costar[®], USA)

24. ปิเปตแบบฆ่าเชื้อ ปริมาตร 5 ml, 10 ml, 25 ml (Costar[®], USA)
25. สไลด์นับเซลล์ (Haemocytometer)
26. ตู้เขี่ยเชื้อ
27. ตู้เลี้ยงเซลล์ (CO₂ incubator) (Thermo Scientific, USA)
28. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Motic, Germany)
29. ตู้เพิ่มความดันสำหรับฆ่าเชื้อ
30. เครื่องไมโครเวฟ (Sharp, Japan)
31. เครื่องชั่งดิจิทัล (OHAUS[®], USA)
32. ซ้อนตักสาร
33. NanoDrop 2000c (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 grade (ISC BioExpress, Spain)
 - 1.2 Absolute ethanol (Merck, Germany)
 - 1.3 Ethidium bromide (Bio Basic inc, USA)
 - 1.4 Boric acid (Research organics, USA)
 - 1.5 Tris aminomethane (Research organics, USA)
 - 1.6 EDTA (Research organics, USA)
 - 1.7 100 base pair DNA ladder (Biolab, Thailand)
2. สารเคมีที่ใช้เลี้ยงเซลล์
 - 3.1 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (GIBCO, Invitrogen, USA)
 - 3.2 Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO, Invitrogen, USA)
 - 3.3 100x Pen-Strep (GIBCO, Invitrogen, USA)
 - 3.4 Basic Fibroblast Growth Factor (FGF) (Invitrogen, USA)

3.5 Trypsin-EDTA (GIBCO, Invitrogen, USA)

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

3.7 Tryphan blue (GIBCO, Invitrogen, USA)

3. 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)

โปรแกรมที่ใช้ในงานวิจัย

1. Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA)

2. Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>)

3. StepOne Software V2.1 (Applied Biosystems®, USA)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การจัดทำเอกสารขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาล ธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ

การดำเนินงานเอกสารสำหรับขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ โดยนำเสนอ โครงร่างงานวิจัยที่มีพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ ถูกต้อง รวมถึงข้อพิจารณาด้านจริยธรรมการวิจัย เพื่อให้งานวิจัยมีมาตรฐานเป็นที่ยอมรับในระดับ สากล และเป็นกาให้เคารพในศักดิ์ศรีความเป็นมนุษย์ ซึ่งอาสาสมัครต้องยินยอมเข้าร่วมด้วยความ สมจริตใจ โดยข้อมูลที่ได้จะถูกเก็บรักษาเป็นการลับ เพื่อความเป็นส่วนตัวของอาสาสมัคร

2. การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน โดยใช้เทคโนโลยีชีวสารสนเทศ

นำข้อมูลการแสดงออกของยีนที่ศึกษาในข้อมูลด้วยวิธีไมโครอาร์เรย์ (accession number GSE12021) จาก GEO DataSet ในฐานข้อมูล NCBI มาวิเคราะห์เปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของ ยีนด้วยโปรแกรม Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA) โดยใช้ *t* test เพื่อหา ยีนในข้อมูลที่มีระดับการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ($n = 10$, อายุเฉลี่ย 71.9 ± 2.0 ปี) กับกลุ่มควบคุม ($n = 9$, อายุเฉลี่ย 49.9 ± 6.7 ปี) เมื่อ *p*-value มีค่า น้อยกว่า 0.0005 หรือ *p*-value ที่ 0.05 แต่ยีนมีการแสดงออกลดลงตั้งแต่ 4 เท่าขึ้นไป หรือยีนมีการแสดงออก

เพิ่มขึ้นอย่างน้อย 1.4 เท่า ในผู้ป่วย เนื่องจากยีนในกลุ่มดังกล่าว มักมีรูปแบบการแสดงออกของยีนระหว่างไมโครอาร์เรย์และ real-time PCR เป็นไปในทิศทางเดียวกัน (Dallas *et al.*, 2005) จากนั้นจึงทำการเลือกยีน 4 ยีน ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมการถอดรหัสหรือการแปลรหัส มาทำการศึกษาต่อในขั้นตอนต่อไป โดยหน้าที่และการทำงานของยีนสามารถสืบหาได้จากฐานข้อมูล PhosphoSitePlus[®] (<http://www.phosphosite.org>) และ PubMed ในฐานข้อมูล NCBI

3. การเก็บตัวอย่างน้ำไขข้อ เพาะเลี้ยงเซลล์ และสกัดอาร์เอ็นเอ

เก็บตัวอย่างด้วยวิธีการเจาะน้ำไขข้อจากกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญทางศัลยกรรมกระดูกว่าเป็นโรคข้อเข่าเสื่อม 10 ราย และกลุ่มควบคุมที่เข้ารับการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม 10 ราย โดยวิธีการผ่าตัดส่องกล้อง 5 ราย นำมาสกัดอาร์เอ็นเอหรือเพาะเลี้ยงเซลล์ ภายใน 24 ชั่วโมง

3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

3.1.1 การเริ่มต้นเลี้ยงเซลล์ชิโนไวรัสต์จากตัวอย่างน้ำไขข้อ

แยกเซลล์ชิโนไวรัสต์ออกจากน้ำไขข้อ ภายในตู้เขี่ยเชื้อ (safety cabinet) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน โดยนำน้ำไขข้อที่ได้ไปผสมกับ PBS ในอัตราส่วนน้ำไขข้อ 1 ส่วนต่อ PBS 1 ส่วน เพื่อลดความหนืดของน้ำไขข้อลง ก่อนนำไปพอร์เท็กซ์ให้เข้ากัน และนำไปหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาที เสร็จแล้วจึงของเหลวด้านบนทิ้ง และเติมอาหารชนิด DMEM ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย FBS ความเข้มข้นร้อยละ 10 Pen-Strep เข้มข้นร้อยละ 1 และ FGF ความเข้มข้น 4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารกระตุ้นการแบ่งเซลล์ โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบา ๆ ให้ตะกอนเซลล์กระจายออกจากกัน ก่อนย้ายไปเลี้ยงในงานเลี้ยงเซลล์แบบ 12 หลุม ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ 1 มิลลิลิตร รวมปริมาตรทั้งหมดเป็น 2 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเอียงงานเลี้ยงเซลล์วนสลับซ้ายขวา เพื่อให้เซลล์กระจายทั่วหลุม แล้วนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5

3.1.2 วิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ชิโนไวรัสต์

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ชิโนไวรัสต์ไม่ให้เกินแพสเสจ (passage) ที่ 3 เริ่มจากเปลี่ยนอาหารในงานเลี้ยงเซลล์ทุก 2 ถึง 3 วัน โดยใช้ปิเปตดูดอาหารทิ้ง 1 มิลลิลิตร และใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ให้ปริมาตรเท่าเดิม เมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนจนเต็มหลุม จึงย้ายเซลล์ไปเลี้ยงต่อในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาดหน้าตัด 25 ตารางเซนติเมตร (T25-Flask) โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลุมทิ้ง จากนั้นเติม PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เอียงงานเลี้ยงเซลล์ให้ PBS กระจายทั่วหลุมเพื่อล้างอาหารและของเสียต่าง ๆ ออกให้หมด ก่อนใช้ปิเปตดูด PBS ทิ้ง ทำซ้ำ 1 ถึง 2 ครั้ง แล้วจึงเติม trypsin-EDTA ปริมาณ 200 ไมโครลิตร แล้วนำเข้าไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวงานเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 1.8 มิลลิลิตร ที่ผสม FBS เอาไว้ สำหรับยับยั้งปฏิกิริยาของ trypsin-EDTA

แล้วใช้ปิเปตคูดอาหารทั้งหมด ซึ่งมีเซลล์ผสมอยู่ในสไลด์เลี้ยงเซลล์หน้าตัด 25 ตารางเซนติเมตร ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ในขวด 3 มิลลิลิตร รวมปริมาตรได้ 5 มิลลิลิตร โดยนับเป็นแพสเสจที่ 1 และหมั่นเปลี่ยนอาหาร เพื่อเพิ่มอาหารและเร่งการเจริญเติบโตของเซลล์ จนกว่าเซลล์เพิ่มปริมาณเต็มขวดเพาะเลี้ยง

หลังจากเซลล์เจริญเต็มขวดเลี้ยงเซลล์หน้าตัด 25 ตารางเซนติเมตรแล้ว จึงย้ายเซลล์ไปเลี้ยงต่อในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาดหน้าตัด 75 ตารางเซนติเมตร แล้วนับเป็นแพสเสจที่ 2 โดยเพิ่มปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น 10 มิลลิลิตร เมื่อเซลล์เจริญเต็มขวดเพาะเลี้ยงจึงแบ่งเซลล์ออกไปใส่ขวดเลี้ยงเซลล์หน้าตัด 75 ตารางเซนติเมตร จำนวน 3 ขวด เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ให้เพียงพอต่อการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน และนับเป็นแพสเสจที่ 3

3.2 การสกัดอาร์เอ็นเอ

3.2.1 การเตรียมตัวอย่างซีโนไวโอไซต์จากน้ำไขข้อสำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอ

ใช้ปิเปตคูดน้ำไขข้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วปิเปตขึ้นลงผสมให้เข้ากัน เพื่อลดความหนืดของน้ำไขข้อ ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เสร็จแล้วจึงเทสารละลายส่วนใสทิ้ง ให้เหลือแต่ตะกอนเซลล์

3.2.2 การเตรียมตัวอย่างซีโนไวโอไซต์จากการเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอ

เมื่อเซลล์เพิ่มปริมาณเต็มขวดเลี้ยงเซลล์หน้าตัด 75 ตารางเซนติเมตร (มีซีโนไวโอไซต์ประมาณ 12 ล้านเซลล์ต่อพลาสติก) ให้คูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง จากนั้นเติม PBS 3 มิลลิลิตร เอียงขวดช้า ๆ ให้ PBS กระจายทั่วขวด ก่อนเททิ้ง แล้วทำซ้ำ 1 ถึง 2 ครั้ง เสร็จแล้วจึงเติม trypsin-EDTA 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากผิวขวดเลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นจึงใช้ปิเปตคูดสารละลายที่มีเซลล์ผสมอยู่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 นาที ให้ซีโนไวโอไซต์ตกตะกอน แล้วแยกสารละลายส่วนใสทิ้งไป

3.2.3 วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอ

นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาสกัดอาร์เอ็นเอด้วย innuPREB RNA Mini Kit (AnalytikJena, Germany) เริ่มจากเติมบัฟเฟอร์ RL 400 ไมโครลิตร สำหรับย่อยเซลล์ โดยบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นวอร์เท็กซ์จนเซลล์กระจายออกจากกัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องต่ออีก 3 นาที ก่อนนำสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน spin filter D ที่ซ่อนอยู่ใน receiver tube แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อคัดกรองดีเอ็นเอออกจากอาร์เอ็นเอ จากนั้นเติมเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงในสารละลายที่อยู่ใน receiver tube แล้วใช้ปิเปตคูดขึ้นลงหลาย ๆ ครั้ง จนสารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนคูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน spin filter R ที่ซ่อนอยู่ใน receiver tube หลอดเดิม นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

แล้วแยกส่วนสารละลายทิ้ง หลังจากนั้นเติมบัฟเฟอร์ HS 500 ไมโครลิตร ลงบน spin filter R แล้วไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 นาที เพื่อดึงตะกอน แล้วเทส่วนสารละลายทิ้ง จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ LS 750 ไมโครลิตร ลงบน spin filter R แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อดึงตะกอนอีกรอบ แล้วแยกส่วนสารละลายทิ้ง ไปตามด้วยนำ spin filter R ไปซ้อนทับบน receiver tube หลอดใหม่ ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ เป็นระยะเวลา 3 นาที เพื่อกำจัดแอลกอฮอล์ที่ตกค้างอยู่ใน spin filter R หลังจากนั้นนำ spin filter R ใส่ใน elution tube จากนั้นเติม RNase-Free water 30 ไมโครลิตรลงบนตรงกลางของ spin filter R แล้วปั๊มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที เพื่อละลายตะกอนอาร์เอ็นเอให้อยู่ในรูปสารละลาย ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เสร็จแล้วจึงนำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

4. การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน

4.1 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์สายสายคอมพลีเมนต์อาร์เอ็นเอ (cDNA) ด้วยชุด SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA) เริ่มจากเตรียมอาร์เอ็นเอ 50 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา ผสมกับไพรเมอร์ (random hexamers) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ dNTPs Mix 1 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 ไมโครลิตร โดยใช้ DEPC-treated water จากนั้นนำไปปั๊มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที ด้วยเครื่องพีซีอาร์ เสร็จแล้วจึงนำไปแช่ในน้ำแข็งเพื่อให้ความเย็นเป็นเวลา 1 นาที แล้วเติม RT buffer 2 ไมโครลิตร MgCl₂ 4 ไมโครลิตร DTT 2 ไมโครลิตร RNaseOUT™ 1 ไมโครลิตร และ SuperScript™ III RT 1 ไมโครลิตร รวมปริมาตรทั้งหมดเป็น 20 ไมโครลิตร และนำไปปั๊มในเครื่องพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับอาร์เอ็นเอต้นแบบ ตามด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เพื่อดำเนินการสังเคราะห์สายคอมพลีเมนต์อาร์เอ็นเอ และอุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สำหรับยับยั้งปฏิกิริยา SuperScript™ III RT หลังจากนั้นเติม RNaseH 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั๊มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที สำหรับขจัดสายอาร์เอ็นเอต้นแบบ ก่อนนำสายคอมพลีเมนต์อาร์เอ็นเอ ที่สังเคราะห์ได้จาก RT-PCR ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้วิจัยต่อไป

4.2 real-time PCR

ออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *ATF3* *DPH5* *eIF4G2* *SBP2* และ *GAPDH* จากฐานข้อมูล NCBI ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 1 และนำไพรเมอร์ที่ได้มาตรวจสอบความจำเพาะต่อยีนด้วยโปรแกรม Primer-BLAST ในฐานข้อมูล

NCBI ก่อนนำไปใช้ศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนโดยวิธี real-time PCR ด้วย StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, USA) แต่ละตัวอย่างทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 3 หรือ 2 ซ้ำ โดยใช้สารตามตารางที่ 2 ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของ *DPH5 eIF4G2 SBP2* และ *GAPDH* ใช้สารตามตารางที่ 3 สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ของ *ATF3* และตั้งโปรแกรมสำหรับขั้นตอนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังต่อไปนี้

initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที เพื่อให้สายคอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอ เสียสภาพอย่างสมบูรณ์และกระตุ้นการทำงานของนํ้ายาสำเร็จรูป SsoFastEvaGreensupermix (BIO-RAD, USA) ก่อนตามด้วย denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที annealing/extension ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส สำหรับ *DPH5 eIF4G2 SBP2* หรืออุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สำหรับ *ATF3* นาน 5 วินาที เป็นจำนวน 40 รอบ และตามด้วย melting phase เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส โดยเพิ่มอุณหภูมิในอัตราส่วน 0.3 องศาเซลเซียสต่อนาที เพื่อสร้าง melt curve สำหรับตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

สร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพ (efficiency) ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในแต่ละคู่ไพรเมอร์ โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 200 50 12.5 6.25 และ 1.5625 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (เจือจางระดับ 1:4) ตามลำดับ ก่อนนำตัวอย่างดีเอ็นเอทั้งห้า ความเข้มข้นไปเพิ่มปริมาณด้วย real-time PCR พร้อมกัน โดยใช้ปฏิกิริยาและขั้นตอนในการทำพีซีอาร์ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ตามที่ได้กล่าวไปแล้วในข้างต้น จากนั้นคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2) ด้วยโปรแกรม StepOne Software V2.1 (Applied Biosystems®, USA) เพื่อพิจารณาความเหมาะสมของกราฟมาตรฐานที่ได้ว่า สามารถใช้อธิบายความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างสองตัวแปร โดย r^2 ควรมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.98 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า จุดข้อมูลส่วนใหญ่อยู่ใกล้หรืออยู่บนเส้นถดถอย ก่อนคำนวณค่า % efficiency ของปฏิกิริยาในแต่ละคู่ไพรเมอร์ โดยใช้สมการของ Wong and Medrano (2005) ดังนี้

$$\begin{aligned} \% \text{ efficiency} &= (E - 1) \times 100\% \\ &= (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100\% \end{aligned}$$

เมื่อ E คือ ประสิทธิภาพของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในแต่ละคู่ไพรเมอร์ และ slope เท่ากับ ความชันของกราฟ ค่า % efficiency ที่ได้ควรอยู่ระหว่าง 80 ถึง 110 ซึ่งแสดงว่า ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มขึ้นเทียบเคียงสองเท่าในแต่ละรอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ และเป็นการป้องกันความคลาดเคลื่อนในข้อมูลการแสดงออกของยีน (systematic error) เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นไม่ใกล้เคียงกันในแต่ละรอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ อันเป็นผลมาจาก % efficiency นอกจากนี้ถ้า % efficiency มีค่าน้อยกว่า 80 แสดงว่าปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้อาจไม่เหมาะสม หรือถ้า % efficiency มีค่ามากกว่า 110 แสดงว่าอาจเกิด primer-dimer ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ เป็นต้น

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ real-time PCR amplification

Accession number	ยีน		ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' to 3')
NM_001077394.1	<i>DPH5</i>	Forward	ATGGAGATGGAGATGCTAA
		Reverse	AACACCTGGGAATTATGAGG
NM_001042559.2	<i>eIF4G2</i>	Forward	TGTTCCAGGTGAATCAGTGG
		Reverse	TTCGCAGTGGTTAGGTCA
NM_024077.3	<i>SBP2</i>	Forward	CACACTACGGATCTG
		Reverse	CTCACTCACTTGGCTCAG
NM_001674	<i>ATF3</i>	Forward	GTATGATGGCAGGTCCTC
		Reverse	CTAAGACATTGAGTGGAGAGT
NM_002046.4	<i>GAPDH</i>	Forward	GAAGGTGAAGGTCCGAGTC
		Reverse	GAAGATGGTGATGGGATTTC

ตารางที่ 2 องค์ประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน *DPH5 eIF4G2 SBP2* และ *GAPDH*

	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
SsoFastEvaGreensupermix	7.5	
10 μ M forward-primer	0.45	300 nM
10 μ M reverse-primer	0.45	300 nM
distilled water	4.6	
cDNA	2	
ปริมาตรรวม	15	

ตารางที่ 3 องค์ประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน *ATF3*

	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
SsoFastEvaGreensupermix	10	
10 μ M forward-primer	0.25	200 nM
10 μ M reverse-primer	0.25	200 nM
distilled water	2.5	
cDNA	2	
ปริมาตรรวม	15	

4.3 วิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta C_t}$

ศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนแบบ comparative quantification โดยวิธี $2^{-\Delta\Delta C_t}$ เพื่อเปรียบเทียบค่า C_t ของยีนเป้าหมาย (*ATF3* *DPH5* *eIF4G2* และ *SBP2*) กับ *GAPDH* ซึ่งเป็น reference gene และคำนวณหาระดับการแสดงออกของยีนระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มควบคุม ตามสมการของ Livak and Schmittgen (2001) ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{Fold difference} &= 2^{-\Delta\Delta C_t} \\ &= 2^{-(\Delta C_t(\text{test}) - \Delta C_t(\text{calibrator}))} \\ &= 2^{-[(C_t(\text{target, test}) - C_t(\text{ref, test})) - (C_t(\text{target, calibrator}) - C_t(\text{ref, calibrator}))]} \end{aligned}$$

เมื่อ $C_t(\text{target, test})$ คือ C_t ของยีนเป้าหมายจากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม $C_t(\text{ref, test})$ คือ C_t ของ *GAPDH* จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม $C_t(\text{target, calibrator})$ คือ C_t ของยีนเป้าหมายจากกลุ่มควบคุม และ $C_t(\text{ref, calibrator})$ คือ C_t ของ *GAPDH* จากกลุ่มควบคุม

จากนั้นนำข้อมูลการแสดงออกของยีนมาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วย *t* test โดยโปรแกรม Microsoft Office Excel 2007 เพื่อตรวจหาพื้นที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม เมื่อ *p*-value มีค่าน้อยกว่า 0.05

บทที่ 4

ผลการศึกษา

1. การขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ

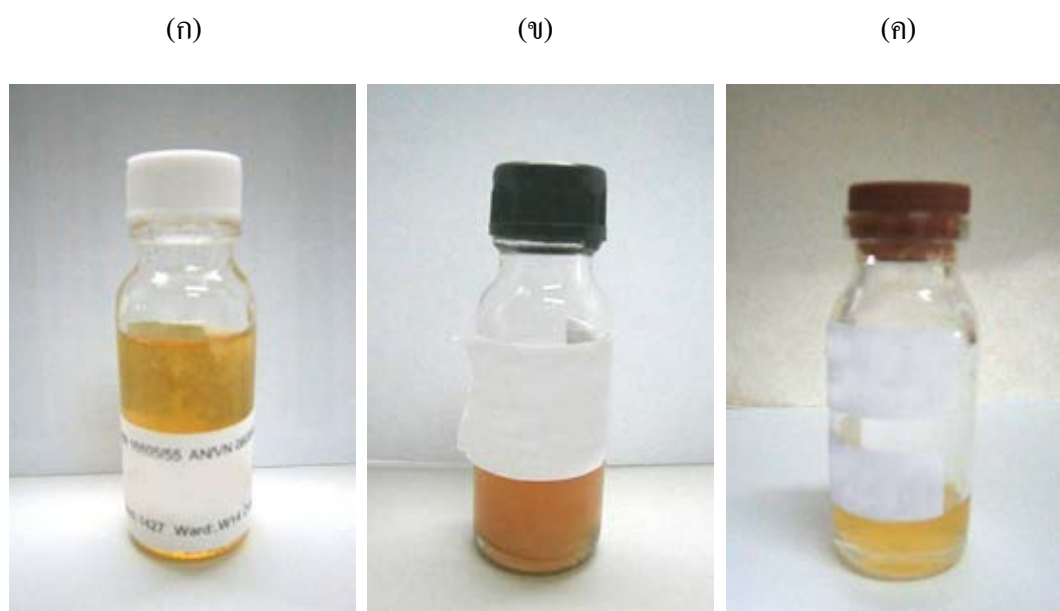
งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับพิจารณาอนุมัติด้านจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ ให้ดำเนินงานวิจัยได้ ภายใต้โครงการการแสดงผลของยีนในซีโนวิโอไซต์จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม หนังสือรับรองเลขที่ 057/2555 รหัสโครงการวิจัย MTU-EC-OT-4-049/55

2. การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน โดยใช้เทคโนโลยีชีวสารสนเทศ

จากการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนในเยื่อข้อระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ($n = 10$, อายุเฉลี่ย 71.9 ± 2.0 ปี) กับกลุ่มควบคุม ($n = 9$, อายุเฉลี่ย 49.9 ± 6.7 ปี) จากไมโครอาร์เรย์ด้วยเทคโนโลยีชีวสารสนเทศ พบว่ามี 4,816 ยีน จากทั้งหมด 22,283 ยีน ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 21.61 มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมกับกลุ่มควบคุม เมื่อ p -value มีค่าน้อยกว่า 0.05 เช่น ยีน *TNKS2* ซึ่งมีหน้าที่ซ่อมแซมเทโลเมียร์ (telomere) (Nan *et al.*, 2011) เป็นต้น จากนั้นจึงคัดกรองยีน ก่อนนำไปศึกษาและเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธี real-time PCR โดยเลือกยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อ p -value มีค่าน้อยกว่า 0.0005 หรือ p -value ที่ 0.05 แต่ยีนมีการแสดงออกลดลงตั้งแต่ 4 เท่าขึ้นไป หรือยีนมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 1.4 เท่า โดยเป็นยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมการถอดรหัสและการแปลรหัส อันได้แก่ *ATF3* (p -value เท่ากับ 0.0227 และมีการแสดงออกลดลง 5.57 เท่า) *DPH5* (p -value เท่ากับ 0.0371 และมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 1.43 เท่า) *eIF4G2* (p -value เท่ากับ 0.00004 และมีการแสดงออกลดลง 4.28 เท่า) และ *SBP2* (p -value เท่ากับ 0.00041 และมีการแสดงออกลดลง 2.01 เท่า) มาศึกษาต่อในขั้นต่อไป

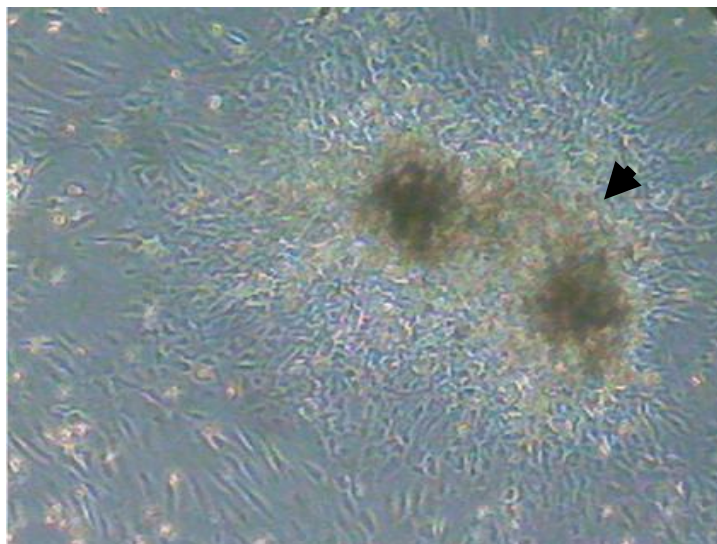
3. ตัวอย่างน้ำไขข้อ และซิโนไวรัสต์จากน้ำไขข้อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์

ตัวอย่างน้ำไขข้อที่นำมาใช้ศึกษา มีลักษณะสีเหลืองใส ชั้นหนืด มีปริมาตรตั้งแต่ 1 มิลลิลิตร จนถึง 12 มิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างกันไปในแต่ละบุคคล (รูปที่ 2) และเมื่อนำเซลล์ซิโนไวรัสต์ที่แยกได้จากน้ำไขข้อมาเพาะเลี้ยงเซลล์ ปรากฏว่ามีเซลล์ชนิดอื่นนอกจาก ซิโนไวรัสต์ปะปนมากับน้ำไขข้อ โดยซิโนไวรัสต์ที่พบในน้ำไขข้อจะมีลักษณะเกาะกันเป็นกลุ่ม แตกต่างไปจากซิโนไวรัสต์ที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเซลล์แยกออกเป็นเซลล์เดี่ยว มีลักษณะหัวท้ายเรียว และแผ่กระจายไปตามพื้นผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์ (รูปที่ 3)

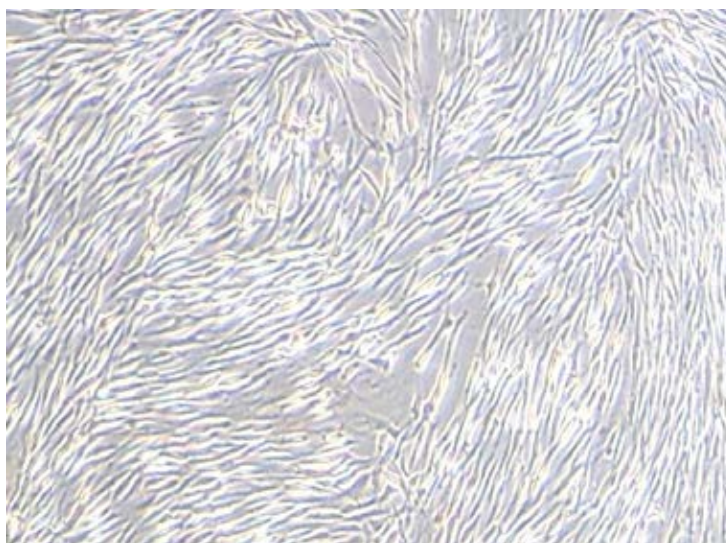


รูปที่ 2 ตัวอย่างน้ำไขข้อ (ก) และ (ข) ตัวอย่างน้ำไขข้อจากผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม
(ค) ตัวอย่างน้ำไขข้อจากกลุ่มควบคุม

(ก)



(ข)

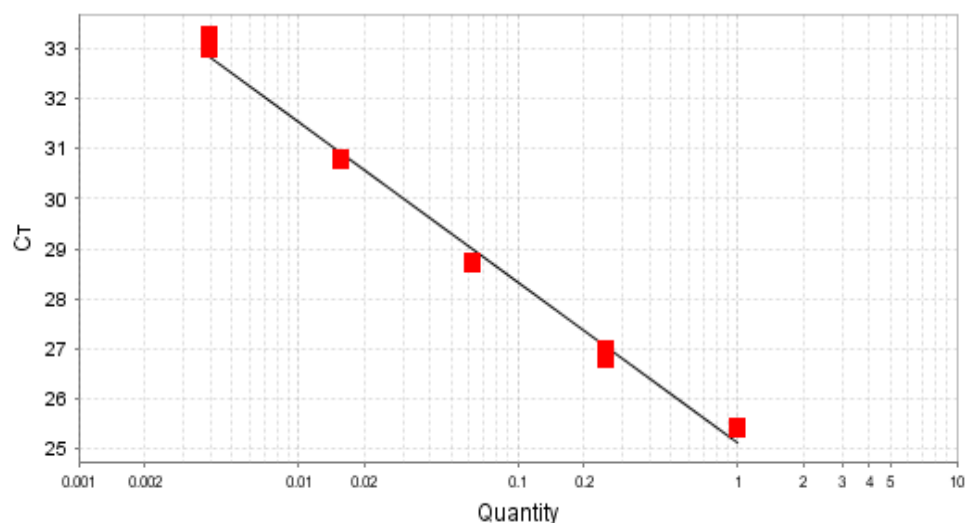


รูปที่ 3 ซิโนไวรัสที่ได้จากน้ำไขข้อ (ก) เซลล์ที่เกาะกันเป็นกลุ่ม (ลูกศร) ในแพจเสจที่ศูนย์ (ข) ซิโนไวรัสที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ ในแพจเสจที่สาม โดยใช้กำลังขยาย 40 เท่า

4. ผลการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน

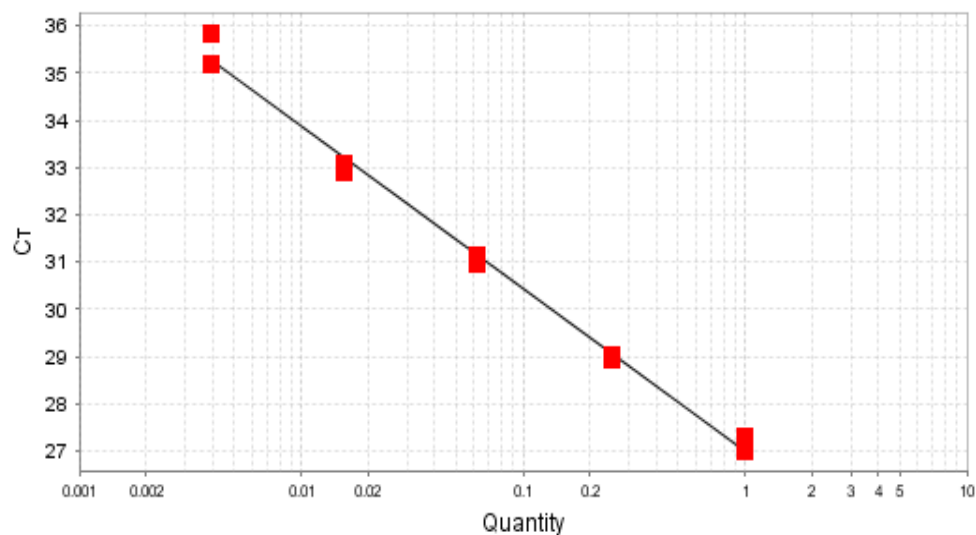
4.1 ประสิทธิภาพปฏิกิริยาพีซีอาร์ของแต่ละคู่ไพรเมอร์

จากการสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในแต่ละคู่ไพรเมอร์ ได้ผลดังรูปที่ 4 ถึง 9 โดย % efficiency ของไพรเมอร์ *GAPDH* ที่อุณหภูมิ annealing/extension 56 และ 60 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 95.275 และ 104.961 ส่วนค่า % efficiency ของคู่ไพรเมอร์ *ATF3* *eIF4G2* *DPH5* และ *SBP2* มีค่าเท่ากับ 93.705 86.09 104.746 และ 91.328 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าแต่ละคู่ไพรเมอร์มีค่า % efficiency อยู่ระหว่าง 80 ถึง 110 ซึ่งแสดงว่าปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มขึ้นใกล้เคียงสองเท่าในแต่ละรอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ และสามารถใช้วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน โดยไม่เกิดความคลาดเคลื่อนในข้อมูลการแสดงออกของยีน เนื่องจากความแตกต่างของ % efficiency นอกจากนี้ r^2 มีค่ามากกว่า 0.98 แสดงว่าจุดข้อมูลส่วนใหญ่อยู่ใกล้หรืออยู่บนเส้นถดถอย และกราฟมาตรฐานที่ได้มีความเหมาะสมในการคำนวณหา % efficiency



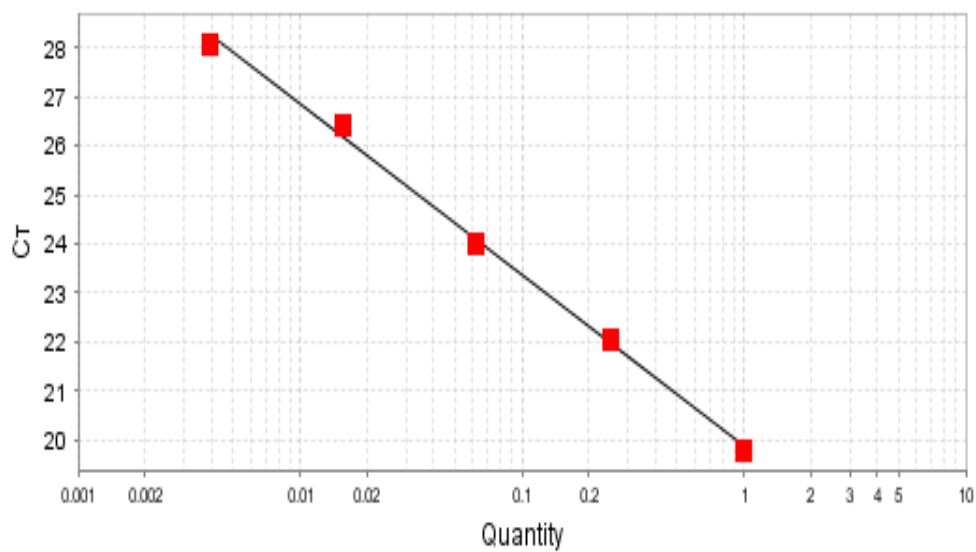
slope: -3.441 r^2 : 0.994 % efficiency: 95.275

รูปที่ 4 กราฟมาตรฐานของ *GAPDH* ที่อุณหภูมิ annealing/extension 56 องศาเซลเซียส



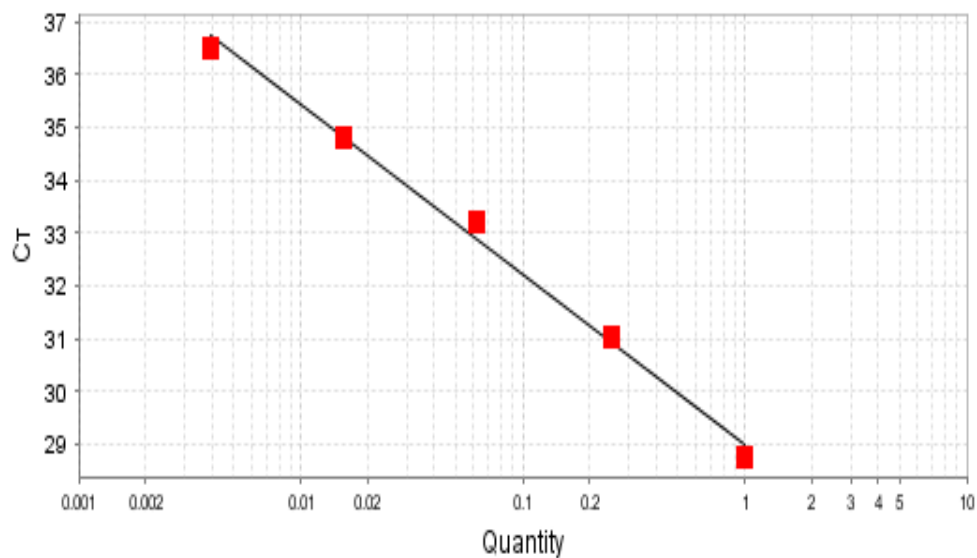
slope: -3.208 r^2 : 0.993 % efficiency: 104.961

รูปที่ 5 กราฟมาตรฐานของ *GAPDH* ที่อุณหภูมิ annealing/extension 60 องศาเซลเซียส



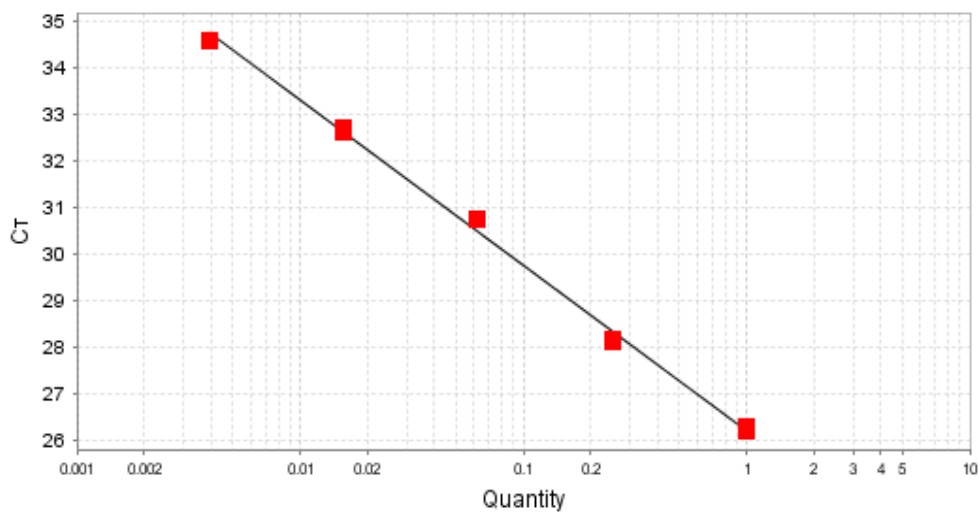
slope: -3.483 r^2 : 0.997 % efficiency: 93.705

รูปที่ 6 กราฟมาตรฐานของ *ATF3* ที่อุณหภูมิ annealing/extension 60 องศาเซลเซียส



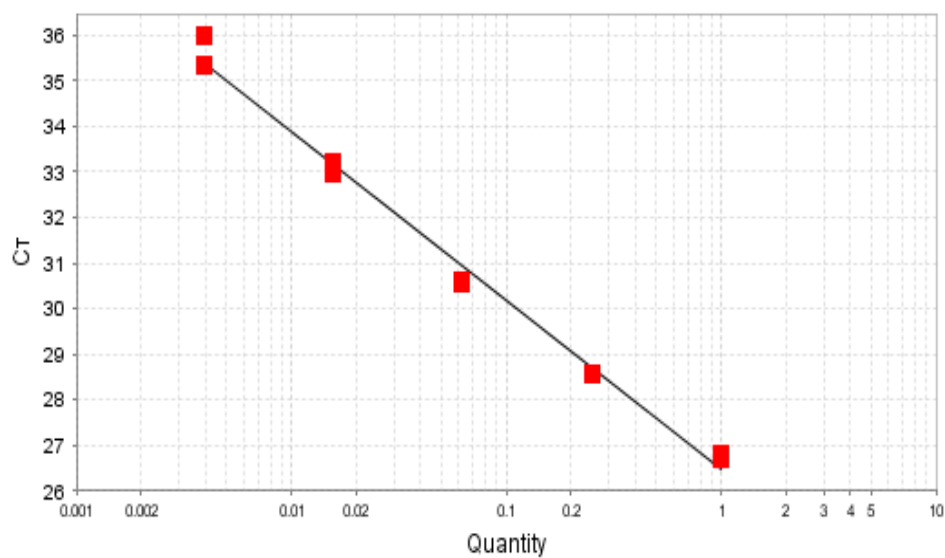
slope: -3.708 r^2 : 0.992 % efficiency: 86.09

รูปที่ 7 กราฟมาตรฐานของ *DPH5* ที่อุณหภูมิ annealing/extension 56 องศาเซลเซียส



slope: -3.213 r^2 : 0.992 % efficiency: 104.746

รูปที่ 8 กราฟมาตรฐานของ *eIF4G2* ที่อุณหภูมิ annealing/extension 56 องศาเซลเซียส



slope: -3.549 r^2 : 0.997 % efficiency: 91.328

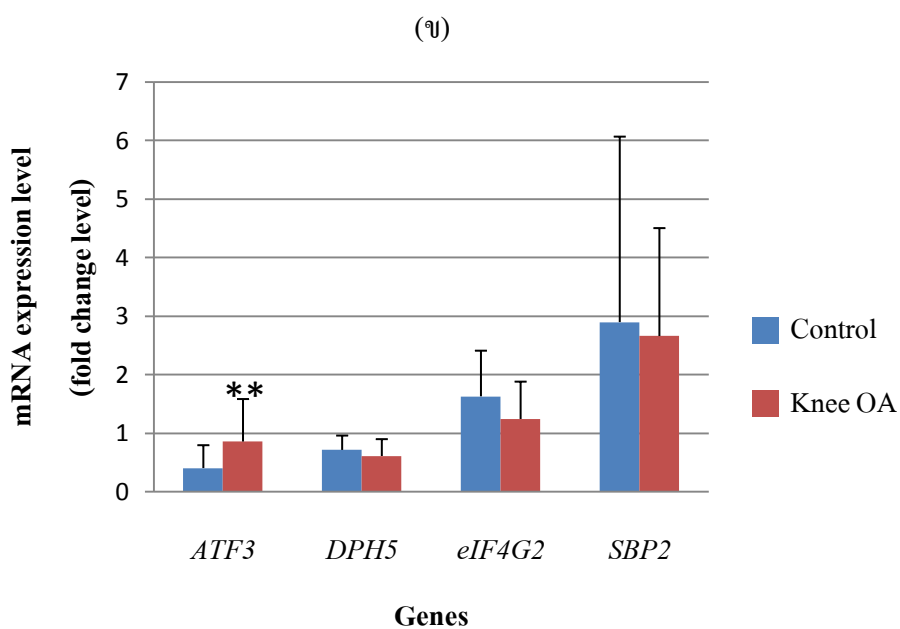
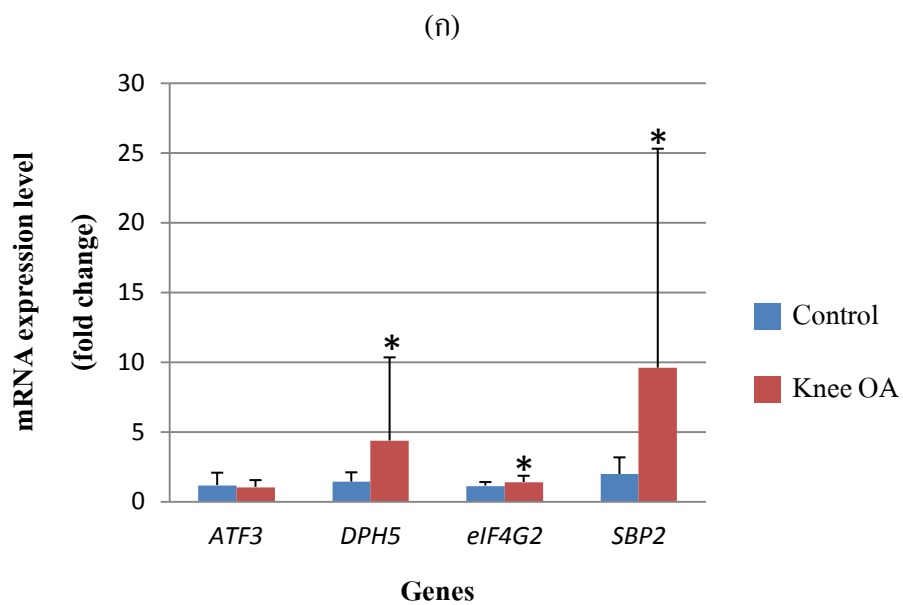
รูปที่ 9 กราฟมาตรฐานของ *SBP2* ที่อุณหภูมิ annealing/extension 56 องศาเซลเซียส

4.2 ผลการศึกษา รูปแบบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี real-time PCR

จากการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมกับกลุ่มควบคุมด้วยวิธี real-time PCR ได้ผลดังรูปที่ 10 จะเห็นว่า *DPH5 eIF4G2* และ *SBP2* จากตัวอย่างน้ำไขข้อมีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมกับกลุ่มควบคุม ที่ p-value น้อยกว่า 0.05 โดย *DPH5 eIF4G2* และ *SBP2* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยเท่ากับ 3.08 1.23 และ 4.89 เท่า ตามลำดับ ส่วน *ATF3* มีระดับการแสดงออกไม่แตกต่างกันระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมกับกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$) ผลการศึกษาที่ได้ตรงกันข้ามกับ ข้อมูลการแสดงออกของยีนที่ได้จากชิโนไวรัสที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *ATF3* มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมกับกลุ่มควบคุม ที่ p-value น้อยกว่า 0.01 โดยมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยเท่ากับ 2.12 เท่า ส่วน *DPH5 eIF4G2* และ *SBP2* มีระดับการแสดงออกไม่แตกต่างกันระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมกับกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$) ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สรุปผลการทดลอง real-time PCR

ตัวอย่าง	ยีน	p-value	ทิศทางการแสดงออก
ตัวอย่างน้ำไขข้อ	<i>ATF3</i>	$P > 0.05$	ไม่แตกต่างระหว่างผู้ป่วยกับกลุ่มควบคุม
	<i>DPH5</i>	$P < 0.05$	แสดงออกเพิ่มขึ้น 3.08 เท่า
	<i>eIF4G2</i>	$P < 0.05$	แสดงออกเพิ่มขึ้น 1.23 เท่า
	<i>SBP2</i>	$P < 0.05$	แสดงออกเพิ่มขึ้น 4.89 เท่า
ซีโนไวรัสใน น้ำไขข้อที่ผ่านการเพาะเลี้ยง เซลล์	<i>ATF3</i>	$P < 0.01$	แสดงออกเพิ่มขึ้น 2.12 เท่า
	<i>DPH5</i>	$P > 0.05$	ไม่แตกต่างระหว่างผู้ป่วยกับกลุ่มควบคุม
	<i>eIF4G2</i>	$P > 0.05$	ไม่แตกต่างระหว่างผู้ป่วยกับกลุ่มควบคุม
	<i>SBP2</i>	$P > 0.05$	ไม่แตกต่างระหว่างผู้ป่วยกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 10 ผลการแสดงผลของยีนระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม (n=10) กับกลุ่มควบคุม (n=5) ด้วยวิธี real-time PCR จาก (ก) ตัวอย่างน้ำไขข้อ (ข) ซิโนวิโอไซต์ในน้ำไขข้อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ เมื่อ I-bar คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน * และ ** แสดงถึง p-value น้อยกว่า 0.05 กับ 0.01 ตามลำดับ

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

ผลการศึกษากการแสดงออกของยีนที่ได้จากซิโนไวรัสในตัวอย่างน้ำไขข้อ ด้วยวิธี real-time PCR แสดงให้เห็นว่ายีน *eIF4G2* *DPH5* และ *SBP2* มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีงานวิจัยรายงานว่า ถ้ายีน *SBP2* มีการแสดงออกเปลี่ยนไปจะมีผลต่อกลไกการอักเสบ การทำลาย ECM รวมถึงการสังเคราะห์ selenoprotein เช่น Thioredoxin reductase 1 (TNXRD1) ซึ่งทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จาก oxidative stress เป็นต้น ถ้าโปรตีน TNXRD1 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้การตายของเซลล์ลดลง (Carlson *et al.*, 2009) นอกจากนี้การแสดงออกของยีน *DPH5* และ *eIF4G2* ที่เพิ่มขึ้น จะส่งผลให้เซลล์มีการแบ่งตัวมากขึ้น (Uthman *et al.*, 2013; Rezaul *et al.*, 2010) ดังนั้น ซิโนไวรัสอาจเพิ่มจำนวนจนเข้าไปทำลายกระดูกอ่อนผิวข้อ เช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นในโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis, RA) ซึ่งพยาธิสภาพของโรคเกิดจากการอักเสบเรื้อรังของเยื่อหุ้มข้อต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเยื่อข้อ ทำให้เยื่อข้อหนาตัวขึ้นและแผ่ขยาย จนเข้าไปทำลายกระดูกอ่อนผิวข้ออย่างต่อเนื่อง (Ribel-Madsen *et al.*, 2012)

ในขณะที่ ผลการศึกษากการแสดงออกของยีนที่ได้จากซิโนไวรัสที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ ด้วยวิธี real-time PCR แสดงให้เห็นว่ายีน *ATF3* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ผลการแสดงออกของยีน *eIF4G2* *DPH5* และ *SBP2* มีรูปแบบการแสดงออกไม่แตกต่างกันระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมกับกลุ่มควบคุม

ความแตกต่างที่เกิดขึ้นระหว่างผลการแสดงออกของยีนจากซิโนไวรัสในน้ำไขข้อและซิโนไวรัสที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ อาจมีสาเหตุมาจากเซลล์ชนิดอื่นที่ปะปนมากับน้ำไขข้อ เนื่องจากภายในน้ำไขข้อประกอบด้วยเซลล์แขวนลอยหลายชนิด เช่น macrophages eosinophils และ lymphocytes เป็นต้น (Freemont *et al.*, 1991) ซึ่งอาจมีผลต่อระดับการแสดงออกของยีนที่ได้จากตัวอย่างน้ำไขข้อ (Morey *et al.*, 2006) ทำให้รูปแบบการแสดงออกของยีนแตกต่างไปจากผลการแสดงออกของยีนในตัวอย่างซิโนไวรัสที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้ส่วนประกอบในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์มีความจำเพาะกับซิโนไวรัส ส่งผลให้ซิโนไวรัส ซึ่งเป็นเซลล์เกาะพื้นผิว สามารถกระจายตัวยึดเกาะผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์ได้ดีกว่าเซลล์ชนิดอื่น ๆ และทุกครั้งที่เปลี่ยนอาหารจะเป็นการคัดแยกซิโนไวรัส ซึ่งเรียงตัวเกาะบนผิวภาชนะ ออกจากเซลล์แขวนลอยที่ปนมากับน้ำไขข้อในตอนแรก (Woei, 2010) ดังนั้นรูปแบบการแสดงออกของยีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ จึงมีความน่าเชื่อถือมากกว่ารูปแบบการแสดงออกของยีนที่มาจากตัวอย่างน้ำไขข้อ

ถึงแม้รูปแบบการแสดงออกของยีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ จะมีความจำเพาะกับซิโนไวรัสโอไซค์ แต่รูปแบบการแสดงออกของยีนที่ได้อาจเปลี่ยนแปลงไปจากสภาพแวดล้อมเดิมในร่างกาย เนื่องจากการเกิด cell dedifferentiation เมื่อเลี้ยงเซลล์ไปหลายแพสเสจ โดยมีรายงานการวิจัยว่า ซิโนไวรัสโอไซค์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์จากแพสเสจที่ 2 ไปแพสเสจที่ 4 มีระดับการแสดงออกของยีนเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมอย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่ซิโนไวรัสโอไซค์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์จากแพสเสจที่ 2 ไปจนถึงแพสเสจที่ 5 พบว่า ยีนมีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปร้อยละ 7 ดังนั้นรูปแบบการแสดงออกของยีน *ATF3* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซิโนไวรัสโอไซค์ภายใน 3 แพสเสจแรก อาจมีรูปแบบการแสดงออกของยีนเปลี่ยนไปเพียงเล็กน้อย (Neumann *et al.*, 2010)

นอกจากนี้ ผล real-time PCR จากตัวอย่างซิโนไวรัสโอไซค์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์แสดงให้เห็นว่ายีน *ATF3* มีทิศทางการแสดงออกตรงข้ามกับข้อมูลที่ได้จากไมโครอาร์เรย์ โดยข้อมูลการแสดงออกของยีนในไมโครอาร์เรย์บ่งชี้ว่ายีน *ATF3* มีการแสดงออกลดลงในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม แต่ผลจาก real-time PCR กลับพบว่า ยีน *ATF3* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในผู้ป่วย แสดงให้เห็นถึงความขัดแย้งของข้อมูลระหว่างสองเทคนิคที่ใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ ซึ่งสาเหตุที่ข้อมูลจากทั้งสองวิธีไม่ตรงกันนั้น อาจเกิดจาก ผลบวกหลง (false positive) ในไมโครอาร์เรย์ ทำให้ผลไมโครอาร์เรย์แตกต่างไปจากผล real-time PCR ซึ่งมีสาเหตุจาก คู่โพรบจับกับเป้าหมายในตำแหน่งที่ไม่ถูกต้อง หรือจับกับเป้าหมายอื่นที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกัน (cross-hybridization) เนื่องจาก spliced variant หรือการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผิดพลาดในฐานข้อมูล เช่น GenBank มาใช้ในการออกแบบโพรบ เป็นต้น ส่งผลให้การอ่านและแปลสัญญาณความเข้มข้นของสารเรืองแสงตามปริมาณสายคอมพลีเมนต์อาร์เอ็นเอ ที่จับกับคู่โพรบบนแผ่นอาร์เรย์ ผิดไปจากความเป็นจริง (Arikawa *et al.*, 2008) รวมถึงข้อแตกต่างระหว่างเทคโนโลยี real-time PCR และไมโครอาร์เรย์ เช่น อุณหภูมิที่ใช้ไฮบริไดซ์ระหว่างโพรบกับไพรเมอร์ ในขั้นตอน annealing ของไมโครอาร์เรย์กับ real-time PCR เนื่องจากไมโครอาร์เรย์ไฮบริไดซ์โพรบทั้งหมดภายใต้อุณหภูมิเดียว ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้อาจไม่เหมาะสมกับคู่โพรบในบางยีน จนนำไปสู่การเกิด cross-hybridization ในขณะที่อุณหภูมิ annealing ของไพรเมอร์ใน real-time PCR สามารถปรับแต่งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของปฏิกิริยาพีซีอาร์และความจำเพาะกับยีนเป้าหมาย (Ashbolt *et al.*, 2012) หรือข้อแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา โดยไมโครอาร์เรย์ศึกษาการแสดงออกของยีนในเยื่อหุ้ม ซึ่งภายในเยื่อหุ้มนอกจากจะประกอบด้วยซิโนไวรัสโอไซค์แล้ว ยังพบเซลล์ชนิดอื่นปะปนอยู่ด้วย เช่น เซลล์ไขมัน และ mast cell เป็นต้น (Smith, 2011) แต่ตัวอย่างที่ใช้ใน real-time PCR คือซิโนไวรัสโอไซค์ในน้ำไขข้อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ ดังนั้นรูปแบบการแสดงออกของยีนที่ได้ จึงมีความแตกต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลการแสดงออกที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ จะมีความจำเพาะกับซิโนไวรัสโอไซค์มากกว่า ผลที่ได้จากไมโครอาร์เรย์

ยีน *ATF3* ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ ซึ่งมีโครงสร้างโมติฟแบบลิพซิมบเปอร์ โดยเกิดจากพอลิเพปไทด์แบบ α -helix 2 สาย ที่เหมือนกันมาจับคู่เป็นโฮโมไดเมอร์ (homodimers) หรือสายพอลิเพปไทด์ต่างชนิดกัน อาทิ Jun ATF2 เป็นต้น รวมเป็นเฮเทอโรไดเมอร์ (heterodimers) เช่น ATF3 สามารถจับคู่กับ c-Jun เกิดเป็นเฮเทอโรไดเมอร์กระตุ้นกระบวนการถอดรหัส *proenkephalin (PENK)* ในระบบประสาทเพื่อตอบสนองต่อความเจ็บปวด (Fink *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 1994) เป็นต้น ซึ่งแบบหลังเป็นกลไกที่สลับซับซ้อนในการควบคุมการแสดงออกของยีน ที่กระบวนการถอดรหัสถูกควบคุมด้วยเฮเทอโรไดเมอร์ เนื่องจากต้องมีการสังเคราะห์สายพอลิเพปไทด์ ทั้งสองชนิดในอัตราส่วนที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดเฮเทอโรไดเมอร์แทนที่โฮโมไดเมอร์ (Alberts *et al.*, 2002) ฉะนั้น ถ้ายีนมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น อาจทำให้ปริมาณ ATF3 ภายในเซลล์เปลี่ยนไปจากเดิม ส่งผลต่อการเกิดเป็นโฮโมไดเมอร์หรือเฮเทอโรไดเมอร์ระหว่างสายพอลิเพปไทด์ ซึ่งจะกระทบต่อกระบวนการถอดรหัสของยีนที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ ATF3 เช่น *claudin 1 (CLDN1)* ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะของเซลล์ หรือ *cornichon homolog 3 (CNIH3)* สังเคราะห์โปรตีนขนส่ง (transport protein) (Buganim *et al.*, 2011) เป็นต้น ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงของยีนดังกล่าว อาจมีผลต่อสถานะและสรีระของเซลล์เป็นวงกว้าง จนสามารถนำไปสู่การเป็นโรคข้อเข่าเสื่อมได้ในท้ายที่สุด

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เทคโนโลยีชีวสารสนเทศเพื่อคัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ทำให้กระบวนการคัดเลือกยีนมีความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น รวมถึงประหยัดค่าใช้จ่ายในการทำวิจัย เนื่องจากใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์เป็นเครื่องมือช่วยในการสืบค้นและประมวลผลรูปแบบการแสดงออกของยีนที่มีอยู่แล้วในฐานข้อมูล จึงช่วยให้การคัดเลือกยีนเป็นไปโดยสะดวก

ผล real-time PCR จากตัวอย่างซีโนวิโอไซต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ แตกต่างจากการทำ real-time PCR จากตัวอย่างน้ำไขข้อ ที่ภายในประกอบด้วยเซลล์ชนิดอื่นนอกจากซีโนวิโอไซต์ และให้ข้อมูลที่แตกต่างจากผลของไมโครอาร์เรย์ที่ได้จากฐานข้อมูล เนื่องจากความแม่นยำและความไวของ real-time PCR ที่สูงกว่าในการศึกษาการแสดงออกของแต่ละยีน รวมถึงผลบวกลวงที่อาจเกิดขึ้นในไมโครอาร์เรย์ ดังนั้นควรมีการตรวจสอบรูปแบบการแสดงออกของยีนที่ได้จากไมโครอาร์เรย์ด้วยวิธี real-time PCR เพื่อยืนยันผลที่ได้ ก่อนนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพ หรือตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรค

นอกจากนี้ผลการแสดงออกของยีนที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ ยังมีความจำเพาะกับซีโนวิโอไซต์มากกว่าผลจากไมโครอาร์เรย์ เนื่องจากตัวอย่างที่ใช้ศึกษาในไมโครอาร์เรย์ คือ เยื่อข้อ ซึ่งอาจมีเซลล์ชนิดอื่นปะปนมาด้วย โดยผล real-time PCR จากตัวอย่างซีโนวิโอไซต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์แสดง

ให้เห็นว่า *ATF3* มีการระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น 2.12 เท่าในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ที่ p-value มีค่าน้อยกว่า 0.01

ข้อเสนอแนะ

จากข้อมูลระดับการแสดงออกของยีนใน ไมโครอาร์เรย์ ควรเลือกยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยกับกลุ่มควบคุม ตั้งแต่ 2 เท่าขึ้นไป มาใช้ในการศึกษารูปแบบการแสดงออกเนื่องจากยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย อาจจะไม่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษารูปแบบการแสดงออกยีน ถ้าเป็นไปได้ควรใช้กลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม ที่มีอายุ เพศ เฉลี่ยใกล้เคียงกัน เพื่อลดความคลาดเคลื่อนของข้อมูล ที่อาจเกิดจากความแตกต่างทางปัจจัยชีวภาพระหว่างกลุ่มตัวอย่าง

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ชิโนไวรัสต่ออาจลดจำนวนแพสเสจที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ลง จาก 3 แพสเสจ ให้เหลือเพียง 2 แพสเสจ เพื่อป้องกันการเกิด cell dedifferentiation

ในขั้นตอน real-time PCR อาจใช้โพรบ เช่น Taqman probe เป็นต้น ในการศึกษาการแสดงออกของยีน เนื่องจากมีความจำเพาะและแม่นยำ ต่อการตรวจวัดปริมาณผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นจริงในปฏิกิริยา มากกว่า การใช้ EvaGreen กับคู่ไพรเมอร์ แต่อาจมีต้นทุนค่าใช้จ่ายในการทดลองที่สูงขึ้น

ศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *ATF3* *DPH5* *eIF4G2* และ *SBP2* ในเม็ดเลือดขาว เพื่อใช้เปรียบเทียบกับผลการแสดงออกของยีนจากชิโนไวรัสในน้ำไขข้อ ว่ารูปแบบการแสดงออกของยีนในน้ำไขข้อกับเม็ดเลือดขาว มีความใกล้เคียงกันหรือไม่

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

พงษ์ศักดิ์ วัฒนา, 2548. *แนวทางเวชปฏิบัติการวินิจฉัยและรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

ภาษาอังกฤษ

Abhishek, A. and Doherty, M., 2013. Diagnosis and clinical presentation of osteoarthritis. *Rheumatic Disease Clinical of North America* 39: 45-66.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science.

Arikawa, E., *et al.*, 2008. Cross-platform comparison of SYBR Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study. *BMC Genomics* 9: 328-339.

Ashbolt, N., *et al.* 2012. Quantitative Real-time PCR in Applied Microbiology. (Ed M. Filion). Canada: Caister Academic Press.

Bramlage, C. P., *et al.*, 2006. Decrease in expression of bone morphogenetic proteins 4 and 5 in synovial tissue of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy* 8: 58-67.

Buganim, Y., *et al.*, 2011. Transcriptional activity of ATF3 in the stromal compartment of tumors promotes cancer progression. *Carcinogenesis* 32: 1749-1757.

Chuaqui, R. F., *et al.*, 2002. Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nature Genetic* 32: 509-514.

Colizza, W. A., Insall, J. N. and Scuderi, G. R., 1995. The posterior stabilized total knee prosthesis. Assessment of polyethylene damage and osteolysis after a ten-year-minimum follow-up. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 77: 1713-1720.

Du, Y., Zhang, H., Lu, J. and Holmgren, A., 2012. Glutathione and glutaredoxin act as a backup of human thioredoxin reductase 1 to reduce thioredoxin 1 preventing cell death by aurothioglucose. *The Journal of Biological Chemistry* 287: 38210-38219.

Dumitrescu, A. M., Di Cosmo, C., Liao, X. H., Weiss, R. E. and Refetoff, S., 2010. The syndrome of inherited partial SBP2 deficiency in humans. *Antioxidant and Redox Signal* 12: 905-920.

- Fink, D. J., *et al.*, 2011. Gene therapy for pain: results of a phase I clinical trial. *Annals of Neurology* 70: 207-212.
- Freemont, A. J., Denton, J., Chuck, A., Holt, P. J. and Davies, M., 1991. Diagnostic value of synovial fluid microscopy: a reassessment and rationalisation. *Annals of the Rheumatic Diseases* 50: 101-107.
- Gupta, P. K., Liu, S., Batavia, M. P. and Leppla, S. H., 2008. The diphthamide modification on elongation factor-2 renders mammalian cells resistant to ricin. *Cellular Microbiology* 10: 1687-1694.
- Hai, T. and Curran, T., 1991. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proceeding of National Academy Science of the United States of America* 88: 3720-3724.
- Hai, T. and Hartman, M. G., 2001. The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* 273: 1-11.
- Harding, G. T., Hubley-Kozey, C. L., Dunbar, M. J., Stanish, W. D. and Astephen Wilson, J. L., 2012. Body mass index affects knee joint mechanics during gait differently with and without moderate knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 20: 1234-1242.
- Huber, R., *et al.*, 2008. Identification of intra-group, inter-individual, and gene-specific variances in mRNA expression profiles in the rheumatoid arthritis synovial membrane. *Arthritis Research and Therapy* 10: 98-113.
- Ikeda, T., *et al.*, 2002. Association analysis of single nucleotide polymorphisms in cartilage-specific collagen genes with knee and hip osteoarthritis in the Japanese population. *Journal of Bone and Mineral Research* 17: 1290-1296.
- Ikegawa, S., 2007. New gene associations in osteoarthritis: what do they provide, and where are we going? *Current Opinion in Rheumatology* 19: 429-434.
- Jang, M. K., Kim, C. H., Seong, J. K. and Jung, M. H., 2012. ATF3 inhibits adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 421: 38-43.
- Kerkhof, H. J., *et al.*, 2010. A genome-wide association study identifies an osteoarthritis susceptibility locus on chromosome 7q22. *Arthritis and Rheumatism* 62: 499-510.
- Kheir, E. and Shaw, D., 2009. Hyaline articular cartilage. *Orthopaedics and trauma* 23: 450-455.

- 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: 241-246, 248.
- Kipp, A. P., Muller, M. F., Goken, E. M., Deubel, S. and Brigelius-Flohe, R., 2012. The selenoproteins GPx2, TrxR2 and TrxR3 are regulated by Wnt signalling in the intestinal epithelium. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1820: 1588-1596.
- Lee, J. W., Kim, Y. H., Kim, S. H., Han, S. H. and Hahn, S. B., 2004. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. *Yonsei Medical Journal* 45: 41-47.
- Lementowski, P. W. and Zelicof, S. B., 2008. Obesity and osteoarthritis. *American Journal of Orthopaedics* 37: 148-151.
- Li, H., *et al.*, 2012. Levels of metalloproteinase (MMP-3, MMP-9), NF-kappaB ligand (RANKL), and nitric oxide (NO) in peripheral blood of osteoarthritis (OA) patients. *Clinical Laboratory* 58: 755-762.
- Lieberman, N., Marash, L. and Kimchi, A., 2009. The translation initiation factor DAP5 is a regulator of cell survival during mitosis. *Cell Cycle* 8: 204-209.
- Lockhart, D. J. and Winzeler, E. A., 2000. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405: 827-836.
- Loeser, R. F., *et al.*, 2005. Articular chondrocytes express the receptor for advanced glycation end products: Potential role in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 52: 2376-2385.
- Migliore, A., Giovannangeli, F., Granata, M. and Lagana, B., 2010. Hylan g-f 20: review of its safety and efficacy in the management of joint pain in osteoarthritis. *Clinical Medicine Insights Arthritis and Musculoskeletal Disorders* 3: 55-68.
- Miyamoto, Y., *et al.*, 2008. Common variants in DVWA on chromosome 3p24.3 are associated with susceptibility to knee osteoarthritis. *Nature Genetics* 40: 994-998.
- Morey, J. S., Ryan, J. C. and Van Dolah, F. M., 2006. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biological Procedures Online* 8: 175-193.
- Moskowitz, R. W., Howell, D. S., Altman, R. D., Buckwalter, J. A. and Goldberg, V. M. 2001. *Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management*. Philadelphia: W.B. Saunder.

- Mototani, H., *et al.*, 2008. A functional SNP in EDG2 increases susceptibility to knee osteoarthritis in Japanese. *Human Molecular Genetics* 17: 1790-1797.
- Nan, H., Qureshi, A. A., Prescott, J., De Vivo, I. and Han, J., 2011. Genetic variants in telomere-maintaining genes and skin cancer risk. *Human Genetics* 129: 247-253.
- Neumann, E., *et al.*, 2010. Cell culture and passaging alters gene expression pattern and proliferation rate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Research and Therapy* 12: 83-92.
- O'Connell, J. X., 2000. Pathology of the synovium. *American Journal of Clinical Pathology* 114: 773-784.
- Oas, T. G., McIntosh, L. P., O'Shea, E. K., Dahlquist, F. W. and Kim, P. S., 1990. Secondary structure of a leucine zipper determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 29: 2891-2894.
- Okimura, A., *et al.*, 1997. Enhancement of cartilage matrix protein synthesis in arthritic cartilage. *Arthritis and Rheumatism* 40: 1029-1036.
- Primrose, S. B. and Twyman, R. M. 2003. *Principles of Genome Analysis and Genomics*. UK: Blackwell publishing.
- Rezaul, K., *et al.*, 2010. Differential protein expression profiles in estrogen receptor-positive and -negative breast cancer tissues using label-free quantitative proteomics. *Genes and Cancer* 1: 251-271.
- Riancho, J. A., *et al.*, 2010. Common variations in estrogen-related genes are associated with severe large-joint osteoarthritis: a multicenter genetic and functional study. *Osteoarthritis Cartilage* 18: 927-933.
- Ribel-Madsen, S., *et al.*, 2012. A synoviocyte model for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: response to Ibuprofen, betamethasone, and ginger extract-a cross-sectional in vitro study. *Arthritis* 2012: 505842-505850.
- Scheper, G. C., van der Knaap, M. S. and Proud, C. G., 2007. Translation matters: protein synthesis defects in inherited disease. *Nature Reviews Genetics* 8: 711-723.
- Schuelert, N., Johnson, M. P., Oskins, J. L., Jassal, K., Chambers, M. G. and McDougall, J. J., 2011. Local application of the endocannabinoid hydrolysis inhibitor URB597 reduces nociception in spontaneous and chemically induced models of osteoarthritis. *Pain* 152: 975-981.
- Scott, J. L., *et al.*, 2010. Superoxide dismutase downregulation in osteoarthritis progression and end-stage disease. *Annals of the Rheumatic Diseases* 69: 1502-1510.

- Shi, D., *et al.*, 2008. Lack of association between the CALM1 core promoter polymorphism (-16C/T) and susceptibility to knee osteoarthritis in a Chinese Han population. *BMC Medical Genetics* 9: 91-95.
- Shin, M. H., *et al.*, 2012. Genetic association analysis of GDF5 and ADAM12 for knee osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 79: 488-491.
- Smith, M. D., 2011. The normal synovium. *The Open Rheumatology Journal* 5: 100-106.
- Spector, T. D., Doherty, S., Wheeler, M., Hart, D. J. and Doherty, M., 2009. Association of the DVWA and GDF5 polymorphisms with osteoarthritis in UK populations. *The Annals of Rheumatic Diseases* 68: 1916-1920.
- Tammachote, R., 2011. The genetics behind osteoarthritis: Asian focus. *Asian Biomedicine* 5: 23-36.
- Tan, Y., Low, K. G., Boccia, C., Grossman, J. and Comb, M. J., 1994. Fibroblast growth factor and cyclic AMP (cAMP) synergistically activate gene expression at a cAMP response element. *Molecular and Cellular Biology* 14: 7546-7556.
- Uthman, S., *et al.*, 2013. The amidation step of diphthamide biosynthesis in yeast requires DPH6, a gene identified through mining the DPH1-DPH5 interaction network. *PLOS Genetics* 9: 1003334-1003348.
- Valdes, A. M. and Spector, T. D., 2011. Genetic epidemiology of hip and knee osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 7: 23-32.
- Wang, Y., *et al.*, 2011. Effects of Hylan G-F 20 supplementation on cartilage preservation detected by magnetic resonance imaging in osteoarthritis of the knee: a two-year single-blind clinical trial. *BMC Musculoskeletal Disorders* 12: 195-203.
- Wang, Y. H., *et al.*, 2010. Expression of beta-1,4-galactosyltransferase I in a surgically-induced rat model of knee osteoarthritic synovitis. *Chinese Medical Journal* 123: 3067-3073.
- Webb, T. R., *et al.*, 2008. Diphthamide modification of eEF2 requires a J-domain protein and is essential for normal development. *Journal of Cell Science* 121: 3140-3145.
- Welnowska, E., Castello, A., Moral, P. and Carrasco, L., 2009. Translation of mRNAs from vesicular stomatitis virus and vaccinia virus is differentially blocked in cells with depletion of eIF4GI and/or eIF4GII. *Journal of Molecular Biology* 394: 506-521.
- Woei, K. 2010. *A Manual For Primary Human Cell Culture*. Singapore: World Scientific Publishing.
- Wong, M. L. and Medrano, J. F., 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39: 75-85.

- Zhang, R., *et al.*, 2012. Gene expression analyses of subchondral bone in early experimental osteoarthritis by microarray. *PLOS One* 7: 32356-32374.
- Zhou, H., *et al.*, 2011. Activating transcription factor 3 deficiency promotes cardiac hypertrophy, dysfunction, and fibrosis induced by pressure overload. *PLOS One* 6: 26744-26753.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก



คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ชุดที่ 1 คณะแพทยศาสตร์

หนังสือรับรองเลขที่ 057/2555

โครงการวิจัยเรื่อง การแสดงออกของยีนในซิโนไวต์จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม: Expression of genes in synoviocytes from knee osteoarthritis patients

รหัสโครงการวิจัย MTU-EC-OT-4-049/55

ผู้วิจัย
 1. อาจารย์ ดร. รัชนิกร ชรรวมโชติ
 2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ฌัฐพล ชรรวมโชติ
 3. นายเอกณรงค์ สีนสุวรรณนท์
 4. นายชารนภ สุภักศสถาพรพันธุ์

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)

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน 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 จันทร์วิมลสิ่ง)
 ประธานคณะกรรมการ

ลงชื่อ.....
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ทิพาพร ชาระวานิช)
 อนุกรรมการและเลขานุการ

อนุมัติ ณ วันที่ 19 มิถุนายน 2555

รูปที่ 11 เอกสารรับรองการอนุมัติด้านจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 5 ข้อมูลกลุ่มตัวอย่างในไมโครอาร์เรย์

	จำนวน	เพศ (ชาย/หญิง)	อายุเฉลี่ย (ปี)
โรคข้อเข่าเสื่อม	10	2/8	71.9 ± 2
กลุ่มควบคุม	9	7/2	49.9 ± 6.7

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 6 ข้อมูล real-time PCR จากตัวอย่างน้ำไขข้อ

ตัวอย่าง	ยีน	อุณหภูมิ annealing/extension	ค่าเฉลี่ย Ct	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
OA 1	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	34.5068	0.2818
	<i>GAPDH</i>		28.2807	0.2442
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	33.7575	0.1994
	<i>eIF4G2</i>		31.4011	0.1272
	<i>SBP2</i>		32.8026	0.2696
	<i>GAPDH</i>		30.3455	0.0843
OA 2	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	36.8088	0.5932
	<i>GAPDH</i>		30.2615	0.2266
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	35.7018	0.1335
	<i>eIF4G2</i>		31.8853	0.3127
	<i>SBP2</i>		34.556	0.3888
	<i>GAPDH</i>		31.7246	0.2201
OA 3	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	26.4275	0.0697
	<i>GAPDH</i>		20.2216	0.0656
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	29.3021	0.061
	<i>eIF4G2</i>		22.9925	0.0675
	<i>SBP2</i>		29.6118	0.129
	<i>GAPDH</i>		22.2104	0.1777

ตารางที่ 6 (ต่อ) ข้อมูล real-time PCR จากตัวอย่างน้ำไขข้อ

ตัวอย่าง	ยีน	อุณหภูมิ annealing/extension	ค่าเฉลี่ย Ct	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
OA 4	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	29.9987	0.192
	<i>GAPDH</i>		22.1244	0.0897
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	29.7734	0.2311
	<i>eIF4G2</i>		23.5872	0.0685
	<i>SBP2</i>		29.476	0.2127
	<i>GAPDH</i>		23.0565	0.114
OA 5	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	32.4917	0.1265
	<i>GAPDH</i>		25.3105	0.1095
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	33.3769	0.1824
	<i>eIF4G2</i>		27.8716	0.0717
	<i>SBP2</i>		33.3423	0.4078
	<i>GAPDH</i>		27.213	0.1355
OA 6	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	26.2458	0.2515
	<i>GAPDH</i>		19.2509	0.1376
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	27.9428	0.1326
	<i>eIF4G2</i>		21.9714	0.0762
	<i>SBP2</i>		28.0217	0.0833
	<i>GAPDH</i>		20.7133	0.1141

ตารางที่ 6 (ต่อ) ข้อมูล real-time PCR จากตัวอย่างน้ำไขข้อ

ตัวอย่าง	ยีน	อุณหภูมิ annealing/extension	ค่าเฉลี่ย Ct	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
OA 7	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	31.9223	0.0922
	<i>GAPDH</i>		24.6172	0.088
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	32.7947	0.046
	<i>eIF4G2</i>		26.9166	0.0265
	<i>SBP2</i>		33.535	0.2472
	<i>GAPDH</i>		26.4447	0.0536
OA 8	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	30.6063	0.0458
	<i>GAPDH</i>		23.555	0.0973
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	32.1059	0.1806
	<i>eIF4G2</i>		26.8065	0.0203
	<i>SBP2</i>		30.8885	0.0888
	<i>GAPDH</i>		25.5737	0.1675
OA 9	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	26.4549	0.1549
	<i>GAPDH</i>		20.7382	0.105
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	30.9305	0.0773
	<i>eIF4G2</i>		23.9157	0.0314
	<i>SBP2</i>		29.8674	0.2125
	<i>GAPDH</i>		22.5003	0.0368

ตารางที่ 6 (ต่อ) ข้อมูล real-time PCR จากตัวอย่างน้ำไขข้อ

ตัวอย่าง	ยีน	อุณหภูมิ annealing/extension	ค่าเฉลี่ย Ct	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
OA 10	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	25.5052	0.0366
	<i>GAPDH</i>		18.8328	0.1135
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	29.1466	0.1551
	<i>eIF4G2</i>		21.808	0.0216
	<i>SBP2</i>		28.4613	0.0885
	<i>GAPDH</i>		20.5998	0.1496
Control 1	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	30.0591	0.1473
	<i>GAPDH</i>		22.38775	0.0687
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	32.1591	0.3106
	<i>eIF4G2</i>		25.4984	0.0186
	<i>SBP2</i>		31.6012	0.1644
	<i>GAPDH</i>		23.9454	0.0443
Control 2	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	26.3503	0.2338
	<i>GAPDH</i>		19.6147	0.2605
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	28.2181	0.1159
	<i>eIF4G2</i>		21.9202	0.0134
	<i>SBP2</i>		28.4778	0.0527
	<i>GAPDH</i>		20.6319	0.0234

ตารางที่ 6 (ต่อ) ข้อมูล real-time PCR จากตัวอย่างน้ำไขข้อ

ตัวอย่าง	ยีน	อุณหภูมิ annealing/extension	ค่าเฉลี่ย Ct	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
Control 3	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	23.7792	0.0488
	<i>GAPDH</i>		17.8884	0.0299
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	30.344	0.0885
	<i>eIF4G2</i>		24.2457	0.0865
	<i>SBP2</i>		30.738	0.1871
	<i>GAPDH</i>		22.9624	0.0465
Control 4	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	31.6031	0.2526
	<i>GAPDH</i>		21.2632	0.0197
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	25.968	0.086
	<i>eIF4G2</i>		20.2229	0.0709
	<i>SBP2</i>		25.7228	0.0698
	<i>GAPDH</i>		19.3313	0.1067
Control 5	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	25.6411	0.1266
	<i>GAPDH</i>		20.1806	0.0369
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	28.1899	0.1107
	<i>eIF4G2</i>		22.5449	0.0186
	<i>SBP2</i>		27.7272	0.0739
	<i>GAPDH</i>		21.8241	0.0237

ตารางที่ 7 ข้อมูล real-time PCR จากซีโนไวรัสต้นน้ำไขข้อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์

ตัวอย่าง	ยีน	อุณหภูมิ annealing/extension	ค่าเฉลี่ย Ct	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
OA 11	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	33.8063	0.4438
	<i>GAPDH</i>		22.3233	0.0842
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	31.6066	0.2304
	<i>eIF4G2</i>		34.2243	0.4638
	<i>SBP2</i>		30.2138	0.1344
	<i>GAPDH</i>		28.9982	0.2061
OA 12	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	31.2984	0.0355
	<i>GAPDH</i>		21.0477	0.1373
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	30.2688	0.1534
	<i>eIF4G2</i>		30.7858	0.1634
	<i>SBP2</i>		30.2818	0.26
	<i>GAPDH</i>		27.3394	0.0518
OA 13	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	28.1426	0.3281
	<i>GAPDH</i>		16.4247	0.2232
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	28.3975	0.1654
	<i>eIF4G2</i>		29.9343	0.1771
	<i>SBP2</i>		29.3311	0.2058
	<i>GAPDH</i>		26.1387	0.0472

ตารางที่ 7 (ต่อ) ข้อมูล real-time PCR จากซีโนไวรัสในน้ำไขข้อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์

ตัวอย่าง	ยีน	อุณหภูมิ annealing/extension	ค่าเฉลี่ย Ct	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
OA 14	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	33.7148	0.2655
	<i>GAPDH</i>		21.6088	0.0727
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	29.54	0.1513
	<i>eIF4G2</i>		30.2716	0.1839
	<i>SBP2</i>		29.7958	0.0817
	<i>GAPDH</i>		27.135	0.1178
OA 15	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	35.2089	0.49
	<i>GAPDH</i>		25.1495	0.1141
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	31.0565	0.1251
	<i>eIF4G2</i>		31.9965	0.4829
	<i>SBP2</i>		30.4357	0.1651
	<i>GAPDH</i>		27.969	0.1067
OA 16	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	28.3606	0.1047
	<i>GAPDH</i>		19.2101	0.0465
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	29.1098	0.128
	<i>eIF4G2</i>		30.2057	0.1033
	<i>SBP2</i>		29.9945	0.388
	<i>GAPDH</i>		27.1356	0.0499

ตารางที่ 7 (ต่อ) ข้อมูล real-time PCR จากซีโนไวรัสในน้ำไขข้อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์

ตัวอย่าง	ยีน	อุณหภูมิ annealing/extension	ค่าเฉลี่ย Ct	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
OA 17	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	30.5674	0.1286
	<i>GAPDH</i>		16.5747	0.1407
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	27.7987	0.051
	<i>eIF4G2</i>		29.9606	0.2164
	<i>SBP2</i>		29.0084	0.1103
	<i>GAPDH</i>		26.2012	0.0341
OA 18	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	32.0285	0.1375
	<i>GAPDH</i>		22.0554	0.0787
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	31.7543	0.4336
	<i>eIF4G2</i>		32.2748	0.3518
	<i>SBP2</i>		30.812	0.1688
	<i>GAPDH</i>		29.6982	0.4144
OA 19	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	31.7801	0.2448
	<i>GAPDH</i>		21.9741	0.1311
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	32.5817	0.4446
	<i>eIF4G2</i>		33.8606	0.1095
	<i>SBP2</i>		31.299	0.1625
	<i>GAPDH</i>		29.396	0.0515

ตารางที่ 7 (ต่อ) ข้อมูล real-time PCR จากซีโนไวรัสที่นำไขข้อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์

ตัวอย่าง	ยีน	อุณหภูมิ annealing/extension	ค่าเฉลี่ย Ct	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
OA 20	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	30.5219	0.172
	<i>GAPDH</i>		16.4154	0.2081
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	28.5487	0.0693
	<i>eIF4G2</i>		28.2744	0.1964
	<i>SBP2</i>		29.4065	0.2467
	<i>GAPDH</i>		23.9194	0.2467
Control 6	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	34.4568	0.3075
	<i>GAPDH</i>		20.8202	0.1339
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	30.7111	0.2089
	<i>eIF4G2</i>		31.0586	0.3398
	<i>SBP2</i>		30.4962	0.1967
	<i>GAPDH</i>		27.8439	0.0619
Control 7	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	29.8662	0.1263
	<i>GAPDH</i>		17.1311	0.1376
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	27.6851	0.0416
	<i>eIF4G2</i>		29.0095	0.3486
	<i>SBP2</i>		28.9889	0.0702
	<i>GAPDH</i>		25.8062	0.1338

ตารางที่ 7 (ต่อ) ข้อมูล real-time PCR จากซีโนไวรัสในน้ำไขข้อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์

ตัวอย่าง	ยีน	อุณหภูมิ annealing/extension	ค่าเฉลี่ย Ct	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
Control 8	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	36.4623	0.4535
	<i>GAPDH</i>		24.8774	0.2573
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	31.7214	0.4044
	<i>eIF4G2</i>		32.8702	0.2041
	<i>SBP2</i>		32.0717	0.4217
	<i>GAPDH</i>		28.913	0.0569
Control 9	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	33.7393	0.2818
	<i>GAPDH</i>		23.4309	0.0786
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	34.6555	0.0982
	<i>eIF4G2</i>		34.7292	1.2157
	<i>SBP2</i>		32.9536	0.4953
	<i>GAPDH</i>		32.3412	0.146
Control 10	<i>ATF3</i>	60 องศาเซลเซียส	30.0886	0.1916
	<i>GAPDH</i>		17.7507	0.0054
	<i>DPH5</i>	56 องศาเซลเซียส	27.1009	0.0982
	<i>eIF4G2</i>		29.2482	0.1699
	<i>SBP2</i>		29.0293	0.0175
	<i>GAPDH</i>		25.326	0.0245

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล	นายธารนภ สุภักศสถาพรพันธุ์
วันเดือนปีเกิด	16 สิงหาคม พ.ศ. 2530
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ที่อยู่ปัจจุบัน	62/145 หมู่บ้านชนากร 2 ซอย 6/2 ถนนเทิดพระเกียรติ ตำบลวัดชลอ อำเภอ บางกรวย จังหวัดนนทบุรี 11130
เบอร์โทรศัพท์	028-839257, 085-1225175
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (พันธุศาสตร์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2552
ประวัติเผยแพร่ผลงาน	การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 38 (วทท 38)