



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การวิเคราะห์เมทิลเลชันของยีน *DIO2* ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

ชื่อนิสิต ธารทอง สุขภารังษี

เลขประจำตัว 5832118923

ภาควิชา พฤษศาสตร์

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the senior project authors' files submitted through the faculty.

การวิเคราะห์เมทิลเลชันของยีน *DIO2* ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

นางสาวธารทอง สุขภารังษี

โครงงานวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาแพทยศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561

Methylation analysis of the *DIO2* gene
in knee osteoarthritis patients

Miss Thanthong Sukparangsri

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for
the Degree of Bachelor of Science
Program Genetics, Department of Botany
Faculty of Science, Chulalongkorn University
Academic Year 2018

ชื่อเรื่อง	การวิเคราะห์เมทิลเลชันของยีน <i>DIO2</i> ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม
ชื่อนิสิต	นางสาวธารทอง สุขภารังษี
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.ทพ.นครินทร์ กิตกำธร
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
ปีการศึกษา	2561

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ อนุมัติให้โครงการวิทยาสตรนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงการวิทยาสตร

.....รัชนีกร ธรรมโชติ..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ)

.....นครินทร์ กิตกำธร..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.ทพ.นครินทร์ กิตกำธร)

.....ปฐมวดี ญาณทัศน์ย์จิต..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศน์ย์จิต)

ชื่อเรื่อง	การวิเคราะห์เมทิลเลชันของยีน <i>DIO2</i> ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม
ชื่อนิสิต	นางสาวธรรทอง สุขภารังษี
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.ทพ.นครินทร์ กิตกำธร
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

โรคข้อเข่าเสื่อมเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมของกระดูกอ่อน เกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น อายุ น้ำหนักตัว และพันธุกรรม มีการศึกษาพบว่า การเปลี่ยนแปลงสภาวะเหนือพันธุกรรม (epigenetics) โดยเฉพาะดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีนต่าง ๆ ได้แก่ ยีน *Growth differentiation factor 5 (GDF5)* ยีน *SRY-box 9 (SOX9)* และยีน *Iodothyronine deiodinase 2 (DIO2)* สัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ทั้งยังเคยมีการศึกษาในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของชาวคอเคเซียน พบว่าโรคข้อเข่าเสื่อมสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงเมทิลเลชันบริเวณ CpG islands ของโปรโมเตอร์ยีน *DIO2* ส่งผลให้เกิดการสลาย cartilage matrix และการสะสมแร่ธาตุในกระดูกอ่อน จึงทำให้เกิดความสนใจศึกษาระดับการเกิดเมทิลเลชันของยีน *DIO2* ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมชาวไทย โดยสกัดดีเอ็นเอจากเลือดของผู้ป่วยและคนปกติกลุ่มละ 50 คน มาตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันด้วยวิธี Methylaton-Specific PCR (MSP) พบว่าเกิดอุปสรรคในขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งไพรเมอร์ที่ออกแบบทั้งจากซอฟต์แวร์และออกแบบด้วยตัวเอง ไม่จำเพาะต่อลำดับเบสของยีนที่ศึกษา ส่งผลให้เมื่อทำเจลอิลีกโทรโฟริซิสจึงไม่ขึ้นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดตรงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการ ทั้งนี้เนื่องมาจากบริเวณส่วนใหญ่ของยีน *DIO2* มีการเรียงตัวของเบสอะดีนีนและไทมีนซ้ำเป็นจำนวนมาก ส่งผลต่อการจำเพาะของไพรเมอร์ อุณหภูมิ melting temperature (Tm) รวมไปถึงประสิทธิภาพการทำงานของ *Taq DNA polymerase* ดังนั้นเทคนิค MSP อาจจะไม่เหมาะสมในการวิเคราะห์เมทิลเลชันของยีน *DIO2*

คำสำคัญ: โรคข้อเข่าเสื่อม, ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน, *DIO2*, MSP

Title	Methylation analysis of the <i>DIO2</i> gene in knee osteoarthritis patients
Student	Miss Thanthong Sukparangsri
Advisor	Assist. Prof. Dr. Rachaneekorn Tammachote
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Nakatin kitkhumthorn
Program	Genetics
Department	Botany
Academic Year	2018

Abstract

Knee osteoarthritis (OA) is caused by degradation of cartilage. Risk factors include advancing age, body weight and genetics. Previous studies suggested that epigenetics especially DNA methylation in many genes were associated with knee OA such as *Growth differentiation factor 5 (GDF5)*, *SRY-box 9 (SOX9)* and *Iodothyronine deiodinase 2 (DIO2)*. Another previous study in cartilage tissue from Caucasian volunteers reported that knee OA was associated with changing methylation level at the CpG islands of *DIO2* promoter that effected cartilage matrix degrading and mineralization. Hence, this study aims to investigate methylation level of the *DIO2* gene in knee OA in Thai patients compared to healthy knee (50 samples in each group) through Methylation-Specific PCR (MSP) technique. However, we encountered problems in primer design process. Both primers from designed by MSP primer design software and manually were not specific to sequences of the target gene. Results from gel electrophoresis showed the PCR products at the different size of the expected PCR products. It may be due to the fact that a large area of *DIO2* gene includes adenine and thymine repeats that effect primer specificity, melting temperature (T_m) and efficiency of *Taq* DNA polymerase. Thus, MSP technique is not appropriate methylation analysis of *DIO2* gene.

Keywords: knee OA, DNA methylation, *DIO2*, MSP

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิทยาศาสตร์ในครั้งนี้แม้จะมีปัญหาและอุปสรรคมากมายแต่สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ เนื่องจากได้รับคำปรึกษาทั้งในด้านความรู้และในด้านกำลังใจจากอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ผศ.ดร. รัชนีกร ธรรมโชติ ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูงที่ให้ความกรุณาในด้านต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็น ตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย สารเคมี เครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษาทดลอง ทั้งยังคอยช่วยเหลือ แก้ไข และตรวจทานตั้งแต่แผนการทดลองของผู้วิจัย จนถึงรายงานความก้าวหน้าโครงการวิทยาศาสตร์ของผู้วิจัยทุกครั้ง รวมถึงหาทางออกที่ดีที่สุดให้กับผู้วิจัยตลอดมา

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ทพ.นครินทร์ กิตกัธธ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และ ศ.ดร.นพ.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร หัวหน้าภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ปฏิบัติการในการศึกษาทดลอง และสารเคมีในการทดลอง

ขอขอบพระคุณผู้บริจาคโลหิตทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเลือด เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ นำมาใช้เป็นตัวอย่างในการทดลองในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต กรรมการสอบที่สละเวลาและกรุณาให้คำแนะนำ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความเรียบร้อยและสมบูรณ์แบบ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการ 306 (RTC Lab) และห้องปฏิบัติการกลาง (Central Lab) ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และวัสดุอุปกรณ์สำหรับการศึกษาทดลองในครั้งนี้ รวมถึงพินิสิตปริญญาเอก และปริญญาโททุก ๆ ท่านในห้องปฏิบัติการที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และคอยเป็นกำลังใจ ทำให้การศึกษาทดลองครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนวัสดุและอุปกรณ์การศึกษาทดลองในการทำโครงการวิทยาศาสตร์ประจำปี 2561

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนและทำให้การศึกษาทดลองในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงาน	16
บทที่ 4 ผลการทดลอง	24
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผล	41
เอกสารอ้างอิง	46

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1	การวินิจฉัยแบบถ่ายภาพเอกซเรย์บริเวณสะโพก	5
2	การวินิจฉัยแบบถ่ายภาพบริเวณกระดูกอ่อน	6
3	กลไกการเปลี่ยนจากเบสไซโทซีนเป็นยูราซิล เมื่อผ่านกระบวนการ sodium sulfite treatment	14
4	ไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค MSP แบ่งเป็น 2 คู่ คือ อันเมทิลเลชันไพรเมอร์และเมทิลเลชันไพรเมอร์	14
5	ลำดับเบสไพรโมเตอร์ของยีน <i>DIO2</i> (<i>DIO2</i> -209) จากฐานข้อมูล ensemble	25
6	ลำดับเบสไพรโมเตอร์ของยีน <i>DIO2</i> จากฐานข้อมูล EPD	25
7	ลำดับเบสของไพรโมเตอร์ยีน <i>DIO2</i> เครื่องหมายสีเหลือง คือ ตำแหน่ง CpG, สีฟ้า คือ ตำแหน่ง TSS และสีเขียว คือ ตำแหน่ง SNP	26
8	ลำดับเบสของอันเมทิลเลชันไพรเมอร์	26
9	ลำดับเบสของเมทิลเลชันไพรเมอร์	27
10	ซอฟต์แวร์ Methprimer	30
11	ซอฟต์แวร์ Bisearch	31
12	ผลการทำ gradient PCR ครั้งที่ 1 โดยใช้ไพรเมอร์ชุดที่ 1	32
13	ผลการทำ gradient PCR ครั้งที่ 2 โดยใช้เฉพาะเมทิลเลชันไพรเมอร์จากไพรเมอร์ชุดที่ 1	33
14	ผลการทำ gradient PCR ครั้งที่ 3 โดยใช้เฉพาะเมทิลเลชันไพรเมอร์จากไพรเมอร์ชุดที่ 2	34
15	ผลการทำ gradient PCR ครั้งที่ 4 โดยใช้เฉพาะอันเมทิลเลชันไพรเมอร์จากไพรเมอร์ชุดที่ 2	35
16	ผลการทำ gradient PCR ครั้งที่ 5 โดยใช้ไพรเมอร์ชุดที่ 3	36
17	ผลการทำ gradient PCR ครั้งที่ 6 โดยใช้ไพรเมอร์ชุดที่ 4	37

รูปที่		หน้า
18	ผลการทำ gradient PCR ครั้งที่ 7 โดยใช้ไพรเมอร์ชุดที่ 5	38
19	ผลการทำ gradient PCR ครั้งที่ 8 เป็นการนำไพรเมอร์ชุดที่ 1 มาทดลองซ้ำ โดยเปลี่ยนมาใช้ชุดดีเอ็นเอมาตรฐานเป็น positive control	39
20	ผลการทำ gradient PCR ครั้งที่ 9 เป็นการนำไพรเมอร์ชุดที่ 1 มาทดลองซ้ำ โดยเปลี่ยนมาใช้ HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen Inc., German) แทน Taq DNA Polymerase (Apsalagen Co.Ltd., Thailand)	40

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	วิเคราะห์ระดับเมทิลเลชันของยีนที่สัมพันธ์กับโรคข้อเสื่อม	8
2	การศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชันในยีน DIO2	10
3	จำนวน CpG site ของยีน DIO2 ในแต่ละ splice variant	24
4	ไพรเมอร์ชุดที่ 1	27
5	ไพรเมอร์ชุดที่ 2	28
6	ไพรเมอร์ชุดที่ 3	28
7	ไพรเมอร์ชุดที่ 4	29
8	ไพรเมอร์ชุดที่ 5	30

บทที่ 1

บทนำ

โรคข้อเข่าเสื่อม เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของกระดูกอ่อน หากเกิดการสึกหรอของกระดูกอ่อนเป็นบริเวณกว้างจะทำให้กระดูกในข้อเข่าเสียดสีกันเองส่งผลให้เกิดเสียงดังและอาการเจ็บปวดขึ้นที่บริเวณข้อเข่าเมื่อมีการเคลื่อนไหว โรคนี้พบได้ตั้งแต่วัยกลางคนขึ้นไปจนถึงวัยผู้สูงอายุ (Alshami, 2014) แต่จะพบมาก 1 ใน 3 ของผู้ที่มีอายุมากกว่า 65 ปีขึ้นไป (Ringdahl and Pandit, 2011) และมีงานวิจัยในชาวญี่ปุ่นพบว่ามักจะเป็นในผู้หญิงมากกว่าผู้ชาย (Heidari, 2011) สำหรับสาเหตุของการเกิดโรคมาจากพันธุกรรม อายุ น้ำหนักตัว (Murphy and others, 2008) และการบาดเจ็บที่ข้อเข่า (Driban and others, 2015) โดยข้อเข่าจะเสื่อมไปตามอายุที่มากขึ้น (Arden and Nevitt, 2006) และน้ำหนักตัวที่มากจะเพิ่มแรงกดทับให้ข้อเข่า ทำให้ข้อเข่าเสื่อมมากขึ้น (Abbate and others, 2006) ในปัจจุบันยังไม่สามารถรักษาข้อเข่าเสื่อมให้หายขาดได้ สำหรับวิธีการรักษาแบ่งเป็น 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 การรักษาแบบไม่ผ่าตัด เป็นการบรรเทาความเจ็บปวดด้วยยา หรือ ปรับเปลี่ยนพฤติกรรมเพื่อชะลอการเสื่อมของข้อเข่า ส่วนวิธีที่ 2 คือ การรักษาด้วยการผ่าตัด เช่น การผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม และการผ่าตัดจัดแนวกระดูกขา เป็นต้น (Lespasio and others, 2017)

การศึกษาทางด้านพันธุกรรมก่อนหน้านี้นี้พบว่า การเปลี่ยนแปลงสถานะเหนือพันธุกรรม (epigenetics) โดยเฉพาะดีเอ็นเอเมทิลเลชัน สามารถควบคุมลักษณะทางชีววิทยาและการก่อให้เกิดโรคได้ (Laird, 2010) ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน คือ การเติมหมู่เมทิลโดยการทำงานของ DNA methyltransferases (DNMTs) ให้กับคาร์บอนที่ 5 ของวงแหวนเบสไซโทซีนที่ติดกับเบสกวานีน (CpG site) (Herman and others, 1996) หากดีเอ็นเอเมทิลเลชันเกิดขึ้นในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน จะทำให้ transcription factor ไม่สามารถจับได้ ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีน (Jin, Li, and Robertson, 2011) ทั้งยังเคยมีการศึกษาในโรคข้อเข่าเสื่อมพบว่ายีนบางชนิดถูกควบคุมด้วยดีเอ็นเอเมทิลเลชัน และสัมพันธ์กับเกิดโรคอีกด้วย เช่น ยีน *Growth differentiation factor 5 (GDF5)* ยีน *SRY-box 9 (SOX9)* (Bonin and others, 2016) และยีน *Iodothyronine deiodinase 2 (DIO2)* (Rushton and others, 2015) เป็นต้น โดยยีน SOX9 กล่าวเพียงควบคุมกระบวนการสร้างเซลล์กระดูกอ่อน (Blanco and Rego-Pérez, 2014) ส่วนยีน GDF5 กล่าวเพียงควบคุมการเจริญ การรักษา และการซ่อมแซมของข้อต่อซินโนเวียล (synovial joint) ซึ่งเป็นข้อต่อที่พบได้บริเวณข้อเข่า (Dodd,

Syddall, and Loughlin, 2013) แต่ยีน *DIO2* ในภาวะปกติจะผลิตโปรตีนที่เร่งการเปลี่ยนรูปฮอร์โมนไทรอยด์ที่ไม่ทำงาน (T4) เป็นฮอร์โมนไทรอยด์ที่สามารถทำงานได้ (T3) ซึ่งจะชักนำให้เกิดถึง 4 กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับโรคข้อเข่าเสื่อม คือ กระบวนการเจริญสูงสุดท้ายของเซลล์กระดูกอ่อนบริเวณ growth plate ทำให้เกิดการขยายตัวมากกว่าปกติ (cell hypertrophy) สลายส่วนเซลล์กระดูกอ่อนและเนื้อกระดูกอ่อน (ECM destruction) สะสมแร่ธาตุในกระดูกอ่อน (mineralization) และการสร้างกระดูกแข็ง (formation of bone) (Hollander, 2013)

นอกจากนั้น การศึกษาในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของชาวคอเคเซียน ยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงเมทิลเลชัน บริเวณ CpG islands ของโปรโมเตอร์ยีน *DIO2* สัมพันธ์กับการแสดงออกของยีนที่มากและส่งผลให้เกิดการสลาย cartilage matrix และการสะสมแร่ธาตุในกระดูกอ่อน (Bomer and others, 2015) ซึ่งเป็นสองสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อม จึงทำให้เกิดความสนใจในยีน *DIO2* โดยในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาระดับการเกิดเมทิลเลชันของยีน *DIO2* ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมชาวไทย โดยจะสกัดดีเอ็นเอจากเลือดของกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมกลุ่มละ 50 คน มาตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันด้วยวิธี Methylation-Specific PCR (MSP) เนื่องจากเคยมีงานวิจัยรายงานว่าสามารถตรวจสอบระดับเมทิลเลชันของยีน *DIO2* จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่มาจากเลือดได้เช่นเดียวกับที่มาจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (Bos and others, 2009) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสกัดจีโนมดีเอ็นเอจากเลือดเพื่อมาตรวจสอบระดับเมทิลเลชัน ซึ่งประโยชน์จากการทำวิจัยในครั้งนี้อาจพัฒนาไปเป็นตัวบ่งชี้ในการวินิจฉัยและทำนายโอกาสเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ทำให้ผู้ที่มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคข้อเข่าเสื่อมหาแนวทางในการป้องกันตนเองจากการเป็นโรคข้อเข่าเสื่อมได้ทัน่วงที

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการเกิดเมทิลเลชันในยีน *DIO2* ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

บทที่ 2

การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. โรคข้อเข่าเสื่อม

โรคข้อเข่าเสื่อมเป็นหนึ่งในโรคข้ออักเสบที่พบบ่อยที่สุด เกิดจากการเสื่อมของกระดูกอ่อน มีหินปูนมาจับระหว่างรอยต่อกระดูกกับกระดูกอ่อน (subchondral bone sclerosis) และกระดูกงอก (osteophyte formation) ส่งผลให้ข้อเข่าผิดปกติและมีอาการเจ็บข้อเข่าตามมา เมื่ออาการรุนแรงขึ้นทำให้เกิดข้อยึด กล้ามเนื้อลีบและขาโก่งในที่สุด ทั้งยังเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญของวัยกลางคนรวมไปถึงวัยผู้สูงอายุทั่วโลก ในปี 2004 ประเทศอเมริกาพบผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมากกว่า 20 ล้านคน (Buckwalter, Saltzman, and Brown, 2004) และภายในปี 2020 คาดการณ์ว่าจะมีประชากรมากกว่า 50 ล้านคนเป็นโรคข้อเข่าเสื่อม (Shen and Chen, 2014) สำหรับภูมิภาคเอเชียมีรายงานว่าทางตะวันออกเฉียงใต้ของภูมิภาค ได้แก่ ประเทศสิงคโปร์ เวียดนาม รวมไปถึงประเทศไทย พบอุบัติการณ์ของโรคข้อเข่าเสื่อมสูงกว่าในสหราชอาณาจักร (Nguyen, 2014)

นอกจากนั้น ประเทศไทยได้จัดให้โรคข้อเข่าเสื่อมเป็นโรคที่มีความสำคัญอันดับ 6 และแต่ละปีมีอัตราเพิ่มขึ้นร้อยละ 0.1 โดยในปี 2010 พบผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมากกว่า 6 ล้านคน (Nimit-arnu, 2014) และจากสถิติห้องผ่าตัดโรงพยาบาลนครปฐมตั้งแต่ปี 2013 จนถึง 2015 พบว่าการผ่าตัดข้อเข่าเทียมอันเกิดจากภาวะข้อเข่าเสื่อมในผู้สูงอายุ เป็นสาเหตุที่ผู้ป่วยเข้ารับการผ่าตัดแบบไม่เร่งด่วน อันดับ 1 ของโรงพยาบาล (ศุภฤทธิ เสงคราวิทย์, 2560) ในปัจจุบันสังคมไทยมีจำนวนประชากรผู้สูงอายุมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการอุบัติของโรคข้อเข่าเสื่อมมากขึ้นตามมา และคาดว่าในปี 2025 ประชากรไทยจะประกอบไปด้วยผู้สูงอายุมากกว่าร้อยละ 20 หรือ 14.4 ล้านคน (ชาติตรี โปสิทธิพิเชษฐ, 2560) ดังนั้นจึงควรตระหนักถึงภาวะข้อเข่าเสื่อมที่มีอัตราเพิ่มขึ้นในทุก ๆ ปี เพื่อป้องกัน หรือ ชะลอการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

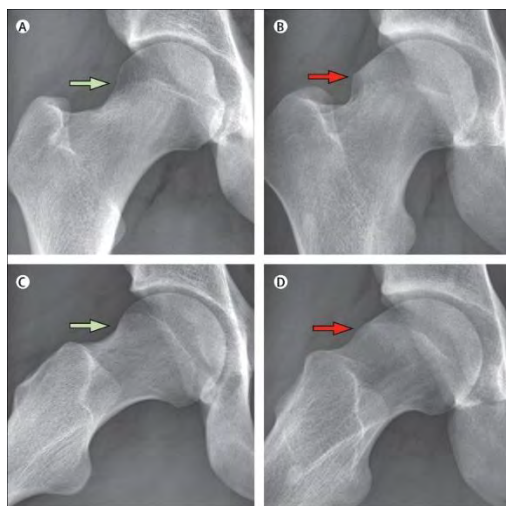
โรคข้อเข่าเสื่อมเป็นหนึ่งในสาเหตุที่นำไปสู่การพิการได้ โดยเคยมีการศึกษาในชาวคอเคเซียนพบว่า มีสาเหตุมาจากพหุปัจจัย (multifactorial disorder) มาจากปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม เช่น อายุ เพศ ภาวะน้ำหนักตัวเกินหรือความอ้วน อาชีพ เคยมีอาการบาดเจ็บที่บริเวณข้อเข่า และพฤติกรรมการใช้ชีวิตประจำวัน เป็นต้น และมาจากปัจจัยด้านพันธุกรรม (Felson, 2004) สำหรับปัจจัยเรื่องอายุและความอ้วน ทั้งการศึกษาในระดับภูมิภาคเอเชียและการศึกษาโรคข้อเข่าเสื่อมของพระสงฆ์ในประเทศไทย พบเช่นเดียวกันว่า อาการของโรคข้อเข่าเสื่อมยิ่งเพิ่มขึ้นตามอายุที่มากขึ้น และน้ำหนักตัวที่มากจะยิ่งเพิ่มแรงกดทับให้ข้อเข่า ส่งผลให้ผู้ที่มีภาวะน้ำหนักเกินเกณฑ์มาตรฐานหรือภาวะอ้วนมีความเสี่ยงเป็นโรคข้อเข่าเสื่อมมากกว่าผู้ที่มีน้ำหนักตัวปกติ (Tangtrakulwanich, Geater, and Chongsuvivatwong, 2006; Fransen and others, 2011) ส่วนปัจจัยเรื่องเพศ จากการศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่า เพศหญิงจะมีความเสี่ยงเป็นโรคข้อเข่าเสื่อมมากกว่าเพศชาย (Culvenor and others, 2017) และจากการศึกษาในประเทศญี่ปุ่นทำให้ทราบว่า ปัจจัยเรื่องอาชีพ โดยเฉพาะอาชีพที่ใช้แรงงาน ได้แก่ เกษตรกร ประมง และก่อสร้าง รวมไปถึงผู้ที่เคยมีอาการบาดเจ็บที่บริเวณข้อเข่า เพิ่มโอกาสการเป็นโรคข้อเข่าเสื่อมมากกว่าปกติเช่นกัน (Yoshimura and others, 2006) นอกจากนี้ พฤติกรรมการใช้ชีวิตประจำวันที่ส่งผลให้มีความเสี่ยงเป็นโรคข้อเข่าเสื่อมมากกว่าปกติ ได้แก่ ทำงานหนักมากกว่า 4 ชั่วโมง นั่งยองๆ และการใส่ส้นสูง (Aftab and others, 2015)

สำหรับปัจจัยด้านพันธุกรรม จากการศึกษาหลายประเภท ทั้งการศึกษาชีวประวัติครอบครัว การสำรวจโรคพันธุกรรมหายาก และการศึกษา twin study พบว่าพันธุกรรมส่งผลต่อโรคข้อเสื่อมไม่ว่าจะที่ ข้อมือ ข้อเข่าหรือข้อสะโพกร่วมกับปัจจัยอื่นๆ (Spector and MacGregor, 2004) ต่อมาพบความสัมพันธ์ระหว่างโรคข้อเสื่อมบนโครโมโซม ได้แก่ โครโมโซมที่ 2, 9, 11 และ 16 เมื่อมองในระดับโมเลกุล พบว่ามียีนจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับโรคข้อเข่าเสื่อมได้แก่ ยีน *component of oligomeric golgi complex 5 (COG5)*, ยีน *MCF.2 cell-line-derived transforming sequence-like (MCF2L)* และยีน *GDF5* (Valdes and others, 2012) สำหรับประเทศไทยมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีนกับโรคข้อเข่าเสื่อมมากมาย ได้แก่ การศึกษาภาวะพหุสัณฐานของยีน *ADAM Metalloproteinase With*

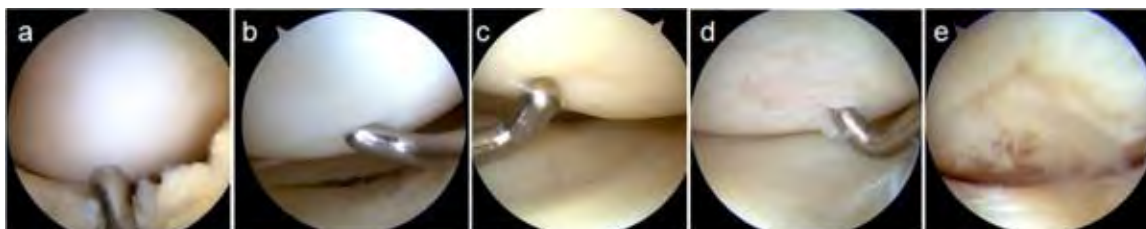
Thrombospondin Type 1 Motif 14 (ADAMTS14) ซึ่งสัมพันธ์กับโรคข้อเข่าเสื่อมเช่นกัน (Poonpet and others, 2013)

การวินิจฉัยโรคข้อเข่าเสื่อมและการรักษา

โรคข้อเข่าเสื่อม เป็นหนึ่งในโรคข้อเสื่อมที่พบมากที่สุด โดยการวินิจฉัยโรคข้อเสื่อมสามารถทำได้หลายวิธี วิธีที่ 1 การถ่ายภาพเอกซเรย์ (radiographic techniques) เป็นการวินิจฉัยแบบดั้งเดิมที่ความสัมพันธ์ระหว่างภาพเอกซเรย์กับอาการมีความสัมพันธ์กันในระดับต่ำ และจะสามารถวินิจฉัยได้เมื่อผู้ป่วยมีอาการรุนแรง วิธีที่ 2 Magnetic Resonance Imaging (MRI) เป็นการวินิจฉัยที่พัฒนาขึ้นมาจากวิธีวินิจฉัยแบบดั้งเดิมสามารถวินิจฉัยโรคข้อเสื่อมได้ตั้งแต่ระยะต้น แต่มีราคาการวินิจฉัยในแต่ละคนสูง วิธีที่ 3 การถ่ายภาพ (imaging) วิธีที่ 4 ดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ (biomarkers) ทั้งวิธีถ่ายภาพและวิธีดัชนีชี้วัดทางชีวภาพสามารถวินิจฉัยได้ก่อนที่ข้อต่อจะเป็นโรคข้อเสื่อม (Guermazi, Hunter, and Roemer, 2009; Chu and others, 2012; Glyn and others, 2015) นอกจากนี้ ในประเทศไทยยังมีการใช้คำถามเพื่อตรวจหาผู้ที่มีความเสี่ยงเป็นโรคข้อเข่าเสื่อม คำถามจะเกี่ยวกับอาการบาดเจ็บที่ข้อเข่า และค่าดัชนีมวลร่างกาย (BMI) แต่วิธีนี้ควรจะใช้กับผู้ที่มีความเสี่ยงสูงที่จะเป็นโรคข้อเข่าเสื่อม และวิธีนี้ยังไม่สมบูรณ์ยังต้องยืนยันความถูกต้องของการทดสอบในกลุ่มประชากรที่ใหญ่ขึ้น (Satayavongthip and others, 2011)



รูปที่ 1 การวินิจฉัยแบบถ่ายภาพเอกซเรย์บริเวณสะโพก (Glyn and others, 2015)



รูปที่ 2 การวินิจฉัยแบบถ่ายภาพบริเวณกระดูกอ่อน (Constance and others, 2012)

ด้านการรักษา ในปัจจุบันยังไม่สามารถรักษาข้อเข่าเสื่อมให้หายขาดได้ มีเพียงการบรรเทาความเจ็บปวดและการบรรเทาด้วยการเคลื่อนไหวที่จำกัดเท่านั้น (Heidari, 2011) วิธีการรักษาแบ่งเป็น 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 การรักษาแบบไม่ผ่าตัด เป็นการบรรเทาความเจ็บปวดด้วยยา หรือ ปรับเปลี่ยนพฤติกรรมเพื่อชะลอการเสื่อมของข้อเข่า ตัวอย่างยาที่ใช้ในการบรรเทาความเจ็บปวด ได้แก่ Acetaminophen, Non-steroidal anti-inflammatory (NSAIDs) และ Statins (Sinusas, 2012) สำหรับการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมเพื่อชะลอการเสื่อมของข้อเข่า และการออกกำลังกาย ทั้งการศึกษาในต่างประเทศ เช่น การศึกษาผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมชาวอังกฤษที่มีอายุตั้งแต่ 45 ปีขึ้นไป พบว่าการออกกำลังกายจะช่วยลดอาการปวดและเพิ่มความสามารถในการทำงานของข้อเข่า (Thomas and others, 2002) และการศึกษาในประเทศไทย โปรแกรมออกกำลังกาย เช่น โปรแกรมการบริหารกล้ามเนื้อข้อเข่าด้วยยางยืด มีส่วนช่วยบรรเทาความรุนแรงของภาวะข้อเข่าเสื่อมในผู้สูงอายุจังหวัดชัยนาท (ปารวีร์ มั่นพัก และคณะ, 2561) และโปรแกรมดูแลผู้สูงอายุข้อเข่าเสื่อมโดยการมีส่วนร่วมของชุมชนของจังหวัดเชียงใหม่ให้ผลเช่นเดียวกันคือ โปรแกรมออกกำลังกายช่วยลดอาการปวดข้อเข่าและเพิ่มสมรรถภาพทางกาย (รังสิยา นารินทร์, วิลาวัณย์ เตือนราษฎร และวราภรณ์ บุญเชียง, 2558) ส่วนวิธีที่ 2 คือ การรักษาด้วยการผ่าตัด เช่น การผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม และการผ่าตัดจัดแนวกระดูกขาเป็นต้น (Lespasio and others, 2017)

2. พันธุกรรมกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

เนื่องจากพันธุกรรมเป็นปัจจัยสำคัญที่มีส่วนทำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ดังนั้นการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ในโรคข้อเข่าเสื่อมจะมีส่วนช่วยให้เข้าใจกลไกที่ทำให้เกิดความเสียหายที่ข้อต่อกระดูกอ่อนบริเวณข้อเข่าได้ (Chapman and Valdes, 2012) จากการศึกษาทางด้านพันธุกรรม ได้แก่

การศึกษา Genome-wide association studies (GWAS) ทำให้พบความแปรผันทางพันธุกรรมในโรคข้อเข่าเสื่อม เช่น ยีน *Transforming Growth Factor Alpha (TGFA)*, *phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1 (PIK3R1)* และยีน *fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3)* ยีนเหล่านี้เกี่ยวข้องกับความหนาของกระดูกอ่อน และในคนเดียวกันจะมีการแสดงออกในกระดูกอ่อนบริเวณที่เป็นแผลกับกระดูกอ่อนบริเวณที่ไม่เป็นแผลแตกต่างกัน (Castaño-Betancourt and others, 2016) ความแปรผันทางพันธุกรรมนั้นส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นในบริเวณที่ไม่สามารถแปลรหัสได้ของยีนหรือบริเวณที่ควบคุมยีน ได้แก่ บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน สำหรับประโยชน์ของความแปรผันทางพันธุกรรมของโรคข้อเข่าเสื่อมสามารถพัฒนาเป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพช่วยวินิจฉัยโรคข้อเข่าเสื่อม

เอพิเจเนติก

เอพิเจเนติก (epigenetics) หรือสภาวะเหนือพันธุกรรม เป็นอีกหนึ่งการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนซึ่งไม่ขึ้นกับการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ สามารถถ่ายทอดจากรุ่นหนึ่งสู่อีกรุ่นหนึ่งได้ โดยเอพิเจเนติก แบ่งตามกลไกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ได้ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) กลุ่มที่ 2 กระบวนการดัดแปลงโปรตีนฮิสโตน (posttranslational histone modifications) เช่น ฮิสโตนเมทิลเลชัน และกลุ่มที่ 3 กระบวนการปรับเปลี่ยนโครงสร้างโครมาติน (chromatin remodeling) (โชตีกา หยกทองวัฒนา, 2554) จากกระบวนการที่กล่าวมาทั้งดีเอ็นเอเมทิลเลชันและฮิสโตนเมทิลเลชัน เป็นการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยควบคุมระดับการถอดรหัส ทำให้โครงสร้าง 3 มิติของโครมาตินและระดับการแปลรหัสเปลี่ยนแปลง สุดท้ายส่งผลต่อการแสดงออกของโปรตีน โดยเอพิเจเนติกมีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาของโรคข้อเสื่อม (Peffer, Balaskas, and Smagul, 2018)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน

เนื่องจากโรคข้อเสื่อมส่วนใหญ่เกิดจากการเสื่อมของกระดูกอ่อน ดังนั้น ระดับการแสดงออกของยีนและการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางฟีโนไทป์ในเซลล์กระดูกอ่อน ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดเดียวที่พบในข้อต่อกระดูกอ่อนจึงสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเสื่อม ต่อมาเมื่อมีการศึกษาพบว่า ดีเอ็นเอเมทิลเลชันทำให้

การแสดงออกของยีนในเซลล์กระดูกอ่อนผิดปกติส่งผลให้พยาธิสภาพของโรคข้อเสื่อมเปลี่ยนแปลงไป (Hollander and Meulenbelt, 2015) สำหรับดีเอ็นเอเมทิลเลชัน คือ หนึ่งในกระบวนการของเอพิเจเนติกซึ่งเป็นการเติมหมู่เมทิลให้กับคาร์บอนที่ 5 ของวงแหวนเบสไซโทซีนที่ติดกับเบสกวานีน (CpG site) โดย DNA methyltransferases (DNMTs) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปเป็น 5-methylcytosine (5mC) (Herman and others, 1996) ส่วนใหญ่ดีเอ็นเอเมทิลเลชันมักจะทำให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีน (gene silencing) เนื่องจากเกิดเมทิลชันในบริเวณพรอมอเตอร์ของยีน ทำให้ transcription factor ไม่สามารถเข้ามาจับบริเวณดังกล่าวได้ ไม่เกิดการเริ่ม transcription ยีนจึงไม่แสดงออก แต่มีบางส่วนที่ทำให้มีการแสดงออกของยีนมากกว่าปกติ ยีนที่พบเมทิลชันในโรคข้อเข่าเสื่อมได้แก่ เช่น ยีน *GDF5* ยีน *SOX9* (Bonin and others, 2016) และยีน *DIO2* (Rushton and others, 2015) เป็นต้น ยีน *SOX9* จะมีความสำคัญในโรคข้อเข่าเสื่อมเนื่องจากควบคุมกระบวนการสร้างเซลล์กระดูกอ่อน (Blanco and Rego-Pérez, 2014) ส่วนยีน *GDF5* ควบคุมการเจริญ การรักษา และการซ่อมแซมของข้อต่อซินโนเวียล (synovial joint) ซึ่งเป็นข้อต่อที่พบได้บริเวณข้อเข่า (Dodd, Syddall, and Loughlin, 2013) ส่วนยีน *DIO2* ในภาวะปกติจะผลิตโปรตีนที่เร่งการเปลี่ยนรูปฮอร์โมนไทรอยด์ที่ไม่ทำงาน (T4) เป็นฮอร์โมนไทรอยด์ที่สามารถทำงานได้ (T3) ซึ่งจะชักนำให้เกิดกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อมได้ (Hollander, 2013)

ตารางที่ 1 วิเคราะห์ระดับเมทิลเลชันของยีนที่สัมพันธ์กับโรคข้อเสื่อม (Duarte, 2018)

ยีน	เซลล์	ตัวอย่าง	ระดับเมทิลเลชัน	การแสดงออกของยีน	วิธีที่ใช้วิเคราะห์
<i>GDF5</i>	เซลล์กระดูกอ่อน	CH8 cell line	ต่ำ	เพิ่มขึ้น	Bisulfite pyrosequencing

ยีน	เซลล์	ตัวอย่าง	ระดับ เมทิลเล ชัน	การ แสดงออก ของยีน	วิธีที่ใช้วิเคราะห์
SOX9	เซลล์กระดูกอ่อน ของโรคข้อเสื่อม	จากผู้ป่วยผ่าตัด เปลี่ยนข้อสะโพก เทียม และ ผู้ป่วยที่คอ กระดูกต้นขาหัก	สูง	ลดลง	Methylation- specific PCR and bisulfite sequencing
DIO2	เซลล์กระดูกอ่อน ของโรคข้อเสื่อม และเซลล์กระดูก อ่อนปกติ	จากผู้ป่วยผ่าตัด เปลี่ยนข้อสะโพก เทียมและผู้ป่วย ผ่าตัดเปลี่ยนข้อ เข่าเทียม และ จากคนที่มีข้อ ปกติ	สูง	เพิ่มขึ้น	MALDI-TOF mass spectrometry

ยีน DIO2

ยีน *DIO2* ในภาวะปกติจะผลิตโปรตีน selenoprotein ที่เร่งการเปลี่ยนรูปฮอร์โมนไทรอยด์ที่ไม่ทำงาน (T4) เป็นฮอร์โมนไทรอยด์ที่สามารถทำงานได้ (T3) ซึ่งจะชักนำให้เกิดกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับก่อให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ได้แก่ กระตุ้นการเจริญสูงสุดท้ายของเซลล์กระดูกอ่อนบริเวณ growth plate ทำให้เกิดการขยายตัวมากกว่าปกติ (cell hypertrophy) สลายส่วนเซลล์กระดูกอ่อนและเนื้อกระดูกอ่อน (ECM destruction) สะสมแร่ธาตุในกระดูกอ่อน (mineralization) และการสร้างกระดูกแข็ง (formation of bone) (Hollander, 2013) โดยปี 2008 จากการศึกษาในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมชาย ญูครอน ชาวดัตช์ และชาวญี่ปุ่น พบภาวะพหุสัญญาณของยีน *DIO2* ถึง 2 ตำแหน่งคือ rs12885300 (T/C) และ rs225014 (C/T) ที่สัมพันธ์กับการเป็นโรคข้อเสื่อม โดยแอลลีล C มีความสัมพันธ์กับโรคข้อเสื่อมมากกว่าแอลลีล T และพบว่ายีน *DIO2* ผลิตโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับโรคข้อเสื่อม (Meulenbelt

and others, 2008; Tammachote, 2011) หลังจากนั้นในปี 2009 พบว่าในแต่ละบุคคลจะมีระดับเมทิลเลชันที่แตกต่างกันและในการวัดระดับเมทิลเลชันสามารถใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่มาจากเลือดแทน ตัวอย่างดีเอ็นเอที่มาจากกระดูกอ่อนได้ (Bos and others, 2009) ต่อมาในปี 2013 การศึกษาข้อต่อกระดูกอ่อนของผู้ป่วยชาวคอเคเซียนที่เป็นโรคข้อเข่าเสื่อมเทียบกับคนปกติ พบว่าดีเอ็นเอเมทิลเลชันในบริเวณโพรโมเตอร์ของยีนมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน *DIO2* โดยผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจะมีระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันมากกว่าในคนปกติ (hypermethylation) ส่วนในปี 2015 พบดีเอ็นเอเมทิลเลชันบริเวณที่ใกล้กับ transcription start site (TSS) ของยีน *DIO2* สัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน *DIO2* ในกระดูกอ่อนของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม โดยดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่พบห่างไปจากจุด TSS ทางปลาย 5' ประมาณ 2000 เบส สำหรับการศึกษานี้ยังพบว่าระหว่างการสร้างเซลล์กระดูกอ่อน หากเกิดการแสดงออกที่มากกว่าปกติของยีนนี้ จะทำให้มีเซลล์กระดูกอ่อนใน extracellular matrix (ECM) น้อยลง พร้อมทั้งยังกระตุ้นเอนไซม์ทำหน้าที่ย่อย ECM (Hollander, 2013; Bomer and others, 2015)

ตารางที่ 2 การศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชันในยีน *DIO2*

หัวข้อ	รายละเอียดการทดลอง	สรุป	อ้างอิง
1. Underlying molecular mechanisms of <i>DIO2</i> susceptibility in symptomatic osteoarthritis	- ตัวอย่างกระดูกอ่อนจากผู้ป่วยผ่าตัดเปลี่ยนข้อสะโพกเทียม ผู้ป่วยผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม และคนที่มีข้อปกติ อย่างละ 52 ตัวอย่าง - วิธีที่ใช้ศึกษา คือ MALDI-TOF mass spectrometry	- ยีน <i>DIO2</i> สัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน <i>DIO2</i> ในกระดูกอ่อนของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม โดยดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่พบห่างไปจากจุด TSS ทางปลาย 5' ประมาณ 2000 เบส - ระดับเมทิลเลชันและการแสดงออกของยีนของกระดูกอ่อนในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมสูงกว่าในคนปกติ	(Bomer and others, 2015)

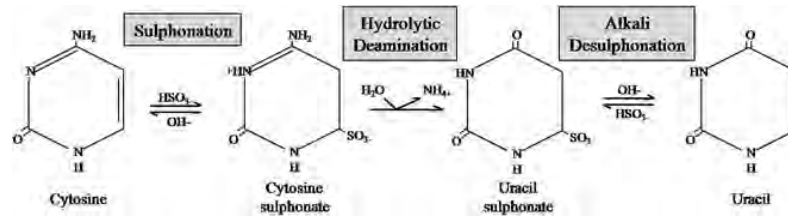
หัวข้อ	รายละเอียดการทดลอง	สรุป	อ้างอิง
<p>2. Deiodinase 2 upregulation demonstrated in osteoarthritis patients cartilage causes cartilage destruction in tissue-specific transgenic rats.</p>	<p>- ศึกษาระดับการแสดงออกของยีน <i>DIO2</i> ในกระดูกอ่อนของหนูที่เป็นโรคข้อเสื่อมเทียบกับหนูที่มีข้อปกติ</p> <p>- วิธีที่ใช้ศึกษา คือ microarray analysis</p>	<p>- หนูที่เป็นโรคข้อเสื่อมมีการแสดงออกของยีน <i>DIO2</i> ในกระดูกอ่อนที่มากกว่าหนูที่มีข้อปกติ</p> <p>- หนูดัดแปลงพันธุกรรมที่ทำให้กระดูกอ่อนมีแคื่อยีน <i>DIO2</i> แสดงออกนั้น พบฮอร์โมนไทรอยด์รูป T3 กระตุ้นให้เกิดเอนไซม์ย่อยสลายกระดูกอ่อนทำให้เกิดการสลายของข้อต่อบริเวณเข่า</p>	<p>(Nagase and others, 2013)</p>
<p>3. <i>DIO2</i> is epigenetically regulated by CPG methylation in articular cartilage</p>	<p>- ศึกษาระดับเมทิลเลชันและการแสดงออกของยีน <i>DIO2</i> เทียบกันระหว่างผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมและคนที่มีข้อสุขภาพดี</p> <p>- ตัวอย่างมาจากผู้ป่วยชาวคอเคเซียนที่เข้ารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมจำนวน 21 ตัวอย่าง และผู้ป่วยที่เข้ารับการเปลี่ยนข้อสะโพกเทียมจำนวน 27 ตัวอย่าง</p> <p>- วิธีที่ใช้ศึกษา คือ</p> <ol style="list-style-type: none"> วัดการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค quantitative reverse transcription 	<p>- การแสดงออกของยีน <i>DIO2</i> สัมพันธ์กับ rs225014 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ</p> <p>- พบ CpG 1 ตำแหน่ง ในบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน <i>DIO2</i> สัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน ในกระดูกอ่อนของโรคข้อเสื่อม นอกจากนั้น ยังพบระดับเมทิลเลชันที่สูงขึ้นในบริเวณดังกล่าวของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม</p>	<p>(Hollander, 2013)</p>

หัวข้อ	รายละเอียดการทดลอง	สรุป	อ้างอิง
	<p>polymerase chain reaction (RT-qPCR)</p> <p>2. ศึกษาในระดับเมทิลเลชันโดยใช้เทคนิค mass spectrometry (Epityper, Sequenom)</p>		
<p>4. CpG sites of osteoarthritis susceptibility gene <i>DIO2</i> are differentially methylated in arthritic compared to preserved cartilage.</p>	<p>- ศึกษาตำแหน่งที่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างกระดูกอ่อนของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและผู้ป่วยโรคข้อสะโพกเสื่อมกับกระดูกอ่อนสุขภาพดี โดยมีช่วงอายุอยู่ระหว่าง 44-60 ปี</p> <p>- วิธีที่ใช้ศึกษา คือ mass spectrometry (Epityper, Sequenom)</p>	<p>- ตำแหน่ง CpG ที่เกิดเมทิลเลชันในกระดูกอ่อนของโรคข้อเสื่อมแตกต่างกับกระดูกอ่อนสุขภาพดีอย่างน้อย 3 ตำแหน่ง ส่งผลต่อการแสดงออกของยีนและยังเกี่ยวข้องกับโรคข้อเสื่อม</p>	<p>(Hollander and others, 2012)</p>
<p>5. <i>DIO2</i> methylation in articular cartilage and whole blood</p>	<p>- เปรียบเทียบระดับเมทิลเลชันของยีน <i>DIO2</i> ระหว่างตัวอย่างที่มาจากเลือดกับตัวอย่างที่มาจากกระดูกอ่อน</p> <p>- วิธีที่ใช้ศึกษา คือ mass spectrometry (Epityper, Sequenom)</p>	<p>- พบว่าในแต่ละบุคคลจะมีระดับเมทิลเลชันที่ต่างกัน นอกจากนั้น ทั้งตัวอย่างดีเอ็นเอที่มาจากเลือดและตัวอย่างดีเอ็นเอที่มาจากกระดูกอ่อนสามารถระบุระดับเมทิลเลชันในยีน <i>DIO2</i> ได้เหมือนกัน</p>	<p>(Bos and others, 2009)</p>

หัวข้อ	รายละเอียดการทดลอง	สรุป	อ้างอิง
6. Identification of <i>DIO2</i> as a new susceptibility locus for symptomatic osteoarthritis.	<p>- ตัวอย่างกระดูกอ่อนชาวญี่ปุ่นที่เป็นผู้ป่วยรับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเทียม 1478 ตัวอย่าง และคนที่มีข้อปกติ 738 ตัวอย่าง</p> <p>- ทำการทดลองซ้ำ มีจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 1582 ตัวอย่าง ประกอบไปด้วยตัวอย่างกระดูกอ่อนของผู้ป่วยโรคข้อสะโพกเสื่อมชาวเดนมาร์ก 94 ตัวอย่าง และชาวญี่ปุ่นที่มีอาการโรคข้อสะโพกเสื่อม 267 ตัวอย่างที่เหลือคือตัวอย่างของคนที่มีข้อปกติ</p> <p>- วิธีที่ใช้ศึกษา คือ genome-wide linkage และ combined linkage association analysis</p>	<p>- พบภาวะพหุสัณฐานของยีน <i>DIO2</i> 2 ตำแหน่ง คือ rs12885300 (T/C) และ rs225014 (C/T) ที่สัมพันธ์กับการเป็นโรคข้อเสื่อม</p> <p>- ผลិតภัณฑ์ของยีน <i>DIO2</i> เปลี่ยนรูปฮอร์โมนไทรอยด์จาก T4 ไปเป็น T3 ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนบริเวณ growth plate</p>	(Meulenbelt and others, 2008)

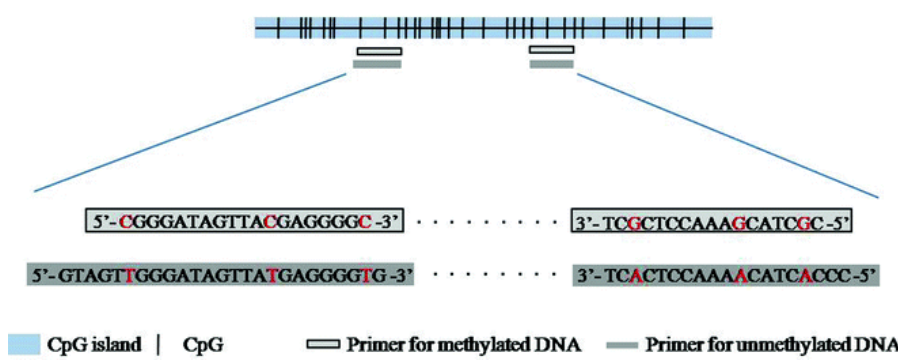
3. Methylation-Specific PCR (MSP)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์รูปแบบเมทิลชันในบริเวณที่เป็น CpG islands หลักการของเทคนิคอยู่บนพื้นฐานของ PCR โดยจะนำดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบผ่านกระบวนการ sulphonation ทำให้เบสไซโทซีนที่ไม่มีหมู่เมทิลเกาะอยู่จะเปลี่ยนเป็นเบสยูราซิลซึ่งเบสยูราซิลจะไม่เสถียรจะเปลี่ยนเป็นเบสไทมีน ส่วนเบสไซโทซีนที่มีหมู่เมทิลเกาะอยู่จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงยังคงเป็นเบสไซโทซีน



รูปที่ 3 กลไกการเปลี่ยนจากเบสไซโทซีนเป็นยูราซิล เมื่อผ่านกระบวนการ sodium sulfite treatment (Ku, Jeon and Park, 2011)

สำหรับการทดลองที่ใช้เทคนิคนี้ต้องออกแบบไพรเมอร์เป็น 2 คู่ ไพรเมอร์คู่ที่ 1 อันเมทิลเลชันไพรเมอร์ (unmethylation primer) เป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอที่ไม่มีการเติมหมู่เมทิลหรือดีเอ็นเออันเมทิลเลชัน (unmethylated DNA) และไพรเมอร์คู่ที่ 2 เมทิลเลชันไพรเมอร์ (methylation primer) เป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอที่มีการเติมหมู่เมทิลหรือดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (methylated DNA) โดยการแยกระหว่างดีเอ็นเอเมทิลเลชันและดีเอ็นเออันเมทิลเลชันในไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ ต้องมีตำแหน่งที่เบสไซโทซีนติดกับเบสกวานีน (CpG site) อย่างน้อย 1 ตำแหน่ง และต้องมีตำแหน่ง CpG เท่ากัน แต่สามารถมีความยาวและจุดเริ่มต้นไพรเมอร์ต่างกันได้ ถ้าไพรเมอร์ที่จำเพาะกับดีเอ็นเออันเมทิลเลชันสามารถจับดีเอ็นเอที่ทำการทดลองได้แสดงว่า เกิดดีเอ็นเออันเมทิลเลชันขึ้น หากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอเมทิลเลชันสามารถจับดีเอ็นเอได้สำเร็จแสดงว่า ดีเอ็นเอที่ทำการทดลองเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (Ku, Jeon and Park, 2011)



รูปที่ 4 ไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค MSP แบ่งเป็น 2 คู่ คือ อันเมทิลเลชันไพรเมอร์และเมทิลเลชันไพรเมอร์

ประโยชน์ของเทคนิค MSP คือ สามารถตรวจสอบระดับเมทิลเลชันได้เกือบทุก CpG site, สามารถใช้ดีเอ็นเอในปริมาณน้อยในการตรวจสอบได้ และเทคนิคมีความไวต่อดีเอ็นเอเมทิลเลชัน คือ สามารถตรวจสอบมีดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่มีเพียง 0.1 % ในบริเวณ CpG island ได้ (Ku, Jeon and Park, 2011) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันผ่านเทคนิค MSP ในโรคต่างๆ รวมถึงโรคข้ออักเสบ เช่น ในปี 2014 มีการศึกษาระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน *Fas associated via death domain (FADD)* และยีน *Fas cell surface death receptor (FAS)* ในโรคมะเร็งช่องปาก (Saber and others, 2014) และการศึกษาในระดับเมทิลเลชันโดยใช้เทคนิค MSP บริเวณโปรโมเตอร์ยีน *Glutathione S-Transferase P1 (GSTP1)* ในผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมชาวไทย (Pongtheerat and others, 2011) นอกจากนี้ ในปี 2017 ยังมีการศึกษาในที่เกี่ยวข้องกับโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ผ่านการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันโดยใช้เทคนิค MSP ในหนู (Zhang and others, 2017)

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการ

กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเป็นตัวอย่างเลือดจากกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มควบคุมซึ่งกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มของคนที่มีข้อเข่าสุขภาพดี หรือเป็นโรคที่ไม่เกี่ยวข้องกับโรคข้อเข่าเสื่อมจากโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ และคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งตัวอย่างเหล่านี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เอกสารรับรองโครงการวิจัยเลขที่ IRB no. MTU-EC-OT-4-193/60

วัสดุอุปกรณ์

- Computer DELL Inspiron 14
- Micropipette (Gilson Inc., France)
- Pipette tip
- Beaker
- Flask
- Rack
- Nanodrop spectrophotometer
- Vortex machine
- Hettich® MIKRO® 120 Centrifuge D-78532 (SIGMA-ALDRICH corp., Germany)
- Electrophoresis chamber set (ATTO corp., japan)
- Electrophoresis power supply (ATTO corp., japan)
- Gel documentation analysis set (Quantity One, Bio Rad Inc., USA)
- Gene Pro Thermal Cycler (Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd., China)

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
 - ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer corp., Korea)
2. โซลไฟต์ทรีตเมนต์ (bisulfite treatment)
 - EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo research corp., USA)
3. สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR
 - Human methylated & non-methylated DNA Set (Zymo Research Corp., USA)
 - Nuclease free H₂O
 - 10X Buffer
 - dNTP mix (Invitrogen corp., USA)
 - Oligonucleotide primer (Macrogen corp., Korea) สำหรับ ยีน *DIO2*
 - Taq DNA Polymerase (Apsalagen Co.Ltd., Thailand)
 - HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen Inc., German)
4. สารเคมีที่ใช้สำหรับการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส
 - 1.5% agarose gel (Vectec Inc., virginia)
 - 40% Acrylamide/Bis Solution 19:1 (Bio-Rad Inc., USA)
 - 1X Tri-Borate-EDTA (1X TEB buffer)
 - TRIS (Bio Basic Inc., Canada)
 - Boric acid (Bio Basic Inc., Canada)
 - EDTA (Bio Basic Inc., Canada)
 - RedSafe (iNtRON Bio Inc., Korea)
 - OneMARK 100 (100 bp DNA ladder) (GeneDireX Inc., USA)
 - 25 bp DNA ladder (New England Biolab Inc., USA)
 - 10 bp DNA ladder (New England Biolab Inc., USA)
 - DNA loading dye (biotechrabbit corp., Canada)

วิธีการดำเนินงาน

คัดเลือกยีนที่ใช้ในการศึกษา

คัดเลือกยีนที่ใช้ในการศึกษาจากฐานข้อมูล PubMed จาก The National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อหาอินที่มีเกี่ยวข้องกับโรคข้อเข่าเสื่อม โดยใช้คำค้นหาที่มีความจำเพาะ แล้วนำข้อมูลจากงานวิจัยเหล่านั้นมาแปลงผลสรุป เพื่อคัดเลือกยีนที่จะใช้ในการศึกษาต่อไป

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับกระบวนการ MSP

ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ออกแบบด้วยตัวเอง และส่วนที่ออกแบบด้วยซอฟต์แวร์ สำหรับขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์ด้วยตัวเอง มีลักษณะสำคัญต่าง ๆ ให้คำนึงถึงเพื่อให้ได้ไพรเมอร์ที่ดีสำหรับการทำ MSP (Davidovic' and others, 2014) ดังนี้

1. ดาวน์โฮลด์ลำดับเบสบริเวณพรโมเตอร์ของยีนที่ใช้ศึกษาจาก <https://asia.ensembl.org/index.html> (ensembl) โดยเลือกจาก splice variant ที่มีตำแหน่ง CpG มากที่สุด
2. ยืนยันลำดับเบสพรโมเตอร์ของยีน *DIO2* ว่าถูกต้องโดยเทียบกับลำดับเบสที่ได้จาก <https://epd.vital-it.ch/index.php> (EPD) โดยใช้ Sequence Retrieval Tool ของฐานข้อมูล กำหนดพื้นที่ของยีนที่ต้องการจะศึกษา ซึ่งมักจะกำหนดให้เริ่มจาก -1000 เบสจากจุด Transcription start site (TSS) ไปจนถึง +500 เบส
3. ค้นหาตำแหน่ง CpG, TSS และ SNP และทำเครื่องหมายตำแหน่งเหล่านั้น
4. เนื่องจากดีเอ็นเอต้องผ่านการทำไบซัลไฟต์ทรีตเมนต์ (bisulfite treatment) ก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการ PCR จึงต้องเปลี่ยนเบสไซโตซีนทั้งหมดไปเป็นเบสไทมีน ยกเว้นลำดับเบส CpG เนื่องจากไม่ทราบว่าตำแหน่ง CpG นั้นๆ เกิดกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชันหรือไม่ จึงยังคงเป็นลำดับเบสเดิมทั้งหมด

5. ออกแบบไพรเมอร์ให้อยู่ในบริเวณดังต่อไปนี้

5.1 ใกล้เคียงตำแหน่ง TSS ของยีน

5.2 เป็นบริเวณที่ hot spot (consensus sequence) โดยใช้ Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) เทียบระหว่างคน (*Homo sapiens*), ลิงวอก (*Macaca mulatta*) และ หนูหริ่งบ้าน (*Mus musculus*)

5.3 หลีกเลี่ยงบริเวณ Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

5.4 ควรมี CpG site อย่างน้อย 1 ตำแหน่งใกล้บริเวณ 3'

5.5 ไพรเมอร์ควรมีขนาดระหว่าง 20 – 30 เบส

5.6 ไม่มี primer dimer และ primer hairpin โดยใช้ Netprimer (<http://www.premierbiosoft.com/NetPrimer/AnalyzePrimer.jsp>) มาช่วยวิเคราะห์

5.7 ควรมีค่า melting temperature (Tm) อยู่ระหว่าง 60 – 70 องศาเซลเซียส และ Tm ของ forward primer และ reverse primer ไม่ควรต่างกันเกิน 2 องศาเซลเซียส โดยใช้ Oligonucleotide Properties Calculator (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) มาช่วยวิเคราะห์

5.8 ตรวจสอบความจำเพาะระหว่างไพรเมอร์กับบริเวณยีนที่ศึกษา โดยใช้ MSP design จาก Bisearch (<http://bisearch.enzim.hu/?m=msp>)

ส่วนไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยซอฟต์แวร์ สามารถกำหนดค่าตำแหน่ง CpG ค่า Tm รวมถึงลำดับเบสที่ต้องการออกแบบไพรเมอร์ตามคำแนะนำของแต่ละซอฟต์แวร์ สำหรับซอฟต์แวร์ที่ใช้ ออกแบบได้แก่ Methprimer, Bisearch, Primo MSP และ MSP primer อ้างอิงจาก Methylation-specific PCR: four steps in primer design (Davidovic' and others, 2014)

การสกัดดีเอ็นเอ

นำเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มควบคุมมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer corp., Korea) จากนั้นเปิดดีเอ็นเอปริมาณ 1 ไมโครลิตร มาวัดคุณภาพของดีเอ็นเอผ่านการวัดค่าดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่อง Nanodrop spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอต่อค่าดูดกลืนแสงของโปรตีน (OD_{260}/OD_{280}) สำหรับค่าการดูดกลืนแสงที่

แสดงถึงดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์จะต้องมีค่ามากกว่า 1.8 (Sukumaran, 2011) หลังจากนั้นเก็บหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ที่บรรจุดีเอ็นเอไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การทำไบซัลไฟต์ทรีตเมนต์ (bisulfite treatment)

นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำไบซัลไฟต์ทรีตเมนต์ โดยใช้ชุดคิตส์ EZ DNA Methylation-Gold™ (Zymo research corp., USA) ร่วมกับ DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Inc., USA) ตามวิธีของบริษัท และเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการทดลองขั้นต่อไป

กระบวนการ MSP

เป็นเทคนิคที่มีหลักการอยู่บนพื้นฐานของ PCR จึงเป็นทั้งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและใช้ตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันในบริเวณที่ไพรเมอร์สามารถจับได้ โดยขั้นตอนแรก คือ การทำ gradient PCR เพื่อหาความจำเพาะระหว่างไพรเมอร์ที่ออกแบบกับ PCR product ที่ทำนายไว้ รวมถึงหาปริมาณสาร และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันในตัวอย่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเทียบกับกลุ่มควบคุม ก่อนที่จะ PCR และตรวจสอบด้วยเจลิเล็กโทรโฟริซิสกับตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมจริง โดยแต่ละตัวอย่างจะแบ่งเป็น 2 หลอด หลอดหนึ่งใส่เฉพาะอันเมทิลเลชันไพรเมอร์ อีกหลอดใส่เฉพาะเมทิลเลชันไพรเมอร์

gradient PCR ครั้งที่ 1 สารที่ใช้แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรก คือ master Mix ส่วนที่ 2 คือ ดีเอ็นเอ หรือ nuclease free H₂O โดยส่วนของดีเอ็นเอ ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ผ่านการทำ PCR และเจลิเล็กโทรโฟริซิส แล้วขึ้นแถบดีเอ็นเอชัดเจน คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอ RTC และตัวอย่างดีเอ็นเอ T ทั้งนี้ตัวอย่างดีเอ็นเอดังกล่าวยังไม่ผ่านการไบซัลไฟต์ทรีตเมนต์ นำมาเป็น positive control ส่วน nuclease free H₂O (NTC) ใช้เป็น negative control และส่วน master Mix ต่อ 1 ตัวอย่าง จะมีปริมาณเท่ากับ 18 ไมโครลิตร ประกอบด้วย nuclease free H₂O ปริมาณ 13.8 ไมโครลิตร, 10X Buffer ปริมาณ 0.8 ไมโครลิตร, MgCl₂ 2 mM ปริมาณ 0.8 ไมโครลิตร, dNTP 200 μM ปริมาณ 0.4 ไมโครลิตร, forward primer 0.2 μM ปริมาณ 0.4 ไมโครลิตร, reverse primer 0.2 μM ปริมาณ 0.4 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร และส่วนที่สองคือ ดีเอ็นเอ 50 ng/μl ปริมาณ 2 ไมโครลิตร หรือ nuclease free H₂O 2 ไมโครลิตร รวมปริมาตรสุทธิของสารที่ใช้ในกระบวนการ PCR ต่อ 1 ตัวอย่าง เท่ากับ 20 ไมโครลิตร หลังจากผสมสองส่วนให้เข้ากันแล้ว นำเข้าเครื่อง Gene Pro Thermal Cycler

เพื่อทำ MSP ขั้นตอนในการทำ MSP ประกอบด้วย ขั้นตอน initial activation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที, ขั้นตอน denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 52 และ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที, ขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที และขั้นตอน final-extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยในขั้นตอน denature, annealing และ extension จะเกิดเป็น cycles จำนวน 35 cycles

gradient PCR ครั้งที่ 2 เป็นการนำไพรเมอร์ชุดที่ 1 เฉพาะเมทิลเลชันไพรเมอร์ มาทำการทดลองซ้ำ โดยความเข้มข้นและปริมาณสารต่าง ๆ ที่ใช้ อุณหภูมิในขั้นตอน annealing รวมถึงดีเอ็นเอเหมือนกับครั้งที่ 1 ยกเว้น $MgCl_2$ เพิ่มความเข้มข้นเป็น 2.5 mM ปริมาณ 1 ไมโครลิตร

gradient PCR ครั้งที่ 3 ความเข้มข้นและปริมาณสารต่าง ๆ ที่ใช้เหมือนกับครั้งที่ 1 แต่เปลี่ยนมาใช้ไพรเมอร์ชุดที่ 2 โดยทำ PCR เฉพาะเมทิลเลชันไพรเมอร์ ทั้งยังเปลี่ยนมาใช้ชุดดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งประกอบไปด้วย Human methylated DNA และ Human non-methylated DNA (Zymo Research Corp., USA) มาเป็น positive control ของเมทิลเลชันไพรเมอร์และอันเมทิลเลชันไพรเมอร์ ตามลำดับ แทนดีเอ็นเอเดิมที่ไม่ผ่านการไบซัลไฟต์ทรีตเมนต์ รวมถึงอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ของกระบวนการทำ PCR คือ 50 และ 54 องศาเซลเซียส

gradient PCR ครั้งที่ 4 ความเข้มข้นและปริมาณสารต่าง ๆ ที่ใช้เหมือนกับครั้งที่ 1 แต่เปลี่ยนมาใช้ไพรเมอร์ชุดที่ 2 โดยใช้เฉพาะอันเมทิลเลชันไพรเมอร์ รวมถึงเปลี่ยนมาใช้ชุดดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งประกอบไปด้วย Human methylated DNA และ Human non-methylated DNA (Zymo Research Corp., USA) มาเป็น positive control ของเมทิลเลชันไพรเมอร์และอันเมทิลเลชันไพรเมอร์ ตามลำดับ แทนดีเอ็นเอเดิมที่ไม่ผ่านการไบซัลไฟต์ทรีตเมนต์ และอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ของกระบวนการทำ PCR คือ 50 และ 54 องศาเซลเซียส

gradient PCR ครั้งที่ 5 ความเข้มข้นและปริมาณสารต่าง ๆ ที่ใช้เหมือนกับครั้งที่ 1 แต่เปลี่ยนมาใช้เมทิลเลชันไพรเมอร์และอันเมทิลเลชันไพรเมอร์จากไพรเมอร์ชุดที่ 3 รวมถึงเปลี่ยนมาใช้ชุดดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งประกอบไปด้วย Human methylated DNA และ Human non-methylated DNA (Zymo Research Corp., USA) มาเป็น positive control ของเมทิลเลชันไพรเมอร์และอันเมทิลเลชัน

ไพรมเมอร์ ตามลำดับ แทนดีเอ็นเอเดิมที่ไม่ผ่านการไบซัลไฟต์ทรีตเมนต์ และอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ของกระบวนการทำ PCR คือ 50 และ 54 องศาเซลเซียส

gradient PCR ครั้งที่ 6 ความเข้มข้นและปริมาณสารต่าง ๆ ที่ใช้เหมือนกับครั้งที่ 1 แต่เปลี่ยนมาใช้เมทิลเลชันไพรมเมอร์และอันเมทิลเลชันไพรมเมอร์จากไพรมเมอร์ชุดที่ 4 รวมถึงเปลี่ยนมาใช้ชุดดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งประกอบไปด้วย Human methylated DNA และ Human non-methylated DNA (Zymo Research Corp., USA) มาเป็น positive control ของเมทิลเลชันไพรมเมอร์และอันเมทิลเลชันไพรมเมอร์ ตามลำดับ แทนดีเอ็นเอเดิมที่ไม่ผ่านการไบซัลไฟต์ทรีตเมนต์ และอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ของกระบวนการทำ PCR คือ 50 และ 54 องศาเซลเซียส

gradient PCR ครั้งที่ 7 ความเข้มข้นและปริมาณสารต่าง ๆ ที่ใช้เหมือนกับครั้งที่ 1 แต่เปลี่ยนมาใช้เมทิลเลชันไพรมเมอร์และอันเมทิลเลชันไพรมเมอร์จากไพรมเมอร์ชุดที่ 5 รวมถึงเปลี่ยนมาใช้ชุดดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งประกอบไปด้วย Human methylated DNA และ Human non-methylated DNA (Zymo Research Corp., USA) มาเป็น positive control ของเมทิลเลชันไพรมเมอร์และอันเมทิลเลชันไพรมเมอร์ ตามลำดับ แทนดีเอ็นเอเดิมที่ไม่ผ่านการไบซัลไฟต์ทรีตเมนต์ และอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ของกระบวนการทำ PCR คือ 50 และ 54 องศาเซลเซียส

gradient PCR ครั้งที่ 8 เป็นการนำไพรมเมอร์ชุดที่ 1 มาทำการทดลองซ้ำ โดยความเข้มข้นและปริมาณสารต่าง ๆ เหมือนกับ gradient PCR ครั้งที่ 1 แต่เปลี่ยนมาใช้ชุดดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งประกอบไปด้วย Human methylated DNA และ Human non-methylated DNA (Zymo Research Corp., USA) มาเป็น positive control ของเมทิลเลชันไพรมเมอร์และอันเมทิลเลชันไพรมเมอร์ ตามลำดับ แทนดีเอ็นเอเดิมที่ไม่ผ่านการไบซัลไฟต์ทรีตเมนต์ และอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ของกระบวนการทำ PCR คือ 52 และ 54 องศาเซลเซียส

gradient PCR ครั้งที่ 9 เป็นการนำไพรมเมอร์ชุดที่ 1 มาทำการทดลองซ้ำ โดยความเข้มข้นและปริมาณสารต่าง ๆ เหมือนกับ gradient PCR ครั้งที่ 1 แต่เปลี่ยนมาใช้ HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen Inc., German) แทน Taq DNA Polymerase (Apsalagen Co.Ltd., Thailand) และเปลี่ยนมาใช้ชุดดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งประกอบไปด้วย Human methylated DNA และ Human non-methylated DNA (Zymo Research Corp., USA) มาเป็น positive control ของเมทิลเลชันไพรมเมอร์

และอันเมทิลเลชันไพรมเมอร์ ตามลำดับ แทนดีเอ็นเอเดิมที่ไม่ผ่านการไบซัลไฟต์ทรีตเมนต์ และอุณหภูมิ
ในขั้นตอน annealing ของกระบวนการทำ PCR คือ 52 และ 54 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบความถูกต้องของ PCR products ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

หลังจากขั้นตอนทำ PCR นำ PCR products ที่ได้มาทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดย gradient PCR ครั้งที่ 1, 2, 3, 4, 8 และ 9 จะใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.5% และใช้ DNA ladder ขนาด 100 เบส ของ OneMARK 100 (GeneDireX Inc., USA) เป็น DNA marker ที่ใช้ในการเทียบขนาดของ PCR products จากนั้นเมื่อผสมอะกาโรส กับ 1x TBE buffer ผสมเป็นเนื้อเดียวกันแล้วจะใส่ RedSafe (iNtRON Bio Inc., Korea) เป็นสารฟลูออเรสเซนต์ที่จะจับดีเอ็นเอ เมื่อส่องได้แสงยูวีจะให้เห็นแถบดีเอ็นเอ หลังจากนั้นใส่ตัวอย่างดีเอ็นเอลงในหลุม และกำหนด electrophoresis power supply ในการทำ gradient PCR ครั้งแรกใช้กำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที ส่วน gradient PCR ครั้งที่ 2-4 เปลี่ยนเป็น 30 นาที ส่วน gradient PCR ครั้งที่ 5-7 ใช้อะคริลาไมด์เจล ความเข้มข้น 8 % และใช้ DNA ladder ขนาด 25 เบส และ 10 เบส ของ New England Biolab (New England Biolab Inc., USA) และกำหนด electrophoresis power supply ในการทำ gradient PCR ครั้งที่ 5-7 ใช้กำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที สุดท้ายจึงตรวจสอบผลโดย gel documentation analysis ทำการบันทึกภาพ และเก็บข้อมูลเช่นเดียวกัน

บทที่ 4

ผลการทดลอง

คัดเลือกยีนที่ใช้ในการศึกษา

จากการคัดเลือกยีนที่ใช้ในการศึกษาจากฐานข้อมูล PubMed จาก NCBI พบว่า ยีนที่มีความสัมพันธ์กับโรคข้อเข่าเสื่อม และดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีนมีผลต่อการแสดงออกของยีนในโรคข้อเข่าเสื่อมด้วย คือ ยีน *DIO2*

ไพรเมอร์สำหรับกระบวนการ MSP

ขั้นแรกดาวน์โหลดลำดับเบสบริเวณไพรโมเตอร์ของยีน *DIO2* ที่ใช้ศึกษาจาก ensembl โดยเลือกจาก splice variant ที่มีตำแหน่ง CpG มากที่สุด คือ DIO2-209

ตารางที่ 3 จำนวน CpG site ของยีน *DIO2* ในแต่ละ splice variant

Name	Number of amino acid (aa)	Size	Translation	Number of CpG site
DIO2-211	56	517	Protein coding	11
DIO2-210	273	6367	Protein coding	4
DIO2-209	58	984	Protein coding	18
DIO2-208	No protein	267	No protein	-
DIO2-207	37	776	Nonsense mediated decay	-
DIO2-206	309	1049	Protein coding	11
DIO2-205	5	569	Protein coding	9
DIO2-204	6	417	Protein coding	6
DIO2-203	6	491	Protein coding	5


```

>TGTCGAGTTTTGTTTTTATTATTGTAATTTGGTTAAAGTAAAGTTTTTTTTTAATGACGTTAAGATTTTTATTAAGATTAGGTTTTATTTT
TTTTATTGTAGTAATTAGTTAGGGAATGTATAAAAGGCGTTAGGGAGATTTATTGGGTTGTAGAGAGAGGATTTTTGTATTATAGATAGATAGTAAGA
AGGGAAAAGATAGAGAGTGAGAAAAAGAGGAGTTAGTCTTTTTGGGGAAGGGAGAGAGTGAGATTGGGAGAAAAGAGAAGTATAGAAAAGTGTGTGT
AAAAAGGAGTAAAGAAAAGAAAAAATTTATTTTAAAGTATATTTAAAAAATTTTGGTAATTTAAGAAAAGAAATAGGTTACGTTTA
AAGAGTATAGAGATAATGAAAGGTTAAAGAAAATTTTAAAAATTTTGTATAGTTTTATAGGTTTGGAAAAGTAAAGTAGAATTGTTTGTTTTTAAC
GGATTTGTAGAGGTAATTGGATTAGGGACGAGTACGTTAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAATTTTTAAATTTTGAAAAA
AAAAAAGGTTAGTAGTTTTCGAATTGAATGAATTGATGGGTATATTTAATTGTTGGGTTGGAGAGATTGGATTAGTTTTGTTATTTTTGT
TTTTTGAAGAGGAGATAATTTGGGTTTTTTTTTAATTTAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAATTTTTAATTTTTTTTTTATTTTTTATTTTTT
TATTATTATTTTTTTTTAAATAAGAGGGTGAAGGGAATTAGACGTTATAAGGGAATTGATTTAGGAGGTAGAGAAGATGGGTATTTTAGCGTAG
ATTTGTTGATTATATTGAAATTTGTTAGTTTTTTTTTAATTTGTTTTTTTTGGTTTTTATGATTCTGTTATTTTGTAAAGTACGTTGGTGTGT
TGTTGAGTCTTTTTAAGTTTTCTCGGAGAGTGGCGGCTATGTTGATTTAGAGGGATTGCTTGCTTTGGAAAGATTTTTTTTTCGATGTTTA
TAAATAGTGGAGTTGAGTTGAGAAGGGTTTTTTTTTAGGTTTATAGGGTAGGGTTTATGTTGGGATTAGAGGTTATTGGGAGTATTGGGGGG
AGAGTTGTGAAGTTTTATTTGTGGGTTGTTAAGTGAGTTTTAAGTTATTTTTATATTTGTTGTATAGGTTAGTTGGGAGGTTGATAGTTATTA
AGTTATAATGATTTTGTGTATTTAATAAGGAATTTTTTATTAAGGTTATTAATTTTTGTTGTGATTGGGAGTAGAAGGTTATTGTTGGTACG
ATAATTTGGAAAAGTTAGAAAATGATGGAGAAGAGGAGATTGTTGATTTATTTGTTTTGTTATAAATTGGAATTTGATTTTTGTTGATGGG
AGGTTGAGGTATATTGAGGAAGTATGTTGAGG

```

รูปที่ 9 ลำดับเบสของเมทิลเลชันไพรเมอร์

หลังจากได้ลำดับเบสที่จำเพาะกับแต่ละไพรเมอร์แล้ว ดังรูปที่ 8 และ 9 จากนั้นจะทำการเลือก บริเวณที่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์ ได้เมทิลเลชันไพรเมอร์และอันเมทิลเลชันไพรเมอร์ที่สนใจ ดัง ตารางที่ 4, 5, 6, 7 และ 8

ตารางที่ 4 ไพรเมอร์ชุดที่ 1

Primer	Primer sequences (5' to 3')	Tm (°C)	C:G content (%)	PCR products size (bp)
unmethylation primer				
forward primer	GAGGTAATTGGATTAGGGATGAGTATG	56.7	41	538
reverse primer	GAGAGTGGTGGTGTATGTTGATTTTAGAG	58.7	41	
methylation primer				
forward primer	TTGGATTAGGGACGAGTACGTTAG	55.7	46	524

Primer	Primer sequences (5' to 3')	Tm (°C)	C:G content (%)	PCR products size (bp)
reverse primer	GAGAGTGGCGGCATGTTGAT	56.7	55	

ตารางที่ 5 ไพรมเมอร์ชุดที่ 2

Primer	Primer sequences (5' to 3')	Tm (°C)	C:G content (%)	PCR products size (bp)
unmethylation primer				
forward primer	GGTGAAGGGGAATTAGAGTG	51.8	50	179
reverse primer	CAACTCAACAACAACACCACA	50.5	43	
methylation primer				
forward primer	GGTGAAGGGGAATTAGAGCG	53.8	55	179
reverse primer	CGACTCAACAACAACACCACG	54.4	52	

ตารางที่ 6 ไพรมเมอร์ชุดที่ 3

Primer	Primer sequences (5' to 3')	Tm (°C)	C:G content (%)	PCR products size (bp)
unmethylation primer				
forward primer	GGATGGGAGTTGTTTTAAGTTTATTTGT	54.1	32	88

Primer	Primer sequences (5' to 3')	Tm (°C)	C:G content (%)	PCR products size (bp)
reverse primer	ATCCCAACTCTTCCAAACACAACA	54.0	42	
methylation primer				
forward primer	GGGAGTCGTTTTAAGTTTATTCGC	54.0	42	81
reverse primer	CCAACCTCTTCCAAACGCAACG	54.4	52	

ตารางที่ 7 ไพรมเมอร์ชุดที่ 4

Primer	Primer sequences (5' to 3')	Tm (°C)	C:G content (%)	PCR products size (bp)
unmethylation primer				
forward primer	GGTGGAGGTGGGTGTTTTAAGTTTATTTGT	58.9	40	92
reverse primer	TCCACCCAACCTCTTCCAAACACAACA	58.0	46	
methylation primer				
forward primer	GGGATGGGCGTTTTAAGTTTATTCGC	58.0	46	87
reverse primer	CCATACAACCTCTTCCAAACGCAACG	57.7	48	

ตารางที่ 8 ไพรมเมอร์ชุดที่ 5

Primer	Primer sequences (5' to 3')	Tm (°C)	C:G content (%)	PCR products size (bp)
unmethylation primer				
forward primer	GGATGTAGAGAGTGGTGGTG	53.8	55	65
reverse primer	CACCAACTCTTCCAAACACAACA	53.5	43	
methylation primer				
forward primer	GGATGAGAGTGGCGGCG	54.3	43	60
reverse primer	CCAACTCTTCCAAACGCAACG	54.4	52	

ในส่วนการออกแบบไพรมเมอร์ด้วยซอฟต์แวร์ ซอฟต์แวร์ Methprimer และ Bisearch ไม่สามารถออกแบบไพรมเมอร์ในบริเวณที่สนใจได้ ดังรูปที่ 10 และ 11 ส่วนซอฟต์แวร์ Primo MSP ไม่สามารถใช้งานได้ และไม่พบซอฟต์แวร์ MSP primer

MethPrimer result

Please cite MethPrimer: Li LC and Dahiya R. [MethPrimer: designing primers for methyla](#)
PMID: [12424112](#)

Sequence Name:
Sequence Length: 1201

NO primer found

CpG island prediction results
Criteria used: Island size > 100, GC Percent > 50.0, Obs/Exp > 0.60
1 CpG island(s) were found in your sequence
Size (Start - End)
Island 1 108 bp (949 - 1056)

Primer picking results for methylation specific PCR (MSP)
No primers found!

รูปที่ 10 ซอฟต์แวร์ Methprimer

Primer Design and Search Tool

Primer design results

Selected regions were (20 30)-(20 30)

No primer was found with the specified parameters! ← NO primer was found

Parameters

Primer melting temperature

Primer conc	1.0	mikromol	Glycerol conc	0.0	%
Potassium conc	50.0	milimol	Ethylene glycol conc	0.0	%
Magnesium conc	1.5	milimol	Formamid conc	0.0	%

Primer scoring values

Description	Weight	Min	Opt	Max	Description	Weight	Max
Primer length	0.5	20	23	35	Self annealing	0.1	20
GC content	1.0	40.0	50.0	60.0	Self end-annealing	0.2	10
GC content (bis)	1.0	0.0	30.0	60.0	Pair annealing	0.1	20
Melting temp	1.0	45.0	60.0	70.0	Pair end-annealing	0.2	10

Primer design

Results list size 10 Max Tm diff 8.0 Minimum of CpGs 1

รูปที่ 11 ซอฟต์แวร์ Bisearch

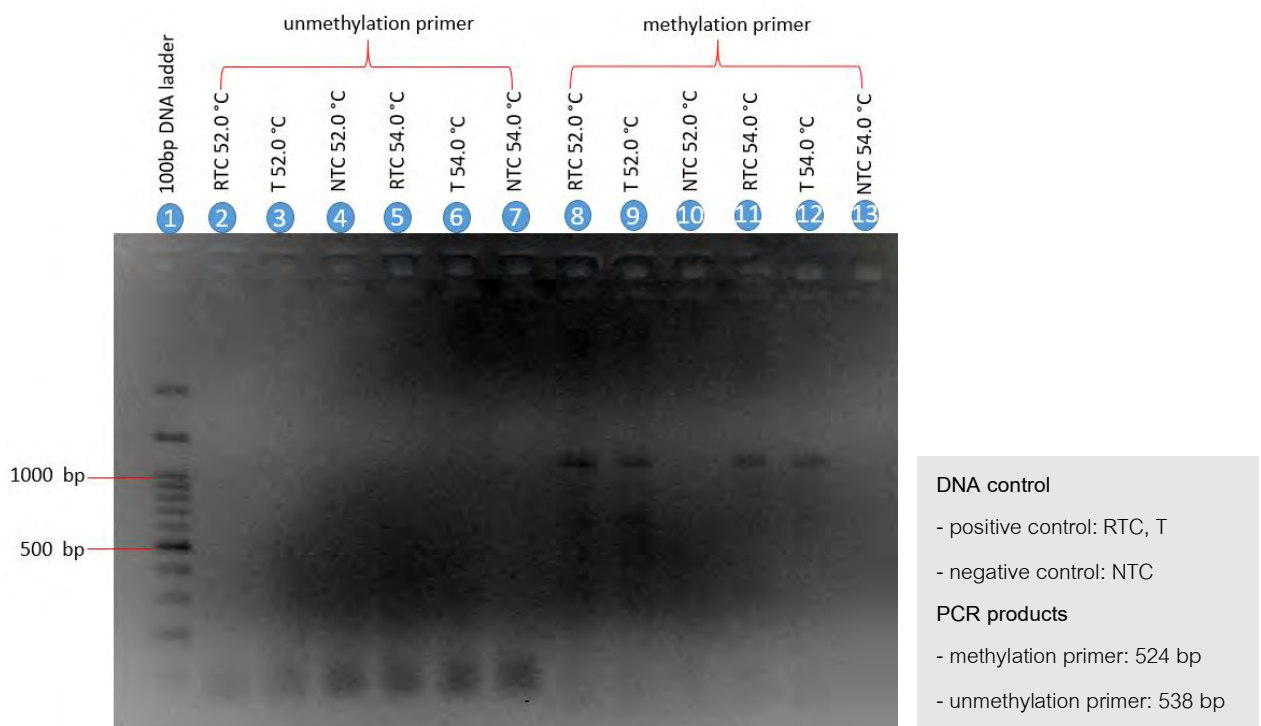
ผลการสกัดดีเอ็นเอ

หลังจากสกัดดีเอ็นเอแล้วจะได้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จึงนำดีเอ็นเอมาวัดกับเครื่อง nanodrop spectrophotometer พบว่าดีเอ็นเอมีค่าการดูดกลืนแสง OD_{260}/OD_{280} อยู่ในช่วง 1.6-1.9 ซึ่งถือว่ามีคุณภาพดี สามารถนำมาใช้ในการทดลองได้

กระบวนการ MSP

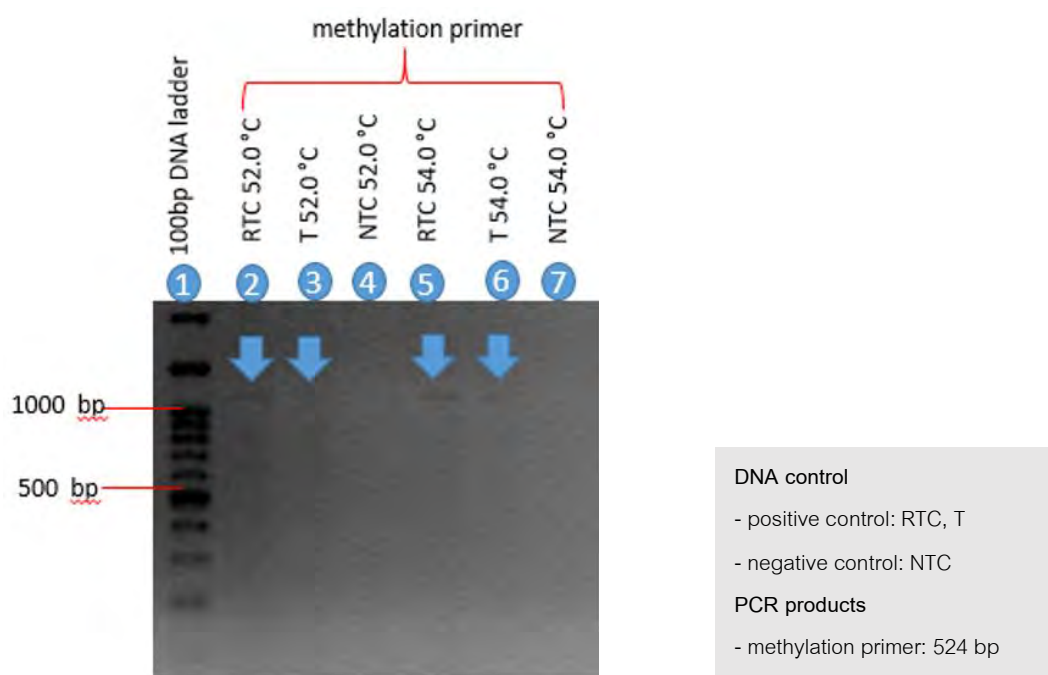
หลังจากนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์ที่รีดเมนท์ ก่อนที่จะนำดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มควบคุม มาวิเคราะห์ระดับเมทิลเลชันของยีน *DIO2* นั้น ต้องผ่านการกระบวนการ gradient PCR จากนั้นตรวจสอบความถูกต้องของ PCR product ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

gradient PCR ครั้งที่ 1 ในหลุมที่ 2-7 ของอันเมทิลเลชันไพรเมอร์ ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่สนใจ (538 เบส) ส่วนหลุมของเมทิลเลชันไพรเมอร์หลุมที่ 8, 9, 11 และ 12 พบแถบดีเอ็นเอขนาดที่ไม่สนใจเท่ากับ 1000 เบส ชัดเจนกว่าขนาดที่สนใจ คือ 524 เบส ดังรูปที่ 12



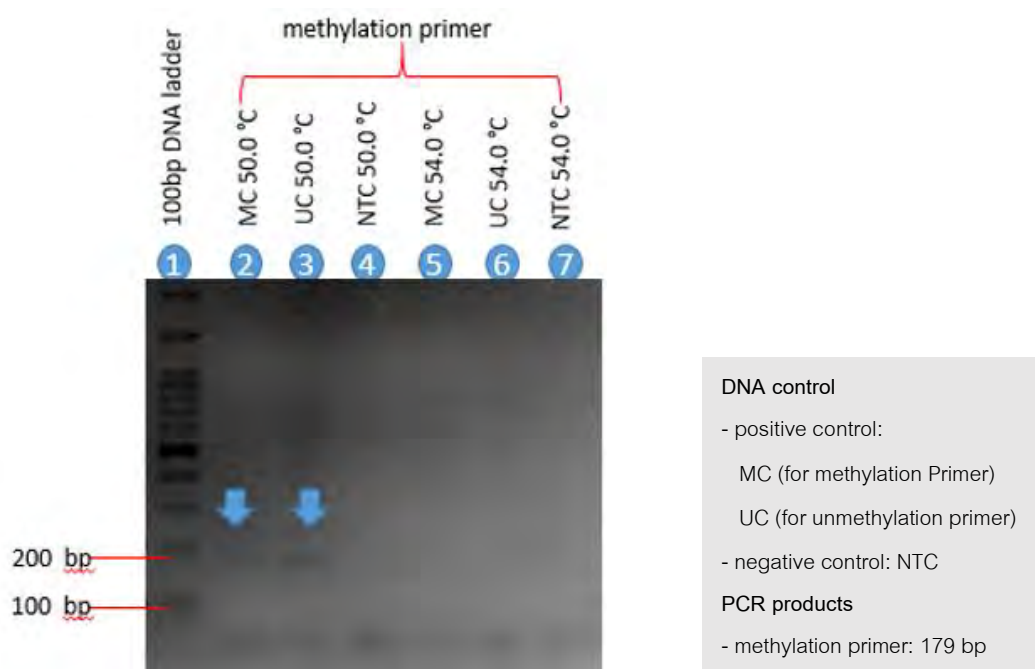
รูปที่ 12 ผลการทำ gradient PCR ครั้งที่ 1 โดยใช้ไพรเมอร์ชุดที่ 1

gradient PCR ครั้งที่ 2 เป็นการนำไพรเมอร์ชุดที่ 1 เฉพาะเมทิลเลชันไพรเมอร์ มาทำการทดลองซ้ำ โดยเพิ่มความเข้มข้นของ $MgCl_2$ จาก 2.0 mM เป็น 2.5 mM ผลการทดลองที่ได้เป็นเช่นเดียวกับ gradient PCR ครั้งที่ 1 คือ ในหลุมที่ 2, 3, 5 และ 6 ที่ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอ RTC และ T ทั้งที่อุณหภูมิ 52 และ 54 องศาเซลเซียส พบแถบดีเอ็นเอขนาดที่ไม่สนใจเท่ากับ 1000 เบส ชัดเจนกว่าขนาดที่สนใจ คือ 524 เบส ดังรูปที่ 13



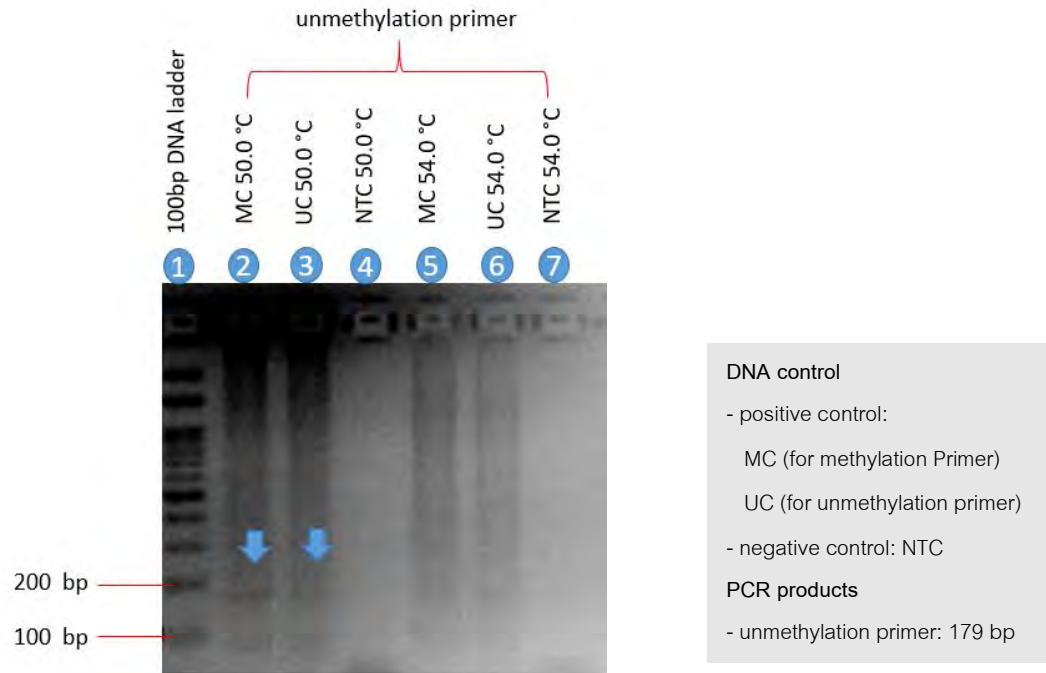
รูปที่ 13 ผลการทำ gradient PCR ครั้งที่ 2 โดยใช้เฉพาะเมทิลเลชันไพรเมอร์จากไพรเมอร์ชุดที่ 1

gradient PCR ครั้งที่ 3 เมื่อใช้เมทิลเลชันไพรเมอร์ชุดที่ 2 พบว่าทั้งหลุมที่ 2 ที่ใช้ Human methylated DNA และหลุมที่ 3 ที่ใช้ Human non-methylated DNA พบแถบดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียงกับ PCR product ที่สนใจ (179 เบส) เช่นเดียวกัน ดังรูปที่ 14



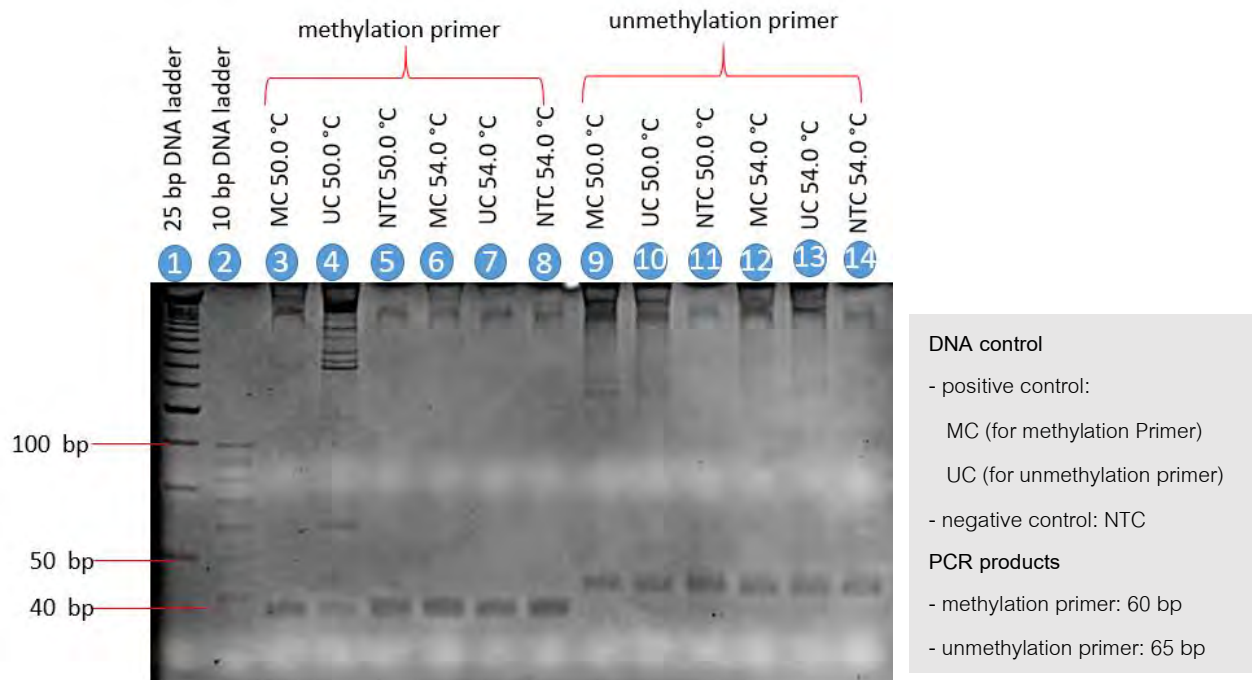
รูปที่ 14 ผลการทำ gradient PCR ครั้งที่ 3 โดยใช้เฉพาะเมทิลเลชันไพรเมอร์จากไพรเมอร์ชุดที่ 2

gradient PCR ครั้งที่ 4 เมื่อใช้อันเมทิลเลชันไพรเมอร์ชุดที่ 2 พบว่าทั้งหลุมที่ 2 ที่ใช้ Human Methylated DNA และหลุมที่ 3 ที่ใช้ Human non-methylated DNA พบแถบดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียงกับ PCR product ที่สนใจ (179 เบส) เช่นเดียวกัน ดังรูปที่ 15



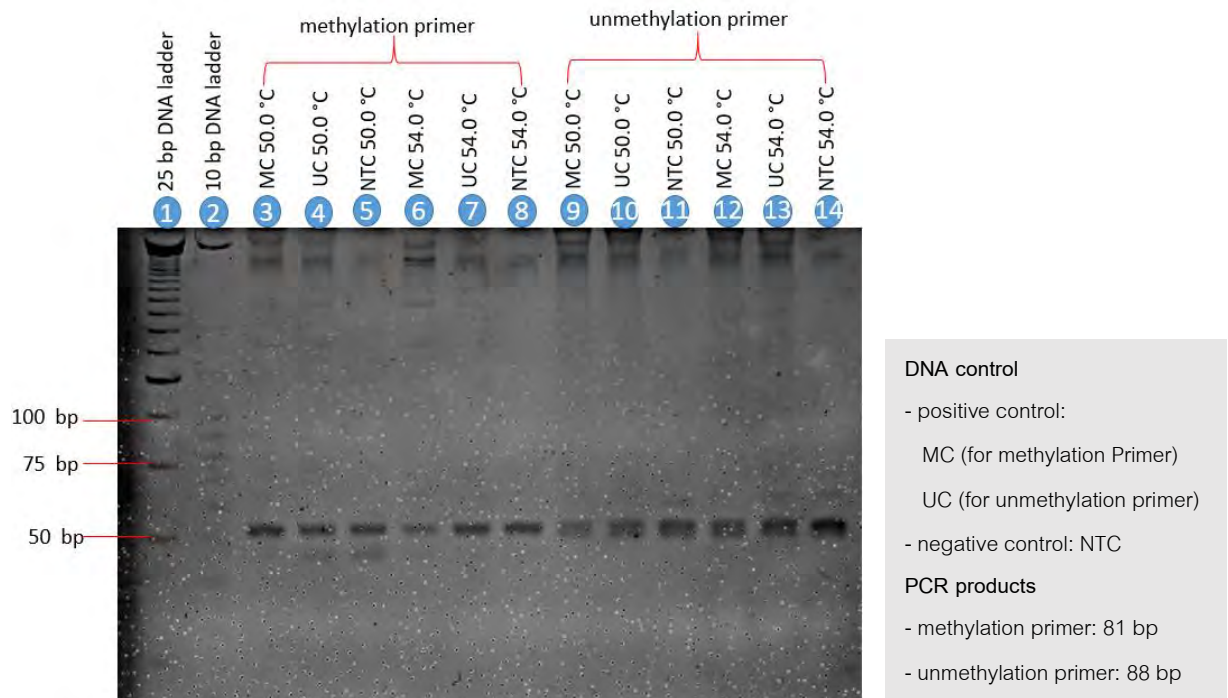
รูปที่ 15 ผลการทำ gradient PCR ครั้งที่ 4 โดยใช้เฉพาะอันเมทิลเลชันไพรเมอร์จากไพรเมอร์ชุดที่ 2

gradient PCR ครั้งที่ 5 เมื่อใช้ไพรเมอร์ชุดที่ 3 ทั้งหลุมที่ใช้เมทิลเลชันไพรเมอร์และอันเมทิลเลชันไพรเมอร์ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดที่สนใจที่ 60 เบส และ 65 เบส ตามลำดับ พบแต่แถบดีเอ็นเอขนาดที่ไม่สนใจ โดยหลุมที่ใช้เมทิลเลชันไพรเมอร์ตั้งแต่ 3-8 พบแถบดีเอ็นเอขนาดต่ำกว่า 40 เบส ส่วนหลุมที่ใช้อันเมทิลเลชันไพรเมอร์ตั้งแต่ 9-14 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 40 เบส นอกจากนั้นหลุมที่ใช้เมทิลเลชันไพรเมอร์หลุมที่ 4 Human non-methylated DNA พบแถบดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่สนใจ ดังรูปที่ 16



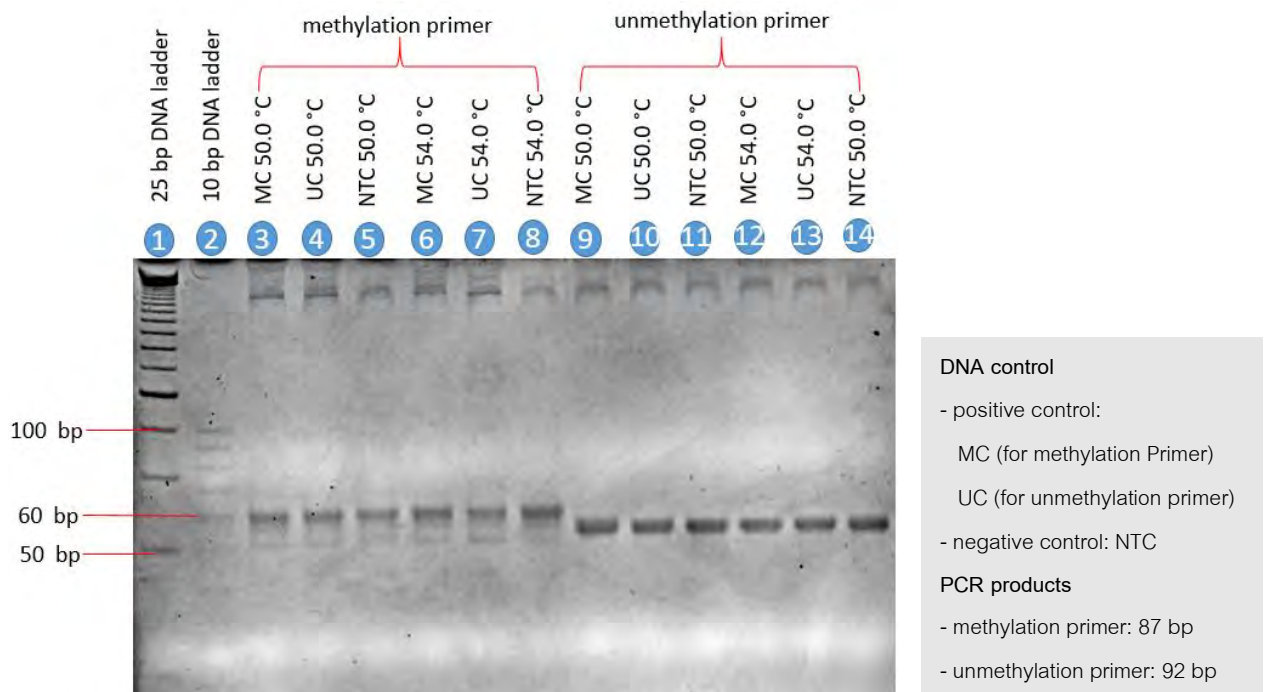
รูปที่ 16 ผลการทำ gradient PCR ครั้งที่ 5 โดยใช้ไพรเมอร์ชุดที่ 3

gradient PCR ครั้งที่ 6 เมื่อใช้ไพรเมอร์ชุดที่ 4 ทั้งหลุมที่ใช้เมทิลเลชันไพรเมอร์และอันเมทิลเลชันไพรเมอร์ ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดที่สนใจที่ 81 เบส และ 88 เบส ตามลำดับ พบแต่แถบดีเอ็นเอขนาดที่ไม่สนใจขนาดประมาณ 50 เบส ดังรูปที่ 17



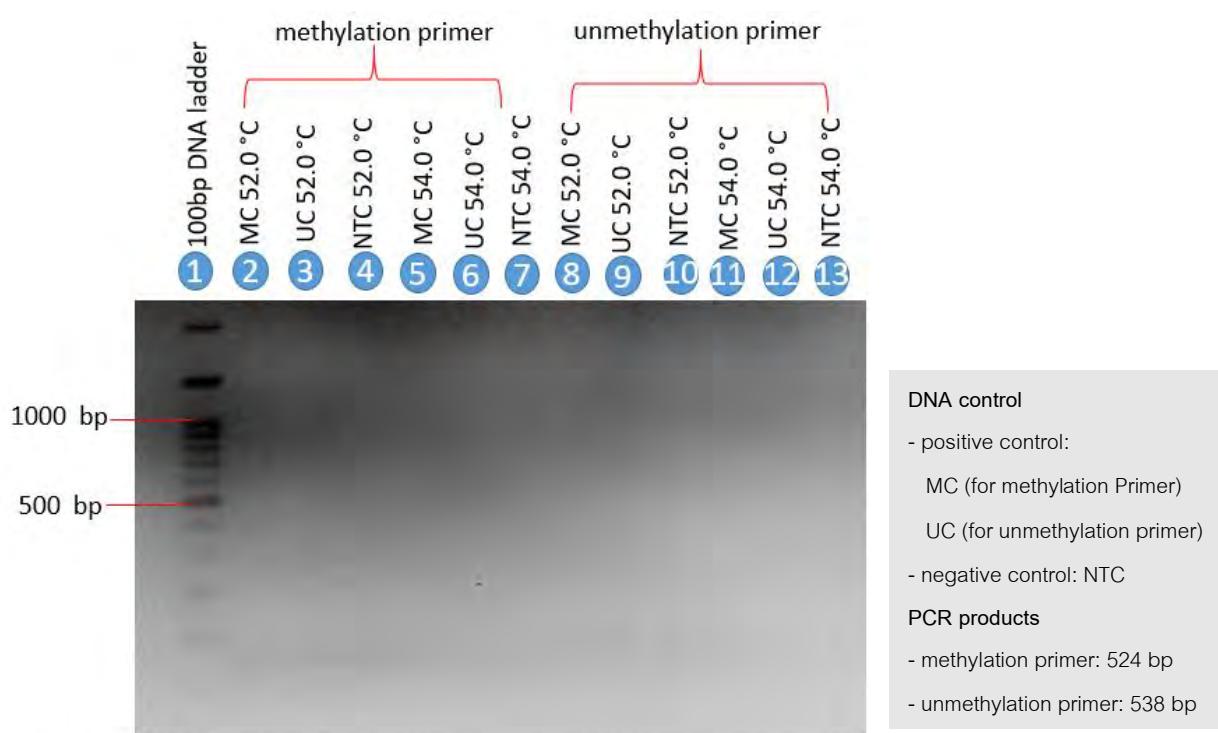
รูปที่ 17 ผลการทำ gradient PCR ครั้งที่ 6 โดยใช้ไพรเมอร์ชุดที่ 4

gradient PCR ครั้งที่ 7 เมื่อใช้ไพรเมอร์ชุดที่ 4 ทั้งหลุมที่ใช้เมทิลเลชันไพรเมอร์และอันเมทิลเลชันไพรเมอร์ ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดที่สนใจที่ 87 เบส และ 92 เบส ตามลำดับ พบแต่แถบดีเอ็นเอขนาดที่ไม่สนใจ โดยหลุมที่ใช้เมทิลเลชันไพรเมอร์ตั้งแต่ 3-8 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 60 เบส ส่วนหลุมที่ใช้อันเมทิลเลชันไพรเมอร์ตั้งแต่ 9-14 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 50 เบส ดังรูปที่ 18



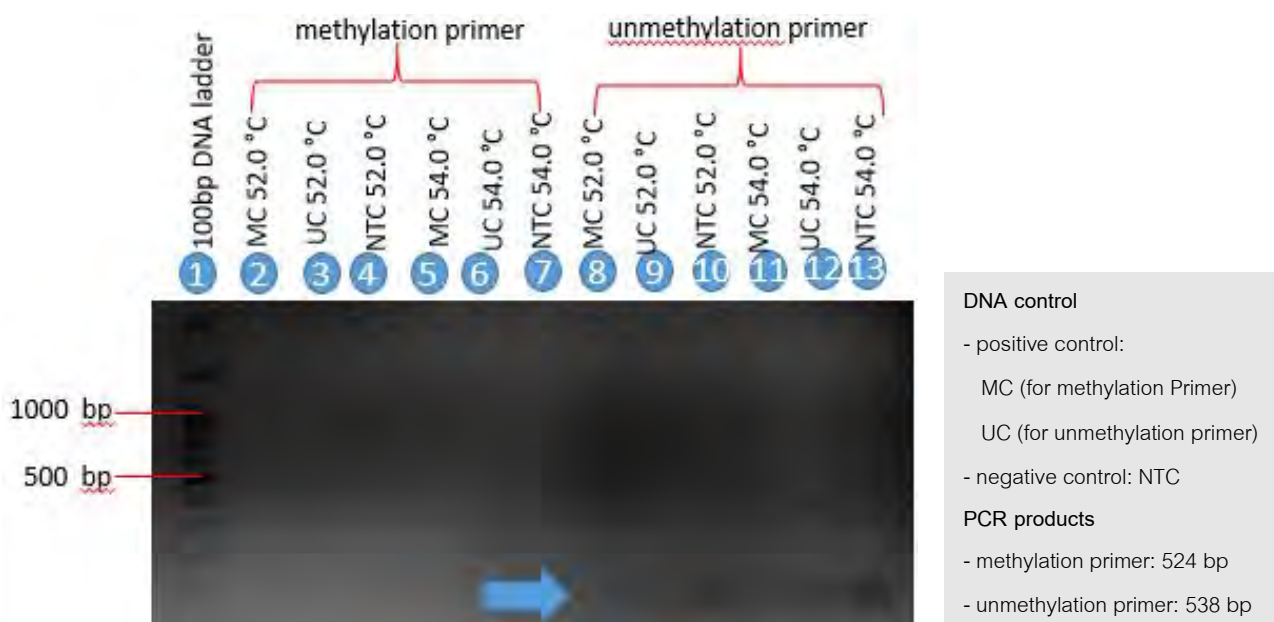
รูปที่ 18 ผลการทำ gradient PCR ครั้งที่ 7 โดยใช้ของไพรเมอร์ชุดที่ 5

gradient PCR ครั้งที่ 8 เป็นการนำไพรเมอร์ชุดที่ 1 มาทดลองซ้ำ โดยเปลี่ยนมาใช้ชุดดีเอ็นเอมาตรฐานซึ่งประกอบไปด้วย Human methylated DNA และ Human non-methylated DNA (Zymo Research Corp., USA) มาเป็น positive control ของเมทิลเลชันไพรเมอร์และอันเมทิลเลชันไพรเมอร์ตามลำดับ แทนดีเอ็นเอเดิมที่ไม่ผ่านการไบซัลทริตเมนต์ สำหรับผลที่ได้ คือ ทั้งหลุมที่ใช้เมทิลเลชันไพรเมอร์และอันเมทิลเลชันไพรเมอร์ ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดที่สนใจที่ 524 และ 538 เบส ตามลำดับ พบแต่แถบดีเอ็นเอขนาดที่ไม่สนใจขนาดต่ำกว่า 100 เบส ดังรูปที่ 19



รูปที่ 19 ผลการทำ gradient PCR ครั้งที่ 8 เป็นการนำไพรเมอร์ชุดที่ 1 มาทดลองซ้ำ โดยเปลี่ยนมาใช้ชุดดีเอ็นเอมาตรฐานเป็น positive control

gradient PCR ครั้งที่ 9 เป็นการนำไพรเมอร์ชุดที่ 1 มาทดลองซ้ำ โดยเปลี่ยนมาใช้ HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen Inc., German) แทน Taq DNA Polymerase (Apsalagen Co.Ltd., Thailand) และเปลี่ยนมาใช้ชุดดีเอ็นเอมาตรฐานซึ่งประกอบไปด้วย Human methylated DNA และ Human non-methylated DNA (Zymo Research Corp., USA) มาเป็น positive control ของเมทิลเลชันไพรเมอร์และอันเมทิลเลชันไพรเมอร์ ตามลำดับ แทนดีเอ็นเอเดิมที่ไม่ผ่านการไบซัลไฟต์ทรีตเมนต์ สำหรับผลที่ได้เช่นเดียวกับ gradient PCR ครั้งที่ 8 คือ ทั้งหลุมที่ใช้เมทิลเลชันไพรเมอร์และอันเมทิลเลชันไพรเมอร์ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดที่สนใจที่ 524 และ 538 เบส ตามลำดับ พบแต่แถบดีเอ็นเอขนาดที่ไม่สนใจขนาดต่ำกว่า 100 เบส ดังรูปที่ 20



รูปที่ 20 ผลการทำ gradient PCR ครั้งที่ 9 เป็นการนำไพรเมอร์ชุดที่ 1 มาทดลองซ้ำ โดยเปลี่ยนมาใช้ HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen Inc., German) แทน Taq DNA Polymerase (Apsalagen Co. Ltd., Thailand)

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผล

ผลจากการคัดเลือกยีนที่ใช้ในการศึกษา จากฐานข้อมูล PubMed จาก NCBI ทำให้ได้ยีนที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด 3 ยีน คือ ยีน *GDF5*, ยีน *SOX9* และยีน *DIO2* โดยเลือกยีน *DIO2* มาศึกษา เนื่องจากยีนนี้มีความสัมพันธ์กับโรคข้อเข่าเสื่อมในหลายประเทศทั้งในชาวยูเครน ชาวดัตช์ และชาวญี่ปุ่น (Meulenbelt and others, 2008) และดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีนมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่มากกว่าปกติ (hypermethylation) ในโรคข้อเข่าเสื่อม โดยโปรตีน selenoprotein ที่ผลิตจากยีน *DIO2* เร่งการเปลี่ยนรูปฮอร์โมนไทรอยด์ที่ไม่ทำงาน (T4) เป็นฮอร์โมนไทรอยด์ที่สามารถทำงานได้ (T3) ซึ่งจะชักนำให้เกิดกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับก่อให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อมถึง 4 กระบวนการ คือ กระบวนการเจริญขั้นสุดท้ายของเซลล์กระดูกอ่อนบริเวณ growth plate ทำให้เกิดการขยายตัวมากกว่าปกติ (cell hypertrophy) สลายส่วนเซลล์กระดูกอ่อนและเนื้อกระดูกอ่อน (ECM destruction) สะสมแร่ธาตุในกระดูกอ่อน (mineralization) และการสร้างกระดูกแข็ง (formation of bone) (Hollander, 2013) สำหรับบริเวณที่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมอยู่บริเวณพรอมอเตอร์ของยีน ห่างจากจุด TSS ไปทาง 5' ประมาณ 2000 เบส (Bomer and others, 2015) จึงทำให้เกิดงานวิจัยนี้ขึ้นมาเพื่อศึกษาระดับเมทิลเลชันในบริเวณพรอมอเตอร์ของยีน *DIO2* ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมชาวไทยเทียบกับคนปกติที่มีข้อเข่าสุขภาพดี เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการวินิจฉัยและทำนายโอกาสเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับใช้ในกระบวนการ MSP จะใช้ลำดับเบสพรอมอเตอร์ของยีน *DIO2* จาก ensembl และ EPD โดยจะใช้ลำดับเบสจาก EPD มาออกแบบไพรเมอร์ เนื่องจากสามารถกำหนดลำดับเบสให้ห่างจากจุด TSS ได้สะดวกกว่า สำหรับไพรเมอร์ของเทคนิค MSP จะออกแบบไพรเมอร์ 2 ชุด คือ เมทิลเลชันไพรเมอร์และอันเมทิลเลชันไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ทั้งสองชุดจะอยู่ในบริเวณเดียวกันมีตำแหน่ง CpG เท่ากัน ไม่อยู่ในบริเวณที่เป็น SNP และพยายามให้อยู่ในบริเวณที่เป็น hot spot หรือบริเวณที่พบลำดับเบสเช่นเดียวกันทั้งในมนุษย์ ลิงวอก และหนูหริ่งบ้าน หลังจากนั้นเลือกบริเวณที่เหมาะสมที่จะใช้ออกแบบไพรเมอร์ได้ออกมาเป็นไพรเมอร์ทั้ง 5 ชุด เมื่อตรวจสอบด้วย Netprimer ไม่พบ primer dimer และ primer hairpin ในทุกชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบ ทั้งเมื่อตรวจสอบ

ด้วย Bisearch พบความจำเพาะระหว่างไพรเมอร์กับบริเวณยีนที่ศึกษา แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถนำมาใช้ในกระบวนการ MSP ได้

หลังจากออกแบบไพรเมอร์ จะทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มควบคุมอย่างละ 50 ตัวอย่าง โดยดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ต่อกันนั้นนำดีเอ็นเอมาวัดค่าการดูดกลืนแสง OD_{260}/OD_{280} ด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 1.6-1.9 ซึ่งถือว่ามีความบริสุทธิ์เพียงพอ สามารถนำมาใช้ในการทดลองได้ แล้วจึงนำดีเอ็นเอมาทำการไบซัลไฟต์ทรีตเมนต์ ทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างเบสไซโทซีนที่มีหมู่เมทิลเกาะอยู่กับเบสไซโทซีนที่ไม่มีหมู่เมทิลเกาะอยู่ เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถลงมาจับและตรวจสอบการมีเมทิลเลชันบริเวณไพรเมอร์เตอร์ของยีน *DIO2* ได้

สำหรับเทคนิค MSP จะมีหลักการอยู่บนพื้นฐานของ PCR จึงเป็นทั้งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและใช้ตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันในบริเวณที่ไพรเมอร์สามารถจับได้ โดยก่อนจะทำการตรวจสอบเมทิลเลชันกับกลุ่มตัวอย่างคนไข้และกลุ่มคนปกติ ขั้นตอนแรก คือ ทำ gradient PCR เพื่อหาความจำเพาะระหว่างไพรเมอร์ที่ออกแบบกับ PCR product ที่ทำนายไว้ รวมถึงหาปริมาณสาร และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ทั้งยังเป็นขั้นตอนที่พบปัญหาและอุปสรรค ทำให้เกิดการออกแบบไพรเมอร์ถึง 5 ชุด

จากผลการทดลอง gradient PCR ครั้งที่ 1 และ 2 เพื่อทดสอบไพรเมอร์ชุดที่ 1 แถบดีเอ็นเอที่พบไม่ตรงกับขนาด PCR products ที่สนใจ แต่เนื่องจาก gradient PCR ครั้งที่ 1 และ 2 นำดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการไบซัลไฟต์ทรีตเมนต์มาเป็น positive control ซึ่งผลที่ได้จึงไม่ถูกต้องตามหลักการ เนื่องจากเมทิลเลชันไพรเมอร์ถูกออกแบบให้เบสไซโทซีนที่ติดกับเบสกวานีนยังคงเป็นเบสไซโทซีน ส่วนอันเมทิลเลชันไพรเมอร์เบสไซโทซีนทั้งหมดถูกเปลี่ยนเป็นเบสไทมีน แต่ดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการไบซัลไฟต์ทรีตเมนต์เบสไซโทซีนของดีเอ็นเอดังกล่าวไม่ว่าจะมีหมู่เมทิลเกาะอยู่หรือไม่มีหมู่เมทิลเกาะอยู่ จะยังคงเป็นเบสไซโทซีน ทำให้เมทิลเลชันไพรเมอร์มีโอกาสจับดีเอ็นเอดังกล่าวได้ เมื่อทำ PCR และตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจึงสามารถพบแถบดีเอ็นเอได้ ส่วนอันเมทิลเลชันไพรเมอร์มีโอกาสที่ไม่สามารถจับดีเอ็นเอดังกล่าวได้ เมื่อตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจึงไม่พบแถบดีเอ็นเอ ทำให้เกิด gradient PCR ครั้งที่ 8 เป็นการนำไพรเมอร์ชุดที่ 1 มาทดลองซ้ำ โดยเปลี่ยนมาใช้ดีเอ็นเอจากชุดดีเอ็นเอ

มาตรฐาน ซึ่งประกอบไปด้วย Human methylated DNA และ Human non-methylated DNA (Zymo Research Corp., USA) มาเป็น positive control ของเมทิลเลชันไพรเมอร์และอันเมทิลเลชันไพรเมอร์ตามลำดับ แทนดีเอ็นเอเดิมที่ไม่ผ่านการไบซัลไฟต์ที่รีตเมนต์ ผลจากการทดลองไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดที่สนใจทั้งหลุมที่ใช้เมทิลเลชันไพรเมอร์และอันเมทิลเลชันไพรเมอร์ พบเพียงแถบดีเอ็นเอขนาดต่ำกว่า 100 เบส คาดว่าน่าจะเกิดจาก *Taq* DNA polymerase ที่ใช้ทำงานได้ไม่ดี จึงทำให้เกิดการ gradient PCR ครั้งที่ 9 เพื่อทดสอบไพรเมอร์คู่ที่ 1 ซ้ำ โดยเปลี่ยนจาก *Taq* DNA Polymerase (Apsalagen Co.Ltd., Thailand) เป็น HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen Inc., German) ผลจากการทดลองเป็นเช่นเดียวกับ gradient PCR ครั้งที่ 8 และจากขนาดแถบดีเอ็นเอต่ำกว่า 100 เบสที่พบ แสดงให้เห็นว่า *taq* DNA polymerase ที่ใช้สามารถทำงานได้ ปัญหาที่เกิดขึ้นไม่น่าจะเป็นผลมาจาก *taq* DNA polymerase แต่น่าจะเป็นผลมาจากไพรเมอร์ชุดที่ 1 ไม่เหมาะสมในการใช้ตรวจสอบเมทิลเลชัน ทั้งขนาด PCR products ของไพรเมอร์ใหญ่เกินไป โดยตามหลักการของเทคนิค MSP ควรออกแบบไพรเมอร์ขนาดไม่เกิน 300 เบส (Davidovic' and others, 2014) จึงทำให้เกิดการออกแบบไพรเมอร์ชุดที่ 2 โดยไพรเมอร์ชุดที่ 2 จะหลีกเลี่ยงบริเวณเบสซ้ำที่พบในไพรเมอร์ชุดที่ 1 ทำให้ขนาด PCR product จากประมาณ 500 เบสในไพรเมอร์ชุดที่ 1 ลดลงเหลือ 179 เบส ในไพรเมอร์ที่ 2

ผลจากการทดลอง gradient PCR ครั้งที่ 3 และ 4 สำหรับทดสอบไพรเมอร์ชุดที่ 2 ในหลุมที่ใช้เมทิลเลชันไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียงกับแถบดีเอ็นเอขนาดที่สนใจ ทั้งในหลุมที่เป็น Human methylated DNA และ Human non-methylated DNA แสดงให้เห็นว่าเมทิลเลชันไพรเมอร์ไม่จำเพาะต่อดีเอ็นเอเมทิลเลชัน สามารถจับได้ทั้งดีเอ็นเอเมทิลเลชันและดีเอ็นเออันเมทิลเลชัน ส่วนในหลุมที่ใช้อันเมทิลเลชันไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียงกับแถบดีเอ็นเอขนาดที่สนใจ ทั้งในหลุมที่เป็น Human methylated DNA และ Human non-methylated DNA แสดงให้เห็นว่าอันเมทิลเลชันไพรเมอร์ไม่จำเพาะต่อดีเอ็นเออันเมทิลเลชัน สามารถจับได้ทั้งดีเอ็นเอเมทิลเลชันและดีเอ็นเออันเมทิลเลชัน ดังนั้น ไพรเมอร์ชุดที่ 2 จึงไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ตรวจสอบเมทิลเลชัน เนื่องจากขาดความจำเพาะระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอ จึงทำให้เกิดการออกแบบไพรเมอร์ชุดที่ 3 เพิ่มความจำเพาะระหว่างเมทิลเลชันไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเมทิลเลชัน และเพิ่มความจำเพาะระหว่างอันเมทิลเลชันไพรเมอร์กับดีเอ็นเออันเมทิลเลชัน เพิ่มความแตกต่างระหว่างเมทิลเลชันไพรเมอร์และอันเมทิลเลชันไพรเมอร์ โดยเพิ่มตำแหน่ง CpG ในไพรเมอร์ที่ออกแบบจาก 3 ตำแหน่ง เป็น 4 ตำแหน่ง

ผลจากการทดลอง gradient PCR ครั้งที่ 5 สำหรับทดสอบไพรเมอร์ชุดที่ 3 ในหลุมที่ใช้เมทิลเลชันไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่สนใจในหลุมที่เป็น Human non-methylated DNA แสดงให้เห็นว่า เมทิลเลชันไพรเมอร์ไม่จำเพาะต่อดีเอ็นเอเมทิลเลชัน สามารถจับดีเอ็นเออันเมทิลเลชันได้ และหลุมที่ใช้อันเมทิลเลชันไพรเมอร์ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดที่สนใจ พบแต่แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 40 กว่าเบส แถบดีเอ็นเอที่พบน่าจะเป็นผลมาจากไพรเมอร์สามารถจับกันตัวเอง หรือ primer dimer จึงทำให้เกิดการออกแบบไพรเมอร์ชุดที่ 4 และ 5 โดยเพิ่มตำแหน่ง CpG จาก ตำแหน่งเป็น 5 ตำแหน่ง เพื่อเพิ่มความแตกต่างระหว่างเมทิลเลชันไพรเมอร์และอันเมทิลเลชันไพรเมอร์

ผลจากการทดลองครั้งที่ 6 สำหรับการทดสอบไพรเมอร์ชุดที่ 4 ทั้งเมทิลเลชันไพรเมอร์และอันเมทิลเลชันไพรเมอร์ ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดที่สนใจ พบแต่แถบดีเอ็นเอขนาดที่ไม่สนใจขนาดประมาณ 50 เบส ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากไพรเมอร์สามารถจับกันตัวเอง หรือ primer dimer จึงทำให้เกิดการทดสอบไพรเมอร์ชุดที่ 5 ต่อไป

ผลจากการทดลองครั้งที่ 7 สำหรับการทดสอบไพรเมอร์ชุดที่ 5 ทั้งเมทิลเลชันไพรเมอร์และอันเมทิลเลชันไพรเมอร์ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดที่สนใจ พบแต่แถบขนาดประมาณ 60 และ 50 ตามลำดับ ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากไพรเมอร์สามารถจับกันตัวเอง หรือ primer dimer เช่นเดียวกับไพรเมอร์ชุดที่ 3 และ 4

เมื่อการออกแบบไพรเมอร์ด้วยตัวเองไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบเมทิลเลชันของยีน *DIO2* จึงทำให้เกิดการออกแบบไพรเมอร์โดยอาศัยซอฟต์แวร์ ได้แก่ Methprimer, Bisearch, Primo MSP และ MSP primer พบว่าทั้ง 4 ซอฟต์แวร์ไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับยีน *DIO2* ได้ จึงทำให้เกิดการประเมินบริเวณอื่นนอกเหนือจากบริเวณที่เคยออกแบบไพรเมอร์ โดยเพิ่มการพิจารณาจาก -1000 เบส จาก TSS จนถึง +500 เบส เป็น -2500 เบส จาก TSS จนถึง +500 เบส ซึ่งยังเป็นบริเวณที่เหมาะสมแก่การออกแบบไพรเมอร์ เนื่องจากเป็นบริเวณดังกล่าวใกล้กับ TSS มีบทบาทสำคัญและมักส่งผลกระทบต่อการถอดรหัสของยีน (Radoslav and others, 2014) แต่พบว่าบริเวณที่พิจารณาเพิ่มมีตำแหน่งของ CpG น้อยเกินไป ทั้งเมื่อนำบริเวณดังกล่าวมาออกแบบไพรเมอร์ พบว่ามักจะมี Tm น้อยกว่า 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการเปลี่ยนจากดีเอ็นเอสายคู่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว รวมถึงส่งผลกระทบต่อ การจับของไพรเมอร์กับบริเวณดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ดังนั้นเทคนิค MSP อาจจะไม่เหมาะสม

ในการวิเคราะห์เมทิลเลชันของยีน *DIO2* ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม สำหรับข้อแนะนำในตรวจสอบเมทิลเลชันของยีน *DIO2* โรคข้อเข่าเสื่อม จากการรวบรวมข้อมูลการศึกษาเมทิลเลชันของยีน *DIO2* ในโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่า 4 ใน 6 งานวิจัยก่อนหน้านี้ ศึกษาโดยใช้วิธี EpiTYPER® DNA Methylation Analysis (Agena bioscience, USA) จึงเป็นวิธีที่ผู้ทดลองแนะนำให้ใช้ตรวจสอบเมทิลเลชันของยีนนี้ แต่หากต้องการตรวจสอบด้วยเทคนิค MSP ต่อควรขยายบริเวณที่ออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณไพรโมเตอร์ของยีนให้ครอบคลุมถึงบริเวณ exon ที่ 1 เนื่องจาก RNA polymerase ที่ทำการถอดรหัสของยีนไม่ได้จับเฉพาะบริเวณไพรโมเตอร์แต่ยังจับบริเวณ exon ที่ 1 ของยีนด้วยเช่นกัน และสำหรับการ gradient PCR ควรลดอุณหภูมิ annealing ลงมา ควรเริ่ม gradient PCR ตั้งแต่ 40 องศาเซลเซียส เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอเมทิลเลชันและดีเอ็นเออันเมทิลเลชันให้ได้เป็นอันดับแรก

สรุปผล

การทดลองในครั้งนี้ไม่สามารถตรวจสอบเมทิลเลชันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเทียบกับกลุ่มควบคุมได้ เนื่องจากพบปัญหาและอุปสรรคอยู่ในขั้นตอนออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิค MSP ผลจากการทดลอง gradient PCR แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ทั้ง 5 ชุดไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบเมทิลเลชันไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ชุดที่ 1 มีขนาด PCR products ใหญ่เกินไป ไพรเมอร์ชุดที่ 2 และ 3 ชนิดไพรเมอร์ไม่จำเพาะต่อชนิดดีเอ็นเอ ส่วนไพรเมอร์ชุดที่ 4 และ 5 เกิดไพรเมอร์จับกันเอง ทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถจับดีเอ็นเอบริเวณที่สนใจได้ รวมถึงลำดับเบสของยีน *DIO2* มีลำดับเบสอะดีนีนและไทมีนซ้ำเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้ต่อการจำเพาะของไพรเมอร์ อุณหภูมิ melting temperature (T_m) รวมไปถึงประสิทธิภาพการทำงานของ *Taq* DNA polymerase ดังนั้นเทคนิค MSP อาจจะไม่เหมาะสมในการวิเคราะห์เมทิลเลชันของยีน *DIO2* โดยวิธีที่แนะนำให้ใช้ตรวจสอบเมทิลเลชันของยีน *DIO2* คือ EpiTYPER® DNA Methylation Analysis (Agena bioscience, USA)

เอกสารอ้างอิง

- โชตทิภา หยกทองวัฒนา. 2554. เอพิเจเนติก-การควบคุมเหนือลำดับดีเอ็นเอ. *Thai Journal of Genetics* 4 : 71-84.
- ชาติรี โปสิทธิพิเชษฐ. 2560. การศึกษาความชุกของโรคข้อเข่าเสื่อมในผู้สูงอายุ ในศูนย์เวชปฏิบัติครอบครัว จังหวัดพระนครศรีอยุธยา. *วารสารสมาคมเวชศาสตร์ป้องกันแห่งประเทศไทย* 7 : 1-10.
- ปารวีร์ มั่นพัก, ชาติรี สุพรธมา, สุวัฒนา เกิดม่วง, อนุสรรา คงบัว และอรนุช นุ่นละออง. 2561. ผลของโปรแกรมการบริหารกล้ามเนื้อเข่าด้วยยางยืดต่อการบรรเทาความรุนแรงของภาวะข้อเข่าเสื่อมในผู้สูงอายุ อำเภอ นະโฌง จังหวัดชัยนาท. *วารสารการพัฒนาสุขภาพชุมชน มหาวิทยาลัยขอนแก่น* 6 : 93-108.
- รังสิยา นารินทร์, วิลาวัลย์ เตือนราษฎร์ และวราภรณ์ บุญเชียง. 2558. การพัฒนาโปรแกรมดูแลผู้สูงอายุข้อเข่าเสื่อมโดยการมีส่วนร่วมของชุมชน. *พยาบาลสาร* 42 : 170-181.
- ศุภฤทธิ เสงคราวิทย์. 2560. การป้องกันและชะลอภาวะข้อเข่าเสื่อมในผู้สูงอายุวัยต้นในจังหวัดนครปฐม. *วารสารวิชาการสาธารณสุข* 26 : 105-110.
- Abbate, L.M., and others. 2006. Anthropometric measures, body composition, body fat distribution, and knee osteoarthritis in women. *Obesity* 14 : 1274-1281.
- Aftab, A., Siddiqui, F.A., Babur, M.N., and Memon, A.R. 2015. Risk factors in the development of knee osteoarthritis: a case-control study. *International Journal of Rehabilitation Sciences* 4 : 7-10.
- Alshami, A.M. 2014. Knee osteoarthritis related pain: a narrative review of diagnosis and treatment. *International Journal of Health Sciences* 8 : 85-104.
- Arden, N., and Nevitt, M.C. 2006. Osteoarthritis: epidemiology. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 20 : 3-25.
- Blanco, F.J., and Rego-Pérez, I. 2014. Editorial: is it time for epigenetics in osteoarthritis?. *Arthritis & Rheumatology* 66 : 2324-2327.
- Bomer, N., and others. 2015. Underlying molecular mechanisms of DIO2 susceptibility in symptomatic osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 74 : 1571-1579.
- Bonin, C.A., and others. 2016. Identification of differentially methylated regions in new genes associated with knee osteoarthritis. *Gene* 576 : 312-318.
- Bos, S.D., and others. 2009. 373 DIO2 methylation in articular cartilage and whole blood. *osteoarthritis and Cartilage* 17 : S197.

- Buckwalter, J.A., Saltzman, C., and Brown, T. 2004. The impact of osteoarthritis: implications for research. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 427 : S6-S15.
- Castaño-Betancourt, M.C., and others. 2016. Novel genetic variants for cartilage thickness and hip osteoarthritis. *the non-profit organization Public Library of Science Genetics* 12 : e1006260.
- Chapmana, K., and Valdesb, A.M. 2012. Genetic factors in OA pathogenesis. *Bone* 51 : 258-264.
- Chu, C.R., Williams, A.A., Coyle, C.H., and Bowers, M.E. 2012. Early diagnosis to enable early treatment of pre-osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy* 14 : 212.
- Culvenor, A.G., and others. 2017. Thigh muscle specific-strength and the risk of incident knee osteoarthritis: the influence of sex and greater body mass index. *Arthritis Care & Research* 69 : 1266-1270.
- Dodd, A.W., Syddall, C.M., and Loughlin, J. 2013. A rare variant in the osteoarthritis-associated locus GDF5 is functional and reveals a site that can be manipulated to modulate GDF5 expression. *European Journal of Human Genetics* 21 : 517-521.
- Driban, J.B., and others. 2015. Knee pain and a prior injury are associated with increased risk of a new knee injury: data from the osteoarthritis initiative. *The Journal of Rheumatology* 42 : 1463-1469.
- Duarte, A.M. 2018. DNA methylation in osteoarthritis: current status and therapeutic implications. *The Open Rheumatology Journal* 12 : 37-49.
- Felson, D.T., Goggins, J., Niu, J., Zhang, Y., and Hunter, D.J. 2004. The effect of body weight on progression of knee osteoarthritis is dependent on alignment. *Arthritis & Rheumatology* 50 : 3904-3909.
- Fransen, M., and others. 2011. The epidemiology of osteoarthritis in Asia. *International Journal of Rheumatic Diseases* 14 : 113-121.
- Glyn, S., and others. 2015. Osteoarthritis. *Lancet* 386 : 376-387.
- Guermazi, A., Hunter, D.J., and Roemer, F.W. 2009. Plain radiography and magnetic resonance imaging diagnostics in osteoarthritis: validated staging and scoring. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 91 : 54-62.
- Heidari, B. 2011. Knee osteoarthritis prevalence, risk factors, pathogenesis and features: part I. *Caspian Journal of Internal Medicine* 2 : 205-212.

- Heidari, B. 2011. Knee osteoarthritis diagnosis, treatment and associated factors of progression: part II. *Caspian Journal of Internal Medicine* 2 : 249-255.
- Herman, J.G., Graff, J.R., Myöhänen, S., Nelkin, B.D., and Baylin, S.B. 1996. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 : 9821–9826.
- Hollander, W.D., and others. 2012. CpG sites of osteoarthritis susceptibility gene *DIO2* are differentially methylated in arthritic compared to preserved cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 20 : S196.
- Hollander, W.D. 2013. *DIO2* is epigenetically regulated by CPG methylation in articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 21 : S26-S27.
- Hollander, W.D., and Meulenbelt, I. 2015. DNA methylation in osteoarthritis. *Current Genomics* 16 : 419-426.
- Jin, B., Li, Y., and Robertson, K.D. 2011. DNA methylation. *Genes Cancer* 2 : 607–617.
- Laird, P.W. 2010. Principles and challenges of genome wide DNA methylation analysis. *Nature Reviews* 11 : 191–203.
- Lespasio, M.J., and others. 2017. Knee osteoarthritis: a primer. *The Permanente Journal* 21 : 16-183.
- Meulenbelt, I., and others. 2008. Identification of *DIO2* as a new susceptibility locus for symptomatic osteoarthritis. *Human Molecular Genetics* 17 : 1867-1875.
- Murphy, L., and others. 2008. Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheumatism* 59 : 1207-1213.
- Nagase, H., and others. 2013. Deiodinase 2 upregulation demonstrated in osteoarthritis patients cartilage causes cartilage destruction in tissue-specific transgenic rats. *Osteoarthritis and Cartilage* 21 : 514-523.
- Nguyen, T.V. 2014. Osteoarthritis in southeast Asia. *International Journal of Clinical Rheumatology* 9 : 405-408.
- Nimit-arnun, N. 2014. The epidemiological situation and risk assessment of knee osteoarthritis among Thai people. *Journal of The Royal Thai Army Nurses* 15 : 185-194.
- Peffer, M.J., Balaskas, P., and Smagul, A. 2018. Osteoarthritis year in review 2017: genetics and epigenetics. *Osteoarthritis and Cartilage* 26 : 304-311.

- Pongtheerat, T., Pakdeethai, S., Purisa, W., Chariyalertsak, S., and Petmitr, S. 2011. Promoter methylation and genetic polymorphism of glutathione s-transferase p1 Gene (*GSTP1*) in Thai breast cancer patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 12 : 2731-2634.
- Poonpet, T., Honsawek, S., Tammachote, N., Kanitnate, S., and Tammachote, R. *ADAMTS14* gene polymorphism associated with knee osteoarthritis in Thai women. *Genetics and Molecular Research* 12 : 5301-5309.
- Radoslav, S.D., Ana, M.B., MandušićMilena, M.K. 2014. Methylation-specific PCR: four steps in primer design. *Central European Journal of Biology* 9 : 1127–1139.
- Ringdahl, E., and Pandit, S. 2011. Treatment of knee osteoarthritis. *American Family Physician* 83 : 1287-1292.
- Rushton, M.D., and others. 2015. Methylation quantitative trait locus analysis of osteoarthritis links epigenetics with genetic risk. *Human Molecular Genetics* 24 : 7432-7444.
- Saberi, E., Kordi-Tamandani, D.M., Jamali, S., Rigi-Ladiz, M.A. 2014. Analysis of methylation and mRNA expression status of *FADD* and *FAS* genes in patients with oral squamous cell carcinoma. *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal* 19 : E562-568.
- Satayavongthip, B., Kerdchantuk, P., Hanrinth, R., Methieng, T., and Khunpimul, P. 2011. Development of the Thai knee osteoarthritis screening questionnaire (Thai-KOA-SQ) in Kanleung sub-district, Nakronpanom province. *Journal of the Medical Association of Thailand* 94 : 947-951.
- Shen, J., and Chen, D. 2014. Recent progress in osteoarthritis research. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 22 : 467-468.
- Sinusas, K. 2012. Osteoarthritis: diagnosis and treatment. *American Family Physician* 85 : 49-56.
- Spector, T.D., and MacGregor, A.J. 2004. Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis and Cartilage* 12 : S39-S44.
- Sukumaran, S. 2011. Concentration determination of nucleic acids and proteins using the micro-volume bio-spec nano spectrophotometer. *Journal of Visualized Experiments* 48 : 2699.
- Tammachote, R. 2011. The genetics behind osteoarthritis: Asian focus. *Asian Biomedicine* 5 : 23-36.

- Tangtrakulwanich, B., Geater, A.F., and Chongsuvivatwong, V. 2006. Prevalence, patterns, and risk factors of knee osteoarthritis in Thai monks. *International Journal of Orthopaedics Sciences* 11 : 439-445.
- Thomas, K.S., and others. 2002. Home based exercise programme for knee pain and knee osteoarthritis: randomised controlled trial. *British Medical Journal* 325 : 752.
- Valdes, A.M., and others. 2012. Genetic contribution to radiographic severity in osteoarthritis of the knee. *Annals of the Rheumatic Diseases* 71 : 1537-1540.
- Yoshimura, N., and others. 2006. Risk factors for knee osteoarthritis in Japanese men: a case-control study. *Modern Rheumatology* 16 : 24-29.
- Zhang, L., and others. 2017. Identification of pathogenic genes related to rheumatoid arthritis through integrated analysis of DNA methylation and gene expression profiling. *Gene* 634 : 62-67.