

ดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเม็ดเลือดขาวและเซลล์เยื่อบุช่องของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม



นางสาวนิภาภรณ์ อีระวัฒนพงศ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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 University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DNA methylation in blood leukocytes and synovial fibroblasts of
knee osteoarthritis patients

Miss Nipaporn Teerawattanapong



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ตีเอ็นเอเมทิลเลชันในเม็ดเลือดขาวและเซลล์เยื่อบุช่องของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม
โดย	นางสาวนิภาภรณ์ ชีระวัฒนพงศ์
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ ธรรมชาติ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์สิทธิ์ งามอุโฆษ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธัญญา ทองตัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ ธรรมชาติ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์สิทธิ์ งามอุโฆษ)

.....กรรมการ
(ดร.นพิต จันทรวิสูตร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.วันวิสาข์ อุดมสินประเสริฐ)

นิภาภรณ์ ชีระวัฒนพงศ์ : ดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเม็ดเลือดขาวและเซลล์เยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้อ
 เข้าเสื่อม (DNA methylation in blood leukocytes and synovial fibroblasts of knee
 osteoarthritis patients) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. ดร. นพ.สิทธิศักดิ์ ทรราชเวก, อ.ที่
 ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. นพ.สีหัช งามอุโฆษ, 127 หน้า.

โรคข้อเข้าเสื่อมเกิดจากการอักเสบเรื้อรังภายในข้อทำให้กระดูกอ่อนผิวข้อเสื่อมสภาพ และมีการ
 งอกของเนื้อกระดูกบริเวณข้อบวม และการอักเสบบริเวณเยื่อข้อ โดยพบมากในผู้สูงอายุ กระบวนการ
 อักเสบภายในข้อของผู้ป่วยมีผลต่อการความไม่สมดุลของจีโนม การแสดงออกของยีนภายในร่างกาย ซึ่ง
 เกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมของ DNA methylation ผ่านกลไกของ epigenetics อย่างไรก็ตาม
 การศึกษา LINE-1 methylation กับระดับความรุนแรงของโรคข้อเสื่อมยังมีจำนวนน้อย การศึกษานี้มี
 วัตถุประสงค์เพื่อตรวจวัดระดับ LINE-1 methylation และความยาวเทโลเมียร์ (relative telomere
 length, RTL) ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข้าเสื่อม และศึกษาผลของ tumor necrosis factor-
 α (TNF- α) ภาวะเครียดออกซิเดชัน (H_2O_2) และสารต้านอนุมูลอิสระ (tocopheryl acetate, TA) ต่อ
 ระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เยื่อข้อ รวมถึงระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค
 ข้อเสื่อม โดยวิเคราะห์ระดับ LINE-1 methylation ด้วย combined bisulfite restriction analysis
 (COBRA) LINE-1 และวัดระดับการแสดงออกของยีนและ RTL ด้วย quantitative real-time polymerase
 chain reaction (qRT-PCR) ผลการศึกษาพบระดับ LINE-1 methylation ต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์
 เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข้าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P=0.008$) นอกจากนี้ LINE-1
 methylation ($r = -0.300, P < 0.001$) และความยาวเทโลเมียร์ ($r = -0.361, P < 0.01$) มีความสัมพันธ์เชิง
 ลบกับระดับความรุนแรงของโรคข้อเสื่อมโดยเกณฑ์ภาพถ่ายรังสี Kellgren-Lawrence (KL) grading แต่ไม่
 มีความสัมพันธ์ทางสถิติกับข้อมูลทางคลินิก แบบประเมิน VAS scores, KOOS, WOMAC และ Lesquense
 index ในผู้ป่วยโรคข้อเข้าเสื่อม และระดับ LINE-1 hypomethylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวส่งผลต่อความ
 เสี่ยงของการเกิดโรคข้อเข้าเสื่อมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (OR=1.97; 95%CI 1.11-3.49; $P=0.02$) ส่วน
 เซลล์เยื่อข้อมีระดับ LINE-1 methylation แนวน้อยต่ำลงในระยะเวลา 1 วัน หลังจากได้รับ 10 ng/ml
 TNF- α , 100 μ M H_2O_2 และ pre-treatment ด้วย 50 μ M TA ในทางกลับกันเซลล์เยื่อข้อในกลุ่มที่ได้รับ
 10 ng/ml TNF- α มีระดับการแสดงออกของยีน *IL-1 β* , *IL-6*, *MMP-3* และ *VEGF* สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ
 กลุ่มควบคุม ผลการศึกษานี้ทำให้สรุปได้ว่า LINE-1 methylation อาจมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการ
 อักเสบและอาจนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้การดำเนินไปของผู้ป่วยโรคข้อเข้าเสื่อม

ภาควิชา ชีวเคมี

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5974009130 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: LINE-1, METHYLATION, BLOOD LEUKOCYTES, SYNOVIAL FIBROBLASTS, TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA, KNEE OSTEOARTHRITIS

NIPAPORN TEERAWATTANAPONG: DNA methylation in blood leukocytes and synovial fibroblasts of knee osteoarthritis patients. ADVISOR: PROF.SITTISAK HONSAWEK, M.D., Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF.SRIHATACH NGARMUKOS, M.D., 127 pp.

Knee osteoarthritis (OA) is the most common of chronic inflammatory joint disease in elderly people. Chronic inflammation causes articular cartilage degradation, subchondral sclerosis and synovial membrane inflammation. DNA methylation is one of epigenetic mechanisms for regulation of gene expression and genomic stability which have been implicated in several diseases. However, there have been few studies of LINE-1 methylation in blood leukocytes and synovial fibroblasts (SFs) in knee OA patients. The purposes of this study were to investigate LINE-1 methylation and relative telomere length (RTL) in blood leukocytes of knee OA patients and to determine LINE-1 methylation and expression of inflammatory genes in SFs after treatment with tumor necrosis factor- α (TNF- α), H₂O₂ and tocopheryl acetate (TA). LINE-1 methylation levels were assessed using combined bisulfite restriction analysis (COBRA) LINE-1. Furthermore, the relative mRNA expression and RTL were analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The results showed that LINE-1 methylation was significantly decreased in blood leukocytes of OA patients compared to the controls ($P=0.008$). LINE-1 methylation and RTL were negatively correlated with radiographic severity ($r = -0.300, P < 0.001$ and $r = -0.361, P < 0.01$, respectively). Further analysis revealed that there was no association of these factors with VAS scores, KOOS, WOMAC and Lesquense index in knee OA patients. LINE-1 methylation in blood leukocytes was observed to be associated with elevated risk of knee OA (OR=1.97; 95%CI 1.11-3.49; $P=0.02$). In addition, LINE-1 hypomethylation was found in SFs treated with 10 ng/mL TNF- α , 100 μ M H₂O₂ and 50 μ M TA compared with control group for 24 hours. Relative mRNA expression of *IL-1 β* , *IL-6*, *MMP-3* and *VEGF* were increased in TNF- α stimulated SFs. These findings suggest that LINE-1 methylation might be regulate inflammatory response and could be used as a biomarker indicating the progression of knee OA.

Department: Biochemistry

Student's Signature

Field of Study: Medical Biochemistry

Advisor's Signature

Academic Year: 2017

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์และเสร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจากหลายฝ่ายอย่างดียิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ให้คำปรึกษาในการทำวิจัย แนะนำในหลายด้าน พร้อมทั้งให้ความช่วยเหลือแก้ไขปัญหาและอุปสรรคที่เกิดขึ้น อีกทั้งยังเป็นแบบอย่างที่ดีในการศึกษาและการทำงานให้กับผู้เขียน ตลอดจนช่วยผลักดันให้ผู้เขียนตั้งใจและเอาใจใส่การทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนสำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณนายแพทย์สีหัช งามอุโฆษ ที่กรุณาได้รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมและให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างตลอดการทำวิจัยครั้งนี้ รวมถึงให้คำปรึกษาและชี้แนะในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนสำเร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธัญญา ทองตัน ประธานการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. นภัต จันทรวิสูตร และอาจารย์ ดร. วันวิสาข์ อุดมสินประเสริฐ ที่ยินดีเป็นกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ อีกทั้งช่วยชี้แนะให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์และเหมาะสมมากยิ่งขึ้น และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนและมอบความรู้อันมีค่าให้กับผู้เขียนตลอดเวลา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชั้นสูงตร โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่อำนวยความสะดวกและช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม รวมถึงเจ้าหน้าที่ พยาบาล และแพทย์ประจำบ้านจากฝ่ายออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำแบบประเมินผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมตลอดการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษาและเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในทุกด้าน

ขอขอบพระคุณทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ที่สนับสนุนค่าใช้จ่ายด้านสารเคมีตลอดการทำวิจัยครั้งนี้ และศูนย์เครื่องมือกลาง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chula MRC) ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือในการทำวิจัย

ขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ให้คำปรึกษาและคอยให้กำลังใจ ตลอดจนขอบคุณพี่ และเพื่อน ในระดับปริญญาโท และปริญญาเอกสำหรับกำลังใจที่ดี

สุดท้ายนี้ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และพี่สาว ที่เป็นแรงผลักดัน ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูป	ญ
สารบัญตาราง.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
คำถามการวิจัย	5
วัตถุประสงค์ของโครงการ.....	5
สมมติฐานการวิจัย	5
ขอบเขตของการวิจัย.....	6
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	6
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	7
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย	8
วิธีดำเนินการวิจัย	9
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	10
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	11
โรคข้อเข่าเสื่อม (Knee Osteoarthritis)	11
DNA methylation.....	23
Long interspersed nuclear element-1 (LINE-1).....	26
ความยาวเทโลเมียร์ (telomere length).....	29

ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress).....	31
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	33
ประชากร.....	33
1. กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target Population).....	33
2. กลุ่มประชากรควบคุม (Healthy controls)	33
3. ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample Size).....	33
4. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	34
5. แบบประเมินส่วนบุคคล (Self-report assessment by questionnaire)	36
6. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (Reagents).....	36
7. การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	40
8. การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ.....	40
9. การวิเคราะห์ข้อมูล.....	58
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	59
ผลการวิเคราะห์.....	59
1. การศึกษาระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย	59
โรคข้อเข่าเสื่อมด้วยเทคนิค quantitative combine bisulfite restriction	59
analysis (qCOBRA)	59
2. การศึกษาระดับ LINE-1 methylation และความยาวเทโลเมียร์ใน	67
เซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ข้อมูลทางคลินิก และข้อมูล	67
แบบประเมินอาการ ความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อม.....	67
3. การศึกษาระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เยื่อข้อของผู้ป่วย.....	77
โรคข้อเข่าเสื่อม.....	77
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย การอภิปรายข้อมูล	86

สรุปผลการวิจัย.....	86
อภิปรายผลการทดลอง.....	88
ข้อเสนอแนะ.....	94
รายการอ้างอิง.....	96
ภาคผนวก.....	108
ภาคผนวก ก.....	109
ภาคผนวก ข.....	125
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	127



สารบัญรูป

รูปที่ 1	โครงสร้างของข้อเขาที่เกิดพยาธิสภาพในโรคข้อเข่าเสื่อม	2
รูปที่ 2	ภาพถ่ายรังสีแสดงระดับความรุนแรงของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม.....	15
รูปที่ 3	การเปรียบเทียบระหว่างเยื่อข้อ เนื้อเยื่อข้างเคียงของข้อปกติเปรียบเทียบกับข้ออักเสบ	18
รูปที่ 4	กระบวนการ DNA methylation บนเบสไซโตซีน.....	24
รูปที่ 5	กระบวนการ DNA methylation บริเวณ CpG island ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน	24
รูปที่ 6	โครงสร้างของ LINE-1.....	26
รูปที่ 7	กลไกของ L1 retrotransposition	27
รูปที่ 8	โครงสร้าง t-loop และส่วนประกอบของโปรตีนใน shelterin complex.....	30
รูปที่ 9	LINE-1 methylation จาก PCR product ในตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะแล้วตรวจวิเคราะห์ด้วย 8% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis.....	60
รูปที่ 10	ระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 193 รายที่วิเคราะห์ เปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมจำนวน 96 ราย.....	61
รูปที่ 11	ระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 104 รายที่วิเคราะห์ เปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมที่มีอายุเข้าคู่กันจำนวน 96 ราย.....	62
รูปที่ 12	ระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมกลุ่มเพศชายและเพศหญิง	63
รูปที่ 13	ระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมในแต่ละระดับความรุนแรง KL grading 2, 3 และ 4 กับกลุ่มควบคุม.....	64
รูปที่ 14	ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 193 ราย และระดับความรุนแรงตามเกณฑ์ KL grading.....	65

รูปที่ 15 กราฟ ROC curve แสดงถึงความไวและความจำเพาะของระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาว	66
รูปที่ 16 ความยาวเทโลเมียร์ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่มีอายุเข้าคู่กับกลุ่มควบคุม.....	69
รูปที่ 17 ความยาวเทโลเมียร์ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมระดับความรุนแรง 2, 3 และ 4.....	70
รูปที่ 18 ความสัมพันธ์ของความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและระดับความรุนแรงของโรค 2, 3 และ 4.....	71
รูปที่ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE-1 methylation และความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	72
รูปที่ 20 จำนวนเซลล์เยื่อข้อหลังจากได้รับ 10 ng/ml TNF- α ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน คือ 1, 3 และ 7 วัน	77
รูปที่ 21 ความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α ในระยะเวลา 1, 3 และ 7 วัน	78
รูปที่ 22 ระดับ LINE-1 methylation ของเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α ในระยะเวลา 1, 3 และ 7 วัน	78
รูปที่ 23 ระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α ในระยะเวลา 1, 3 และ 7 วัน	80
รูปที่ 24 จำนวนเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α , 100 μ M H ₂ O ₂ และ 50 μ M TA ระยะเวลา 1 วัน	81
รูปที่ 25 LINE-1 methylation จาก PCR product ในตัวอย่างเซลล์เยื่อข้อ ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะและวิเคราะห์ด้วย 8% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis.....	82
รูปที่ 26 ระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เยื่อข้อที่หลังจากได้รับ 10 ng/ml TNF- α , 100 μ M H ₂ O ₂ และ pre-treatment ด้วย 50 μ M tocopheryl acetate ในระยะเวลา 1 วัน	83

รูปที่ 27 ระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์เยื่อบุช่องที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α ,
100 μ M H₂O₂ และ pre-treatment ด้วย 50 μ M tocopheryl acetate ในระยะเวลา
1 วัน.....85



สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของ COBRA LINE-1.....45

ตารางที่ 2 สารเคมี และปริมาตรที่ใช้ในการทำ PCR ของ COBRA LINE-146

ตารางที่ 3 สภาวะและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ของ COBRA LINE-1.....47

ตารางที่ 4 สารเคมีที่ใช้ในการตัด PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของ LINE-1.....49

ตารางที่ 5 สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียม 8% non-denaturing polyacrylamide gel49

ตารางที่ 6 สารเคมี และปริมาตรที่ใช้ในการทำ cDNA.....52

ตารางที่ 7 สภาวะ และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาการแปรสภาพจาก RNA เป็น cDNA.....52

ตารางที่ 8 แสดง primers และสภาวะที่ใช้ในการวัดระดับการแสดงออกของยีน.....53

ตารางที่ 9 แสดงชนิดและปริมาณสารเคมีสำหรับเทคนิค quantitative real-time PCR ของยีน *IL-6*, *IL-1β*, *ADAMTs5* และ *MMP-3*54

ตารางที่ 10 แสดงชนิดและปริมาณสารเคมีสำหรับเทคนิค quantitative real-time PCR ของยีน *VEGF* 54

ตารางที่ 11 สภาวะและเวลาที่ใช้ในการทำ quantitative real-time PCR.....55

ตารางที่ 12 แสดง primer สำหรับการศึกษาคความยาวเทโลเมียร์ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR.....56

ตารางที่ 13 แสดงชนิดและปริมาณสารเคมีสำหรับการศึกษาคความยาวเทโลเมียร์ ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR.....56

ตารางที่ 14 แสดง condition สำหรับการศึกษาคความยาวเทโลเมียร์ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR.....57

ตารางที่ 15 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มควบคุม.....59

ตารางที่ 16 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ข้อมูลแบบประเมินอาการ ความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อม และลักษณะข้อมูลทางคลินิก.....68

ตารางที่ 17 ความสัมพันธ์แบบถดถอยเชิงเส้นตรงระหว่างระดับ LINE-1 methylation ความยาวเทโลเมียร์ และลักษณะข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	74
ตารางที่ 18 ความสัมพันธ์ของระดับ LINE-1 methylation ที่อาจสัมพันธ์กับความเสี่ยง ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	76
ตารางที่ 19 ความสัมพันธ์ของระดับความยาวเทโลเมียร์ที่อาจสัมพันธ์กับความเสี่ยงใน ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	76

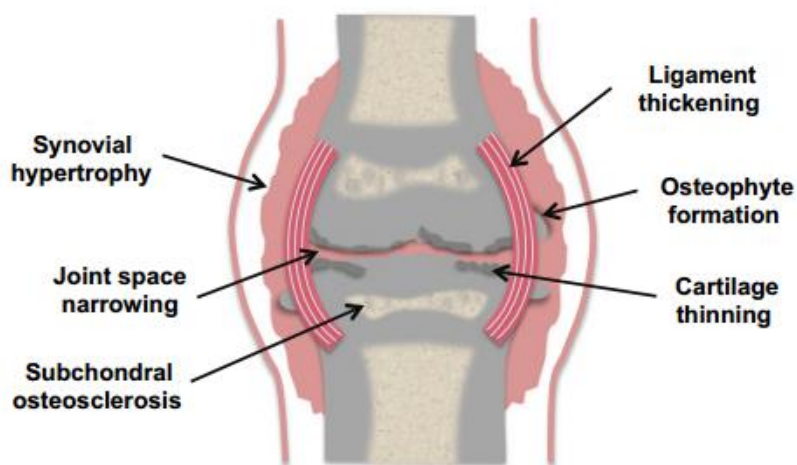


บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

โรคข้ออักเสบ (arthritis) คือ โรคที่เกิดจากความผิดปกติบริเวณข้อที่ส่งผลให้ประสิทธิภาพการใช้งานของข้อลดลง โรคข้ออักเสบมีหลายประเภทแบ่งตามสาเหตุการเกิด เช่น โรคข้อเสื่อม (osteoarthritis) โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) โรคเอสแอลอี (systemic lupus erythematosus, SLE) โรคเกาต์ และโรคเกาต์เทียม ปัจจุบันโรคข้อที่พบมากที่สุด คือ โรคข้อเข่าเสื่อม พบได้บ่อยในผู้สูงอายุ อายุมากกว่า 60 ปี จากสถิติผู้ป่วยโรคกระดูกและข้อในไทยปี พ.ศ.2553 พบว่าผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีมากกว่า 6 ล้านราย นอกจากนี้สถานการณ์ทางระบาดวิทยาขององค์การอนามัยโลก (WHO, พ.ศ.2546) คาดการณ์ว่าผู้ป่วยกระดูกและข้อโดยเฉพาะโรคข้อเข่าเสื่อมจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจาก 400 ล้านรายใน พ.ศ.2551 เป็น 570 ล้านรายใน พ.ศ. 2563 ซึ่งความผิดปกติของโรคข้อเสื่อมอักเสบพบได้ในหลายบริเวณของร่างกาย เช่น ข้อเข่า ข้อเท้า ข้อมือ ข้อสะโพก ข้อกระดูกสันหลัง เป็นต้น โดยโรคข้อเสื่อมอักเสบที่พบได้บ่อยคือ บริเวณข้อเข่า เนื่องจากเป็นบริเวณข้อเสื่อมที่ส่งผลต่อความรุนแรงและกระทบต่อการประกอบกิจวัตรประจำวัน นอกจากนี้ข้อเข่ายังเป็นบริเวณที่รับน้ำหนักทั้งร่างกาย รวมถึงเป็นส่วนหนึ่งของร่างกายที่ทำหน้าที่เคลื่อนที่ตลอดเวลา⁽¹⁾ อีกทั้งยังเป็นบริเวณที่เกิดการเสื่อมสภาพของกระดูกอ่อนผิวข้อ (articular cartilage) กระดูกที่อยู่ใต้ผิวข้อ (subchondral bone) ภาวะไม่สมดุลของการสร้างและการสลายกระดูก การสร้างกระดูกงอก (osteophyte formation) และการอักเสบบริเวณเยื่อข้อ ดังรูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงนี้ไม่สามารถเปลี่ยนกลับสู่สภาพเดิมได้ หรืออาจเกิดสภาพรุนแรงเพิ่มขึ้นตามลำดับ จึงส่งผลกระทบต่อเคลื่อนไหวของร่างกาย มีอาการเจ็บปวดตามข้อ และประสิทธิภาพในการทำงานต่างๆ ลดลง⁽¹⁾



รูปที่ 1 โครงสร้างของข้อเข่าที่เกิดพยาธิสภาพในโรคข้อเข่าเสื่อม⁽²⁾

โรคข้อเสื่อมอีกเสแแบ่งตามสาเหตุของการเกิดโรค 2 ประเภท คือ

- 1) ข้อเสื่อมปฐมภูมิ (primary osteoarthritis) เป็นชนิดที่เกิดขึ้นเองไม่เกี่ยวข้องกับสาเหตุอื่น เช่น พันธุกรรม และ epigenetic factors มักพบในผู้สูงอายุ และพบบ่อยในบริเวณเข่า ข้อกระดูกสันหลัง
- 2) ข้อเสื่อมทุติยภูมิ (secondary osteoarthritis) เป็นชนิดที่เกิดจากสาเหตุปัจจัยอื่นๆ เป็นตัวเหนี่ยวนำทำให้เกิดความผิดปกติของข้อและเป็นโรคข้อกระดูกเสื่อม คือ การเกิดอุบัติเหตุ การติดเชื้ภายในข้อ ภาวะอ้วน เพศ ความไม่สมดุลของเมแทบอลิกและฮอร์โมน มีผลึกแคลเซียมสะสมตามข้อ ทำให้เกิดข้ออักเสบ เป็นต้น⁽³⁾

กระบวนการเหนือพันธุกรรม (epigenetics) เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อพยาธิกำเนิดของการเกิดโรคข้อเสื่อม โดยการเปลี่ยนแปลงของกลไก epigenetics อาจเกิดจากปัจจัยเสี่ยง เช่น เพศ พันธุกรรม อายุ ภาวะอ้วน การบาดเจ็บ และกลไกที่ผิดปกติในร่างกาย เป็นต้น กลไกการทำงานของ epigenetics ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนบริเวณ transcription factors (TFs) การสร้างสารไซโตไคน์กลุ่ม pro-inflammatory หรือ anti-inflammatory สารกลุ่ม matrix metalloproteinases และโปรตีนใน extracellular matrix (ECM) ซึ่งการแสดงออกของกลุ่มยีนเหล่านี้อาจจะแสดงถึงระยะของการเกิดโรคข้อเสื่อมได้ รวมถึงการเกิดพยาธิสภาพของโรคข้อเสื่อมยังมีผลต่อเนื้อเยื่อรอบข้อ และการสลายตัวของกระดูกอ่อนผิวข้อจัดเป็นลักษณะที่สำคัญของการเกิดโรคข้อเสื่อม^(4, 5)

เมื่อผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเกิดพยาธิสภาพจากสาเหตุข้างต้น ส่งผลให้ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีอาการเจ็บปวดบริเวณข้อ ข้อฝืด ข้อเข่ายึดติด ข้อบวม ข้อเข่าโก่งงอ และข้อสูญเสียพิสัยการ

เคลื่อนไหว ข้อพิการ เป็นต้น การรักษาผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมอีกเสบขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรค เช่น การปรับเปลี่ยนพฤติกรรมในชีวิตประจำวัน การใช้ยาบรรเทาอาการปวดข้อ และการรักษาโดยการผ่าตัด เป็นต้น การตรวจวินิจฉัยความรุนแรงและโรคข้อเสื่อมอาศัยภาพถ่ายรังสีและตรวจทางห้องปฏิบัติการ เช่น การถ่ายภาพรังสี (X-rays) เอ็มอาร์ไอ (Magnetic Resonance Imaging, MRI) เจาะตรวจน้ำไขข้อ และการผ่าตัดส่องกล้องในข้อ ซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูงในการรักษา จึงมีการพัฒนาเทคนิควินิจฉัยและบ่งชี้ระดับความรุนแรงของโรค (biomarker) และช่วยตรวจติดตามผลการรักษาด้วยเทคนิคทางพันธุกรรม รวมทั้งประเมินและพยากรณ์ความรุนแรงของโรค

เทโลเมียร์ (telomere) คือ ส่วนที่อยู่ตรงปลายโครโมโซมของเซลล์ยูคาริโอต ประกอบด้วยลำดับกรดนิวคลีอิกที่ซ้ำ 5'-TTAGGG-3' และมีความยาวประมาณ 10-15 kb มีหน้าที่รักษาเสถียรภาพบนปลายโครโมโซมถูกทำลายจากปัจจัยต่างๆ เช่น ภาวะชราภาพ ภาวะกระตุ้นจาก reactive oxygen species (ROS) เป็นต้น การหดสั้นลงของเทโลเมียร์หรือเทโลเมียร์ไม่สามารถทำงานได้เป็นสัญญาณให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์เพิ่มขึ้นและเกิดเซลล์เสื่อมสภาพหรือเซลล์ตาย (apoptotic cell death) ส่งผลให้ความยาวของเทโลเมียร์มีความสำคัญต่อการควบคุมการทำงานของร่างกาย ได้แก่ กลไกควบคุม tumor suppressor จากการควบคุมเซลล์ชราภาพของ checkpoint ใน cell cycle หรือการที่เทโลเมียร์ถูกทำลายอาจส่งผลต่อโรคที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึม และกลไกการอักเสบของร่างกาย เป็นต้น เซลล์บางชนิดสามารถรักษาความยาวเทโลเมียร์ได้ เซลล์เหล่านี้มีกลไกในการเพิ่มความยาวของเทโลเมียร์ กลไกหนึ่งคือการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส ซึ่งทำหน้าที่ต่อสายของเทโลเมียร์บริเวณปลายโครโมโซม⁽⁶⁾

Long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) จัดอยู่ในกลุ่มของ non long terminal repeat (non-LTR) retrotransposons พบได้ทั่วไปในจีโนมของยูคาริโอต และมีลำดับที่ซ้ำกันมากกว่า 450,000 ชุด ในจีโนมของมนุษย์ สามารถเพิ่มจำนวนตัวเองได้อย่างอิสระ โดยในเซลล์ร่างกายจะยับยั้งการทำงานของ LINE-1 แบบ epigenetics ส่งผลให้การทำงานของ LINE-1 มีการเปลี่ยนแปลงของจีโนมภายในร่างกายทำให้เกิดการกลายพันธุ์ และมีการสะสมของยีนที่เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการแปรผันของจีโนม และทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคทางพันธุกรรมที่มีผลมาจาก LINE-1 เช่น โรคคะเร็ง โรคอัลไซเมอร์ โรคเบาหวาน เป็นต้น รวมทั้งยังพบการศึกษา LINE-1 ในโรคข้ออักเสบ การทำงานของ LINE-1 ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงจีโนมของร่างกายที่แตกต่างกันตามชนิดของโรคข้ออักเสบ⁽⁷⁾ และแปรผันต่อช่วงการพัฒนาที่ทำให้เกิดโรคข้ออักเสบ จึงทำให้มีการศึกษาเชิง epigenetics ของระดับ methylation ที่เปลี่ยนแปลงของ LINE-1⁽⁸⁾

Epigenetics คือ กระบวนการเปลี่ยนแปลงเหนือพันธุกรรม ซึ่งการแสดงออกของยีนที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมไม่ได้มีผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสบนสาย DNA กล่าวคือ การเปลี่ยนแปลงลักษณะนี้มีผลต่อลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของยีน (genotype) เกี่ยวข้องกับกระบวนการระดับเซลล์ โดยบางกรณี epigenetics สามารถเกิดขึ้นเองได้ตามธรรมชาติ หรือจากปัจจัยอื่น เช่น อายุ สิ่งแวดล้อม และการดำเนินชีวิต เป็นต้น ซึ่งประกอบไปด้วย 3 กระบวนการหลัก คือ DNA methylation, histone modification และ non-coding RNA (ncRNA) - associated gene silencing กระบวนการ DNA methylation เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับ epigenetics ที่มีการศึกษาจำนวนมาก มีกลไกที่สำคัญคือ การเติมหมู่เมทิล (-CH₃) บนสาย DNA บริเวณ CpG dinucleotides ทำให้เบส cytosine เปลี่ยนเป็น 5-methylcytosine (meC) บริเวณที่พบ CpG จำนวนมาก เรียกว่า CpG islands อยู่ติดกับ promoter มีประมาณร้อยละ 30 ของยีน การเกิด methylation ในบริเวณ CpG islands นี้มีความสัมพันธ์กับการยับยั้งการแสดงออกของยีนและหน้าที่สำคัญของ DNA methylation คือ การทำให้ transposon ไม่สามารถทำงานได้ ในเซลล์ปกติ บริเวณ CpG islands จะไม่มีหมู่เมทิล แต่บริเวณนี้จะถูกเติมหมู่เมทิลก็ต่อเมื่อเซลล์มีการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่ต่างๆ ตำแหน่ง CpG islands ที่อยู่ติดกันกับบริเวณที่มี CpG ต่ำ เรียกว่า CpG island shores ซึ่งบริเวณ shore มีเนื้อเยื่อจำนวนมากที่จำเพาะต่อการเกิด methylation และมีความสัมพันธ์กับการยับยั้งการถอดรหัสเป็น mRNA ที่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน⁽⁹⁾ การแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นหรือลดลงนั้นขึ้นอยู่กับระดับของการเกิด methylation โดยที่ DNA methylation สามารถแบ่งได้ 2 ประเภท คือ hypermethylation ซึ่งหมายถึง กลไกที่มีการเติมหมู่เมทิลที่สูงกว่าระดับปกติ และ hypomethylation หมายถึง กลไกที่มีการเติมหมู่เมทิลที่ต่ำกว่าระดับปกติ กลไกทั้ง 2 ประเภทนี้ สามารถพบในโรคข้ออักเสบของมนุษย์ นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงทาง epigenetics ยังส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในร่างกายแล้ว ยังมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเรื้อรังอื่นๆ เช่น โรคข้ออักเสบ โรคเบาหวาน และ โรคความดันโลหิตสูง เป็นต้น⁽¹⁰⁻¹²⁾ การควบคุมทาง epigenetics จึงมีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของร่างกายและพยาธิสภาพของการเกิดโรคข้ออักเสบ⁽⁴⁾ ปัจจุบันการศึกษากลไกการทำงานของ epigenetics ที่เกี่ยวข้องกับระดับความรุนแรงของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีการศึกษาจำนวนน้อยและยังไม่พบการศึกษาระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์เยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ทำให้มีความสนใจในการศึกษาระดับ LINE-1 methylation ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเพื่อนำกลไก epigenetics มาประยุกต์ใช้ในการศึกษากลไกและพัฒนาตัวบ่งชี้ในการตรวจติดตามการรักษา

คำถามการวิจัย

1. ระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาว (blood leukocytes) และเซลล์เยื่อข้อ (synovial fibroblasts) ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีความแตกต่างกันหรือไม่
2. ผลของไซโตไคน์ TNF- α , H₂O₂ และ pre-treatment ด้วย tocopheryl acetate (TA) ต่อระดับ LINE-1 methylation และระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมบริเวณเซลล์เยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างไร
3. ผลของไซโตไคน์ TNF- α , H₂O₂ และ pre-treatment ด้วย tocopheryl acetate (TA) ต่อระดับ LINE-1 methylation และระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์เยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มควบคุมมีความสัมพันธ์กันหรือไม่

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุม โดยอาศัยเทคนิค quantitative combine bisulfite restriction analysis (qCOBRA) มีความแตกต่างกันหรือไม่
2. เพื่อศึกษา LINE-1 methylation ในเซลล์เยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมกลุ่มที่ได้รับ TNF- α , H₂O₂ และ pre-treatment ด้วย tocopheryl acetate (TA)
3. เพื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มข้อเสื่อมอักเสบและกลุ่มข้อเสื่อมไม่อักเสบหลังจากได้รับไซโตไคน์ TNF- α ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR

สมมติฐานการวิจัย

1. ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจะมีระดับ LINE-1 methylation ลดลง ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุม
2. ระดับของ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์เยื่อข้อของผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมมีความสัมพันธ์กัน ซึ่งอาจนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวเคมี เพื่อพยากรณ์โรคข้อเข่าเสื่อมได้
3. สารไซโตไคน์ TNF- α และ H₂O₂ มีผลต่อระดับที่ลดลงของ LINE-1 methylation ในเซลล์เยื่อข้อ (synovial fibroblasts) ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมในกลุ่มที่ได้รับสารไซโตไคน์ TNF- α และ H₂O₂ จะมีระดับ LINE-1 methylation ที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

4. ระดับการแสดงออกของยีนกลุ่มที่สร้างสารไซโตไคน์ และกลุ่มยีนที่สร้างเอนไซม์ไปกระตุ้นการสลายของเซลล์กระดูกอ่อนในเซลล์เยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีระดับการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงหลังจากได้รับ TNF- α , H₂O₂ และ pre-treatment ด้วย tocopheryl acetate (TA)

ขอบเขตของการวิจัย

การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อข้อจากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ ซึ่งมีความจำเป็นต้องเข้ารับการผ่าตัด และชิ้นเนื้อที่เลือกเก็บเป็นชิ้นเนื้อที่ต้องผ่าตัดออกจากผู้ป่วยตามแผนการรักษา ซึ่งศัลยแพทย์เป็นผู้คัดเลือกกว่าชิ้นเนื้อดังกล่าวโดยดูลักษณะทางพยาธิกายวิภาค (gross pathology) โดยการศึกษาครั้งนี้ได้ดำเนินการเก็บชิ้นเนื้อเยื่อข้อจากอาการของโรคข้อเข่าเสื่อม และทำการเก็บเลือดผู้ป่วยจากฝ่ายเวชศาสตร์ชั้นสูตร โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ รวมถึงการประเมินอาการ และความรุนแรงของผู้ป่วยด้วยแบบประเมิน Knee and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) และ Osteoarthritis of the Knee by Lequesne (Knee ISOA) ส่วนในกลุ่มควบคุมทำการเก็บเลือดจากกลุ่มที่มีสุขภาพดีผู้ป่วย ไม่มีอาการของโรคข้อเสื่อม รวมถึงผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน ผู้ป่วยที่เคยได้รับบาดเจ็บบริเวณเข่า หรือผู้ป่วยที่เคยติดเชือบริเวณข้อ และมะเร็ง เป็นต้น

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. เครื่องมือและชุดการทดสอบต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำของการทดสอบเครื่องมือและชุดการทดสอบนั้นๆ
2. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยเป็นผู้ป่วยที่มารับการผ่าตัด ฝ่ายออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
3. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยให้ความร่วมมือด้วยความเต็มใจตลอดการศึกษาวิจัย โดยมีการลงลายมือชื่อในใบยินยอม (informed consent) ด้วยความสมัครใจภายหลังได้รับการชี้แจงให้ทราบในทุกด้าน ซึ่งรวมถึงความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น

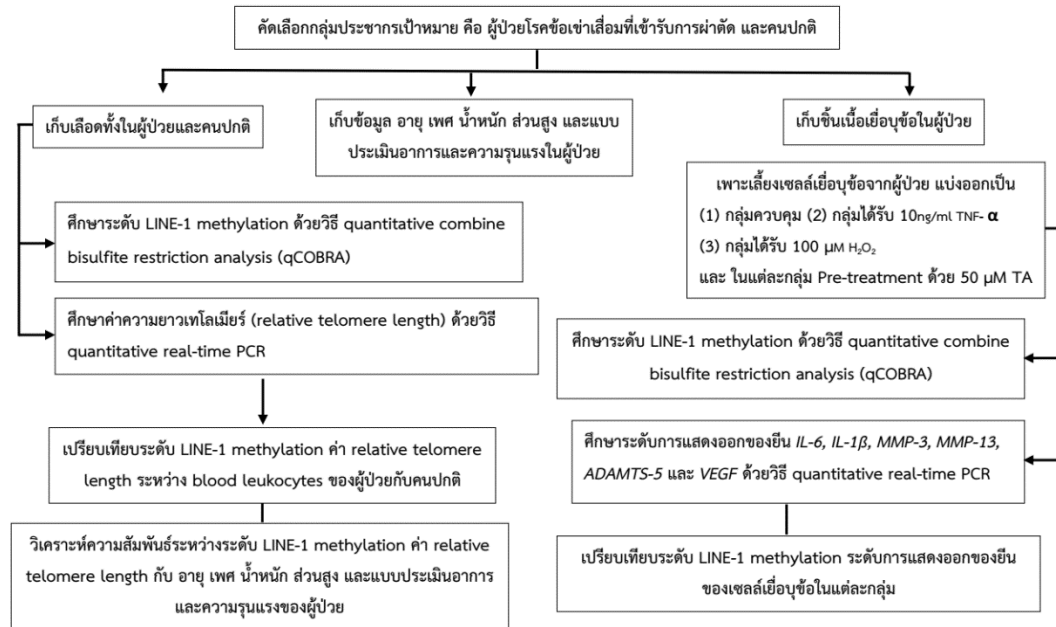
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

- Osteoarthritis (OA) หรือโรคข้อเสื่อม เป็นโรคที่เกิดจากการสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อ พบมากในผู้สูงอายุ และบริเวณที่มักมีการแสดงออกของโรคคือ ข้อเข่าและสะโพก สามารถจำแนกออกตามสาเหตุการเกิดโรคได้เป็นสาเหตุปฐมภูมิ และทุติยภูมิ
- Kellgren and Lawrence (KL) เป็นการประเมินความรุนแรงของโรคด้วยการวินิจฉัยจากภาพถ่ายรังสี แบ่งออกเป็น 4 ระดับความรุนแรง ซึ่งระดับ 4 เป็นระดับที่มีความรุนแรงมากที่สุด
- Bisulfite treatment เป็นการดิงหมู่เอมีน (-NH₂) ที่เบสไซโตซีน (cytosine) ออก ทำให้สามารถเปลี่ยนไปเป็นเบสยูราซิล (uracil) ได้ จึงนำมาประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ methylation ได้
- quantitative combine bisulfite restriction analysis (qCOBRA) คือ เทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของ bisulfite DNA เพื่อตรวจสอบระดับ methylation และรูปแบบการเกิด methylation
- quantitative real-time polymerase chain reaction เป็นการเพิ่มปริมาณ DNA หรือ RNA จากสายที่มีอยู่ก่อน โดยสามารถตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างที่กำลังดำเนินการอยู่
- Polyacrylamide gel electrophoresis เป็นเทคนิคที่ใช้แยก DNA ขนาดเล็กหรือการแยกโปรตีน ด้วยการอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของกระแสไฟฟ้า
- Synovial fibroblasts เป็นเซลล์เยื่อข้อที่อยู่บริเวณเยื่อข้อ (synovial membrane) มีหลอดเลือดจำนวนมากเป็นส่วนประกอบ และทำหน้าที่ในการสร้างน้ำไขข้อ (synovial fluid)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ศึกษาเกี่ยวกับระดับของ LINE-1 methylation ของ blood leukocytes ในผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม ซึ่งการวิจัยนี้สามารถแสดงให้เห็นระดับและรูปแบบการแสดงออกของ DNA methylation ในผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และยังสามารถใช้ผลวิจัยทาง epigenetics มาร่วมในการวิจัยที่อาจช่วยอธิบายกลไกการเกิดพยาธิกำเนิดของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม อีกทั้งนำมาศึกษาความสัมพันธ์ของระดับ LINE-1 methylation ใน blood leukocytes กับเซลล์เยื่อข้อ อาจนำไปประยุกต์ใช้ในการพยากรณ์และการติดตามระดับความรุนแรงของโรคดังกล่าวได้ นอกจากนี้การศึกษาคือความสัมพันธ์ของ TNF- α ต่อดระดับของ LINE-1 methylation และระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมบริเวณเนื้อเยื่อข้อ อาจจะไปลดระดับความรุนแรงของสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อมจากการศึกษากลไกการทำงานที่เกี่ยวข้อง หากทราบความสัมพันธ์ระดับการเปลี่ยนแปลงระดับ DNA methylation ของ LINE-1 methylation กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมจะนำความรู้ที่ได้มาสู่การประยุกต์ใช้พัฒนาเป็นองค์ความรู้ใหม่

วิธีดำเนินการวิจัย



ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. เสนอโครงร่างวิทยานิพนธ์ต่อคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ และคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง
2. แสดงเอกสารข้อมูลโครงการวิจัยและเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยให้แก่อาสาสมัครโครงการวิจัย
3. บันทึกข้อมูลอายุ เพศ น้ำหนัก ส่วนสูงและแบบประเมินอาการส่วนบุคคลของผู้ป่วย และอาสาสมัครที่ลงชื่อยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย
4. เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อข้อเข่า และเลือดทั้งในผู้ป่วยและกลุ่มคนปกติ
5. นำชิ้นเนื้อเยื่อข้อเข่าในผู้ป่วยไปเพาะเลี้ยง และศึกษาเซลล์เยื่อข้อในสภาวะได้รับ Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) ภาวะเครียดออกซิเดชันจาก Hydrogen peroxide (H₂O₂) และวิตามินอี (Tocopheryl acetate, TA)
6. สกัด DNA จากเซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์เยื่อข้อ
7. ศึกษา LINE-1 methylation ด้วยวิธี quantitative Combined bisulfite restriction analysis (qCOBRA) และวิเคราะห์รูปแบบการเกิดเมทิลเลชัน
8. สกัด RNA จากเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) ภาวะเครียดออกซิเดชันจาก Hydrogen peroxide (H₂O₂) และวิตามินอี (Tocopheryl acetate, TA)
9. ศึกษาการแสดงออกของยีน *IL-6*, *IL-1 β* , *ADAMTs5*, *MMP-3* และ *VEGF* ด้วยวิธี quantitative real-time PCR
10. การศึกษาความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยและกลุ่มคนปกติด้วยวิธี quantitative real-time PCR
11. ศึกษาและวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด methylation และความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์เม็ดเลือดขาว และแบบประเมินอาการความรุนแรงของผู้ป่วย
12. ศึกษาและวิเคราะห์ระดับ methylation ในเซลล์เยื่อข้อในแต่ละสภาวะ
13. สรุปผลการวิจัย เขียนรายงานวิทยานิพนธ์ และนำเสนอผลงานการวิจัยต่อคณะกรรมการ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคข้อเข่าเสื่อม (Knee Osteoarthritis)

โรคข้อเสื่อม เป็นโรคที่พบได้บ่อยและมีอุบัติการณ์สูงในกลุ่มผู้สูงอายุมากกว่า 60 ปีขึ้นไป อาการของโรคส่งผลต่อการใช้ชีวิตประจำวันของผู้ป่วย ทำให้เคลื่อนไหวลำบากโดยขึ้นกับระยะและความรุนแรงของโรค สาเหตุของการเกิดโรคนี้อาจแบ่งออกได้ 2 สาเหตุหลัก คือ ข้อเสื่อมปฐมภูมิ เป็นโรคข้อเสื่อมที่เกิดจากสาเหตุที่ยังไม่ทราบแน่ชัด เช่น พันธุกรรม อายุ และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัย epigenetics ข้อเสื่อมทุติยภูมิ เป็นข้อเสื่อมที่ทราบสาเหตุที่ส่งผลให้เกิดอาการข้อเสื่อมที่แน่ชัด เช่น ภาวะอ้วน การได้รับอุบัติเหตุ การติดเชื้อในข้อ และสมดุลงของเมแทบอลิซึมในร่างกาย เป็นต้น สาเหตุเหล่านี้ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของข้อเข่าบริเวณกระดูกอ่อนผิวข้อ (articular cartilage) กระดูกที่อยู่ใต้ผิวข้อ (subchondral bone) และการอักเสบบริเวณเยื่อข้อ ทำให้ผู้ป่วยมีอาการข้อฝืดตึงตอนเช้า มีเสียงกรอบแกรบภายในข้อ อาการปวด บวม และร้อนบริเวณโดยรอบข้อ เป็นต้น เกิดจากการกระตุ้นให้หลั่งสารไซโตไคน์ เช่น interleukin-1 (IL-1), IL-6 และ tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) เป็นต้น⁽³⁾ ทั้งนี้จากรายงานสถิติขององค์การอนามัยโลกคาดว่า พ.ศ. 2563 จะมีผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมเพิ่มขึ้นร้อยละ 14.3 จาก พ.ศ. 2551 และยังพบว่าประชากรตั้งแต่อายุ 45 ปี เริ่มพบอุบัติการณ์ของโรคข้อเข่าเสื่อม รวมถึงร้อยละ 50 จะพบในกลุ่มผู้มีอายุมากกว่า 60 ปี และพบว่าโอกาสเกิดโรคในผู้ป่วยเพศหญิงมากกว่าเพศชาย⁽¹³⁾ จากสถิติอุบัติการณ์ของโรคที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทำให้มีการศึกษามากมายถึงสาเหตุที่ส่งผลให้เกิดโรคข้อเสื่อม รวมทั้งกลไกการควบคุมให้เกิดโรค การศึกษาสารเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องผ่านการทดสอบด้วยเทคนิคทางชีวเคมี และการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมกับพยาธิสภาพของโรค เป็นต้น

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าโรคข้อเสื่อมเป็นโรคที่มีหลายปัจจัยร่วมกันที่ส่งผลต่อการเกิดโรคข้อเสื่อมลักษณะและพยาธิสภาพของโรคข้อเสื่อม ซึ่งสาเหตุของการเกิดโรคข้อเสื่อมยังไม่พบแน่ชัดว่าสาเหตุใดที่ก่อให้เกิดโรคข้อเสื่อม อายุเป็นปัจจัยหลักอย่างหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับระยะการเกิดโรคข้อเสื่อม ช่วงอายุ 70-79 ปี เป็นช่วงที่พบความรุนแรงของการเกิดโรคมามากที่สุด⁽¹⁴⁾ เพศหญิงเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคข้อเสื่อมมากที่สุด พบว่ามีการศึกษามากมายที่แสดงให้เห็นว่าผู้หญิงมี

ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคข้อเสื่อมมากกว่าผู้ชายในบริเวณข้อเข่าและข้อนิ้วมือ^(15, 16) กิจกรรมและการใช้ชีวิตประจำวัน เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคข้อเสื่อมเช่นกัน เพราะว่กิจกรรมการใช้ชีวิตประจำวันที่ทำซ้ำๆ และการใช้งานที่ข้อมากเกิน อาจส่งผลต่อการเกิดโรคข้อเสื่อม ตัวอย่างเช่น กลุ่มประชากรที่อาศัยอยู่ชนบทมีอาชีพซึ่งต้องออกแรงและใช้ข้อมาก เช่น การยกของหนัก การยืนในท่าใดท่าหนึ่งเป็นเวลานาน เป็นต้น ส่งผลต่อการปวดข้อเข่า และเกิดโรคข้อเสื่อมได้ ความผิดปกติบริเวณข้อจากการเกิดเนื้องอก หรือข้อมีรูปร่างผิดปกติ ส่งผลต่อการเคลื่อนไหวที่ผิดปกติและนำมาสู่การสลายของกระดูกอ่อนบริเวณข้อ พันธุกรรมก็เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคข้อเสื่อมเช่นกัน คือ กลไกทางพันธุกรรมเกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้างโปรตีน กลไกการอักเสบ และ extracellular matrix เช่น type II collagen ในกระบวนการปรับแต่งกระดูก (bone remodeling) นอกจากนี้ภาวะอ้วน หรือน้ำหนักเกินค่าดัชนีมวลกาย (body mass index, BMI) ที่กำหนด เป็นปัจจัยเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคข้อเสื่อมผ่านกลไกการรับน้ำหนักของข้อที่มากเกินไป เช่น ข้อเข่า และข้อสะโพก เป็นต้น ดังนั้นผู้ป่วยที่มีน้ำหนักตัวมากจึงมีความเสี่ยงของการเกิดโรคข้อเสื่อม ปัจจัยสุดท้ายที่ส่งผลต่อการเกิดโรคข้อเสื่อม คือ ความไม่สมดุลของกระบวนการเมแทบอลิซึมในการสร้างและสลายของ extracellular matrix ในระยะการพัฒนาเกิดโรคข้อเสื่อม พบว่าไซโตไคน์เป็นตัวกลางที่ส่งผลต่อความไม่สมดุลของกลไกนี้ โดยลักษณะสำคัญที่ปรากฏในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม พบว่า มีการสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อทำให้ช่องข้อแคบลง การงอกของกระดูกใต้ผิวข้อและบริเวณขอบของข้อ รวมถึงการอักเสบของเซลล์เยื่อข้อ ดังนั้นการเกิดพยาธิสภาพของโรคข้อเสื่อมไม่ได้เกิดเฉพาะที่กระดูกอ่อน แต่ยังเกิดที่บริเวณอื่นโดยรอบข้อเช่นกัน เช่น กระดูกใต้ผิวข้อ เยื่อข้อ และปลอกหุ้มข้อ (joint capsule) เป็นต้น

เยื่อข้อ (synovial membrane) เป็นเนื้อเยื่อที่หุ้มรอบข้อทั้งหมด ยกเว้นส่วนของกระดูกอ่อนผิวข้อ แบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ส่วนที่บุผิวอยู่ภายใน (lining layer) เรียกว่า intima และชั้นที่อยู่ถัดออกมา (supportive layer) เรียกว่า subsynovium หรือ sub-intima ในส่วนของชั้น intima อยู่ระหว่างช่องว่างข้อและเนื้อเยื่อด้านนอกของ sub-intima ที่เชื่อมกับ fibrous capsule เยื่อข้อประกอบด้วย 2 เซลล์หลัก คือ type A synoviocytes และ type B synoviocytes โดย type A synoviocytes มีหน้าที่เป็น macrophages ชนิด phagocytosis ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมภายในบริเวณข้อ ส่วน type B synoviocytes เป็น synovial fibroblasts ที่มีบทบาทสร้าง collagen และ fibronectin ในน้ำไขข้อ เยื่อข้อยังมีลักษณะสำคัญดังนี้ คือ เป็นเนื้อเยื่อที่มีส่วนประกอบของหลอดเลือด

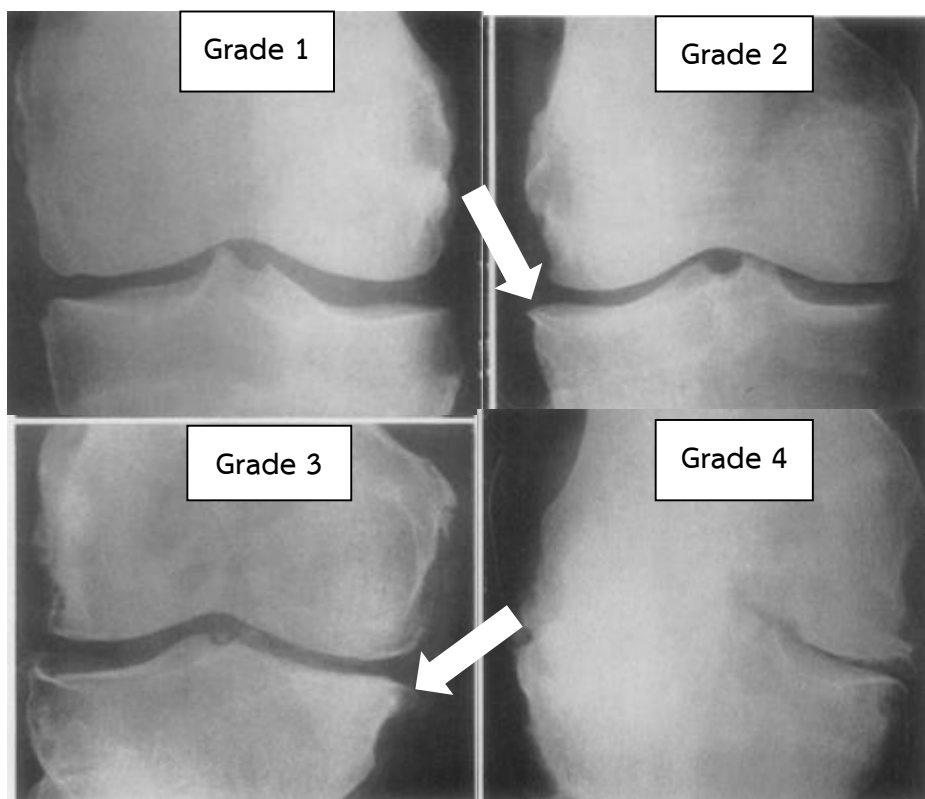
เลือดจำนวนมาก มีเส้นประสาทปกคลุมจำนวนมาก และการหลังของน้ำไขข้อ ในปัจจุบันมีการศึกษาพบว่า โรคข้อเสื่อมเป็นโรคที่มีการอักเสบในระดับต่ำ (low-grade inflammation)⁽¹⁷⁾ จากหลายการศึกษาที่แสดงถึงระดับการเปลี่ยนแปลงของสารไซโตไคน์กลุ่มที่ก่อให้เกิดการอักเสบในเยื่อข้อ และการอักเสบบริเวณเยื่อข้อส่งผลต่อการสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อและกระดูก ทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคข้อเสื่อมในที่สุด โดยปกติลักษณะเยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม เป็น hypertrophy และ hyperplasia ทำให้เพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อข้อ การอักเสบของเซลล์เยื่อข้อ เรียกว่า synovitis เซลล์ชนิดนี้อยู่บริเวณเยื่อข้อที่อยู่ใกล้กับกระดูกอ่อน จึงทำให้เชื่อว่ากลไกพยาธิกำเนิด synovitis เกี่ยวข้องกับการสลายของกระดูกอ่อน ซึ่งชิ้นส่วนของกระดูกอ่อนหลุดมาอยู่ในช่องข้อที่มีน้ำไขข้อ และมีการกำจัดสิ่งแปลกปลอมจากเซลล์ synovial macrophage ทำให้เยื่อข้อเกิดการอักเสบจากการเพิ่มสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ อีกทั้งสารไซโตไคน์ที่สร้างขึ้นมาจากเยื่อข้อไปยังน้ำไขข้อ และกระดูกอ่อน ส่งผลต่อกระบวนการสลายของข้อและการเพิ่มของ synovitis⁽¹⁸⁻²⁰⁾

กระดูกอ่อนผิวข้อ (articular cartilage) เป็นเนื้อเยื่อที่มีส่วนประกอบของ extracellular matrix เป็นหลัก เช่น น้ำ คอลลาเจน โปรตีโอไกลแคน ส่วนประกอบขนาดเล็กของเกลือแคลเซียม และเซลล์ chondrocytes เป็นต้น ทำให้สามารถกักน้ำและยึดหยุ่น และช่วยลดแรงกระแทกป้องกันการบาดเจ็บบริเวณข้อได้ แต่กระดูกอ่อนผิวข้อไม่มีส่วนประกอบของหลอดเลือด และระบบน้ำเหลือง เซลล์ในกระดูกอ่อนผิวข้อจึงแลกเปลี่ยนสารอาหารจากเนื้อเยื่อข้างเคียง เช่น กระดูกอ่อนใต้ผิวข้อ และน้ำไขข้อ เป็นต้น บริเวณกระดูกอ่อนผิวข้อแบ่งออกเป็น 4 ชั้น คือ superficial zone, traditional หรือ middle zone, radial หรือ deep zone และ calcified zone กระดูกอ่อนผิวข้อประกอบด้วยสารชีวโมเลกุลหลัก เช่น type II collagen และ aggrecan ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ โปรตีโอไกลแคน กระดูกอ่อนผิวข้อยังประกอบด้วยเซลล์ chondrocytes มีหน้าที่ในการสร้าง extracellular matrix และสร้างเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (proteolytic enzymes) เช่น matrix metalloproteinase (MMPs), a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) และสารตัวกลางที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (IL-1 β และ nitric oxide) ส่งผลให้กระดูกอ่อนผิวข้อสลายตัว ความสมดุลในการสร้างเอนไซม์ของเซลล์ chondrocytes มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคข้อเสื่อม ในระยะแรกของโรคข้อเสื่อม กระดูกอ่อนผิวข้อที่สลายตัวอาจมีชิ้นส่วนบางส่วนหลุดอยู่ในน้ำไขข้อ โดยปกติในระยะแรก aggrecans สามารถซ่อมแซมกระดูกอ่อนผิวข้อของโรคข้อเสื่อมได้ แต่ในกรณีระยะสุดท้ายของโรคข้อเสื่อม aggrecans ไม่สามารถสร้าง matrix ขึ้นมาทดแทนได้ทั้ง

ในกระดูกอ่อนผิวข้อและน้ำไขข้อ ซึ่งชั้นส่วนของกระดูกอ่อนในน้ำไขข้อยังส่งผลต่อการสลายตัวของกระดูกอ่อนได้ด้วยเช่นกัน⁽²¹⁻²³⁾

กระดูกใต้ผิวข้อ (subchondral bone) ประกอบด้วย 2 ชั้น คือ cortical plate และ cancellous bone หน้าที่หลักของกระดูกใต้ผิวข้อ คือ เป็นแหล่งอาหารของกระดูกอ่อนเพราะเป็นบริเวณที่ประกอบด้วยหลอดเลือดจำนวนมาก ถ้ากระดูกใต้ผิวข้อมีการทำงานผิดปกติจะส่งผลต่อการสลายของกระดูกอ่อนใต้ผิวข้อ ในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมกระดูกใต้ผิวข้อมีลักษณะหนากว่าปกติส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระดูกอ่อน การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการงอกของกระดูกบริเวณข้อข้อมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเสื่อม อีกทั้งกระดูกใต้ผิวข้อของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมยังส่งเสริมการสร้างปัจจัยทาง anabolic ทำให้เกิดการสร้างเนื้อกระดูกเพิ่มขึ้นบริเวณข้อข้อ และในบางกรณีของผู้ป่วยที่ร่างกายมีกลไกการรับน้ำหนักที่มากเกินไป (mechanical loading) อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อกระดูกใต้ผิวข้อ และไขกระดูก (bone marrow) ได้รับความเสียหาย⁽²⁴⁾

ในปัจจุบันการประเมินระยะของโรคข้อเสื่อม การถ่ายภาพรังสี (X-rays) การถ่ายภาพด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic Resonance Imaging, MRI) การเจาะตรวจน้ำไขข้อ และการผ่าตัดส่องกล้องในข้อโดยวิธีการประเมินจากภาพถ่ายรังสีเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวินิจฉัยโรคข้อเสื่อมเบื้องต้น



รูปที่ 2 ภาพถ่ายรังสีแสดงระดับความรุนแรงของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม⁽²⁵⁾

จากภาพถ่ายรังสีข้างต้นแสดงให้เห็นว่ากระบวนการเกิดโรคข้อเสื่อมส่วนใหญ่เกิดพยาธิสภาพบริเวณกระดูกอ่อนผิวข้อเป็นหลักส่งผลให้บริเวณช่องข้อแคบลง และพบการงอกของกระดูกบริเวณขอบข้อดังสัญลักษณ์ลูกศรที่แสดงข้างต้น ทำให้มีลักษณะการแสดงอาการตามความรุนแรงที่แตกต่างกันทั้งหมด 4 ระดับ คือ Grade 1, 2, 3 และ 4 โดยอาศัยเกณฑ์ในการจัดประเภทความรุนแรงของ Kellgren and Lawrence (KL)⁽²⁵⁾ ซึ่งระดับความรุนแรง KL grade 4 แสดงถึงระดับความรุนแรงมากที่สุดของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม จากรูปที่ 2 พบว่าภาพถ่ายรังสีไม่ปรากฏช่องข้อด้านในและข้อเคลื่อนเนื่องจากสูญเสียกระดูกอ่อนผิวข้อ เมื่อเปรียบเทียบกับ KL grade ระยะเวลาความรุนแรงที่น้อยกว่า ทำให้การประเมินเบื้องต้นด้วยภาพถ่ายรังสีสามารถวินิจฉัยระดับความรุนแรงของโรคข้อเสื่อมเบื้องต้นได้อีกทั้งการประเมินอาการและความรุนแรงของโรคด้วยการใช้แบบประเมินอาการส่วนบุคคลของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม ซึ่งแบบประเมินอาการและความรุนแรงของโรคข้อเสื่อมมีหลายประเภท เช่น Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC), Knee injury and

Osteoarthritis Outcome Score (KOOS), Visual Analogue Scale (VAS) และ index of severity for osteoarthritis for the knee (ISK) เป็นต้น

Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC) เป็นแบบประเมินที่ประกอบด้วยคำถาม 24 ข้อ ในแต่ละข้อมีคะแนนการประเมิน 4 ระดับ คือ ช่วง 0-4 และมีคะแนนรวมอยู่ในช่วง 0-96 คะแนน ถ้าผู้ป่วยที่ถูกประเมินมีระดับคะแนนที่สูง แสดงว่ามีความรุนแรงของโรคข้อเสื่อมมาก ซึ่งคำถามในแบบประเมินแบ่งออกเป็น การประเมินอาการเจ็บปวด 5 ข้อ การประเมินอาการตึง 2 ข้อ การประเมินข้อเข่าเชิงกายภาพ 17 ข้อ เช่น การขึ้น-ลงบันได การเดิน และกิจกรรมในชีวิตประจำวัน⁽²⁶⁾

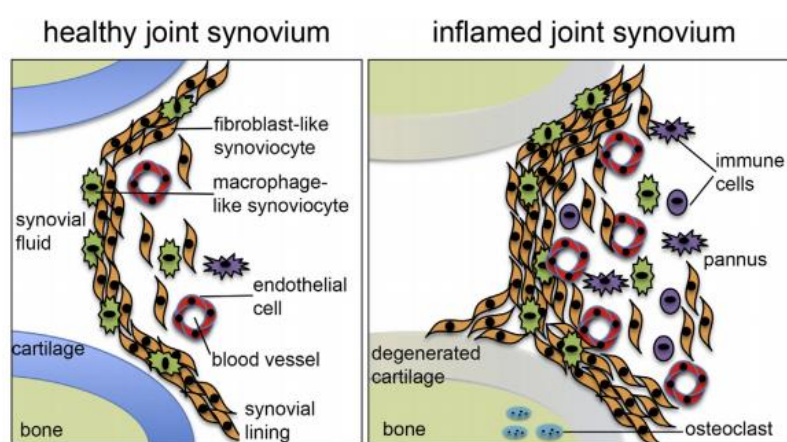
Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) เป็นแบบประเมินที่มีความจำเพาะต่อการประเมินอาการข้อเข่า ซึ่งแบบประเมิน KOOS พัฒนาโดย Ewa M Roos และคณะ ในปี พ.ศ. 2538 เพื่อประเมินในกลุ่มผู้ป่วยบาดเจ็บบริเวณเส้นเอ็นไขว้หน้าข้อเข่า หมอนรองข้อเข่า และระยะแรกเริ่มของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม และยังเป็นแบบประเมินที่สามารถคำนวณคะแนนกลับเป็น WOMAC ได้ คำถามสำหรับการประเมิน KOOS มีทั้งหมด 42 ข้อ แบ่งออกเป็น 5 หัวข้อหลัก คือ (1) อาการปวด 9 ข้อ (2) อาการทั่วไป 7 ข้อ (3) การใช้ชีวิตประจำวัน (Activity daily living, ADL) 17 ข้อ (4) กิจกรรมการออกกำลังกาย (Sport/Reaction) 5 ข้อ และ (5) คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม (Quality of life, QOL) 4 ข้อ โดยครอบคลุมสำหรับการประเมินการบาดเจ็บที่ข้อเข่า และการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ในคำถามของการประเมินแต่ละข้อมีคะแนนทั้งหมด 5 ระดับ ตั้งแต่ 0 (ปกติ) ถึง 4 (มีปัญหารุนแรงมาก) คะแนนทั้งหมดถูกเปลี่ยนให้อยู่ในสเกล 0-100 โดยสเกลที่ 0 หมายความว่า มีความรุนแรงของการเกิดโรคมามากที่สุด และสเกล 100 หมายความว่า ไม่มีปัญหาของการเกิดโรค การประเมิน KOOS ไม่สามารถนำคะแนนทั้งหมดมารวมกันได้ แต่นำเสนอในรูปแบบ 5 หัวข้อหลักของการประเมิน KOOS⁽²⁷⁾

Visual Analogue Scale (VAS) คือการประเมินระดับความปวด ซึ่งประเมินด้วยความยาว 10 เซนติเมตร ช่วยให้สามารถประเมินความรุนแรงของความปวดได้ละเอียดขึ้น โดยการวิเคราะห์คะแนนจากการวัดความยาวเส้นตรงจาก 0 มาถึงขีดที่ผู้ป่วยให้ไว้แสดงความเจ็บปวดแบ่งออกได้เป็น 4 ระดับ คือ (1) 0 เท่ากับ ไม่มีอาการปวด (2) 1-3 เท่ากับ มีอาการปวดเล็กน้อย (3) 4-6 เท่ากับ มีอาการปวดปานกลาง และ (4) 7-10 เท่ากับ มีอาการปวดมาก⁽²⁸⁾

Index of severity for osteoarthritis for the knee (ISK) หรือ Lequesne index เป็นแบบประเมินที่พัฒนามาจากประเทศฝรั่งเศสในปี พ.ศ. 2513 ใช้ในการบอกระดับความรุนแรงของโรคข้อเสื่อมได้โดยใช้คำถามทั้งหมด 10 ข้อ ซึ่งเกี่ยวข้องกับอาการปวด ระยะทางที่เดินได้ไกลที่สุด และการใช้ชีวิตประจำวัน ทำให้แบบประเมินชนิดนี้มีความสะดวกในการใช้ประเมินผู้ป่วย ช่วงคะแนนรวมของแบบประเมินน้อยที่สุด คือ 0 หมายความว่า ปกติ หรือไม่มีอาการปวด ถึงช่วงคะแนนมากที่สุดคือ 24 หมายความว่า มีความรุนแรงของการเกิดโรคข้อเสื่อมมาก^(29, 30)

นอกจากนี้กลไกทาง epigenetics อาจเป็นกลไกหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเสื่อม เริ่มจากการอักเสบบริเวณข้อของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมทำให้เกิดอาการข้อตึงหลังตื่นนอน บริเวณรอบข้ออุ่น อาการปวด และน้ำไขข้อมีปริมาณเพิ่มขึ้นทำให้เกิดอาการข้อบวม รวมถึงเยื่อหุ้มข้อหนาตัวเพิ่มขึ้น ซึ่งการอักเสบเหล่านี้เกิดจากกระบวนการสลายของเซลล์ chondrocytes ส่งผลให้เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนสลายตัวไปกระตุ้นการทำงานของ disease-associated molecular patterns (DAMPs) ซึ่งมีหน้าที่ไปกระตุ้นการจับกับเซลล์ macrophages และ fibroblast-like synoviocytes บริเวณเยื่อข้อส่งผลกระตุ้นให้สร้างสารไซโตไคน์ และสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบแพร่กระจายไปบริเวณรอบข้อ ทำให้เกิดอาการอักเสบบริเวณเยื่อข้อ (synovitis) โดยเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบเคลื่อนตัวมารวมบริเวณเยื่อข้อ (synovial membrane) อีกทั้งยังพบว่าสารไซโตไคน์ที่เพิ่มสูงขึ้นในข้อสามารถแพร่ผ่านไปยังหลอดเลือดรอบข้อทำให้ระดับของสารไซโตไคน์ในกระแสเลือด ซึ่งมีความสอดคล้องกับระดับไซโตไคน์ในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม และยังพบว่าในเนื้อเยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมมีระดับไซโตไคน์ที่เพิ่มขึ้นอย่างผิดปกติ เช่นเดียวกับในกระแสเลือด และน้ำไขข้อ ซึ่งกระบวนการอักเสบนี้ในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมจะเหนี่ยวนำผ่านการสลายของเซลล์ chondrocytes^(17, 31) ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเช่นเดียวกันจึงอาจส่งผลต่อเปลี่ยนแปลงของกลไกทาง epigenetics รวมถึงการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเสื่อมบริเวณเยื่อข้อ⁽³²⁾ อาจนำมาประยุกต์ใช้ประเมินระดับความรุนแรงของโรคข้อเสื่อมจากระดับความแตกต่างของการสร้างสารกลุ่มไซโตไคน์ในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมที่แตกต่างกัน เนื่องจากเยื่อข้ออยู่ภายในข้อ และเนื้อเยื่อข้างเคียง เป็นบริเวณที่สำคัญของการสร้างสารประกอบในน้ำไขข้อ หรือเป็นแหล่งสารอาหารสำหรับเซลล์ในกระดูกอ่อนผิวข้อ จึงเป็นส่วนสำคัญของการรักษาสมดุลภายในข้อ โรคข้ออักเสบยังเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับความหลากหลายทางพันธุกรรม epigenetics และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลต่อความไม่สมดุลของข้อ การอักเสบบริเวณเยื่อข้อ (synovitis) และการ

เปลี่ยนแปลงการสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อเกิดจากบริเวณเยื่อข้อมีเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบร่วมกับเนื้อเยื่อรอบข้อหนาตัวเพิ่มขึ้น (hyperplasia) และการเพิ่มขึ้นของหลอดเลือดจากการเคลื่อนตัวมารวมตัวกันของ T-cells, B-cells, plasma cells และ macrophages รวมถึงการอักเสบของเนื้อเยื่อบริเวณนี้จากการรวมกลุ่มของ immune cells จำนวนมากส่งผลให้เกิดโครงสร้างที่เรียกว่า pannus มีผลต่อการทำลายกระดูกอ่อนผิวข้อ และกระดูกใต้กระดูกผิวข้อ ดังรูปที่ 3 ซึ่งเยื่อข้ออักเสบมีผลทำให้กระดูกอ่อนผิวข้อสลายตัวเพิ่มขึ้นในโรคข้อเสื่อม⁽³¹⁾



รูปที่ 3 การเปรียบเทียบระหว่างเยื่อข้อ เนื้อเยื่อข้างเคียงของข้อปกติเปรียบเทียบกับข้ออักเสบ⁽³¹⁾

สารตัวกลางหลักที่ทำให้เกิดเยื่อข้ออักเสบ คือ สารไซโตไคน์ $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ และ IL-6 ⁽³³⁾ อีกทั้งกระบวนการอักเสบยังเหนี่ยวนำให้เซลล์เยื่อข้อ และเซลล์ articular chondrocytes ผลิตเอนไซม์ เช่น matrix metalloproteinase (MMP)-3 และ MMP-13⁽³⁴⁾, a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS4 และ ADAMTS5)⁽³⁵⁾ เป็นต้น อีกทั้งกระบวนการอักเสบบริเวณเยื่อข้อยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในการสร้างหลอดเลือดเพิ่มขึ้นจำนวนมากโดยรอบบริเวณเยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมที่มีการอักเสบรุนแรงมีลักษณะเยื่อข้อสีแดงเมื่อเทียบกับเยื่อข้อของคนปกติ เนื่องจากการเกิดการอักเสบบริเวณข้อของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมมีระดับการสร้างสารไซโตไคน์ vascular endothelial growth factor (VEGF) สูงในกลุ่มของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมในระยะเบื้องต้น สารไซโตไคน์เหล่านี้ส่งผลต่อการสลายตัวของกระดูกอ่อนผิวข้อจึงทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคข้อเสื่อมในที่สุด⁽³⁶⁾

สารไซโตไคน์ คือ โปรตีนขนาดเล็กที่หลั่งจากเซลล์ที่มีความจำเพาะที่มีการเชื่อมต่อและสื่อสารกันระหว่างเซลล์ ไซโตไคน์ในแต่ละชนิดของเซลล์จะมีชื่อเรียกที่แตกต่างกัน เช่น lymphokine เป็นไซโตไคน์ที่สร้างจากเซลล์ lymphocytes, monokine คือ ไซโตไคน์ที่สร้างจากเซลล์ monocytes และ interleukin คือ ไซโตไคน์ที่สร้างจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่ง และส่งผลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวอีกเซลล์หนึ่ง⁽³⁷⁾

สารกลุ่ม proinflammatory cytokines

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) เป็นโปรตีนที่มีขนาด 17 kDa ผลิตจากการกระตุ้นโดย macrophages มีผลต่อการสร้างไซโตไคน์ IL-6 และ IL-8 เป็นต้น⁽³⁸⁻⁴⁰⁾ ซึ่ง TNF- α เกิดจากการกระตุ้นของเซลล์ชนิดเดียวกันในข้อการศึกษาก่อนหน้านี้ เกี่ยวกับการตรวจวัดระดับ IL-1 β และ TNF- α ในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมหลังจากฉีด hyaluronic acid ที่ข้อ พบว่าระดับไซโตไคน์ทั้งสองชนิดลดลงอย่างมีนัยสำคัญภายหลัง 6 เดือนในกลุ่มวัยกลางคนเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้สูงอายุ⁽⁴¹⁾ การศึกษา TNF receptor ในเลือดของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม แสดงผลความสัมพันธ์เชิงบวกกับอาการปวด อาการตึงในข้อ และความรุนแรงของโรคตามภาพถ่ายรังสี⁽⁴²⁾ และยังพบว่าการศึกษาความสัมพันธ์ของ TNF- α ในพลาสมาและลักษณะของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมที่มีมือไม่มีความสัมพันธ์กัน⁽⁴³⁾ นอกจากนี้ในการศึกษาระดับ TNF- α ในเลือดและความรุนแรงของโรคจากภาพถ่ายรังสีที่แสดงระยะห่างของช่องข้อ พบว่า ระดับ TNF- α มีความสัมพันธ์ต่อช่องข้อที่ลดลง⁽⁴⁴⁾ ซึ่งหมายถึงระดับความรุนแรงของโรคข้อเสื่อมที่มากขึ้น คือ KL มากกว่า 1 และดังนั้น TNF- α อาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่มีประสิทธิภาพในการติดตามการรักษาโรคได้

Interleukin-1 beta (IL-1 β) เป็นสารในกลุ่ม proinflammation cytokines ที่มีผลต่อการเกิดโรคข้อเสื่อมมากที่สุด คือ IL-1 β เป็นโปรตีนที่มีขนาด 17.5 kDa⁽⁴⁵⁾ เป็นตัวยับยั้งการสร้าง type II collagen และ aggrecan เป็นส่วนประกอบหลักของกระดูกอ่อน^(46, 47) นอกจากนี้ IL-1 β ยังเหนี่ยวนำการสร้าง cytokines และ chemokines ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น IL-6 และ IL-8 จึงพบในหลายการศึกษาใช้ IL-1 β เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวเคมี^(38, 39) จากการศึกษาของ Ning และคณะ พบว่าระดับการแสดงออกของ IL-1 β มีความสัมพันธ์กับบริเวณของเยื่อข้อตามระดับความรุนแรงของโรค จึงนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ของโรคข้อเสื่อม⁽⁴⁸⁾ และจากการศึกษาระดับ IL-1 β ในหนูทดลอง พบว่า มีบทบาทสำคัญต่ออาการปวด ส่วนในการศึกษาระดับการแสดงออกของ IL-1 β และ TNF- α เกี่ยวข้อง

กับความรุนแรงของการอักเสบในโรคข้อเสื่อมที่ใช้กระดาษเป็นโมเดลสัตว์ทดลอง⁽⁴⁹⁾ และในการศึกษา IL-1 β เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ประเมินผลของการรักษาผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมด้วย hyaluronic acid พบว่า ระดับ IL-1 β มีความสัมพันธ์เชิงลบกับความรุนแรงของอาการปวด จากการศึกษาเป็นระยะเวลา 6 เดือน และระหว่างการศึกษาเกิดโรคข้อเสื่อม พบว่า IL-1 β กระตุ้นการสร้างสารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species, ROS) เช่น peroxide และ hydroxylated radicals ที่มีผลโดยตรงต่อการสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อ และสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของ oxidative enzymes ที่ลดลงภายในข้อที่มีผลมาจากโรคข้อเสื่อม⁽⁴¹⁾

Interleukin-6 (IL-6) เป็นไกลโคโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 184 ตำแหน่ง⁽⁵⁰⁾ มีบทบาทสำคัญต่อการอักเสบในการเกิดพยาธิสภาพของโรคข้อเสื่อม เซลล์ chondrocytes ของคนสุขภาพดีและไม่ได้รับสารกระตุ้นพบว่ามียกระดับของ IL-6 ที่ต่ำ แต่ถ้าได้รับไซโตไคน์ เช่น IL-1 β ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวกับการอักเสบของข้อ และการเพิ่มขึ้นของเซลล์ chondrocytes⁽³⁹⁾ เช่นเดียวกับ TNF- α มีผลต่อการเหนี่ยวนำการสร้าง IL-6⁽³⁹⁾ และที่สำคัญ IL-6 ยังทำหน้าที่ในการยับยั้งการสร้าง type II collagen ในสัตว์ทดลองอีกด้วย⁽⁵¹⁾ ในการศึกษาในระดับ IL-6 ของสัตว์ทดลองกลุ่มโรคข้อเสื่อมมียกระดับ IL-6 ที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับการศึกษาในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม แต่อย่างไรก็ตามระดับ IL-6 ในน้ำไขข้อไม่สัมพันธ์กับดัชนีมวลกาย อายุ และความรุนแรงของโรคข้อเสื่อม (KL) ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม 82 ราย⁽⁵²⁾ และในทางตรงกันข้ามของการศึกษาระดับ IL-6 ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 47 รายที่ไม่ได้รับการรักษาพบว่า ระดับ IL-6 ในซีรัมของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีความสัมพันธ์เชิงลบกับ KL grade และไม่มีความสัมพันธ์กับอาการปวดของการประเมินด้วยแบบประเมิน WOMAC ยกเว้นอาการตึงที่มีความสัมพันธ์เล็กน้อยกับระดับของ IL-6⁽⁵³⁾ นอกจากนี้ IL-6 ยังเป็นไซโตไคน์หลักที่เป็นสาเหตุการเปลี่ยนแปลงของกระดูกใต้ผิวข้อ โดยมีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของ osteoclasts และการสลายตัวของเนื้อกระดูก ทำงานร่วมกันกับ IL-1 β และ TNF- α รวมถึงการทำงานของ osteoblasts ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 β , TNF- α และ IL-6 อาจส่งผลต่อกลไกการผลิต MMPs ที่ทำให้เกิดผลกระทบต่อกระดูกอ่อนบริเวณใกล้เคียง จากการศึกษาหนูในกลุ่มที่ขาดการแสดงออกของยีน IL-6 และทำการฉีด IL-6 บริเวณ intra-articular พบว่า 1 มียระดับลดลงในกลุ่มข้ออักเสบเรื้อรังชนิดรุนแรง และการเหนี่ยวนำการสร้างของกระดูกบริเวณข้อ⁽⁵⁴⁾

สารกลุ่ม Extracellular matrix (ECM) degrading enzymes

Matrix metalloproteinase (MMP)-3 หรือ stromelysin-1 เกี่ยวข้องกับความไม่สมดุลของกระบวนการเมแทบอลิซึมของการสลายและการสร้างกระดูกอ่อนผิวข้อส่งผลการสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อ ซึ่ง MMP-3 ในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมอยู่บริเวณกระดูกอ่อนชั้น superficial zone และมีการแสดงออกในระดับ mRNA ที่สูงในระยะแรกของการสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อ⁽⁵⁵⁾ กลุ่มเอนไซม์ matrix metalloproteinase มีปริมาณเพิ่มขึ้นจากการกระตุ้นของ proinflammatory cytokines และเป็นส่วนที่ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนี้สลายตัว โดยเอนไซม์ MMP-3 หลั่งออกมาจากเซลล์ chondrocytes และ synovial cells มีหน้าที่กระตุ้นการทำงานของ serine protease ตัวอื่น⁽⁵⁶⁾ ไม่ได้มีหน้าที่เพียงสลาย extracellular matrix แสดงให้เห็นว่า MMP-3 มีการแสดงออกในบริเวณเยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม การศึกษาระดับการแสดงออกของ MMP-3 ในเยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความรุนแรงของโรคที่แตกต่างกันตาม KL grading⁽⁵⁷⁾ อีกทั้งการศึกษาเซลล์ chondrocytes ของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมที่ได้รับ adiponectin พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของ nitric oxide ผ่านตัวเหนี่ยวนำ inducible nitric oxide synthase (iNOS) และมีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีน MMP-1, MMP-3 และ MMP-13 นอกจากนี้⁽⁵⁸⁾ การศึกษาระดับ MMP-3 ในกระดูกที่เป็นโรคข้อเสื่อม พบว่า มีระดับ MMP-3 สูงในเยื่อข้อระยะแรกของโรคข้อเสื่อม และในเซลล์ chondrocytes ระยะสุดท้ายของการเกิดโรค แสดงให้เห็นว่าเซลล์ทั้ง 2 บริเวณของเนื้อเยื่อในกระดูกที่เป็นโรคข้อเสื่อมพบการสร้าง MMP-3⁽⁵⁹⁾ เช่นเดียวกับกับในมนุษย์ พบว่าระดับของ MMP-3 ในพลาสมาเป็นตัวบ่งชี้สะท้อนถึงระยะห่างของช่องข้อในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมอย่างมีนัยสำคัญ และในการศึกษาระดับเอนไซม์ MMP-3 ในน้ำไขข้อของผู้ป่วยมีระดับที่สูงกว่าในข้อปกติ⁽⁶⁰⁾ อีกทั้งในการศึกษาระดับ MMP-3 ในโรคข้อเสื่อมมีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญและสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคข้อเสื่อมในหนูที่ถูกยับยั้งการทำงานของ MMP-3 เป็นเวลา 2 ปี⁽⁶¹⁾

A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS5) เป็น aggrecanases ชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเสื่อมจากการที่เอนไซม์ชนิดนี้มีบทบาทต่อการสลาย aggrecan และ type II collagen ในกระดูกอ่อนผิวข้อ ซึ่งเอนไซม์ ADAMTS5 เรียกอีกชื่อว่า aggrecanase 2⁽⁶²⁾ การศึกษาท่อน้ำเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน connexin 43 (Cx43) ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้มีการเพิ่มการแสดงออกของยีน ADAMTS5 ในเซลล์เยื่อข้อและการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ collagenase ในอาหารเลี้ยงเซลล์เยื่อข้อ⁽³⁵⁾ ส่วนในการศึกษาเซลล์

chondrocytes ได้รับความเข้มข้นของ osteopontin (OPN) แตกต่างกัน พบว่า การแสดงออกของ ยีน ADAMTS5 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ⁽⁶³⁾ อีกทั้งยังมีการศึกษาผลของ ADAMTS5 ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ chondrocytes และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ aggrecanase ร่วมด้วย พบว่า มีผลต่อการเพิ่มเนื้อกระดูกอ่อนของกระดูกอ่อนผิวข้อ และการสร้างกระดูกบริเวณขอบข้อ ระหว่างการเกิดโรคข้อเสื่อม⁽⁶⁴⁾

สารกลุ่ม Chemokines and angiogenic growth factor

Vascular endothelial growth factor (VEGF) คือ glycosylated protein ขนาด 46-48 kDa ประกอบด้วยพันธะ disulfide โดย VEGF เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการสร้างหลอดเลือดและ ท่อน้ำเหลืองใหม่ การควบคุมการแสดงออกของ VEGF ประกอบด้วย 2 ปัจจัยหลัก คือ ระดับออกซิเจน ต่ำ (hypoxia) และไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น IL-1 β ⁽⁶⁵⁾ VEGF อยู่บริเวณ endothelial cells (ECs) แต่ยังมีพบในเซลล์อื่นๆ เช่น hematopoietic stem cells (HSCs), monocytes, osteoblasts และ neuron cells ในบริเวณของเซลล์เยื่อข้อ เซลล์ chondrocytes และ เซลล์ macrophages เป็นบริเวณที่สร้าง VEGF ซึ่ง VEGF มีบทบาทสำคัญต่อการสร้างหลอดเลือดในตัวอ่อน การรักษา บาดแผล และการสร้างเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็ง และการอักเสบของ โรคต่างๆ เช่น โรคข้อเสื่อม การศึกษาก่อนหน้าพบการวัดระดับ VEGF ในน้ำไขข้อและเนื้อเยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้อรูมาตอยด์ และโรคข้อเสื่อม ส่วนการศึกษาค้นคว้าความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ MMP-9, MMP-13 และ VEGF ในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมและโรคข้อรูมาตอยด์ พบว่ามีความสัมพันธ์กัน และอาจมีบทบาทในการสร้างหลอดเลือดใหม่⁽⁶⁶⁾ ระดับการแสดงออกของ VEGF พบว่ามีการศึกษา จำนวนมากในโรคข้ออักเสบหลายชนิด ในโรคข้อรูมาตอยด์ ระดับของ VEGF ในซีรัมสูงกว่าในโรคข้อ เสื่อม และกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับการศึกษา VEGF ในน้ำไขข้อก็พบว่ามีการแสดงออกที่สูงใน กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อรูมาตอยด์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม จากข้อมูลนี้จึงสรุปได้ว่าระดับ การแสดงออกของ VEGF มีบทบาทกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคข้อรูมาตอยด์⁽⁶⁷⁾ นอกจากนี้ การศึกษาค้นคว้าความสัมพันธ์ระดับ VEGF ในซีรัมของผู้ป่วยโรคข้อรูมาตอยด์ พบว่า ระดับ VEGF มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับความรุนแรงสูงสุดของโรคข้อรูมาตอยด์⁽⁶⁸⁾ VEGF มีบทบาทใน ส่วนการสร้าง endochondral bone การสร้างกระดูกบริเวณขอบข้อ การอักเสบของเยื่อข้อ และการสลาย ของกระดูกอ่อนในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม การศึกษาระดับของ VEGF ในกระดูกอ่อนพบเฉพาะในกระดูก อ่อนของโรคข้อเสื่อมไม่พบในกระดูกอ่อนปกติ⁽⁶⁹⁾ ส่วนการศึกษา VEGF ในระดับ mRNA และโปรตีน

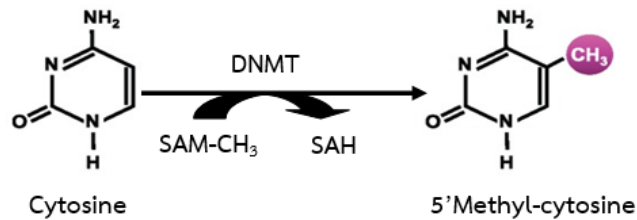
ของผู้ป่วยโรคกระดูกพรุนมีระดับการแสดงออกที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม⁽⁷⁰⁾ เช่นเดียวกันกับการศึกษาการ แสดงออกของ VEGF ในหลอดเลือดที่เป็นโรคข้อเสื่อมจากการได้รับบาดเจ็บ ที่มีระดับการแสดงออก ของ VEGF เพิ่มขึ้น มีความสัมพันธ์กับกระบวนการ catabolism ในเซลล์ chondrocytes และเซลล์ เยื่อข้อ⁽⁷¹⁾

การศึกษากลไกการยับยั้งระดับของ TNF- α และสารทางชีวภาพ (biological agents) ที่ เกี่ยวกับการเพิ่มขึ้นของสารภูมิคุ้มกันผิดปกติอาจช่วยลดการอักเสบเรื้อรังที่เหนียวนำไปสู่ข้อถูกทำลาย และปรับคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยให้ดีขึ้นได้ เนื่องจากกระบวนการอักเสบบริเวณเยื่อข้อของผู้ป่วยโรค ข้อเสื่อมส่งผลต่อความสมดุลของ immune cells ที่เพิ่มขึ้นผิดปกติ เมื่อเยื่อข้ออักเสบมีผลต่อกลไก ควบคุมทาง epigenetics ที่ส่งผลต่อรูปแบบ DNA methylation ระหว่างที่เยื่อข้อเกิดการอักเสบ อาจสัมพันธ์กับ DNA hypomethylation ทำให้การควบคุมการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ พยาธิกำเนิดของโรคข้อเสื่อมมีปริมาณมากกว่าปกติ เช่น transcription factors (TFs), cytokines, collagen, aggrecan และ matrix metalloproteinases เป็นต้น ส่งผลให้กระดูกอ่อนผิวข้อถูก ทำลายและทำให้เกิดโรคข้อเสื่อม

DNA methylation

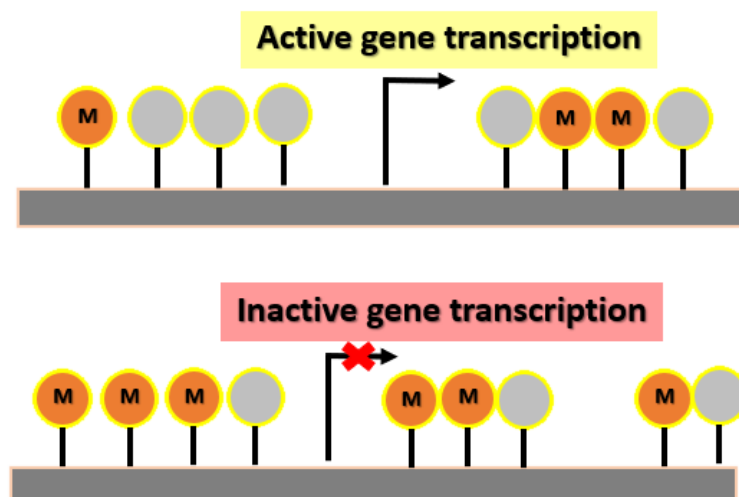
DNA methylation เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลง epigenetics ที่สำคัญและมีส่วน เกี่ยวข้องกับบทบาทการทำงานของยีน การไม่ทำงานของ transposons อายุ การพัฒนาของระยะตัว อ่อน (embryonic development) กระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปทำหน้าที่เฉพาะ และ กลไกการเกิดมะเร็ง (carcinogenesis) โดยในกระบวนการ DNA methylation ถูกกระตุ้นจาก DNA methyltransferases (DNMTs) มีส่วนของ S-adenosyl-L-methionine เป็น methyl donor ซึ่ง DNMTs มีหลายชนิด ได้แก่ DNMT1 เป็นเอนไซม์ที่เติมหมู่เมทิลบนสาย DNA สายใหม่ที่มีรูปแบบ เหมือนกับการเติมหมู่เมทิลของสาย DNA ต้นแบบ DNMT3a และ DNMT3b เป็นเอนไซม์ที่มีรูปแบบ การเติมหมู่เมทิลใหม่บนสาย DNA ที่แตกต่างจาก DNA สายแม่แบบจึงเรียกว่า de novo methyltransferases⁽¹¹⁾ กลไกการเกิด DNA methylation ในมนุษย์จะเกิดการเติมหมู่เมทิล (-CH₃) บริเวณคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโตซีน ในตำแหน่ง cytosine-phosphate-guanine dinucleotide (CpG)⁽⁷²⁾ ทำให้เกิดโครงสร้างของ 5-methylcytosine ดังรูปที่ 4 โดยปกติพบ DNA methylation ได้ตลอดจีโนม ส่วนมาก CpG islands บริเวณ short CpG rich region จะไม่พบการ

เติมหมู่เมทิล (unmethylated) ขณะที่บริเวณหลักของ CpG site ใน non-CpG islands เป็นบริเวณที่เกิด methylation



รูปที่ 4 กระบวนการ DNA methylation บนเบสไซโตซีน⁽⁷³⁾

ส่วนใหญ่ CpG islands มักเกิดบริเวณใกล้เคียงของ transcription start sites (TSS) ของยีนหลายชนิด และการเกิด methylation เกี่ยวข้องกับการควบคุมลำดับ DNA ซึ่งมีความสัมพันธ์กับ transcriptional activity ที่มีการตอบสนองต่อการควบคุมของ methylation ทำให้แบ่ง DNA methylation ออกเป็น 2 รูปแบบ คือ DNA hypomethylation และ DNA hypermethylation การเกิดรูปแบบของ DNA methylation⁽⁹⁾ ทั้ง 2 รูปแบบนี้ส่งผลให้การควบคุมการแสดงออกของยีนภายในจีโนมมีลักษณะที่แตกต่าง และส่งผลต่อความไม่เสถียรของจีโนม ดังรูปที่ 5



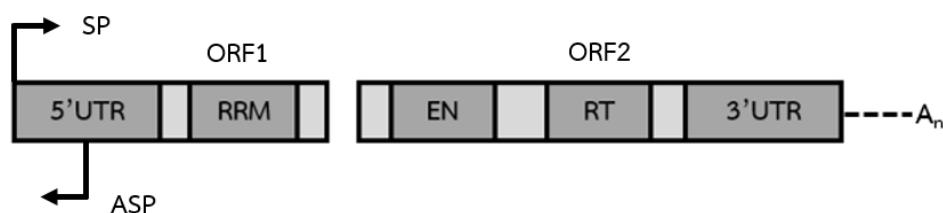
รูปที่ 5 กระบวนการ DNA methylation บริเวณ CpG island ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน⁽⁹⁾

นอกจากนี้กลไก DNA methylation ยังส่งผลต่อบริเวณ interspersed repetitive sequences (IRSs) บริเวณที่พบ CpG sequence จำนวนมาก และมีประมาณร้อยละ 45 ของจีโนมในร่างกาย โดย IRSs สามารถจัดกลุ่มได้ 2 ส่วน คือ DNA transposons ร้อยละ 2.8 ของจีโนมมนุษย์ ในขณะที่ retrotransposon มีร้อยละ 42.2 ในจีโนม retrotransposon สามารถจัดกลุ่มได้ตามโครงสร้างที่มีและไม่มี long terminal repeats (LTRs) คือ non-LTR retroelements and LTR retroelements ซึ่งบริเวณหลักที่เพิ่มจำนวนของ non-LTR retroelements สูงภายในจีโนมมนุษย์ คือ long interspersed nuclear elements (LINEs) และ Short interspersed nuclear elements⁽⁷⁴⁾ เช่น Alu จากการศึกษที่ผ่านมาพบว่า การเกิด hypomethylation ของ LINE-1 พบในโรคมะเร็ง และโรคที่เกี่ยวข้องกับ autoimmune รวมถึงโรคข้ออักเสบ^(7, 75) ในการศึกษาเกี่ยวกับระดับการแสดงออกของโปรตีน DNMT1 ใน synovial fibroblasts ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ เพื่ออธิบายความสัมพันธ์กับระดับ DNA methylation โดยในการศึกษานี้เปรียบเทียบแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม synovial fibroblasts ที่ไม่ได้รับ TNF- α และ กลุ่ม synovial fibroblasts ที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ระดับการแสดงออกของโปรตีน DNMT1 ใน synovial fibroblasts ของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α มีระดับการแสดงออกที่สูงกว่าในผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ แต่มีระดับการแสดงออกของโปรตีน DNMT1 น้อยกว่ากลุ่มควบคุม จึงแสดงให้เห็นว่าสารไซโตไคน์มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน DNMT1 เกี่ยวข้องกับกระบวนการเติมหมู่เมทิลของ DNA methylation บริเวณยีนไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเสื่อม⁽⁷⁾ นอกจากนี้การศึกษา DNA methylation บริเวณ promoter ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเสื่อม อาจส่งผลต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคข้อเสื่อมได้ ตัวอย่างเช่น การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับ DNA methylation จาก %CpG methylation ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ chondrocytes ของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม มีระดับ %CpG methylation ที่ลดลงในกลุ่มเซลล์ chondrocytes ที่ได้รับ 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) แต่พบว่าลดลงมากขึ้นเมื่อได้รับ IL-1 β เปรียบเทียบกับเซลล์ chondrocytes ที่ไม่เกิดรอยโรคของข้อเสื่อม เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ การศึกษาระดับ DNA methylation ที่ตำแหน่ง promoter ของ MMP13 และ IL-1 β พบว่า บริเวณ promoter ทั้ง 2 เกิด DNA hypomethylation ในเซลล์ chondrocytes ของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมเปรียบเทียบกับเซลล์ chondrocytes ปกติ อีกทั้งการเกิด DNA hypomethylation นี้ยังส่งผลต่อการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อ

เสื่อม⁽⁷⁶⁾ รวมถึงการศึกษา DNA methylation บริเวณ IL-6 promoter ในเซลล์เยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม พบว่าในเซลล์เยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมเกิด hypomethylation และ histone hypermethylation บริเวณ promoter ของ IL-6 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อข้อของคนปกติ⁽³³⁾ และการเกิด DNA hypomethylation บริเวณ inducible nitric oxide synthase (iNOS) promoter ที่ตำแหน่ง NF- κ B enhancer ทำให้การแสดงออกของยีน *iNOS* เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการควบคุม cell cycle และการแสดงออกของยีนในเซลล์ chondrocytes ของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ chondrocytes ปกติ⁽⁷⁷⁾

Long interspersed nuclear element-1 (LINE-1)

LINEs เป็น retrotransposons ในกลุ่มของ non-long terminal ซ้ำๆ กันหลายหน่วยในจีโนม พบประมาณร้อยละ 17 และมีลำดับที่ซ้ำกันมากกว่า 450,000 ชุด ในจีโนมของมนุษย์ สามารถเพิ่มจำนวนตัวเองได้อย่างอิสระ โครงสร้างของ LINE-1 มีความยาวประมาณ 6 kb ประกอบด้วย 5'UTR ที่มีส่วนของ internal RNA polymerase II sense strand promoter โพรตีน open reading frames ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ ORF1 และ ORF2 และ 3' UTR ประกอบด้วย poly (A) tail ดังรูปที่ 6

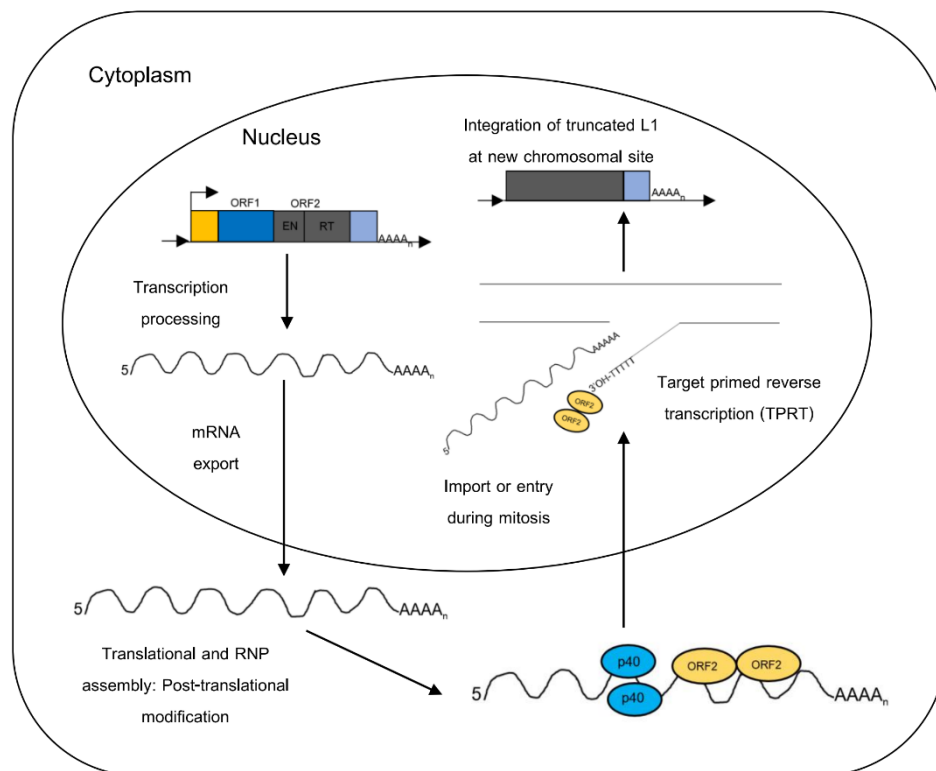


รูปที่ 6 โครงสร้างของ LINE-1⁽⁸⁾

โพรตีน ORF1 ในมนุษย์มีส่วนของ RNA binding protein ขนาด 40 kDa มีหน้าที่ nucleic acid chaperone activity และในส่วนของ ORF2 ประกอบด้วยโพรตีนขนาด 150 kDa ซึ่งทำหน้าที่เป็น endonuclease (L1 EN) และ reverse transcriptase (L1 RT) activities โพรตีน ORF ที่อยู่บน LINE-1 สามารถเปลี่ยนและช่วยการทำงานของ Alu รวมถึงขั้นตอนการถอดรหัสเป็น mRNAs บริเวณตำแหน่งใหม่ของจีโนม และมีกลไกการทำงานที่สำคัญคือ “copy and paste”⁽⁸⁾ เมื่อกระตุ้นให้ LINE-1 element เกิดการถอดรหัสในนิวเคลียสและขนส่งไปแปลรหัสที่ไซโทซอล หลังจากนั้นโพรตีน ORF1 และ ORF2 จับบริเวณ mRNA รวมตัวเป็นโครงสร้าง ribonucleoprotein particle (RNP) เพื่อขนส่งกลับไปยังลำดับ DNA เป้าหมายบริเวณ target-primed reverse transcription

(TPRT) ในนิวเคลียส ทำให้เกิดลำดับ DNA เส้นใหม่ที่เกิดจากการแทรกของ LINE-1 ดังรูปที่ 7 นอกจากนี้ยังพบข้อจำกัดในการขนส่ง LINE-1 transcription ไปยัง undifferentiated cells, early germ cells และ undifferentiated tumor cells อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิด hypomethylation ที่ตำแหน่ง CpG การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การเปลี่ยนแปลงของระดับ LINE-1 methylation มีผลต่อการควบคุมการทำงานของยีนภายในจีโนม เช่น การเพิ่มของ LINE-1 methylation ส่งผลต่อการยับยั้งการแสดงออกยีนเป้าหมาย เป็นเหตุให้เกิดความเสียหายของจีโนมและการเปลี่ยนแปลงของ epigenetics⁽⁷⁴⁾

นอกจากนี้การแสดงออกของ LINE-1 มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการทำงานของ OPR1/p40 บริเวณเนื้อเยื่อข้อ จึงอาจนำ LINE-1 มาพัฒนาประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้ (biomarker) ช่วยในการวินิจฉัยโรคข้ออักเสบ⁽⁷⁾



รูปที่ 7 กลไกของ L1 retrotransposition⁽⁷⁴⁾

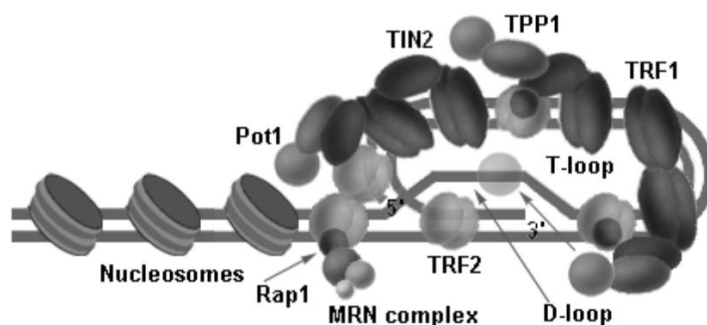
การศึกษาที่ผ่านมา พบว่า DNA methylation ใน synovial fibroblasts ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์เป็นชนิด DNA hypomethylation และยังได้ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน ORF1p ด้วยเทคนิค Immunohistochemical staining พบว่า osteoarthritic synovial fibroblasts (OASFs) ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีส่วนของ ORF1 ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ LINE-1⁽⁷⁾ และยังพบการทำงานของ ORF1/p40 ของผู้ป่วยโรค systemic lupus erythematosus (SLE) และ sjogren's syndrome (SS) ซึ่งเป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ LINE-1 เช่นเดียวกัน⁽⁷⁵⁾ อีกทั้งยังเกิด LINE-1 methylation แบบ hypomethylation ในโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis vulgaris)⁽⁷⁸⁾ นอกจากนี้ในการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการศึกษา พบระดับ LINE-1 hypermethylation ในโรคผิวหนังอักเสบเรื้อรัง (lichen simplex chronicus)⁽⁷⁹⁾ แต่ก็มีการศึกษา ระดับ LINE-1 methylation ในโรคไขกระดูกฝ่อ (dyskeratosis Congenita) พบว่าไม่มีความแตกต่างของระดับ LINE-1 methylation ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม⁽⁸⁰⁾ ทั้งนี้การทำงานของ LINE-1 มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจีโนมภายในร่างกาย จากการที่ LINE-1 hypermethylation ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของยีน นอกจากนี้ยังพบว่า ไซโตไคน์ IL-1 มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ global DNA methylation ใน synovial like-fibroblasts⁽⁸¹⁾ ของผู้ป่วยโรคข้อรูมาตอยด์ และการศึกษา DNA methylation ในผู้ป่วยโรค systemic lupus erythematosus (SLE) พบว่าระดับ LINE-1 methylation ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์เม็ดเลือดขาวทุกชนิดของผู้ป่วย SLE ได้แก่ CD4+ T cells, CD8+ T cells และ B cells เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มคนปกติ จึงอาจนำ LINE-1 methylation มาประยุกต์ใช้ในการบ่งชี้อาการของโรค SLE ได้⁽⁸²⁾

การศึกษา DNA methylation ที่ได้กล่าวไปข้างต้น แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงระดับการเกิด DNA methylation มีผลในการควบคุมความสมดุลของจีโนมและยังเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ ทำให้มีความสนใจในการศึกษาระดับ DNA methylation ของการเกิดพยาธิสภาพของโรคข้อเข่าเสื่อม เพื่อติดตามระยะและระดับความรุนแรงของโรค และอาจนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาทางการแพทย์ และจากการทบทวนวรรณกรรมที่ผ่านมา พบว่าการศึกษาระดับ global DNA methylation ของ LINE-1 ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมได้มีเพียงการศึกษาในตัวอย่างเนื้อเยื่อ เช่น chondrocytes และ fibroblast like synoviocytes แต่ยังไม่มีการศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดขาว (blood leukocytes) และเซลล์เยื่อข้อ (synovial fibroblasts) ในงานวิจัยนี้จึงเลือกศึกษาในตัวอย่างเหล่านี้ เนื่องจากโรคข้อเข่าเสื่อมยังจัดอยู่ในกลุ่มของ innate immune system จากกลไกของ damage-associated molecular patterns (DAMPs) ที่กระตุ้นการสร้างสารไซโตไคน์และสารก่อให้เกิดการอักเสบต่างๆ โดยสารเหล่านี้ส่งผลให้เนื้อเยื่อข้ออักเสบ (synovitis) และสารกลุ่มนี้ยังสามารถแพร่ผ่านไปยังบริเวณอื่นของร่างกายผ่านเลือด⁽³¹⁾ สารไซโตไคน์ที่แพร่ผ่านอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกลไกทาง epigenetics ที่ส่งผลต่อความเสถียรของจีโนมภายในสารพันธุกรรมของ

blood leukocytes ดังนั้นจึงทำการศึกษาระดับ DNA methylation ของ LINE-1 ในตัวอย่าง blood leukocytes เปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อบุข้อในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมที่มีการอักเสบและกลุ่มข้อเสื่อมที่ไม่มีการอักเสบเพื่อนำผลวิเคราะห์ที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยตรวจติดตามและการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม นอกจากนี้ยังทำการศึกษาผลของ TNF- α ต่อระดับการเกิด DNA methylation บริเวณเซลล์เยื่อบุข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม เซลล์เยื่อบุข้อในกลุ่มโรคข้อเสื่อมที่มีการอักเสบและกลุ่มข้อเสื่อมที่ไม่มีการอักเสบ รวมถึงการศึกษากายการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม โดยข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าโรคข้อเข่าเสื่อมมีอุบัติการณ์ของการเกิดโรคสูง ส่งผลต่อการใช้ชีวิตประจำวัน ถึงแม้จะเป็นโรคไม่ได้อันตรายแก่ชีวิต แต่หากไม่ได้เข้ารับการรักษาที่ถูกต้องและทันเวลาอาจส่งผลให้ผู้ป่วยพิการไม่สามารถเดินได้ และคุณภาพชีวิตด้อยลง ดังนั้น ความเข้าใจพยาธิกำเนิดของโรคข้อเสื่อมตลอดจนการศึกษาค้นหาตัวบ่งชี้ที่ช่วยในการวินิจฉัยโรคข้อเสื่อมมีความสำคัญต่อการพัฒนาการรักษาและพัฒนาคุณภาพชีวิตผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมให้ดีขึ้น

ความยาวเทโลเมียร์ (telomere length)

จีโนมของยูคาริโอตประกอบด้วย DNA สายยาว ซึ่งต้องการส่วนปกป้องบริเวณปลายของโครโมโซม เพื่อป้องกันการเกิด DNA double-strand breaks (DSBs) ซึ่งบริเวณปลายของโครโมโซมมีส่วนที่เรียกว่า เทโลเมียร์ ทำหน้าที่ป้องกัน DNA ไม่ให้ถูกทำลาย และกลไกการซ่อมแซม DSB รวมถึงการป้องกันการสลายและการรวมกันของปลายโครโมโซม โดยเทโลเมียร์บน DNA ประกอบด้วยลำดับเบส TTAGGG ที่ซ้ำกันอยู่ที่ปลาย 3' บริเวณปลายโครโมโซม ที่ขดตัววนกลับจับกับเบสคู่สมเกิดโครงสร้าง t-loop มีความสำคัญต่อการปกป้องบริเวณปลายของโครโมโซม นอกจากนี้เทโลเมียร์ยังประกอบด้วยโปรตีนเฉพาะทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 และ POT1 เรียกส่วนประกอบของโปรตีนโดยรวมนี้ว่า shelterin complex มีหน้าที่ในการถอดรหัสของเส้นเทโลเมียร์และเติมลำดับเบสของเทโลเมียร์ที่ปลายของโครโมโซม^(6, 83) ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 โครงสร้าง t-loop และส่วนประกอบของโปรตีนใน shelterin complex⁽⁸⁴⁾

และในกลไกการทำงานของเทโลเมียร์ยังพบว่า telomerase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็น reverse transcriptase ในการนำสาย RNA ต้นแบบเชื่อมกับปลายของเทโลเมียร์ที่ยังคงอยู่เพื่อเติมลำดับเบสที่ซ้ำกันของเทโลเมียร์⁽⁸⁵⁾ ภายในกลไกของ epigenetics แสดงถึงความสำคัญของการควบคุมความยาวของเทโลเมียร์ จากการศึกษาก่อนหน้านี้มีการแสดงถึงการเกิด hypomethylation ของตำแหน่ง subtelomeric มีความเกี่ยวข้องกับความยาวเทโลเมียร์ และตำแหน่งนี้อาจมีความสำคัญต่อกลไก epigenetics ที่ควบคุมความสมดุลของเทโลเมียร์⁽⁸⁶⁾ นอกจากนี้ การศึกษาความยาวเทโลเมียร์ในโรคข้อนิ้วมือเสื่อม พบว่าความยาวเทโลเมียร์มีความสัมพันธ์เชิงลบกับอายุของผู้ป่วยอย่างมีนัยสำคัญ⁽⁸⁷⁾ อีกทั้งการศึกษาความยาวของเทโลเมียร์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย aortic dissection โรคหลอดเลือดแข็งตัว โรคเบาหวาน และ โรคหลอดลมอุดกั้นเรื้อรัง (chronic obstructive pulmonary disease, COPD)^(88, 89) พบว่าเทโลเมียร์หดสั้นลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม Martin และ Buckwalter ศึกษาผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมจำนวน 27 รายที่มีอายุระหว่าง 1-87 ปี พบว่าอายุมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงเซลล์ chondrocytes ของกระดูกอ่อนอาจส่งผลการสลายของกระดูกอ่อนและการเกิดโรคข้อเสื่อม และยังพบว่าบริเวณกระดูกอ่อนไม่มีการทำงานของเอนไซม์ telomerase โดยการวัดความยาวเทโลเมียร์ด้วย Southern blot พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยอายุน้อยมีความยาวเทโลเมียร์ที่ยาวกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีอายุมากอย่างมีนัยสำคัญ⁽⁹⁰⁾ รวมถึงการศึกษาความยาวเทโลเมียร์ของเซลล์ chondrocytes ของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม พบว่าบริเวณที่เกิดรอยโรคของโรคข้อเสื่อมมีความยาวเทโลเมียร์สั้นกว่าเซลล์ chondrocytes บริเวณที่ไม่เกิดรอยโรคของโรคข้อเสื่อม⁽⁹¹⁾ การเพิ่มจำนวนของ DNA มีผลต่อการหดสั้นลงของความยาวเทโลเมียร์ ในการศึกษาเซลล์ chondrocytes ของมนุษย์ พบว่าภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ chondrocytes ส่งผลต่อการแก่

ตัวของเซลล์ ความไม่เสถียรของความยาวเทโลเมียร์ และการหดสั้นลงของเทโลเมียร์⁽⁹⁰⁾ แต่ในการศึกษาของ Tamayo และคณะ ศึกษาความยาวเทโลเมียร์ในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม พบว่าความยาวเทโลเมียร์ในกลุ่มผู้ป่วย 2 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกัน⁽⁹²⁾ ส่วนในโรคมะเร็งไตในเด็ก (wilms tumor, WT) พบว่าระดับ LINE-1 methylation มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับความยาวเทโลเมียร์ในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งไต และยังพบว่าความยาวเทโลเมียร์หดสั้นลงและระดับ LINE-1 methylation ต่ำลงในเซลล์ WT ที่ได้รับสารที่ทำให้เกิด hypomethylation (5-aza-2'-deoxycytidine) เปรียบเทียบกับเซลล์ WT ควบคุม⁽⁹³⁾ นอกจากนี้ในการศึกษาความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงลบกับค่า VEGF⁽⁹⁴⁾ ส่วนการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความยาวเทโลเมียร์และระดับการเกิด DNA methylation ในโรคทางเดินน้ำดีตีบตัน พบว่าระดับ LINE-1 methylation มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความยาวของเทโลเมียร์อย่างมีนัยสำคัญ⁽⁹⁵⁾ เช่นเดียวกับโรคไขกระดูกฝ่อ⁽⁸⁰⁾ แต่ในโรคเบาหวานประเภทที่ 2 พบว่าระดับ LINE-1 methylation มีความสัมพันธ์เชิงลบกับความยาวของเทโลเมียร์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคเบาหวานประเภทที่ 2⁽¹⁰⁾

ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress)

สารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species, ROS) เกิดมาจากระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งสร้างความเข้มข้นของ ROS จากระดับต่ำถึงระดับปานกลาง หากมีการสร้างสาร ROS ที่สูงมากกว่าปกติจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของเซลล์ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตนั้น เช่น ไขมัน โปรตีน และ DNA ความไม่สมดุลระหว่างระดับของสารออกซิแดนซ์ และสารต้านอนุมูลอิสระ หากมีสารออกซิแดนซ์สูงกว่าก่อให้เกิด ภาวะเครียดออกซิเดชัน ร่างกายสามารถสารออกซิแดนซ์จาก 2 แหล่ง คือ ภายในและภายนอกเซลล์ของร่างกาย (endogenous/exogenous sources of ROS) ในส่วนของ ROS ที่สร้างภายในเซลล์ เช่น superoxide anion (O_2^-) hydroxyl radical ($\bullet OH$) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) และ ROS ที่ได้รับจากภายนอกเซลล์ เช่น การสูบบุหรี่ การได้รับโอโซน การได้รับออกซิเจนระดับสูง (hyperoxia) สารรังสี และโลหะหนัก เป็นต้น นอกจากนี้การป้องกันสารออกซิแดนซ์สามารถทำได้จากการสร้างความสมดุลด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ แบ่งออกเป็นกลุ่มเอนไซม์ และไม่ใช่เอนไซม์ สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มเอนไซม์ เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GTPx) เป็นต้น ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มที่

ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น ascorbic acid (vitamin C) และ α -tocopherol (vitamin E) เป็นต้น⁽⁹⁶⁾ โดยภาวะเครียดออกซิเดชันส่งผลต่อการเกิดโรคต่างๆ มากมาย เช่น มะเร็ง ความผิดปกติทางระบบประสาท โรคหลอดเลือดแข็ง โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน เป็นต้น ส่วนในโรคข้อเสื่อมกลไกการเกิด ROS เกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น ความผิดปกติของไมโทคอนเดรีย และการเหนี่ยวนำจากไซโตไคน์ ซึ่งการเหนี่ยวนำของสารไซโตไคน์บริเวณข้อของผู้ป่วยส่งผลต่อการสร้าง ROS ในกลุ่ม nitric oxide (NO) และ superoxide anion⁽⁹⁷⁾ สาร ROS เหล่านี้จะกระตุ้นการสร้างสาร hydrogen peroxide, peroxinitrite และ hydrogen radical ส่งผลต่อการสลายตัวบริเวณกระดูกอ่อนผิวข้อ และการอักเสบบริเวณเซลล์เยื่อข้อ การศึกษาภาวะเครียดที่ส่งผลให้ความยาวเทโลเมียร์ลดลงในกลุ่มแรงงานในโรงงานถลุงเหล็กที่ได้รับโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน หรือพีเอเอช (PAHs) เป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งปอดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และยังพบว่าระดับ LINE-1 methylation มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเช่นเดียวกัน⁽⁹⁸⁾ และในการศึกษาระดับ LINE-1 methylation ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน พบว่า LINE-1 methylation มีความสัมพันธ์เชิงลบกับค่า 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine อย่างมีนัยสำคัญ⁽⁹⁵⁾ นอกจากนี้ ระดับ LINE-1 methylation ลดลงในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ได้รับภาวะเครียดจาก H₂O₂ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม ในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาระดับ LINE-1 methylation และความยาวเทโลเมียร์ในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเพื่อศึกษาคุณภาพของภาวะเครียดออกซิเดชันที่ก่อให้เกิดโรคข้อเสื่อมมีผลอย่างไร อีกทั้งยังศึกษาผลของไซโตไคน์ TNF- α ในเซลล์เยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเพื่อตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของระดับ LINE-1 methylation ความยาวเทโลเมียร์ และระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม การศึกษาระดับ DNA methylation ในกลุ่มคนอ้วนที่มีอาการหยุดหายใจขณะนอนหลับ (sleep Apnea-Hypopnea Syndrome) ที่ได้รับออกซิเจนที่แตกต่างกัน พบว่าบริเวณ promoter ของ IL-6 ในกลุ่มคนอ้วนที่ได้รับออกซิเจนสูงเกิด IL-6 hypermethylation เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มคนอ้วนที่ได้รับออกซิเจนต่ำ⁽⁹⁹⁾

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

ประชากร

1. กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target Population)

เกณฑ์การคัดเลือก (Inclusion criteria)

ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม อายุระหว่าง 50-85 ปี ที่เข้ารับการผ่าตัดจากฝ่ายออร์โธปิดิกส์
โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria)

ผู้ป่วยโรคข้อชนิดอื่น เช่น โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคเอสแอลอี โรคเกาต์ เป็นต้น รวมถึง
ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน ผู้ป่วยที่เคยได้รับบาดเจ็บบริเวณเข่า หรือผู้ป่วยที่เคยติดเชื้อบริเวณข้อ และ
มะเร็ง เป็นต้น

2. กลุ่มประชากรควบคุม (Healthy controls)

เกณฑ์การคัดเลือก (Inclusion criteria)

อาสาสมัครสุขภาพดีช่วงอายุ 40-80 ปี และกลุ่มผู้สูงอายุที่เข้ารับการตรวจสุขภาพที่
โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria)

ประชากรกลุ่มอาสาสมัครที่มีอาการของโรคข้อเสื่อม และมีอาการของโรคข้อชนิดอื่นร่วมอยู่
ด้วย

3. ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample Size)⁽¹⁰⁰⁾

การศึกษานี้ใช้จำนวนกลุ่มประชากรตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่เข้ารับการผ่าตัดจาก
โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยสามารถคำนวณกลุ่มตัวอย่าง โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

$$n = \frac{(z_{\alpha/2})^2}{4e^2}$$

n = ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

$Z_{\alpha/2}$ = ระดับความเชื่อมั่น 95%

e = ระดับความคลาดเคลื่อนของการสุ่มตัวอย่างที่ยอมรับได้ (10%)

$$n = \frac{(1.96)^2}{4 \times (0.1)^2}$$

ดังนั้น ในการศึกษานี้ต้องใช้ตัวอย่างเลือดจำนวน 96 ตัวอย่าง แต่เนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องการเก็บตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวได้จากผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นโรคข้อเข่าเสื่อมที่มีความจำเป็นต้องเข้ารับการผ่าตัด โดยเลือกเก็บตัวอย่างตัวอย่างเลือดของผู้ที่เข้ารับการผ่าตัด จึงควรเก็บตัวอย่างอย่างน้อย 96 ตัวอย่าง

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

- Autoclave (Hydroclave Harvey, USA)
- Automatic adjustable micropipette (Eppendorf, Germany)
- Aluminum foil (Rainbow metal company, USA)
- Balance (Satorius, Germany)
- Biosafety cabinet class II (ESCO, Singapore)
- Blade (Parabolar, Germany)
- Centrifuge, refrigerated centrifuge (Eppendorf, USA)
- Centrifuge, microcentrifuge high speed (Eppendorf, USA)
- Combs (BIO-RAD, Hercules, California, USA)
- Clotted blood and EDTA tube (Vacuettee, Austria)
- Cylinder: 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml (Pyrex, USA)
- CO₂ incubator (Scientific, USA)
- Digital timer
- Disposable gloves (Progllove, Thailand)
- Electrophoresis chamber set (BIO-RAD, USA)
- Easyflask Filter Nunclon: 25 cm², 75 cm², 175 cm² (NUNC, DENMARK)

- 6-well Plate, Round (NUNC, DENMARK)
- 24-well Plate, Round (NUNC, DENMARK)
- Flow Cytometry LSR II (BD Biosciences, USA)
- Freezer -80 °C (Forma Scientific, USA)
- Gel Doc 1000 (BIO-RAD, USA)
- Glass pipette: 1 ml, 5 ml, 10 ml (Witeg, Germany)
- Hemocytometer (BOECO, Germany)
- Kimwipe paper
- Mastercycle personal (Eppendorf, USA)
- Multi-block heater (Techne DRI Block, USA)
- Microcentrifuge tube rack
- Microcentrifuge tube: 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (BIO-RAD, USA)
- NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Scientific, USA)
- Real Time PCR StepOnePlus (Applied Biosystems, USA)
- Phase contrast microscope (Nikon, USA)
- pH meter (ESDO, Schott)
- Pipette rack (Autopack, USA)
- Power supply model 250 (BIO-RAD, USA)
- Parafilm (American National Can, USA)
- Petri dish
- Real time PCR tube
- Plastic wrap
- Polypropylene conical tube, sterile: 15 ml, 50ml (Elkay, USA)
- PCR marker (BIO-RAD, USA)
- Reagent bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Duran, USA)
- Refrigerator (Sanyo, Japan)
- Stirring-magnetic bar

- Sanitary tissue paper (Celox, Thailand)
- Ultrasonic Cleaner (HWASHIN, KOREA)
- Vortex mixer (Scientific Industry, USA)
- Water purification equipment (Water pro Ps, Labconco, USA)
- Water bath: Memmert WB45 (Memmert, German)

5. แบบประเมินส่วนบุคคล (Self-report assessment by questionnaire)

5.1 แบบประเมิน Knee and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) และ Visual analog scale (VAS)

Knee and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) เป็นแบบประเมินอาการปวด การขัดตึง การเคลื่อนไหวของร่างกายฉบับภาษาไทย โดยแบบประเมินนี้แบ่งการประเมินออกเป็น 6 กลุ่ม คือ (1) อาการ 5 คำถาม (2) การฝืดขัดของข้อ 2 คำถาม (3) อาการปวด 9 คำถาม (4) การเคลื่อนไหวในกิจวัตรประจำวัน 17 คำถาม (5) การเคลื่อนไหวในการออกกำลังกายและการทำกิจกรรมอื่นๆ 5 คำถาม และ (6) คุณภาพชีวิต 4 คำถาม ซึ่งระดับคะแนนการประเมินคือ 0-4 ตามลำดับ และคะแนนโดยรวมของการประเมิน KOOS สามารถสรุปว่า ระดับคะแนนของ KOOS สูง แสดงถึงความรุนแรงของอาการปวด การขัดตึง การเคลื่อนไหวของร่างกาย ที่เกิดขึ้นมากในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

5.2 แบบประเมินระดับความรุนแรงของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม Index of Severity for Osteoarthritis of the Knee by Lequesne (Knee ISOA)

แบบประเมินระดับความรุนแรงของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม คือแบบประเมินอาการปวด ระยะทางที่เดินได้มากที่สุด และการทำกิจวัตรประจำวัน ซึ่งคะแนนรวมของแบบประเมินนี้ สามารถแบ่งระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อม โดยคะแนนรวมที่มากกว่าหรือเท่ากับ 14 แสดงถึงระดับความรุนแรงของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมของผู้ป่วยระดับรุนแรงมากที่สุด

6. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (Reagents)

6.1 สารเคมีทั่วไป (General reagents)

- Agarose molecular grade (Sigma, USA)
- Boric acid (Emsure, Germany)
- 70% Ethanol
- Ethidium bromide (Sigma, USA)

- Hydrochloric acid (Sigma, USA)
- RNA later™ (Qiagen, Germany)
- Tris

6.2 สารเคมีสำหรับสกัด DNA จากเซลล์เม็ดเลือดขาว (DNA extraction from peripheral blood leukocytes)

- Absolute ethanol
- Chloroform (CH₃Cl)
- 20 mg/ml Proteinase K
- Distilled water
- 70% ethanol
- Glycogen
- Isoamyl alcohol (IAA)
- Lysis buffer
- Phenol
- 2 M Sodium acetate

6.3 สารเคมีสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อข้อ

- Minimum essential media (MEM) alpha Modification, with L-Glutamine (Hyclone, USA)
- 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Hyclone, USA)
- 1% Antibiotic-antimycotic (Thermo Scientific, USA)
- 0.25% Trypsin (Hyclone, USA)

6.4 สารเคมีสำหรับสกัด DNA จากเซลล์เยื่อข้อ (DNA extraction from synovial fibroblasts) (Vivants, Malaysia)

- Absolute ethanol
- Buffer TB
- Elution buffer
- Lysis enhancer

- 1X Phosphate buffered saline (PBS)
- 20 mg/ml Proteinase K
- Wash buffer

6.5 สารเคมีสำหรับการสกัด RNA จากจากเซลล์เยื่อข้อ (DNA extraction from synovial fibroblasts) (Vivants, Malaysia)

- Buffer TR
- 2-Mercaptoethanol
- 80% ethanol
- DNase I
- Digestion buffer
- Digestion enhancer
- RNase-free Water
- Wash buffer

6.6 สารเคมีสำหรับทำ bisulfite treatment

- CT conversion
- M-binding buffer
- M-desulphonation buffer
- M-dilution buffer
- M-dissolving buffer
- M-elution buffer
- M-wash buffer

6.7 สารเคมีสำหรับทำ quantitative Combined bisulfite restriction analysis (qCOBRA)

- 1X Bovine serum albumin (BSA)
- 10 mM Deoxynucleotide triphosphates (dNTP)
- Distilled water
- 0.5 U Hotstar Taq DNA polymerase (Qiagen, Germany)

- 25 mM MgCl₂ (Qiagen, Germany)
- Mineral oil
- 10X NEBuffer 3.1 (New England BioLabs, UK)
- 10X PCR buffer (Qiagen, Germany)
- 10 μM Forward primer (Macrogen, Korea)
- 10 μM Reverse primer (Macrogen, Korea)
- *Taq I* enzyme (Thermo Scientific, USA)
- *Tas I* enzyme (Thermo Scientific, USA)

6.8 สารเคมีสำหรับการเตรียม Polyacrylamide gel

- 40% Acrylamide (BIO-RAD, USA)
- 10% Ammonium persulfate (APS)
- Distilled water
- 6X loading dye
- 25 bp marker (Promega, USA)
- 1X TBE buffer
- 10X TBE buffer
- Tetramethylethylenediamine (TEMED)

6.9 สารเคมีสำหรับเตรียม cDNA (complementary DNA)

- 10X Taq buffer (Qiagen, Germany)
- 25 mM MgCl₂ (Qiagen, Germany)
- 10 mM dNTP mixture
- Random Hexamer
- RNase inhibitor
- Multiscribe reverse enzyme

6.10 สารเคมีสำหรับการทำ quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

- QPCR Green Master Mix HRox,2X (Apsalagen, Thailand)
- 10 μ M Forward primer (Macrogen, Korea)
- 10 μ M Reverse primer (Macrogen, Korea)
- Distilled water

7. การเก็บรวบรวมข้อมูล

สำหรับการเก็บรวบรวมข้อมูลทั้งหมดในการทำวิจัยครั้งนี้ ได้ทำการเก็บรวบรวมด้วยการจดบันทึกลงในสมุดปฏิบัติการและบันทึกข้อมูลทั้งหมดลงในคอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel

8. การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

8.1 การเก็บชิ้นเนื้อ

- 8.1.1 ทำการเก็บชิ้นเนื้อเยื่อข้อ synovial tissue จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม
- 8.1.2 นำชิ้นเนื้อที่ได้จากผู้ป่วยมาตัดแบ่งและชั่งน้ำหนักให้แต่ละชิ้นหนักประมาณ 60 mg
- 8.1.3 นำชิ้นเนื้อที่ได้จากข้อ 8.1.2 ใส่ใน microcentrifuge tube และเติมน้ำยารักษาสภาพ RNA ปริมาตร 300 μ l นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -20°C

8.2 การเก็บตัวอย่างเลือด

- 8.2.1 เก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็ง ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)
- 8.2.2 นำตัวอย่างเลือดที่ได้มาปั่นที่ความเร็ว 4,000 g นาน 10 นาที
- 8.2.3 เก็บส่วน buffy coat ใส่ใน microcentrifuge tube และนำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -80°C เพื่อรอสกัด DNA ต่อไป

8.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์จากชิ้นเนื้อเยื่อข้อ (primary cell culture of synovial fibroblasts)

8.3.1 การเตรียมตัวอย่างเซลล์เยื่อข้อ

- 8.3.1.1 นำชิ้นเนื้อ synovial tissue ที่ได้จากการผ่าตัดผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมาล้างด้วยน้ำเกลือ และตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดเล็ก
- 8.3.1.2 นำชิ้นเนื้อวางในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (T25 flask) ให้มีระยะห่างที่เท่ากัน แล้วเติม

อาหารเลี้ยงเซลล์ alpha minimum essential medium (α -MEM) ซึ่งประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS) และ 200 IU/ml penicillin/streptomycin ให้ท่วมชิ้นเนื้อ และเลี้ยงเซลล์จากชิ้นเนื้อโดยนำเข้าสู่ตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5

8.3.1.3 เมื่อเซลล์เจริญเต็มที่ ทำการเก็บชิ้นเนื้อออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์ แล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และแยกเซลล์ออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์โดยเติมเอนไซม์ทริปซินที่ผสมกับ EDTA ปริมาตร 2 ml

8.3.1.4 นำเข้าสู่ตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C โดยมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 5-10 นาที ดูการแยกของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจสอบว่าเซลล์ได้หลุดจาก ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งหมด เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 2 ml เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน

8.3.1.5 ดูดสารละลายทั้งหมดลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 ml และทำการปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 824 g นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 ml ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง ผสมให้เข้ากัน

8.3.1.6 ดูดสารละลายที่ได้ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 4 ml

8.3.1.7 ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน หรือเมื่อสังเกตเห็นการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเซลล์

8.3.1.8 กรณีที่ต้องการเก็บเซลล์ไว้ทำการศึกษาต่อ นำตะกอนเซลล์ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาเติม freezing media ที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ และ dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาณ 800 μ l เก็บในหลอด cryotube แช่ไนโตรเจนเหลว

8.3.2 การศึกษาเซลล์เพาะเลี้ยง synovial fibroblasts ที่ได้รับ TNF- α

8.3.2.1 นำเซลล์ synovial fibroblasts ที่เพาะเลี้ยงในข้อ 8.3.1 อยู่ในช่วง passage 4-6 ย้ายลง 6-well plate จำนวน 1×10^5 cells/2 ml ของอาหาร MEM alpha ที่ประกอบด้วย 10% FBS และ 200 IU/ml penicillin/streptomycin ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

8.3.2.2 เมื่อครบระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทำการล้างเซลล์ synovial fibroblasts ใน 6-well plate ด้วย 1X PBS หลังจากล้างเซลล์เรียบร้อยแล้ว เติมน้ำอาหารที่มี 10 ng/ml TNF- α ปริมาตร 2 ml ลงในแต่ละ well ของ 6-well plate เป็นระยะเวลา 1, 3 และ 7 วัน ซึ่งมีชุดควบคุมเป็นเซลล์ synovial fibroblasts ที่เลี้ยงด้วย MEM alpha ที่ประกอบด้วย 10% FBS และ 200 IU/ml penicillin/streptomycin

8.3.2.3 เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดทำการเก็บเซลล์ synovial fibroblasts ที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α และเซลล์ synovial fibroblasts ที่เป็นตัวควบคุม ด้วยการล้างเซลล์ด้วย 1X PBS จำนวน 2 ครั้ง และเติมเอนไซม์ทริปซินที่ผสมกับ EDTA ปริมาตร 0.5 ml

8.3.2.4 นำเข้าตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C โดยมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 5-10 นาที ดูการแยกของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจสอบว่าเซลล์ได้หลุดจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งหมด เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 0.5 ml เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน

8.3.2.5 ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์หลุดแยกตัวอยู่ในแต่ละ well ของ 6 well-plate ใส่ใน microcentrifuge tube ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ml

8.3.2.6 ทำการนับเซลล์ที่มีชีวิตด้วยการย้อมด้วย trypan blue เริ่มต้นด้วยผสมเซลล์ที่อยู่ใน microcentrifuge tube และปิเตต 10 μ l ผสมด้วย 10 μ l trypan blue เพื่อเป็นการเจือจางเซลล์ 2 เท่า ก่อนนับด้วย hemocytometer เพื่อดูจำนวน cell proliferation

8.3.3 การศึกษาผลของสถานะเครียด (oxidative stress) ของเซลล์ synovial fibroblasts ที่ได้รับ H₂O₂ และ tocopheryl acetate (TA)

8.3.3.1 นำเซลล์ synovial fibroblasts ที่เพาะเลี้ยงในข้อ 8.3.1 อยู่ในช่วง passage 4-6 ย้ายลง 6-well plate จำนวน 1 X 10⁵ cells/2 ml ของอาหาร MEM alpha ที่ประกอบด้วย 10% FBS และ 200 IU/ml penicillin/streptomycin ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

8.3.3.2 เมื่อครบระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทำการล้างเซลล์ synovial fibroblasts ใน 6-well plate ด้วย 1X PBS หลังจากล้างเซลล์เรียบร้อยแล้ว เติมน้ำอาหารที่มี 50 μ M TA

ปริมาตร 2 ml ลงในแต่ละ well ของ 6-well plate นำไปเก็บในตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C โดยมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งมีชุดควบคุม เป็นเซลล์ synovial fibroblasts ที่เลี้ยงด้วย MEM alpha ที่ ประกอบด้วย 10% FBS และ 200 IU/ml penicillin/streptomycin

8.3.3.3 เมื่อครบระยะเวลาที่เซลล์ได้รับ 50 μ M TA ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 50 μ M TA และอาหารเลี้ยงเซลล์ในเซลล์ที่ใช้เป็นชุดควบคุมทิ้ง

8.3.3.4 เตรียมการเติมสารสภาวะเครียดของเซลล์ synovial fibroblasts ด้วย 100 μ M H₂O₂ โดยสภาวะของเซลล์ประกอบด้วย 6 สภาวะคือ (1) สภาวะควบคุม (2) เติม 10 ng/ml TNF- α (3) เติม 100 μ M H₂O₂ (4) สภาวะควบคุม + 50 μ M TA (5) เติม 10 ng/ml TNF- α + 50 μ M TA และ (6) เติม 100 μ M H₂O₂ + 50 μ M TA

8.3.3.5 เมื่อครบระยะเวลา 24 ชั่วโมงทำการเก็บเซลล์และส่วน supernatant ของเซลล์ตามขั้นตอนในข้อ 8.3.2.3-8.3.2.6

8.4 การศึกษา DNA methylation

8.4.1 การสกัดแยก DNA จากเซลล์เม็ดเลือดขาว (peripheral blood leukocytes)

8.4.1.1 นำตัวอย่างเลือดปริมาตร 100 μ l เติม proteinase K ปริมาตร 10 μ l ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม lysis buffer ปริมาตร 400 μ l แล้วจึงผสมให้เข้ากันด้วย vortex นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 50 °C เวลา 2 ชั่วโมง

8.4.1.2 เติม phenol ปริมาตร 250 μ l และ chloroform (CH₃Cl): isoamyl alcohol (IAA) ปริมาตร 250 μ l

8.4.1.3 นำไปผสมให้เข้ากันด้วย vortex และปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เวลา 30 นาที ความเร็ว 17,350 g ที่ อุณหภูมิ 4 °C

8.4.1.4 หลังจากปั่นเหวี่ยงในข้อ 8.4.1.3 แล้วให้ดูดส่วนใสด้านบนใน microcentrifuge tube อันใหม่ที่มีส่วนผสมของ glycogen ปริมาตร 4 μ l, 2M sodium Acetate (NaOAc) ปริมาตร 40 μ l และ absolute ethanol (AbEtOH) ปริมาตร 800 μ l ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิก microcentrifuge tube หลอดขึ้นลงเบาๆ

8.4.1.5 นำ microcentrifuge tube ในข้อ 8.4.1.4 บ่มที่อุณหภูมิ -20 °C ซ้ำมคืน

8.4.1.6 หลังจากบ่มข้ามคืนแล้วนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เวลา 30 นาที ความเร็ว 17,350 g ที่ อุณหภูมิ 4 °C

8.4.1.7 เทส่วนใสด้านบนของ microcentrifuge tube ทิ้งและซับด้วยกระดาษซับ นำตะกอน ส่วนที่ได้ล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 ml พลิก microcentrifuge tube ขึ้นลงเบาๆ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 17,350 g เวลา 5 นาที

8.4.1.8 เทส่วนใสทิ้ง แล้วใช้ส่วนใสด้านบนออกให้หมด ทำตะกอน DNA ให้แห้ง ด้วยเปิดฝา microcentrifuge tube แล้วเข้าเครื่อง dry vacuum เวลา 15 นาที

8.4.1.9 นำตะกอนที่แห้งแล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 30-100 μ l

8.4.2 การสกัดแยก DNA จากเซลล์เยื่อข้อ (synovial fibroblasts)

8.4.2.1 นำตะกอนเซลล์ที่ได้จากการปั่นตกตะกอนมาล้างด้วย PBS ปริมาณ 200 μ l ผสมให้เข้ากัน

8.4.2.2 เติม proteinase K 20 μ l และ lysis enhancer 2 μ l ลงในตัวอย่าง ผสม ให้เข้ากันทันที

8.4.2.3 เติม buffer TB 200 μ l ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex แล้วนำไปบ่มที่ 65 °C นาน 10 นาที

8.4.2.4 เติม absolute ethanol 200 μ l และผสมให้เข้ากันทันทีที่เติม

8.4.2.5 ดูด lysate 600 μ l นำไปใส่ใน spin column ที่ใส่อยู่ใน collection tube แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 g นาน 1 นาที เทของเหลวที่ไหลลงสู่ collection tube ทิ้ง ทำซ้ำจน lysate หมด

8.4.2.6 เติม wash buffer 750 μ l ลงใน spin column นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 g นาน 1 นาที เทของเหลวที่ไหลลงสู่ collection tube ทิ้ง ทำขั้นตอนนี้ซ้ำอีกครั้ง

8.4.2.7 นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 g นาน 1 นาที เพื่อกำจัด ethanol ให้หมด แล้วเทของเหลวที่ไหลลงสู่ collection tube ทิ้ง

8.4.2.8 เปลี่ยน spin column ใส่ collection tube ใหม่ เติม elution buffer ที่ บ่มไว้ที่ 65 °C ปริมาตร 200 μ l ลงใน spin column membrane ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2 นาที แล้ว นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 g นาน 1 นาที เพื่อชะล้าง DNA ออกจาก membrane ของ column ได้สารละลาย DNA

8.4.2.9 นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -20°C ก่อนนำไปทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

8.4.3 การวัดปริมาณ DNA

วัดปริมาณ DNA ที่ได้ทั้งหมดด้วยเครื่อง nanodrop โดยอาศัยคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของ DNA ที่ความยาวคลื่น 260 nm โดยที่ $A_{260} = 1 = 50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNA

8.4.3.1 ปิเปต DNA ตัวอย่างมาเจือจาง (dilute) ด้วยน้ำที่ปราศจากการปนเปื้อน DNase

8.4.3.2 วัดค่าการดูดกลืนแสงของ DNA ด้วยเครื่อง nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm

8.4.3.3 คำนวณหาปริมาณ DNA โดยที่ $A_{260} = 1 = 50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNA และวัดคุณภาพ DNA จากสัดส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/280 nm ซึ่ง DNA ที่มีคุณภาพควรมีค่าระหว่าง 1.8-2.0

8.4.4 นำ DNA มาทำ bisulfite treatment

8.4.4.1 ปรับค่าความเข้มข้นของ DNA ให้มีค่าความเข้มข้นเป็น $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ปริมาตร $20 \mu\text{l}$ (100 ng) หลังจากนั้นนำ DNA ผ่านขั้นตอนด้วย bisulfite treatment โดยใช้ EZ 8 DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research Corporation, Orange, CA, USA)

8.4.5 quantitative Combined bisulfite restriction analysis (qCOBRA) ของ LINE-1⁽⁹⁵⁾

8.4.5.1 เพิ่มจำนวนของ bisulfited DNA โดยใช้ปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของ COBRA LINE-1

ชื่อ Primer	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	ขนาด (คู่เบส)
LINE-1 forward primer	5'-GTAAAGAAAGGGGTGAYGGT-3'	92
LINE-1 reverse primer	5'-AATACRCCRTTCTTAAACCRATCTA-3'	

8.4.5.2 เตรียม master mix สำหรับการทำให้ PCR ของ COBRA LINE-1 ตามส่วนประกอบ

ดังแสดง ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สารเคมี และปริมาณที่ใช้ในการทำ PCR ของ COBRA LINE-1

สารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อตัวอย่าง (μ l)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X PCR buffer	1	1X
200 mM dNTPs	0.2	4 mM
25 mM MgCl ₂	0.4	1 mM
20 μ M primers (forward and reverse)	0.3	0.6 μ M
0.5 U HotStar <i>Taq</i> DNA polymerase	0.1	-
Distilled water	6	-
100 ng bisulfite-treated DNA	2	-
ปริมาตรรวม		10

8.4.5.3 นำ master mix ในข้อ 8.4.5.2 ปิดฝา PCR tube แล้วเปิด 100 ng bisulfite-treated DNA (DNA template) ในขั้นสุดท้าย และ positive control ของการศึกษาครั้งนี้คือ Hela cell line และ negative control คือ distilled water

8.4.5.4 นำไปเพิ่มจำนวน DNA ด้วย PCR โดยใช้สภาวะดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สภาวะและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ของ COBRA LINE-1

สภาวะที่ทำปฏิกิริยา	เวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา	
95°C initial activation	15 นาที	
95°C denature	45 วินาที	40 รอบ
55°C annealing	45 วินาที	
72°C extension	45 วินาที	
72°C final extension	7 นาที	

8.2.5.5 การวิเคราะห์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่แสดงถึงรูปแบบการเกิด methylation สามารถคำนวณได้จากสูตร ดังนี้

สูตรการคำนวณรูปแบบของระดับ LINE-1 methylation

กำหนดให้

- A แทน ความเข้มของแถบดีเอ็นเอขนาด 92 คู่เบส ทารด้วย 92
- B แทน ความเข้มของแถบดีเอ็นเอขนาด 60 คู่เบส ทารด้วย 56
- C แทน ความเข้มของแถบดีเอ็นเอขนาด 50 คู่เบส ทารด้วย 48
- D แทน ความเข้มของแถบดีเอ็นเอขนาด 42 คู่เบส ทารด้วย 40
- E แทน ความเข้มของแถบดีเอ็นเอขนาด 32 คู่เบส ทารด้วย 28
- F แทน [(D+E)-(B-C)] ทารด้วย 2

ร้อยละของ LINE-1 methylation (% ^mC) = $100 \times (A+2C+F)/(2A+2B+2C+2F)$

ร้อยละของ LINE-1 hypermethylation (% ^mC ^mC) = $100 \times (C/2)/[(C/2)+A+B+F]$

ร้อยละของ Partially LINE-1 methylation (% ^uC ^mC) = $100 \times F/[(C/2)+A+B+F]$

(% ^mC ^uC) = $100 \times A/[(C/2)+A+B+F]$

ร้อยละของ LINE-1 hypomethylation (% ^uC ^uC) = $100 \times B/[(C/2)+A+B+F]$

8.4.6 การวิเคราะห์รูปแบบการเกิดเมทิลเลชัน

8.4.6.1 หลังจากทำการเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยา PCR แล้ว นำ PCR product ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ คือ LINE-1 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ 2 U *TaqI* และ 8 U *TasI* ในสารละลาย NEBuffer 3 แล้วจึงนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 65 °C ซ้ำมคีน โดยที่ *TaqI* ตำแหน่ง restriction site คือ 5' TCGA 3' และ 3' AGCT 5' ในส่วนของ *TasI* มี ตำแหน่ง restriction site คือ 5' AATT 3' และ 3' TTAA 5' สารที่ใช้เตรียมตั้งตารางที่ 4

8.4.6.2 การวิเคราะห์รูปแบบการเกิด methylation ด้วย 8% non-denaturing polyacrylamide gel สารที่ใช้เตรียมตั้งตารางที่ 5 นำ PCR product 10 µl ผสมกับ 6X loading dye 6 µl หยอดลงในช่องเจลที่เตรียมไว้ แล้วนำมาผ่านการวิเคราะห์ด้วย 8% non-denaturing polyacrylamide gel ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ กระแสไฟฟ้า 0.4 แอมแปร์ เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นนำไปย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเป็นเวลา 10 นาที

8.4.6.3 วัดความเข้มของแถบที่ปรากฏ (band intensity) ด้วยเครื่อง Molecular Imager Gel Doc ด้วยโปรแกรม Image Lab (Bio-Rad, Begoniastraat, Belgium) ขนาดของ PCR product เทียบได้จาก 25 bp ladder โดย LINE-1 สามารถแยกออกได้เป็น 5 ส่วน ประกอบด้วยขนาด 92, 60, 50, 42 และ 32 คู่เบส

ตารางที่ 4 สารเคมีที่ใช้ในการตัด PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ของ LINE-1

สารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อตัวอย่าง (μ l)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X NEBuffer 3.1 buffer	1	1X
10X BSA	0.1	0.1X
2U <i>TaqI</i> enzyme	0.2	0.04U
8U <i>TasI</i> enzyme	0.2	0.16U
Distilled water	0.5	-
PCR product	8	-
ปริมาตรรวม	10	

ตารางที่ 5 สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียม 8% non-denaturing polyacrylamide gel

สารเคมี	ปริมาตรต่อเจล
40% Polyacrylamide	1.2 ml
10X TBE buffer	600 μ l
Distilled water	4.2 ml
TEMED	60 μ l
10% Ammonium persulfate (APS)	6 μ l

8.5 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

8.5.1 การสกัด RNA จากเซลล์เพาะเลี้ยงเยื่อข้อ (synovial fibroblasts)

8.5.1.1 นำตะกอนของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงปั่นตกตะกอนที่ 1,000 g เวลา 5 นาที ที่ังสารละลาย ด้านบนทิ้งเก็บเฉพาะส่วนตะกอนของเซลล์

8.5.1.2 เติม 350 μ l buffer TR ในตะกอนของเซลล์ ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex

8.5.1.3 นำสารผสมที่ได้ใส่ใน homogenization column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดเวลา 2 นาที เก็บสารละลายที่ได้หลังจากปั่นเหวี่ยง

8.5.1.4 เติม 80% ethanol 350 μ l ในสารละลายที่เก็บในข้อ 8.5.1.3 ผสมให้เข้ากันด้วย pipette ห้ามทำการปั่นเหวี่ยง

8.5.1.5 นำสารละลายตัวอย่างจากข้อ 8.5.1.4 ใส่ใน RNA binding column แล้วปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 g เวลา 1 นาที ที่ังสารละลายส่วนที่ผ่าน column

8.5.1.6 เติม 500 μ l wash buffer และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด เวลา 1 นาที ที่ัง สารละลายส่วนที่ผ่าน column

8.5.1.7 เติม 70 μ l DNase I digestion Mix ใน RNA binding Column และบ่มที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที โดยสาร digestion mix ต้องเติมโดยตรงบน membrane

8.5.1.8 เติม 500 μ l inhibitor removal buffer และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดเวลา 1 นาที ที่ังสารละลายส่วนที่ผ่าน column

8.5.1.9 เติม 500 μ l wash buffer ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เวลา 1 นาที ที่ัง สารละลายส่วนที่ผ่าน column

8.5.1.10 ล้างตะกอน RNA ด้วย 500 μ l wash buffer อีกครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เวลา 1 นาที ที่ังสารละลายส่วนที่ผ่าน column และปั่นเหวี่ยง column เปล่าด้วยความเร็ว 10,000 g เวลา 1 นาที อีกครั้งเพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ส่วนที่เหลือ

8.5.1.11 นำ column ใส่ใน microcentrifuge tube อันใหม่ เติม 40-60 μ l RNase-free water โดยตรงบริเวณ membrane และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เวลา 1 นาที หลังจากนั้นเก็บ RNA ที่อุณหภูมิต่ำ -20°C หรือ -80°C

8.5.2 การวัดความเข้มข้นของ RNA

วัดปริมาณ RNA ที่ได้ทั้งหมดด้วยเครื่อง nanodrop โดยอาศัยคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของ RNA ที่ความยาวคลื่น 260 nm โดยที่ $A_{260} = 1 = 40 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNA

8.5.2.1 ปิเปต RNA ตัวอย่างมาเจือจาง (dilute) ด้วยน้ำที่ปราศจากการปนเปื้อน RNase

8.5.3.2 วัดค่าการดูดกลืนแสงของ RNA ด้วยเครื่อง nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm

8.4.3.3 คำนวณหาปริมาณ RNA โดยที่ $A_{260} = 1 = 40 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNA และวัดคุณภาพ RNA จาก สัดส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/280 nm ซึ่ง RNA ที่มีคุณภาพควรมีค่าระหว่าง 1.8-2.0

8.5.3 การเปลี่ยน RNA เป็น cDNA (Reverse transcription)

8.5.3.1 เมื่อวัดความเข้มข้นของ RNA แล้วให้นำมาเจือจางด้วย distilled water ให้ RNA มีความเข้มข้นเท่ากันทุกตัวอย่างที่ $0.65 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ปริมาตร $7.7 \mu\text{l}$ (5ng)

8.5.3.2 เตรียม master mix สำหรับการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ดังตารางที่ 6 และสภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา Reverse transcription ด้วยเครื่อง PCR ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 6 สารเคมี และปริมาณที่ใช้ในการทำ cDNA

สารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยา	ปริมาณต่อตัวอย่าง (μ l)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X Taq buffer	2	1X
25 mM MgCl ₂	4.4	5.5 mM
10 mM dNTP mixture	4	2 mM
Random Hexamer	1	-
RNase inhibitor	0.4	-
Multiscribe reverse enzyme	0.5	-
5 ng RNA	7.7	-
ปริมาตรรวม	20	

ตารางที่ 7 สภาวะ และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาการแปรสภาพจาก RNA เป็น cDNA

สภาวะที่ทำปฏิกิริยา	เวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา
25°C Incubation	10 นาที
48°C Reverse transcription	30 นาที
95°C Reverse transcription initiation	5 นาที

8.5.4 การวัดระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR

8.5.4.1 เตรียม stock primer solution ความเข้มข้น 100 μ M โดยเจือจาง primer ดัง

ตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดง primers และสภาวะที่ใช้ในการวัดระดับการแสดงออกของยีน

ชื่อ primer		ลำดับเบส (5'→3')	ขนาด (bp)	Annealing (°C)
<i>GAPDH</i> ⁽¹⁰¹⁾	(forward)	TTCATTGACCTCAACTACAT	467	60
	(reverse)	GAGGGGCCATCCACAGTCTT		
<i>IL-6</i> ⁽¹⁰²⁾	(forward)	AGCCACTCACCTCTTCAGAAC	83	60
	(reverse)	ACATGTCTCCTTTCTCAGGGC		
<i>IL-1β</i> ⁽¹⁰²⁾	(forward)	GCGGCCAGGATATAACTGACTTC	85	58
	(reverse)	TCCACATTTCAGCACAGGACTCTC		
<i>MMP-3</i> ⁽⁸⁵⁾	(forward)	CTGGACTCCGACACTCTGGA	79	60
	(reverse)	CAGGAAAGGTTCTGAAGTGACC		
<i>ADAMTs5</i> ⁽⁶³⁾	(forward)	CCTGCCACCCAATGGTAAATC	218	60
	(reverse)	CGGCCTACATTTCAGTGCCATC		
<i>VEGF</i> ⁽¹⁰³⁾	(forward)	CAAATGCTTTCTCCGCTCTGA	93	64
	(reverse)	CCTACAGCACAAATGTGAATG		

8.5.4.2 เจือจาง stock primer solution ของ *IL-6*, *IL-1 β* , *ADAMTs5*, *MMP-3* และ *VEGF*

ให้มีความเข้มข้น 10 μ M (stock primer solution 100 μ M ปริมาตร 10 μ l และเติม distilled water 90 μ l)

8.5.4.3 เตรียม master mix สำหรับวัดระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR ดังตารางที่ 9-10

ตารางที่ 9 แสดงชนิดและปริมาณสารเคมีสำหรับเทคนิค quantitative real-time PCR ของยีน *IL-6*, *IL-1 β* , *ADAMTs5* และ *MMP-3*

สารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อตัวอย่าง (μ l)	ความเข้มข้นสุดท้าย
SYBR Green (2x)	5	1X
10 μ M Forward primer	1	0.2 μ M
10 μ M Reverse primer	1	0.2 μ M
Distilled water	2	-
cDNA	1	-
ปริมาตรรวม	10	

ตารางที่ 10 แสดงชนิดและปริมาณสารเคมีสำหรับเทคนิค quantitative real-time PCR ของยีน *VEGF*

สารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อตัวอย่าง (μ l)	ความเข้มข้นสุดท้าย
SYBR Green (2x)	6.25	1.25X
10 μ M Forward primer	0.625	0.1 μ M
10 μ M Reverse primer	0.625	0.1 μ M
Distilled water	3	-
cDNA	2	-
ปริมาตรรวม	10	

8.5.4.4 ปิด master mix จากข้อ 8.5.4.3 ใส่ใน real time PCR tube แล้วเปิด cDNA template ใส่ในชั้นสุดท้าย ยกเว้นหลอดที่เป็น negative control เติม distilled water แทน cDNA template ตั้งค่าสภาวะและเวลาของเครื่อง quantitative real-time PCR ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 สภาวะและเวลาที่ใช้ในการทำ quantitative real-time PCR

สภาวะที่ทำปฏิกิริยา	เวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา	
95 °C Initial activation	10 นาที	
95 °C Denaturation	15 วินาที	40รอบ
Annealing temperature	1 นาที	
72 °C Extension	1 นาที	

8.5.4.5 การคำนวณค่าความสัมพันธ์การแสดงออกของ mRNA ในยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ในการทำ RT-PCR นั้นสามารถวิเคราะห์ผลการทดลองเพื่อดูระดับการแสดงออกของยีนนั้นๆได้จาก

$$\text{สมการความแตกต่างระดับการแสดงออกของยีน} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

โดยในที่นี้ $2^{-\Delta\Delta C_T}$ หมายถึง

$$\Delta C_T = (C_T \text{ Target gene} - C_T \text{ internal control})$$

$$\Delta\Delta C_T = (C_T \text{ Target gene} - C_T \text{ reference gene}) - (C_T \text{ Average internal control})$$

8.6 การศึกษาความยาวเทโลเมียร์ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR

8.6.1 เจือจางความเข้มข้นของ DNA เท่ากับ 1.56 ng/ μ l

8.6.2 เตรียม stock primer solution ความเข้มข้น 100 μ M โดยเจือจาง primer ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 14 แสดง condition สำหรับการศึกษาคความยาวเทโลเมียร์ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR

PCR cycle	เวลา	
95 °C Initial activation	30 วินาที	
95 °C Denaturation	15 วินาที	40 รอบ
54 °C Annealing	1 นาที	

8.6.6 ในการทำ quantitative real-time PCR แต่ละครั้งได้วัดค่าอ้างอิง (reference) ควบคู่ทุกครั้งของการทดลองเพื่อใช้เปรียบเทียบ quantitative real-time PCR ที่ได้แต่ละรอบ

8.6.7 คำนวณค่า Relative telomere length จาก quantitative real-time PCR โดยการเปรียบเทียบกับ internal control 36B4 ดังนี้

$$\Delta C_{T(\text{Reference})} = (C_T \text{ Telomere reference} - C_T \text{ 36B4 reference})$$

$$\Delta C_{T(\text{Unknown})} = (C_T \text{ Telomere Unknown} - C_T \text{ 36B4 Unknown})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{Unknown})} - \Delta C_{T(\text{Reference})}$$

$$\text{Relative telomere length} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

9. การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) ชนิด cross-sectional prospective study เป็นสถิติเกี่ยวข้องกับการเก็บรวบรวมข้อมูล และการนำเสนอข้อมูล โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) และการทดสอบความสัมพันธ์ของข้อมูลโดยใช้ Pearson's correlation ในรูปแบบกราฟและตาราง

สถิติเชิงอนุมาน (inferential statistic) เป็นสถิติที่ใช้สรุปผลของประชากร ในกรณีที่ข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติใช้สถิติ unpaired *t*-test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่ม การทดลอง ได้แก่ การเปรียบเทียบระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี และเมื่อทำการวิเคราะห์โดยแบ่งกลุ่มตามระดับความรุนแรงของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม (Kellgren and Lawrence (KL) grade) ใช้สถิติ One-way analysis of variance (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 6 ในการวาดกราฟ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการเกิด methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และแบบประเมินอาการความรุนแรง KOOS, VAS scores, WOMAC และ Lesquesne index ของโรคข้อเข่าเสื่อม รวมถึงความสัมพันธ์ของการเกิด methylation กับ relative telomere length (RTL) ได้ทำการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่ทดสอบจาก Pearson's correlation ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 22 นอกจากนี้ระดับ LINE-1 methylation ของผู้ป่วยเปรียบเทียบกับคุณลักษณะที่อาจส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพของโรค เช่น อายุ เพศ KL grade และระดับความรุนแรงของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม (Knee ISOA) เป็นต้น ได้ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีความถดถอยเชิงเส้นตรง และในส่วนของการเปรียบเทียบระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์ synovial fibroblasts ของกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับ 10 ng/μl TNF- α เป็นข้อมูลมีการแจกแจงแบบไม่ปกติใช้สถิติ Mann-Whitney test ในการวิเคราะห์ข้อมูล โดยถือว่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $P < 0.05$

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

1. การศึกษาระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมด้วยเทคนิค quantitative combine bisulfite restriction analysis (qCOBRA)

1.1 กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษาระดับ LINE-1 methylation นั้นทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม จำนวน 193 ราย และกลุ่มควบคุมจำนวน 96 รายโดยทำการศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ข้อมูลลักษณะทางคลินิก เช่น อายุ เพศ และระดับความรุนแรงของโรค (KL grade) ได้นำมาวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลทางคลินิก และระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อม ดังแสดงในตารางที่ 15

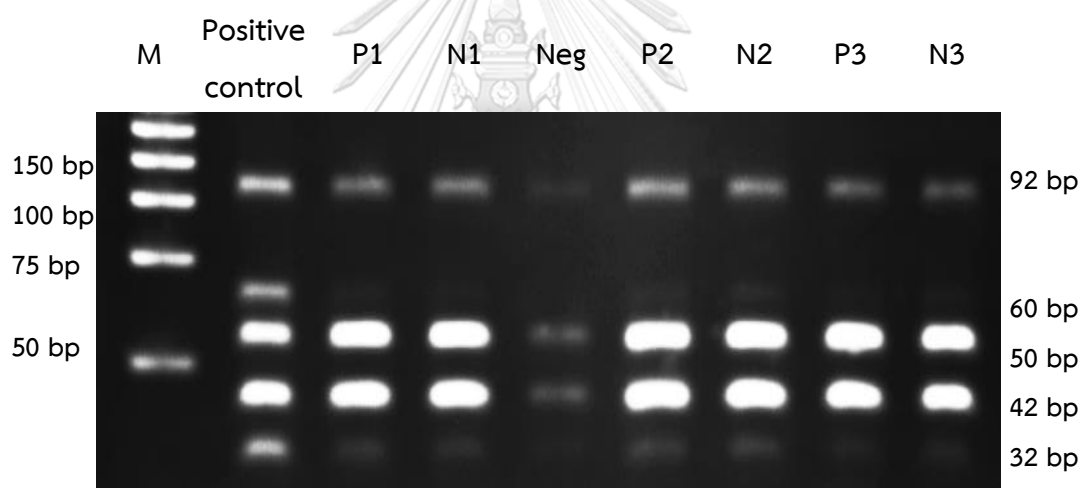
ตารางที่ 15 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มควบคุม

	กลุ่มผู้ป่วย	กลุ่มควบคุม	P-value
จำนวน (ราย)	193	96	-
อายุ (ปี) (mean \pm SD)	69.69 \pm 7.50	62.64 \pm 0.63	<0.001
เพศ			<0.001
- ชาย (%)	39 (20.21%)	48 (50%)	
- หญิง (%)	154 (79.79%)	48 (50%)	
ความรุนแรง (KL grade)			
Grade 2	68	-	-
Grade 3	61	-	-
Grade 4	64	-	-

จากตารางที่ 15 แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 193 ราย แบ่งออกเป็นเพศชาย 39 ราย และเพศหญิงจำนวน 154 ราย โดยมีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 69.69 ± 7.50 ปี เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมตามระดับความรุนแรงของโรค (KL grade) พบว่าผู้ป่วยจำนวน 68 รายมีระดับความรุนแรง grade 2 ผู้ป่วยจำนวน 61 ราย มีระดับความรุนแรง grade 3 และผู้ป่วยจำนวน 64 รายมีระดับความรุนแรง grade 4

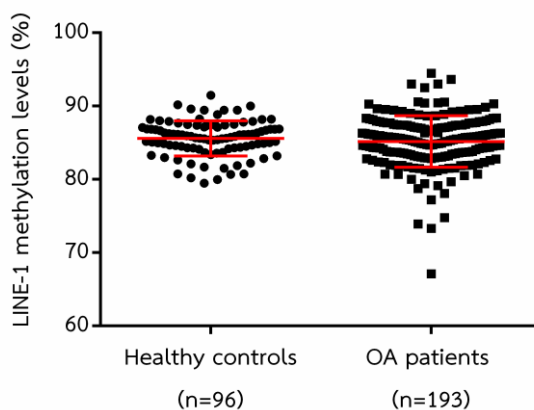
1.2 การศึกษาระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมกับกลุ่มควบคุม

จากผลการวัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอค่า methylation ที่ได้มาวิเคราะห์ผลตามสูตรที่ได้แสดงข้างต้น โดยรูปแบบของระดับ LINE-1 methylation มี 5 รูปแบบ ประกอบด้วยขนาด 92, 60, 50, 42 และ 32 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 9



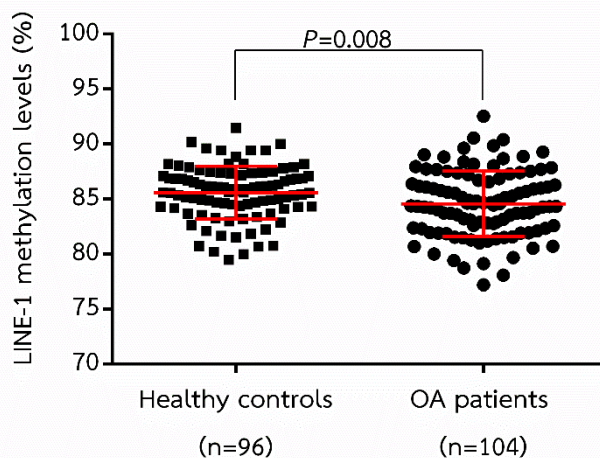
รูปที่ 9 LINE-1 methylation จาก PCR product ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะแล้วตรวจวิเคราะห์ด้วย 8% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (M แทน 25 bp ladder, Positive control แทน Hela cell line, P แทน ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม, N แทน กลุ่มควบคุม, Neg แทน negative control และหมายเลข 1 ถึง 3 แทนลำดับผู้ป่วย)

เมื่อทำการคำนวณค่าร้อยละของ LINE-1 methylation ดังสูตรในบทวิธีการทดลอง นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์สถิติด้วย unpaired *t* test ในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 193 ราย และกลุ่มควบคุม 96 ราย พบว่า ระดับ LINE-1 methylation ในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P = 0.233$) ดังรูปที่ 11



รูปที่ 10 ระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม จำนวน 193 รายที่วิเคราะห์ เปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมจำนวน 96 ราย



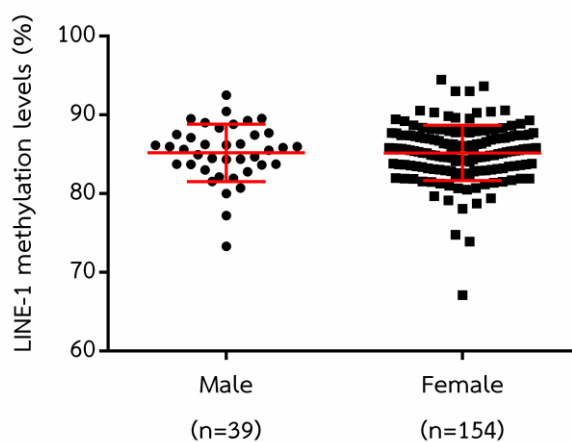


รูปที่ 11 ระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม จำนวน 104 รายที่วิเคราะห์ เปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมที่มีอายุเข้าคู่กันจำนวน 96 ราย

อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการจัดกลุ่มอายุของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมให้เข้าคู่กับอายุของกลุ่มควบคุม โดยกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 104 ราย และกลุ่มควบคุม 96 ราย แล้วทำการวิเคราะห์สถิติ unpaired *t* test พบว่า กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีระดับ LINE-1 methylation ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.008$) ดังรูปที่ 11

1.3 การศึกษาระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมกลุ่มเพศชายและเพศหญิง

นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์สถิติของระดับ LINE-1 methylation ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่แบ่งกลุ่มตามเพศออกเป็น 2 กลุ่ม คือ เพศชายจำนวน 39 ราย และ เพศหญิง 154 ราย พบว่า ไม่มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มเพศชายและเพศหญิง ($P = 0.992$) ดังแสดงในรูปที่ 12

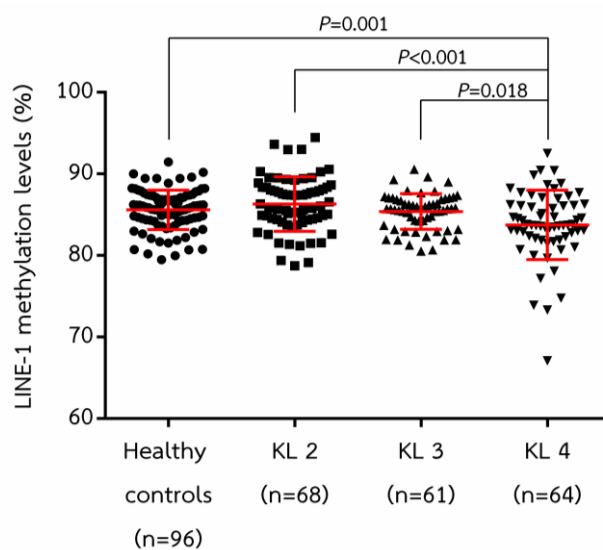


รูปที่ 12 ระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมกลุ่มเพศชาย และเพศหญิง

1.4 การศึกษาระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย

โรคข้อเข่าเสื่อมระดับความรุนแรงตามค่า KL grading กับกลุ่มควบคุม

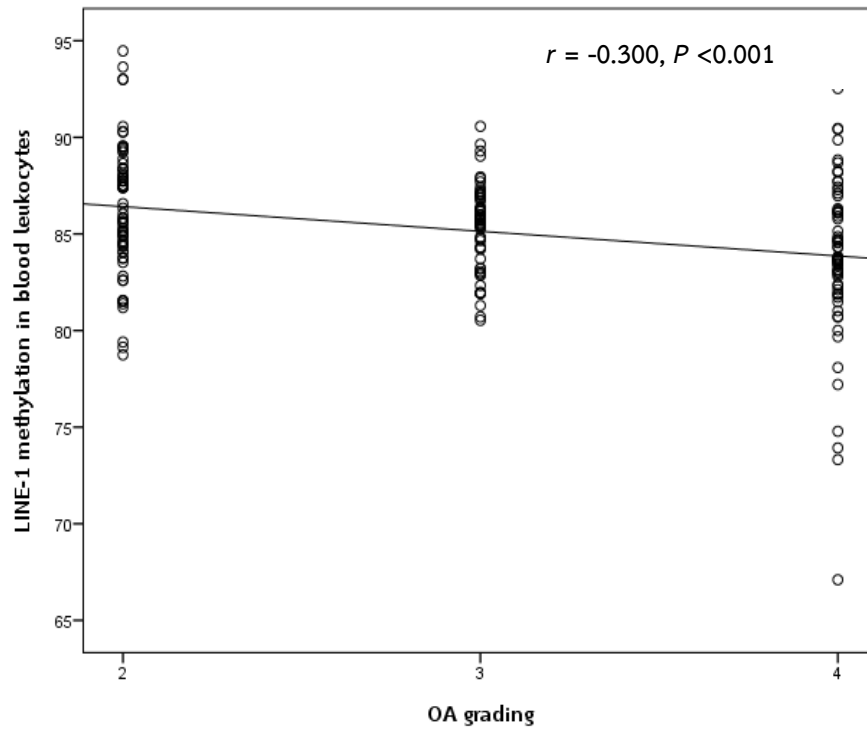
ในการศึกษาระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเปรียบเทียบเทียบระหว่างกลุ่มของผู้ป่วยที่มีระดับความรุนแรง KL grading ที่แตกต่างกัน และกลุ่มควบคุม ด้วยการวิเคราะห์สถิติ One-way ANOVA พบว่า ระดับ LINE-1 methylation ของผู้ป่วยกลุ่มระดับความรุนแรง grade 4 ต่ำกว่าระดับ LINE-1 methylation ในกลุ่มผู้ป่วยระดับความรุนแรง grade 2, 3 และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่ากลุ่มผู้ป่วยระดับความรุนแรง grade 4 เกิด LINE-1 hypomethylation โดยกลุ่มผู้ป่วยระดับความรุนแรง grade 4 มีระดับ LINE-1 methylation ต่ำกว่ากลุ่มผู้ป่วยระดับความรุนแรง grade 2 อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) เช่นเดียวกับกลุ่มผู้ป่วยระดับความรุนแรง grade 4 มีระดับ LINE-1 methylation ต่ำกว่ากลุ่มผู้ป่วยระดับความรุนแรง grade 3 อย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.02$) นอกจากนี้กลุ่มผู้ป่วยระดับความรุนแรง grade 4 ยังมีระดับ LINE-1 methylation ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.001$) แต่ในกลุ่มผู้ป่วยระดับความรุนแรง grade 2 และ grade 3 ระดับ LINE-1 methylation ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญดังแสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 13 ระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมในแต่ละระดับความรุนแรง KL grading 2, 3 และ 4 กับกลุ่มควบคุม

1.5 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและระดับความรุนแรงตามเกณฑ์ KL grading

จากนั้นได้ศึกษาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและระดับความรุนแรงตามเกณฑ์ KL grading 2, 3 และ 4 ตามลำดับ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ตัวแปร ซึ่งวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Pearson's correlation ดังแสดงในรูปที่ 14

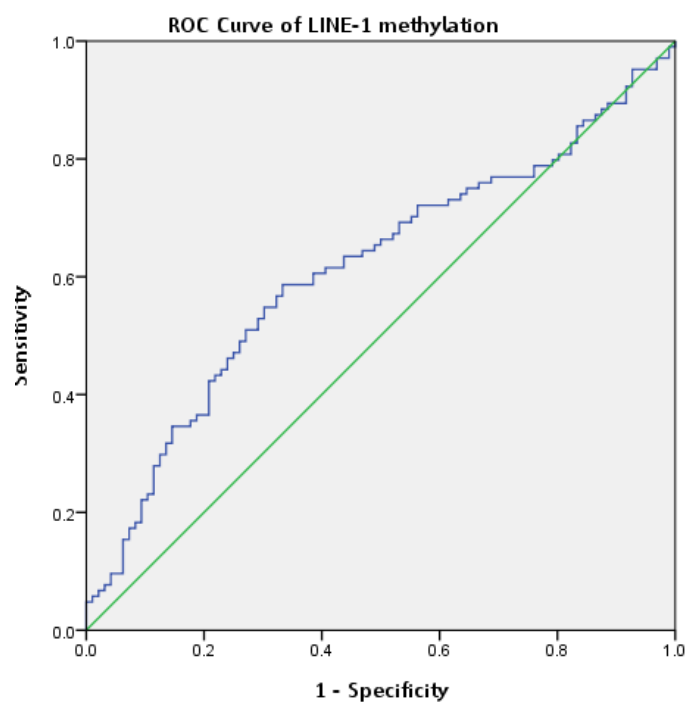


รูปที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 193 ราย และระดับความรุนแรงตามเกณฑ์ KL grading

จากกราฟข้างต้น แสดงให้เห็นว่าระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม มีความสัมพันธ์เชิงลบกับระดับความรุนแรง KL grading อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = -0.300, P < 0.001$) จากผลการศึกษานี้ทำนาย LINE-1 methylation มาประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการติดตามความรุนแรงของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม

1.6 การศึกษาความไวและความจำเพาะของระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาว

นอกจากนี้เพื่อทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความไวและความจำเพาะของวิธีการตรวจวินิจฉัยที่แสดงถึงความแม่นยำและถูกต้องในการตรวจวินิจฉัย จึงทำการวิเคราะห์ด้วยการสร้างกราฟ Receiver Operator Characteristic (ROC curve) ดังแสดงในรูปที่ 15 โดยพบว่าระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวมีค่า sensitivity เท่ากับ 0.606 และค่า specificity เท่ากับ 0.604 ซึ่งค่าดังกล่าวต่ำจึงอาจไม่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ในโรคข้อเข่าเสื่อม (area under curve = 0.612, จุด cut off ที่ 85.19 และ $P=0.006$)



รูปที่ 15 กราฟ ROC curve แสดงถึงความไวและความจำเพาะของระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาว

2. การศึกษาระดับ LINE-1 methylation และความยาวเทโลเมียร์ใน เซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ข้อมูลทางคลินิก และข้อมูล แบบประเมินอาการ ความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อม

2.1 กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา

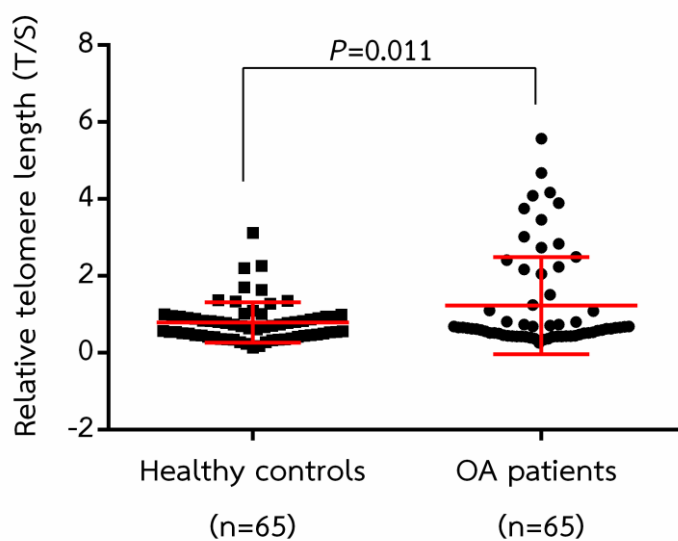
การศึกษาระดับ LINE-1 methylation ความยาวเทโลเมียร์ ข้อมูลทางคลินิก และข้อมูลแบบ ประเมินอาการ ความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมจากแบบประเมิน VAS scores, KOOS, WOMAC และ Lesquesne index ดังตารางที่ 16 แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 81 ราย ที่ได้รับการ ประเมินอาการจากแบบประเมินส่วนบุคคล แบ่งเป็น เพศชายจำนวน ร้อยละ 19.80 และเพศ หญิงจำนวน ร้อยละ 80.20 โดยมีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 70.11 ± 7.78 ปี เมื่อแบ่งกลุ่มตามระดับความ รุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อม (KL grading) พบว่า ผู้ป่วยจำนวน 33 ราย มีระดับความรุนแรง grade 2, ผู้ป่วยจำนวน 22 ราย มีระดับความรุนแรง grade 3 และผู้ป่วยจำนวน 26 ราย มีระดับความรุนแรง grade 4 อย่างไรก็ตามในการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบผลคะแนนการประเมินระหว่างกลุ่มผู้ป่วย โรคข้อเข่าเสื่อมที่แบ่งกลุ่มตามระดับความรุนแรง (KL grading) ด้วยสถิติ One-way ANOVA พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของคะแนนการประเมินในกลุ่มของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมแต่ละ ระดับความรุนแรงในทุกหัวข้อของแบบประเมินในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ข้อมูลแบบประเมินอาการ ความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อม และลักษณะข้อมูลทางคลินิก

	กลุ่มผู้ป่วย	K/L grade 2 (mild)	K/L grade 3 (moderate)	K/L grade 4 (severe)	P
จำนวน (ราย)	81	33	22	26	-
อายุ (ปี)	70.11 ± 7.78	71.39 ± 1.46	69.36 ± 1.34	69.12 ± 1.61	0.47
เพศ					0.70
- ชาย	19.8%	6.2%	6.2%	7.4%	
- หญิง	80.2%	34.6%	21.0%	24.7%	
VAS (0-10 cm)	5.28 ± 2.42	5.13 ± 4.09	5.66 ± 0.42	5.13 ± 0.57	0.69
WOMAC					
Pain (0-4)	6.91 ± 3.26	6.55 ± 0.51	6.86 ± 0.63	7.42 ± 0.77	0.60
Stiffness (0-4)	3.58 ± 1.81	3.48 ± 0.29	3.27 ± 0.39	3.96 ± 0.39	0.40
Physical disability (0-4)	32.25 ± 15.37	29.76 ± 2.38	30.95 ± 3.50	36.50 ± 3.18	0.22
KOOS scores					
KOOS Pain	68.10 ± 15.41	70.51 ± 2.20	63.09 ± 3.45	69.27 ± 3.59	0.21
KOOS Symptom	62.51 ± 14.49	64.12 ± 2.25	63.82 ± 2.59	59.35 ± 3.51	0.41
KOOS ADL	53.16 ± 22.91	56.21 ± 3.51	54.55 ± 5.15	48.12 ± 4.93	0.39
KOOS Sport/Rec	6.23 ± 9.76	7.27 ± 1.76	4.55 ± 1.54	6.35 ± 2.21	0.60
KOOS QOL	21.02 ± 15.80	22.21 ± 2.59	24.32 ± 4.22	16.73 ± 2.45	0.22
Lesquesne index					
Pain	4.85 ± 1.67	4.79 ± 0.30	4.95 ± 0.34	4.85 ± 0.34	0.94
Maximum distance walked	3.95 ± 1.79	3.79 ± 0.32	3.91 ± 0.39	4.19 ± 0.34	0.69
Activities of daily living	5.00 ± 0.63	4.94 ± 0.86	5.14 ± 0.19	4.96 ± 0.10	0.50
Total Lesquesne index	13.80 ± 3.04	13.52 ± 0.54	14.00 ± 0.68	14.00 ± 0.57	0.78
LINE-1 methylation (%)	85.61 ± 0.48	88.74 ± 2.44	85.96 ± 1.56	81.36 ± 4.41	<0.0001
Relative telomere length (T/S)	1.29 ± 1.27	1.88 ± 1.58	0.10 ± 0.96	0.80 ± 0.62	0.002

2.2 การศึกษา relative telomere length ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมกับกลุ่มควบคุม

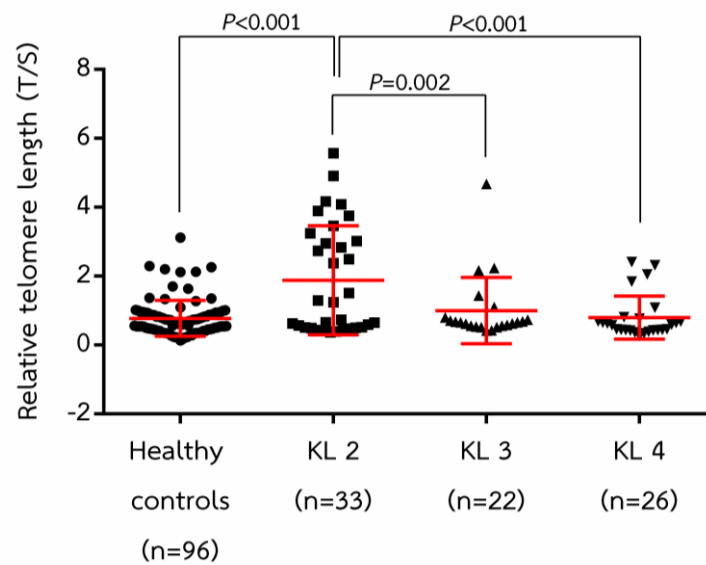
จากการศึกษาระดับ LINE-1 methylation ในข้างต้นแล้วยังทำการศึกษาความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม จำนวน 65 ราย ที่มีอายุเข้าคู่กันกับกลุ่มควบคุม พบว่า กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีความยาวเทโลเมียร์มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.011$) ดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 ความยาวเทโลเมียร์ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่มีอายุเข้าคู่กับกลุ่มควบคุม

2.3 การศึกษา relative telomere length ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมกับระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อม (KL grading)

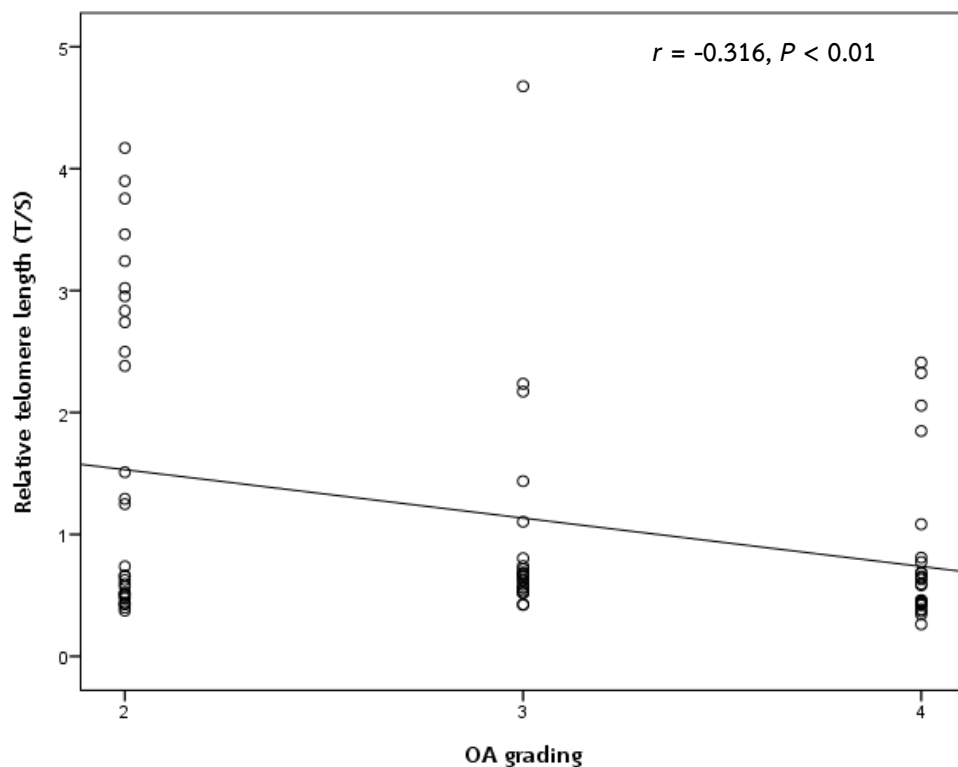
จากรูปที่ 17 แสดงให้เห็นว่าจากกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมในแต่ละกลุ่มที่แบ่งออกตามระดับความรุนแรงของโรค (KL grading) พบว่า ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่มีระดับความรุนแรง grade 3 ($P = 0.002$) และ grade 4 ($P < 0.001$) มีความยาวเทโลเมียร์ที่ต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่มีระดับความรุนแรง grade 2



รูปที่ 17 ความยาวเทโลเมียร์ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมระดับความรุนแรง 2, 3 และ 4

2.4 การศึกษาความสัมพันธ์ของความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และระดับความรุนแรง KL grading

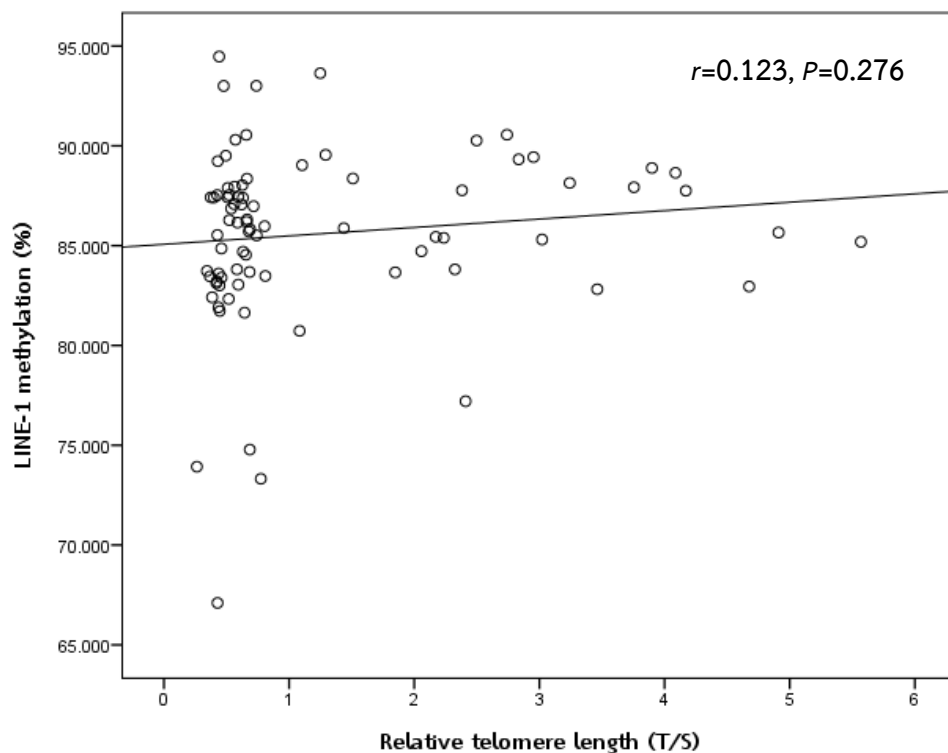
นอกจากการศึกษาความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่มีระดับความรุนแรง KL grading ที่แตกต่างกัน ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับความยาวของเทโลเมียร์กับระดับความรุนแรง KL grading พบว่า ระดับความยาวของเทโลเมียร์มีความสัมพันธ์เชิงลบกับระดับความรุนแรง KL grading ($r = -0.361, P < 0.01$) ดังแสดงในรูปที่ 18



รูปที่ 18 ความสัมพันธ์ของความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และระดับความรุนแรงของโรค 2, 3 และ 4

2.5 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE-1 methylation และความเทโลเมียร์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

จากนั้นได้วิเคราะห์ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE-1 methylation และความยาวเทโลเมียร์ ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 81 ราย พบว่า ระดับ LINE-1 methylation มีแนวโน้มเกิดความสัมพันธ์เชิงบวกกับความเทโลเมียร์แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.123, P = 0.276$) ดังแสดงในรูปที่ 19



รูปที่ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE-1 methylation และความเทโลเมียร์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

2.6 การศึกษาความสัมพันธ์แบบถดถอยเชิงเส้นตรงระหว่างระดับ methylation ความยาวเทโลเมียร์ และลักษณะข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

นอกจากนี้ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE-1 methylation และความยาวเทโลเมียร์ และข้อมูลลักษณะทางคลินิกจากแบบประเมินอาการของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 81 ราย โดยวิเคราะห์จากความสัมพันธ์แบบถดถอยเชิงเส้นตรง ซึ่งการวิเคราะห์ผลแสดงค่าดังนี้ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยมาตรฐาน (β coefficient) ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 (95% CI) และค่าความแตกต่างทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 3

จากตารางที่ 17 แสดงให้เห็นระดับ LINE-1 methylation ในผู้ป่วยที่วิเคราะห์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวกับลักษณะข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ได้แก่ อายุ เพศ ระดับความรุนแรง (KL grading) และแบบประเมินอาการความเจ็บปวดของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่า ระดับความรุนแรงของโรค (KL grading) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยมาตรฐานของเท่ากับ -0.707 ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อยู่ในช่วงระหว่าง -4.494 ถึง -2.725 โดยค่า P -value เท่ากับ <0.0001 และในส่วนของระดับ LINE-1 methylation กับลักษณะข้อมูลทางคลินิกไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยมาตรฐาน (β coefficient) ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 (95% CI) และค่าความแตกต่างทางสถิติ ดังตารางที่ 17

อย่างไรก็ตามความยาวเทโลเมียร์กับลักษณะข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่าระดับความรุนแรงของโรค (KL grading) และ VAS scores มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยระดับความรุนแรงของโรค (KL grading) แสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยมาตรฐานของเท่ากับ -0.308 ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อยู่ในช่วงระหว่าง -0.781 ถึง -0.134 โดยค่า P -value เท่ากับ 0.006 ส่วน VAS scores แสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยมาตรฐานของเท่ากับ 0.277 ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อยู่ในช่วงระหว่าง 0.012 ถึง 0.277 โดยค่า P -value เท่ากับ 0.033 และในส่วนของความยาวเทโลเมียร์กับลักษณะข้อมูลทางคลินิกประเภทอื่นไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยมาตรฐาน (β coefficient) ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 (95% CI) และค่าความแตกต่างทางสถิติ ดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ความสัมพันธ์แบบถดถอยเชิงเส้นตรงระหว่างระดับ LINE-1 methylation ความยาว เทโลเมียร์ และลักษณะข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

คุณลักษณะ	LINE-1 methylation		Relative telomere length	
	β coefficient (95% CI)	P-value	β coefficient (95% CI)	P-value
อายุ (ปี)	-0.059 (-0.144 to 0.78)	0.522	0.011 (-0.039 to 0.042)	0.928
เพศ	0.028 (-1.645 to 2.252)	0.757	0.174 (-0.160 to 1.265)	0.126
KL grading	-0.707 (-4.494 to -2.725)	< 0.0001	-0.308 (-0.781 to -0.134)	0.006
VAS (0-10 cm)	0.052 (-0.270 to 0.456)	0.611	0.277 (0.012 to 0.277)	0.033
WOMAC				
Pain (0-4)	-0.514 (-10.615 to 9.240)	0.890	-5.116 (-5.617 to 1.640)	0.278
Stiffness (0-4)	-0.294 (-10.618 to 9.200)	0.887	-2.787 (-5.577 to 1.667)	0.285
Physical disability (0-4)	-0.014 (-0.230 to 0.222)	0.972	-0.361 (-0.112 to 0.053)	0.475
KOOS scores				
KOOS Pain	-0.175 (-0.117 to -0.020)	0.162	0.003 (-0.025 to 0.025)	0.987
KOOS Symptom	-0.602 (-2.961 to 2.599)	0.897	-6.028 (-1.544 to 0.488)	0.303
KOOS ADL	0.022 (-0.144 to 0.152)	0.955	-0.256 (-0.068 to 0.040)	0.602
KOOS Sport/Rec	-0.110 (-0.147 to 0.048)	0.318	-0.116 (-0.021 to 0.051)	0.401
KOOS QOL	0.077 (-0.039 to 0.081)	0.482	-0.099 (-0.030 to 0.014)	0.470
Lesquesne index				
Pain	0.018 (-0.575 to 0.669)	0.880	0.022 (-0.021 to 0.244)	0.883
Maximum distance walked	-0.052 (-0.656 to 0.404)	0.636	0.272 (-0.001 to 0.386)	0.051
Activities of daily living	0.009 (-1.243 to 1.365)	0.926	-0.127 (-0.732 to 0.222)	0.289

2.7 การศึกษาความสัมพันธ์ของระดับ LINE-1 methylation และความยาวเทโลเมียร์ที่อาจทำให้เกิดความเสี่ยงในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

จากผลการวิเคราะห์ระดับ LINE-1 methylation และความยาวเทโลเมียร์ ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ที่ทำการวิเคราะห์ในเซลล์เม็ดเลือดขาว จำนวน 104 ราย และกลุ่มควบคุมจำนวน 96 ราย ทางคณะผู้วิจัยจึงนำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ระดับ LINE-1 methylation และความยาวเทโลเมียร์ดังกล่าวมาประเมินระดับความเสี่ยงที่อาจก่อให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อมด้วยสถิติ regression analysis ดังแสดงในตารางที่ 18 และตารางที่ 19 ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์พบว่า overall LINE-1 methylation มีความสัมพันธ์เชิงบวก กล่าวคือ มีโอกาสเสี่ยงที่อาจสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม (OR: 0.87, 95%CI: 0.78-0.97 และ $P=0.01$) สำหรับ overall ความยาวเทโลเมียร์ พบว่ามีโอกาสเสี่ยงเป็นโรคข้อเข่าเสื่อมเช่นเดียวกับ LINE-1 methylation (OR: 1.71, 95%CI: 1.10-2.66 และ $P=0.02$) นอกจากนี้เมื่อทำการแบ่งระดับ LINE-1 methylation และความยาวเทโลเมียร์ ตามค่ามัธยฐาน (median) ในกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่มีระดับ LINE-1 methylation ต่ำ (OR: 1.97, 95%CI: 1.11-3.49 และ $P=0.02$) ในส่วนความยาวเทโลเมียร์ พบว่าการเกิดความยาวเทโลเมียร์ที่หดสั้นลง แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (OR: 1.66, 95%CI: 0.82-3.34 และ $P=0.16$) และเพื่อประเมินค่าของผล dose response ของระดับ LINE-1 methylation และความยาวเทโลเมียร์ จึงทำการวิเคราะห์ด้วยการแบ่ง tertile โดยที่ระดับ LINE-1 methylation ใน tertile ที่ 1 มีผลต่อความเสี่ยงที่อาจเกี่ยวข้องกับโรคข้อเข่าเสื่อมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ tertile ที่ 3 (OR: 2.40, 95%CI: 1.20-4.65 และ $P=0.01$) ในส่วนของความยาวเทโลเมียร์ เมื่อทำการแบ่งเป็น tertile พบว่า ไม่มี tertile ที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม เมื่อเปรียบเทียบกับ tertile ที่ 3

ตารางที่ 18 ความสัมพันธ์ของระดับ LINE-1 methylation ที่อาจสัมพันธ์กับความเสี่ยงในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

	Patients (n=104)	Healthy Controls (n=96)	OR (95% CI)	P-values
LINE-1 elements				
Overall	100.00%	100.00%	0.87 (0.78 to 0.97)	0.01
By median				
Low methylation	66.30%	50.00%	1.97 (1.11 to 3.49)	0.02
High methylation	33.70%	50.00%	1.00 (reference)	
By tertile				
1 st tertile	56.70%	33.33%	2.40 (1.20 to 4.65)	0.01
2 nd tertile	19.20%	33.33%	0.80 (0.37 to 1.72)	0.57
3 rd tertile	24.00%	33.33%	1.00 (reference)	

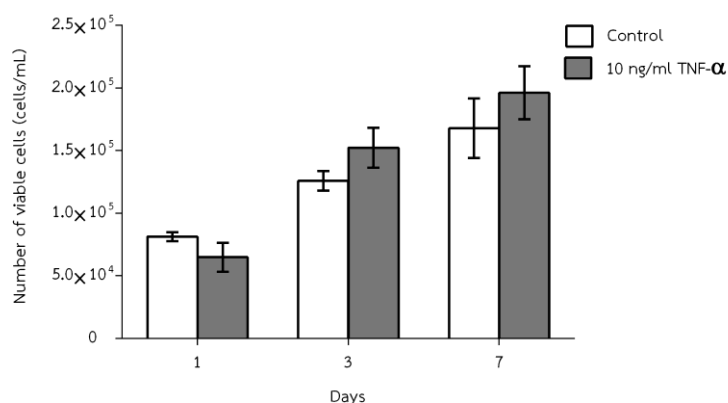
ตารางที่ 19 ความสัมพันธ์ของระดับความยาวเทโลเมียร์ที่อาจสัมพันธ์กับความเสี่ยงในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

	Patients (n=65)	Healthy Controls (n=65)	OR (95% CI)	P-values
Relative telomere length (R/T)				
Overall	100.00%	100.00%	1.71 (1.10 to 2.66)	0.02
By median				
Short telomere length	63.10%	50.00%	1.66 (0.82 to 3.34)	0.16
Long telomere length	36.90%	50.00%	1.000 (reference)	
By tertile				
1 st tertile	27.70%	33.33%	0.95 (0.39 to 2.29)	0.91
2 nd tertile	43.10%	33.33%	1.35 (0.59 to 3.09)	0.48
3 rd tertile	29.20%	33.33%	1.00 (reference)	

3. การศึกษาระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เยื่อบุข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

3.1 การศึกษาจำนวนเซลล์เยื่อบุข้อหลังจากได้รับ 10 ng/ml TNF- α ในระยะเวลา 1, 3 และ 7 วัน

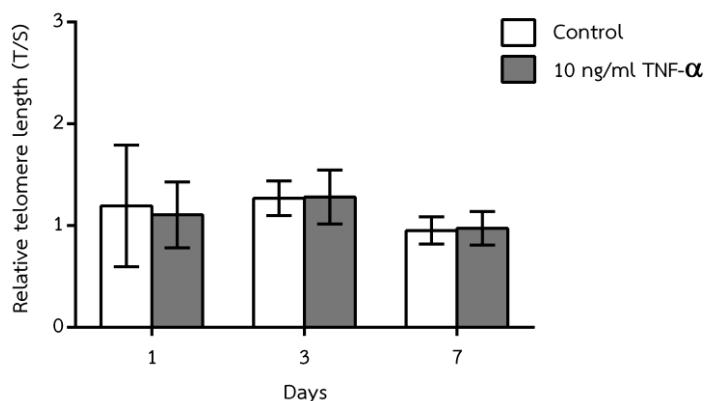
จากการวัดจำนวนเซลล์มีชีวิต (viability) ของเซลล์เยื่อบุข้อจากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 4 ราย หลังจากเซลล์เยื่อบุข้อได้รับ 10 ng/ml TNF- α เป็นช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกันคือ 1, 3 และ 7 วัน พบว่าจำนวนเซลล์เยื่อบุข้อในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α มีระดับจำนวนเซลล์เยื่อบุข้อที่ไม่แตกต่างกัน และไม่ลดลงเมื่อเซลล์เยื่อบุข้อได้รับ 10 ng/ml TNF- α ต่อเนื่อง 7 วัน ดังแสดงในรูปที่ 20



รูปที่ 20 จำนวนเซลล์เยื่อบุข้อหลังจากได้รับ 10 ng/ml TNF- α ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน คือ 1, 3 และ 7 วัน

3.2 การศึกษาความยาวเทโลเมียร์ของเซลล์เยื่อบุข้อหลังจากได้รับ 10 ng/ml TNF- α ในระยะเวลา 1, 3 และ 7 วัน

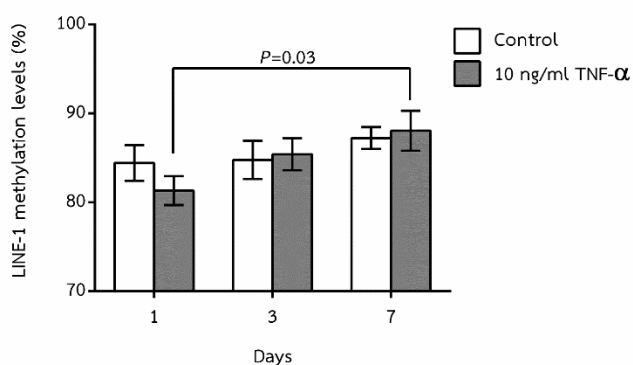
นอกจากนี้ได้ทำการวัดความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์เยื่อบุข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α ในระยะเวลาที่แตกต่าง คือ 1, 3 และ 7 วัน ดังแสดงในรูปที่ 21 พบว่า ความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์เยื่อบุข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α ในแต่ละช่วงเวลามีความยาวเทโลเมียร์ไม่แตกต่างกันเมื่อเทียบกับเซลล์เยื่อบุข้อที่ไม่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α



รูปที่ 21 ความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์เยื่อบุข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α ในระยะเวลา 1, 3 และ 7 วัน

3.3 การศึกษาระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เยื่อบุข้อหลังจากได้รับ 10 ng/ml TNF- α ในระยะเวลา 1, 3 และ 7 วัน

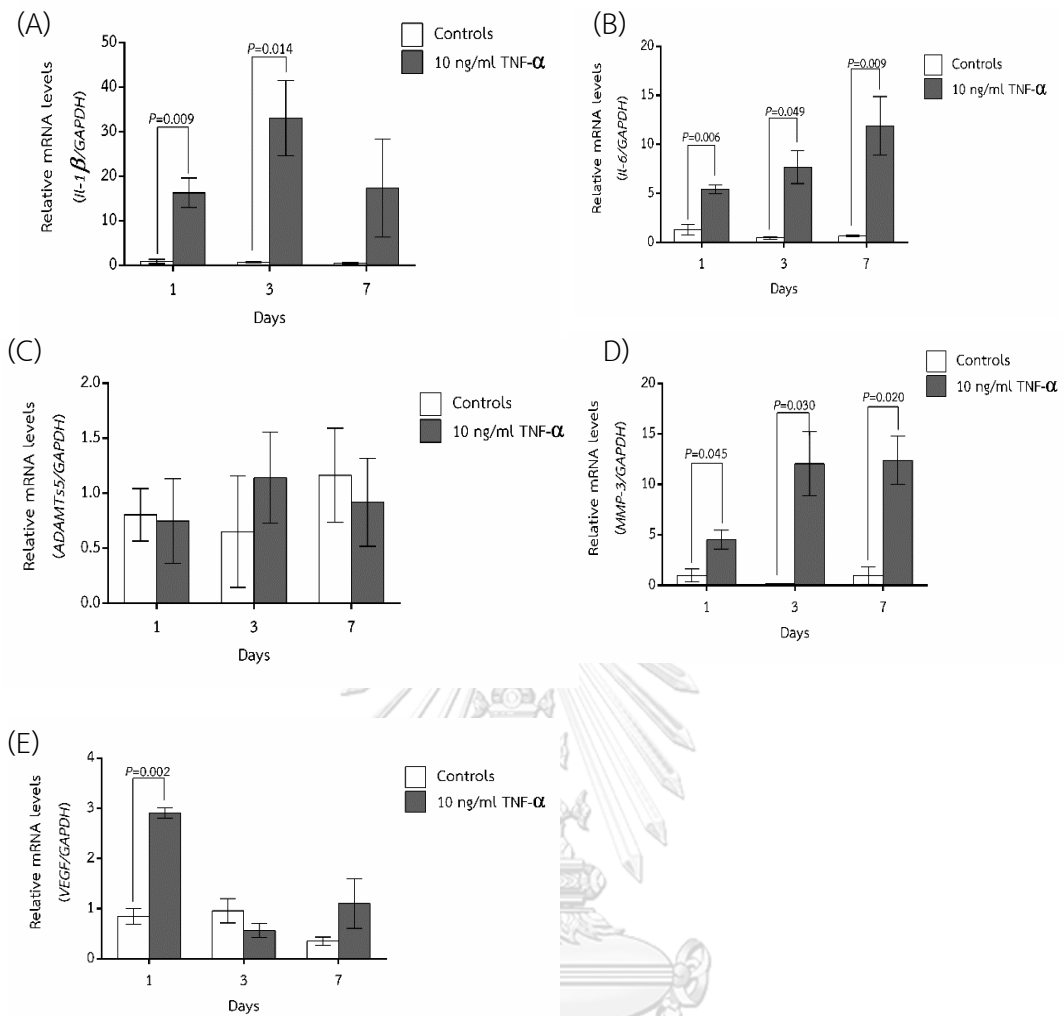
เมื่อทำการวิเคราะห์ระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เยื่อบุข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน 1, 3 และ 7 วัน พบว่า เซลล์เยื่อบุข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α มีระดับ LINE-1 methylation ที่ต่ำกว่าเซลล์เยื่อบุข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α ระยะเวลา 7 วันอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.03$) ดังแสดงในรูปที่ 22 แต่ระดับ LINE-1 methylation ในแต่ละช่วงเวลาในกลุ่มเซลล์เยื่อบุข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α ไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อบุข้อกลุ่มควบคุม



รูปที่ 22 ระดับ LINE-1 methylation ของเซลล์เยื่อบุข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α ในระยะเวลา 1, 3 และ 7 วัน

3.4 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคข้อเข่าเสื่อมในเซลล์เยื่อบุข้อ หลังจากได้รับ 10 ng/ml TNF- α ในระยะเวลา 1, 3 และ 7 วัน

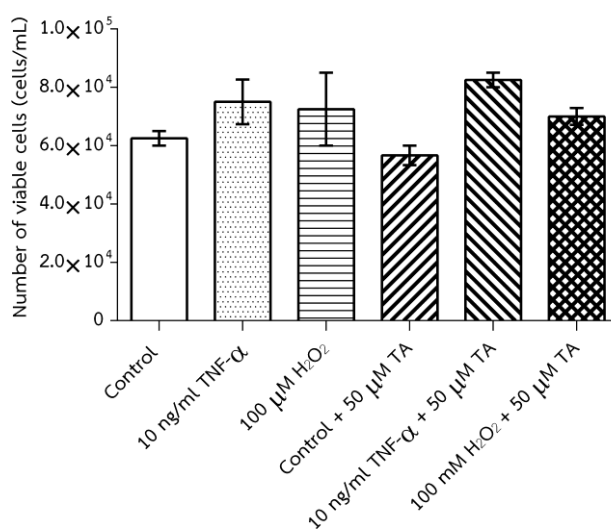
อย่างไรก็ตามระดับ LINE-1 methylation มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงที่ลดลงหลังจากได้รับ 10 ng/ml TNF- α ระยะเวลา 1 วัน ทำให้มีการวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม 4 รายที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน คือ 1, 3 และ 7 วัน วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วย unpaired *t* test พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *IL-1 β* ในเซลล์เยื่อบุข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α มีแนวโน้มการแสดงออกของยีนที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อบุข้อกลุ่มควบคุม ในเวลา 1 และ 3 วัน ดังแสดงในรูปที่ 23A เซลล์เยื่อบุข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α ในเวลา 3 และ 7 วัน ยีน *IL-6* มีระดับการแสดงออกของยีนที่สูงกว่าเซลล์เยื่อบุข้อกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 23B และยีน *MMP-3* มีระดับการแสดงออกของยีนสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์เยื่อบุข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α เวลา 3 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อบุข้อในกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 23D นอกจากนี้ยีน *VEGF* มีระดับการแสดงออกที่สูงอย่างมีนัยสำคัญเช่นกันในเซลล์เยื่อบุข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α ที่เวลา 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อบุข้อกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 23E แต่ระดับการแสดงออกของยีน *ADAMTs5* พบว่า ไม่มีความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีนอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์เยื่อบุข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α ในทุกช่วงเวลา เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อบุข้อกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 23C



รูปที่ 23 ระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์เยื่อบุข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α ในระยะเวลา 1, 3 และ 7 วัน (A) Relative *IL-1 β* expression (B) Relative *IL-6* expression (C) Relative *ADAMT5* expression (D) Relative *MMP3* expression และ (E) Relative *VEGF* expression

3.5 การศึกษาจำนวนเซลล์เยื่อข้อหลังจากได้รับ 10 ng/ml TNF- α , 100 μ M H₂O₂ และ pre-treatment ด้วย 50 μ M tocopheryl acetate (TA) ในระยะเวลา 1 วัน

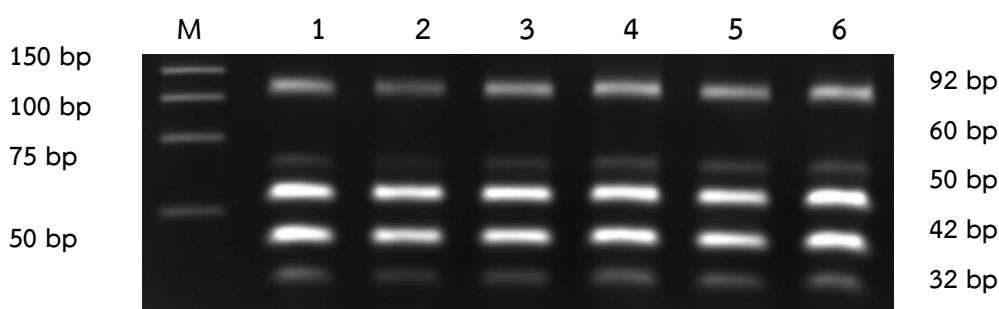
จากการศึกษาระดับ LINE-1 methylation และระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคข้อเข่าเสื่อมในเซลล์เยื่อข้อหลังจากได้รับ 10 ng/ml TNF- α ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน พบว่าระดับ LINE-1 methylation และระดับการแสดงออกของยีนมีการเปลี่ยนแปลงหลังจากได้รับ 10 ng/ml TNF- α เวลา 1 วัน ทำให้มีการศึกษาเพิ่มเติมต่อมาในภาวะออกซิเดชัน และสารต้านอนุมูลอิสระมีผลอย่างไรต่อการเปลี่ยนแปลงระดับระดับ LINE-1 methylation และระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคข้อเข่าเสื่อม ดังรูปที่ 24 ทำการวัดจำนวนเซลล์เยื่อข้อหลังจากได้รับ 100 μ M H₂O₂ และ 50 μ M TA (pre-treatment) เปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α และเซลล์เยื่อข้อกลุ่มควบคุม เป็นระยะเวลา 1 วัน พบว่า จำนวนเซลล์เยื่อข้อในทุกภาวะที่ได้รับเป็นระยะเวลา 1 วัน ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนของเซลล์เยื่อข้อเมื่อทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ



รูปที่ 24 จำนวนเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α , 100 μ M H₂O₂ และ 50 μ M TA ระยะเวลา 1 วัน

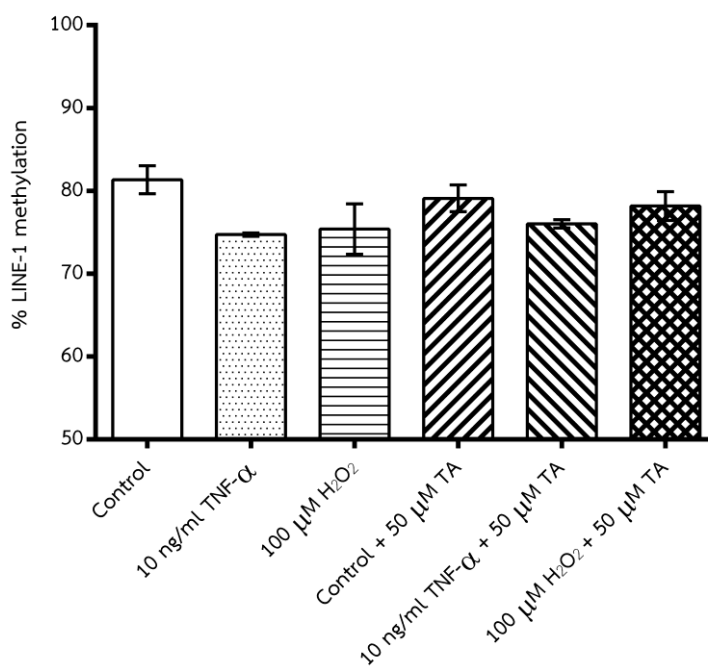
3.6 การศึกษาระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เยื่อบุข้อหลังจากได้รับ 10 ng/ml TNF- α , 100 μ M H₂O₂ และ pre-treatment ด้วย 50 μ M tocopheryl acetate (TA) ในระยะเวลา 1 วัน

จากการวัดความเข้มแถบดีเอ็นเอแล้วนำค่า LINE-1 methylation มาวิเคราะห์ผลตามสูตรที่แสดงข้างต้น โดยรูปแบบของ LINE-1 methylation มี 5 รูปแบบ ประกอบด้วย ขนาด 92, 60, 50, 42 และ 32 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 25



รูปที่ 25 LINE-1 methylation จาก PCR product ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะและวิเคราะห์ด้วย 8% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (M แทน 25 bp ladder, หมายเลข 1 แทน กลุ่มควบคุม, หมายเลข 2 แทน กลุ่มได้รับ 10 ng/ml TNF- α , หมายเลขถึง 3 แทน กลุ่มได้รับ 100 μ M H₂O₂, หมายเลข 4 แทน กลุ่มควบคุมได้รับ 50 μ M TA, หมายเลข 5 แทน กลุ่มได้รับ 50 μ M TA + 10 ng/ml TNF- α และหมายเลข 6 แทน กลุ่มได้รับ 50 μ M TA + 100 μ M H₂O₂)

จากรูปที่ 25 แสดงให้เห็นว่าเซลล์เยื่อบุข้อที่อยู่ในสภาวะที่แตกต่างกันจำนวน 6 กลุ่ม คือ (1) กลุ่มควบคุม (2) กลุ่มได้รับ 10 ng/ml TNF- α (3) กลุ่มได้รับ 100 μ M H₂O₂ (4) กลุ่มควบคุม + 50 μ M TA (5) กลุ่มได้รับ 50 μ M TA + 10 ng/ml TNF- α และ (6) กลุ่มได้รับ 50 μ M TA + 100 μ M H₂O₂ ซึ่งได้เปรียบเทียบกับกันทั้งหมด 6 กลุ่ม พบว่า PCR product ที่ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะสามารถเกิดรูปแบบของ LINE-1 methylation ได้ทั้งหมด 5 รูปแบบ ที่ขนาด 92, 60, 50, 42 และ 32 คู่เบส ตามลำดับ จากนั้นจึงคำนวณร้อยละของระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เยื่อบุข้อทั้ง 6 กลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 26

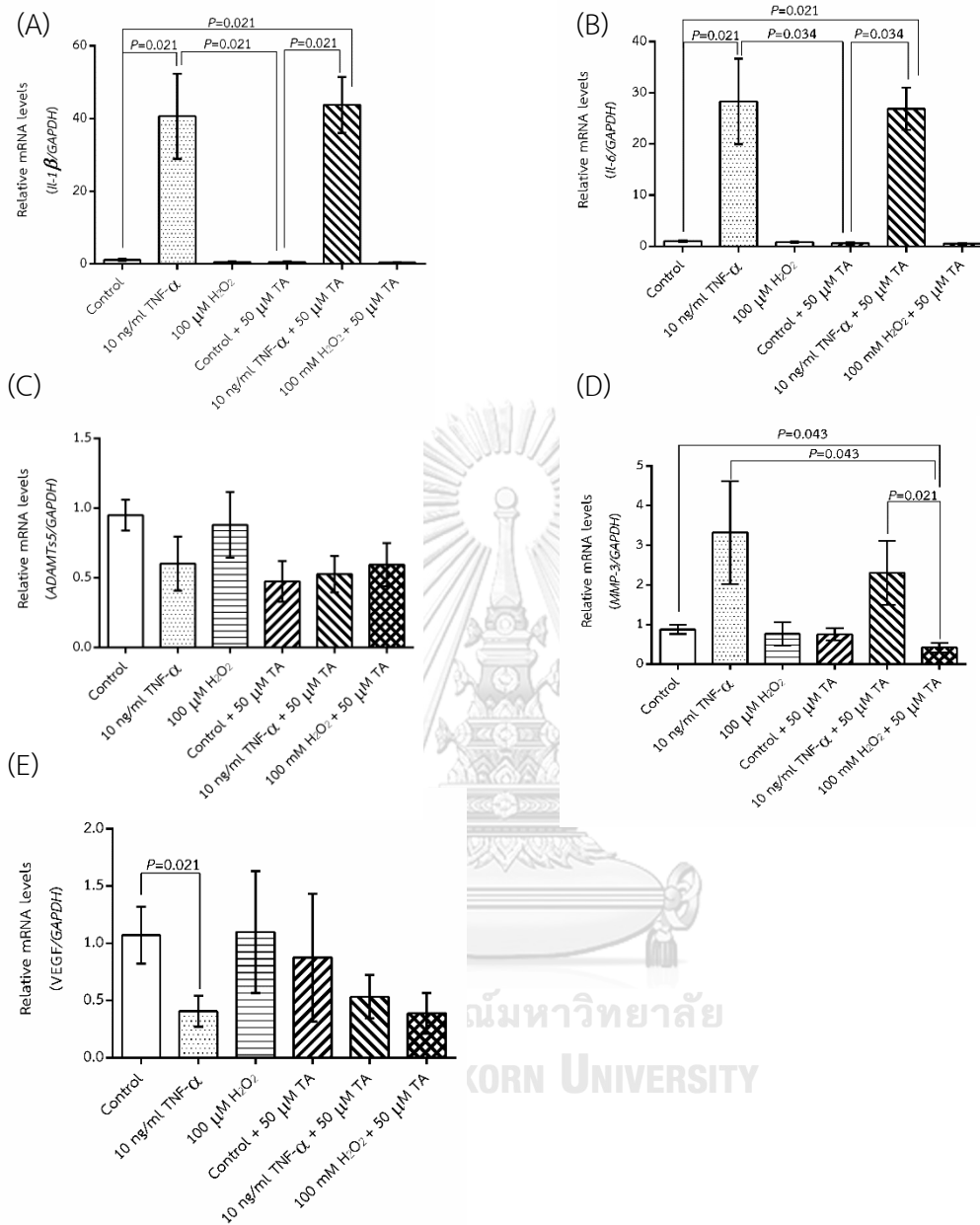


รูปที่ 26 ระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เยื่อบุช่องท้องที่หลังจากได้รับ 10 ng/ml TNF- α , 100 μ M H₂O₂ และ pre-treatment ด้วย 50 μ M tocopheryl acetate (TA) ในระยะเวลา 1 วัน

จากรูปที่ 26 แสดงให้เห็นว่าระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เยื่อบุช่องท้องที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α , 100 μ M H₂O₂ และ pre-treatment ด้วย 50 μ M tocopheryl acetate (TA) ร่วมด้วย มีแนวโน้มต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มควบคุมที่ได้รับการ pre-treatment ด้วย 50 μ M tocopheryl acetate (TA) และไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์ด้วย Kruskal-wallis test

3.7 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคข้อเข่าเสื่อมในเซลล์เยื่อข้อหลังจากได้รับ 10 ng/ml TNF- α , 100 μ M H₂O₂ และ pre-treatment ด้วย 50 μ M tocopheryl acetate (TA) ในระยะเวลา 1 วัน

การวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่ายีน *IL-1 β* และ *IL-6* ของเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α และเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ pre-treatment ด้วย 50 μ M TA เวลา 1 ชั่วโมง ก่อนได้รับ 10 ng/ml TNF- α ระยะเวลา 1 วัน มีระดับการแสดงออกของยีนที่สูงกว่าเซลล์เยื่อข้อกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังรูปที่ 27A และ 27B ตามลำดับ ระดับการแสดงออกของยีน *MMP-3* มีระดับการแสดงออกที่สูงขึ้นเช่นเดียวกับการแสดงออกของยีน *IL-1 β* และ *IL-6* กล่าวคือ ยีน *MMP-3* เซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α และเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ pre-treatment ด้วย 50 μ M TA เวลา 1 ชั่วโมง ก่อนได้รับ 10 ng/ml TNF- α ระยะเวลา 1 วัน มีระดับการแสดงออกของยีนที่สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมดังรูปที่ 27D นอกจากนี้การแสดงออกของยีน *VEGF* พบว่ามีระดับการแสดงออกที่ต่ำลงในเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α ระยะเวลา 1 วัน ดังรูปที่ 27E แต่ระดับการแสดงออกของยีน *ADAMTs5* ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่มของเซลล์เยื่อข้อดังรูปที่ 27C



รูปที่ 27 ระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α , 100 μ M H₂O₂ และ pre-treatment ด้วย 50 μ M tocopheryl acetate (TA) ในระยะเวลา 1 วัน (A) Relative *IL-1 β* expression (B) Relative *IL-6* expression (C) Relative *ADAMTs5* expression (D) Relative *MMP3* expression และ (E) Relative *VEGF* expression

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย การอภิปรายข้อมูล

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการตรวจวัดระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 193 ราย และกลุ่มควบคุมจำนวน 96 ราย ด้วยเทคนิค quantitative Combined bisulfite restriction analysis (qCOBRA) จากผลการวิเคราะห์แถบ DNA ด้วย 8% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis พบว่า LINE สามารถแยกรูปแบบการเกิด methylation ได้แก่ %^mC, %^mC^uC, %^uC^mC และ %^uC^uC มีทั้งหมด 5 คู่เบส คือ 92, 60, 50, 42 และ 32 คู่เบส

เมื่อวิเคราะห์ผลด้วย unpaired t-test พบว่าระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีระดับ LINE-1 hypomethylation อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมที่มีอายุเข้าคู่กัน และเมื่อทำการแบ่งตามระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อม (KL grading) ด้วยสถิติ One-way ANOVA พบความแตกต่างของระดับ LINE-1 methylation คือ กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมระดับความรุนแรง 4 เกิดระดับ LINE-1 hypomethylation มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P = 0.001$) และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมระดับความรุนแรง 2 ($P < 0.001$) และ 3 ($P = 0.018$) อย่างไรก็ตามระดับ LINE-1 methylation ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างเพศชายและเพศหญิง ($P = 0.992$) และเมื่อทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE-1 methylation พบว่า ระดับ LINE-1 methylation ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีความสัมพันธ์เชิงลบกับระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อม KL grading อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = -0.300, P < 0.001$)

เมื่อทำการวัดระดับ LINE-1 methylation และความยาวเทโลเมียร์ (relative telomere length) ในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการประเมินด้วยแบบประเมิน VAS, KOOS, WOMAC และ Lesquense index จำนวน 81 ราย และทำการแบ่งกลุ่มของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมตามระดับความรุนแรง KL grading และวิเคราะห์ผลด้วยสถิติ One-way ANOVA พบว่าระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มของระดับความรุนแรง ($P < 0.0001$) เช่นเดียวกับความยาวเทโลเมียร์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ระหว่างกลุ่มของผู้ป่วยในแต่ละระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อม KL grading ($P = 0.002$) แต่ความยาวเทโลเมียร์เมื่อจัดกลุ่มอายุของผู้ป่วยเข้ากับกลุ่มควบคุม พบว่าความยาวเทโลเมียร์ในกลุ่มผู้ป่วยยาวกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.011$) นอกจากนี้ระดับ LINE-1 methylation มีแนวโน้มความสัมพันธ์เชิงบวกกับความยาวเทโลเมียร์ ($r = 0.123$, $P = 0.276$)

ผลการศึกษาค่าความสัมพันธ์ของการเกิดระดับ LINE-1 methylation และความยาวเทโลเมียร์กับปัจจัยต่างๆ พบว่าระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีความสัมพันธ์เชิงลบกับความรุนแรง KL grading เช่นเดียวกับความยาวเทโลเมียร์ที่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับระดับความรุนแรง KL grading แต่ความยาวเทโลเมียร์มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ VAS scores ร่วมด้วย อีกทั้งเมื่อวิเคราะห์ค่าความไวและความจำเพาะด้วยกราฟ ROC curve ของ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวพบว่า LINE-1 methylation สามารถจำแนกผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมออกจากกลุ่มควบคุมได้โดยมีค่า AUC = 0.612 แต่ค่าความไวและความจำเพาะของ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวมีค่าต่ำส่งผลให้ LINE-1 methylation อาจเป็นตัวบ่งชี้ที่ยังไม่เหมาะสมในการวินิจฉัยโรคข้อเข่าเสื่อม จากผลการประเมินความเสี่ยงของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมจากระดับ LINE-1 methylation พบว่าระดับ LINE-1 methylation ต่ำเพิ่มโอกาสความเสี่ยงของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และอาจนำมาประยุกต์ใช้ในการแบ่งเกณฑ์ระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวร่วมกับระดับความรุนแรง KL grading ในการตรวจวัดและวินิจฉัยในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกันเพื่อลดค่าใช้จ่ายของผู้ป่วยและเพิ่มความสะดวกจากการวัดระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมจากการเจาะเลือด

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจวัดระดับ LINE-1 methylation และระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์เยื่อข้อเข่าจากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 4 ราย แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกคือ การศึกษาระดับ LINE-1 methylation และระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์เยื่อข้อเข่าที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α เป็นระยะเวลา 1, 3 และ 7 วัน โดยทำการนับจำนวนเซลล์เยื่อข้อเข่าที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α ในแต่ละเวลา พบว่ามีจำนวนเซลล์ไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อข้อเข่ากลุ่มควบคุมในแต่ละช่วงเวลา 1, 3 และ 7 เช่นเดียวกับการวัดความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์เยื่อข้อเข่าที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบเซลล์เยื่อข้อเข่ากลุ่มควบคุม รวมถึงการเปรียบเทียบความยาวเทโลเมียร์ของเซลล์เยื่อข้อเข่าที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α แต่ละ

ช่วงเวลา อย่างไรก็ตามการศึกษาระดับ LINE-1 methylation พบว่าระดับ LINE-1 methylation ต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์เยื่อบุข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α เวลา 1 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อบุข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α 7 วัน อีกทั้งการวิเคราะห์ผลทางสถิติของระดับการแสดงออกของยีน IL-1 β , IL-6, MMP-3 และ VEGF มีระดับการแสดงออกของยีนสูงในเซลล์เยื่อบุข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อบุข้อกลุ่มควบคุม แต่ระดับการแสดงออกของยีนเหล่านี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์เยื่อบุข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α แต่ละช่วงเวลา ส่วนระดับการแสดงออกของยีน ADAMTs5 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเซลล์เยื่อบุข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α และกลุ่มควบคุม นอกจากนี้คณะผู้วิจัยศึกษาระดับ LINE-1 methylation มีแนวโน้มลดต่ำลงในกลุ่มเซลล์เยื่อบุข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α , 100 μ M H₂O₂ และกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ 50 μ M TA เวลา 1 ชั่วโมงก่อนเซลล์เยื่อบุข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α และ 100 μ M H₂O₂ ระยะเวลา 1 วันเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อบุข้อกลุ่มควบคุม และผลวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่มเซลล์เยื่อบุข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α ทั้งในกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ TNF- α หรือกลุ่มเซลล์เยื่อบุข้อที่มีการ pre-treatment ก่อนได้รับ TNF- α พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน IL-1 β และ IL-6 และ ยีน MMP-3 ที่สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อบุข้อกลุ่มควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับการแสดงออกของยีน ADAMTs5 ในแต่ละกลุ่มของเซลล์เยื่อบุข้อเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนยีน VEGF มีระดับการแสดงออกลดลงในเซลล์เยื่อบุข้อกลุ่มที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

อภิปรายผลการทดลอง

จากวัตถุประสงค์งานวิจัยนี้เพื่อศึกษาเปรียบเทียบระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์เยื่อบุข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม การศึกษาที่ผ่านมาพบว่ากลไกการเกิด methylation บริเวณ repetitive elements ส่งผลต่อความไม่เสถียรของจีโนมในร่างกายทำให้เกิดโรคมะเร็ง และโรคที่เกี่ยวข้องกับ innate immune systems ซึ่งโรคข้อเข่าเสื่อมเป็นโรคความผิดปกติชนิดหนึ่งที่มีความเกี่ยวข้องกับ innate immune systems เนื่องจากกระบวนการอักเสบเรื้อรังภายในข้อส่งผลให้ในปัจจุบันโรคข้อเข่าเสื่อมจัดอยู่ในกลุ่มโรคที่มีการอักเสบระดับต่ำ⁽¹⁷⁾ โดยกลไกการเกิด methylation แบ่งออก 2 กลไกหลัก คือ hypomethylation และ hypermethylation⁽⁹⁾ ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าระดับ LINE-1 methylation ที่เปลี่ยนแปลง

ส่งผลให้เกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์⁽¹¹⁾ โรคเบาหวาน⁽¹⁰⁾ โรคความดันโลหิตสูง⁽¹⁰⁴⁾ โรคไขกระดูกฝ่อ⁽⁸⁰⁾ โรคสะเก็ดเงิน⁽⁷⁸⁾ และโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง⁽⁷⁵⁾ เป็นต้น แต่การศึกษากระบวนการ methylation ของ LINE ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมยังมีการศึกษาน้อย สมมติฐานของงานวิจัยนี้คือผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีระดับ LINE-1 methylation ลดลงในเซลล์เม็ดเลือดขาวเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่มควบคุม ซึ่งผลการศึกษาระดับ LINE-1 methylation สอดคล้องกับสมมติฐานที่ตั้งไว้ แต่ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบระดับ LINE-1 methylation ในเพศหญิงและเพศชายไม่มีความแตกต่างทางสถิติ อาจเป็นเพราะจำนวนของกลุ่มการศึกษาในเพศชายมีน้อยกว่าเพศหญิง เนื่องจากสถิติการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมพบมากในเพศหญิงส่งผลต่อขนาดของกลุ่มประชากรผู้ป่วย⁽¹³⁾ และในการศึกษาที่ผ่านมาของผู้ป่วยที่มีกระบวนการอักเสบภายในร่างกาย เช่น โรคผิวหนังสะเก็ดเงิน โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง และโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ เป็นต้น พบว่าระดับ LINE-1 hypomethylation ภายในร่างกายเพิ่มขึ้นเมื่อมีระดับความรุนแรงของโรคสูง เช่นเดียวกับผลการศึกษาในงานวิจัยนี้ที่ระดับ LINE-1 hypomethylation เกิดเพิ่มขึ้นเมื่อระดับความรุนแรง KL grading 4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเป็นระดับความรุนแรงที่สูงของโรคข้อเข่าเสื่อม จากการเปรียบเทียบกับระดับความรุนแรง grade 2 และ 3 และยังพบว่าระดับ LINE-1 methylation มีความสัมพันธ์เชิงลบกับระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อม แสดงให้เห็นว่า เมื่อระดับความรุนแรงที่สูงส่งผลต่อกระบวนการอักเสบภายในข้อทำให้มีการส่งผ่านการอักเสบนี้ผ่านกลไก innate immune system บริเวณเยื่อข้อส่งผลให้ระดับไซโตไคน์และส่งผ่านไปยังกระแสเลือดส่งผลต่อความสมดุลของจີโนมภายในร่างกาย^(17, 18, 31) และการควบคุมระดับไซโตไคน์มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการ methylation อย่างในกรณีของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมที่มีระดับความรุนแรงที่สูงอาจมีกลไกการสร้างสารไซโตไคน์ที่สูงภายในข้อ เช่น IL-1 β , IL-6 และ TNF- α เป็นต้น ส่งผ่านกระแสเลือดไปยังระบบไหลเวียนเลือดภายในร่างกาย เนื่องจากโรคข้อเข่าเสื่อมเป็นโรคที่มีการอักเสบระดับต่ำ และระดับ LINE-1 methylation มีความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญกับระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมทำให้ผลการวิเคราะห์ทางสถิติสนับสนุนสมมติฐานของงานวิจัยนี้

จากการประเมินอาการเจ็บ อาการปวด และความรุนแรงของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม จากแบบประเมินคลินิก VAS scores, KOOS, WOMAC และ Lesquesne index ในการศึกษาที่ผ่านมา คะแนนประเมินจาก KOOS และ WOMAC ใช้ในการประเมินติดตามอาการของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม หลังได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเทียม พบว่าก่อนการผ่าตัดผู้ป่วยมีคะแนนแบบประเมิน KOOS ต่ำแสดง

ถึงอาการความรุนแรงของผู้ป่วยจากโรคข้อเข่าเสื่อม หากผู้ป่วยมีคะแนนแบบประเมิน KOOS สูง แสดงถึงค่าความรุนแรงของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมต่ำ⁽¹⁰⁵⁾ เช่นเดียวกับการประเมินข้อมูลทางคลินิก จากแบบประเมิน KOOS ที่คำนวณคะแนนกลับเป็นคะแนน WOMAC พบว่าคะแนนที่สูงแสดงถึง ความรุนแรงของอาการโรคข้อเข่าเสื่อมมาก แต่คะแนน WOMAC ใกล้เคียง 0 แสดงถึงระดับความ รุนแรงของอาการโรคข้อเข่าเสื่อมต่ำ อีกทั้งในการวิเคราะห์คะแนน KOOS กับเส้นผ่านศูนย์กลางใน ภาพถ่าย MRI ของ bone marrow ที่ถูกทำลายด้วยการแบ่งกลุ่มก่อนผ่าตัดและกลุ่มติดตามอาการ หลังผ่าตัดในผู้ป่วยรายเดียวกันมีความสัมพันธ์กับคะแนนความปวดของ KOOS และ WOMAC ใน กลุ่มอาการหลังผ่าตัดที่มีความกว้างของ bone marrow มากขึ้น⁽¹⁰⁶⁾ เช่นเดียวกับการประเมินข้อมูล ทางคลินิกกับภาวะพร่องวิตามินดีในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่มีภาวะ พร่องวิตามินดีมีคะแนนของ WOMAC อาการปวดและการประเมินข้อเข่าเชิงกายภาพ คะแนน Lesquesne index และ VAS scores มีระดับคะแนนที่สูงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่มีระดับวิตามินดีปกติ⁽¹⁰⁷⁾ และฮอร์โมนเกรลิน (ghrelin) ในน้ำไขข้อที่มีหน้าที่ ป้องกันการอักเสบและกระตุ้นการสร้างกระดูกอ่อนมีค่าความสัมพันธ์เชิงลบทางสถิติกับระดับความ รุนแรง KL grading และยังมีความสัมพันธ์กับข้อมูลทางคลินิกของแบบประเมิน Lesquesne index และ VAS scores⁽¹⁰⁸⁾ จากการศึกษาแบบประเมินทางคลินิกเกี่ยวกับโรคข้อเข่าเสื่อมที่กล่าวข้างต้นนี้ พบว่า การประเมินคลินิก VAS scores, KOOS, WOMAC และ Lesquesne index มีความเกี่ยวข้อง กับการหาตัวบ่งชี้ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม และระดับความรุนแรง KL grading แสดงให้ เห็นว่าแบบประเมินเหล่านี้เป็นปัจจัยส่วนหนึ่งของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม โดยการประเมินผู้ป่วยโรค ข้อเข่าเสื่อมในงานวิจัยนี้ทำการแบ่งกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมตามระดับความรุนแรงจากภาพถ่ายรังสี ที่แบ่งเกณฑ์ตาม KL grading ไม่พบความแตกต่างและความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง คะแนนแบบประเมินทางคลินิก VAS scores, KOOS, WOMAC และ Lesquesne index ในผู้ป่วย โรคข้อเข่าเสื่อมแต่ละกลุ่มของระดับความรุนแรง KL grading ยกเว้นระดับ LINE-1 methylation และความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่มีความแตกต่างอย่างมี นัยสำคัญระหว่างกลุ่มระดับความรุนแรง KL grading เนื่องจากระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อม มีผลมาจากปัจจัยความไม่สมดุลของการสร้างสารเมแทบอลิซึมภายในข้อโดยตรงทำให้มีกลไกการ สร้างสารไซโตไคน์ และการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันภายในข้อของผู้ป่วยที่มีระดับความรุนแรงสูง ทำให้เกิดการสลายกระดูกอ่อนผิวข้อ และการอักเสบบริเวณเซลล์เยื่อข้อ^(2, 5, 18) ซึ่งลักษณะดังกล่าว

ได้แสดงชัดเจนจากการตรวจวัดตัวบ่งชี้ทางกลไก epigenetics ส่วนข้อมูลทางคลินิกเป็นการประเมินผ่านอาการเจ็บและปวด รวมถึงการประเมินทางกายภาพของผู้ป่วยทำให้ในบางครั้งการเก็บข้อมูลจากแบบประเมินมีความคลาดเคลื่อนของคะแนนจากบางคำถามที่ผู้ป่วยยากต่อการระบุคะแนนจึงอาจส่งผลให้ระดับ LINE-1 methylation ไม่มีความสัมพันธ์กับอาการของข้อมูลคลินิก

นอกจากนี้ในการศึกษาที่ผ่านมาระดับ LINE-1 methylation ในโรคท่อน้ำดีตีบตัน โรคไขกระดูกฝ่อ และโรคมะเร็งไตในเด็กมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความยาวเทโลเมียร์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ^(80, 93, 95) เนื่องจากความยาวเทโลเมียร์ในกลุ่มผู้ป่วยมีความยาวเทโลเมียร์ที่ลดลงจากความไม่สมดุลของกระบวนการเมแทบอลิซึม กระบวนการซ่อมแซมภายในเซลล์ การแบ่งตัวของเซลล์ อายุของเซลล์ และภาวะความเครียดออกซิเดชัน ส่งผลให้ความยาวของเทโลเมียร์ลดลงตามระดับความรุนแรงของการเกิดโรค⁽¹⁰⁹⁻¹¹³⁾ ปัจจัยเหล่านี้ที่ทำให้ความยาวเทโลเมียร์หดสั้นลงเป็นปัจจัยที่มีความเกี่ยวข้องกับความไม่เสถียรของจีโนมส่งผลต่อกลไก methylation ของ LINE ภายในร่างกายมีการเปลี่ยนแปลงและก่อให้เกิดโรคต่างๆในที่สุด ในงานวิจัยนี้วิเคราะห์ความยาวเทโลเมียร์ในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมยาวกว่ากลุ่มควบคุม อาจมีผลมาจากกลุ่มอายุของผู้ป่วยเมื่อทำการจัดกลุ่มให้อายุเข้าคู่กับกลุ่มควบคุมส่งผลจำนวนผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษามีจำนวนลดลง ซึ่งมีผลตรงกันข้ามกับการศึกษาที่ผ่านมาของความยาวเทโลเมียร์ที่หดสั้นลงในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดแข็งตัว⁽⁸⁹⁾ โรคเบาหวาน⁽¹¹⁴⁾ และโรคหลอดเลือดกั้นเรื้อรัง⁽⁸⁸⁾ รวมถึงบริเวณกระดูกอ่อนผิวข้อที่เกิดพยาธิสภาพของโรคข้อเข่าเสื่อมมีค่าเทโลเมียร์หดสั้นลงเมื่อเปรียบเทียบกับกระดูกอ่อนผิวข้อปกติ⁽⁹¹⁾ แต่ความยาวเทโลเมียร์ที่หดสั้นลงในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมในงานวิจัยนี้ความยาวเทโลเมียร์ลดลงตามกลุ่มระดับความรุนแรง KL grading โดยระดับความรุนแรง grade 3 และ grade 4 มีความยาวเทโลเมียร์สั้นกว่าระดับความรุนแรง grade 2 อย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ความยาวเทโลเมียร์ที่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับระดับความรุนแรง KL grading มีความสัมพันธ์ลักษณะเดียวกันระหว่างการเกิดระดับ LINE-1 methylation และ KL grading นอกจากนี้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโรคข้อเข่าเสื่อมจากระดับ LINE-1 methylation มีแนวโน้มความสัมพันธ์เชิงบวกกับความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมแต่ไม่มีความสัมพันธ์ทางสถิติ

สุดท้ายนี้การศึกษาระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เยื่อข้อเข่าของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่าการเกิดแนวโน้มของ LINE-1 methylation ที่ลดต่ำลงในเซลล์เยื่อข้อเข่าหลังจากได้รับการกระตุ้นจากไซโตไคน์ และภาวะเครียดออกซิเดชัน แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ อาจเป็นเพราะ

การตรวจวัด LINE-1 methylation ในเซลล์เยื่อบุช่องท้องมีจำนวนผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษาน้อยและกลุ่มควบคุมที่ใช้ในการเปรียบเทียบไม่ได้เป็นเซลล์เยื่อบุช่องท้องของคนสุขภาพแข็งแรง อีกทั้งเซลล์เยื่อบุช่องท้องที่ได้รับสารไซโตไคน์ TNF- α และภาวะเครียดออกซิเดชันจาก H₂O₂ ในระยะเวลาที่น้อย ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงระดับ LINE-1 methylation ที่ยังไม่ชัดเจนทำให้ไม่สอดคล้องกับสมมติฐานงานวิจัยนี้ เมื่อเปรียบเทียบระดับ LINE-1 methylation ของเซลล์เยื่อบุช่องท้องที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α เวลา 1 วันมีระดับ LINE-1 methylation ต่ำกว่าระยะเวลา 7 วันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงให้เห็นว่าจำนวนเซลล์เยื่อบุช่องท้องที่เพิ่มจำนวนขึ้นในเวลา 7 วันอาจมีผลต่อการกระตุ้นของ 10 ng/ml TNF- α อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้มีผลสอดคล้องกับการศึกษาระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เยื่อบุช่องท้องจากการวัดระดับการแสดงออกของโปรตีน open reading frame1 (ORF1) ที่มีการแสดงออกในเซลล์เยื่อบุช่องท้องของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมแต่น้อยกว่าเซลล์เยื่อบุช่องท้องของผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ ซึ่งบ่งบอกถึงกระบวนการอักเสบของโรคมีผลต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน ORF1⁽⁷⁾ เช่นเดียวกับการศึกษา global methylation ในเซลล์เยื่อบุช่องท้องของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ที่ได้รับการกระตุ้นจากไซโตไคน์ IL-1 β ระยะเวลา 14 วัน มีระดับ global methylation ลดลง⁽⁸¹⁾ ส่วนผลระดับ LINE-1 methylation ของเซลล์เยื่อบุช่องท้องในภาวะเครียดออกซิเดชันและสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่าระดับ LINE-1 methylation มีแนวโน้มลดลงในภาวะเครียดออกซิเดชัน H₂O₂ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อบุช่องท้องกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ (TA) ผลการศึกษานี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาระดับ LINE-1 hypomethylation ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ได้รับ H₂O₂⁽¹¹⁵⁾ และการศึกษาของโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีระดับ LINE-1 methylation ลดลงเมื่อมีระดับ 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine ที่สูงขึ้นเป็นผลมาจากภาวะเครียดออกซิเดชัน⁽⁹⁵⁾ นอกจากนี้การศึกษาวัยทองเทโลเมียร์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในเซลล์เยื่อบุช่องท้องหลังจากได้รับ 10 ng/ml TNF- α ระยะเวลา 1, 3 และ 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุมอาจเป็นเพราะไซโตไคน์ TNF- α ไม่ได้เป็นปัจจัยที่กระตุ้นต่อการทำลายดีเอ็นเอโดยตรงบริเวณเซลล์เยื่อบุช่องท้อง ซึ่งความยาวเทโลเมียร์เปลี่ยนแปลงในเซลล์ที่มีอายุมากและภาวะเครียดออกซิเดชัน^(2, 3, 111) แต่ในงานวิจัยนี้ไม่ได้เปรียบเทียบเซลล์เยื่อบุช่องท้องแต่ละ passage ที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α เซลล์เยื่อบุช่องท้องที่ใช้ศึกษาจึงมีอายุของเซลล์ที่ไม่แตกต่างกัน แต่งานวิจัยนี้วัดความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์เยื่อบุช่องท้องที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α ช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกันทำให้มีผลการศึกษาไม่สอดคล้องกับงานวิจัยที่

ผ่านมาตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Drigeard Desgarnier M.C และคณะ ศึกษาบริเวณ neural retina มีความยาวของเทโลเมียร์ที่ยาวกว่าในบริเวณกระจกตา เนื่องจากบริเวณกระจกตาของดวงตาถูกเหนี่ยวนำด้วยภาวะเครียดออกซิเดชันจากแสงที่ได้รับบริเวณภายนอกมากกว่าบริเวณ neutral retina⁽¹¹⁶⁾ และในการศึกษาการศึกษาผลของความยาวเทโลเมียร์เซลล์ chondrocytes มีความยาวเทโลเมียร์ที่สั้นลงตามระยะเวลาที่ได้รับสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเซลล์ chondrocytes มีอายุมากจะทนต่อภาวะเครียดออกซิเดชันจากสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลดลง⁽¹¹¹⁾

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในงานวิจัยครั้งนี้พบว่าระดับการแสดงออกของยีนกลุ่ม pro-inflammatory cytokines เช่น *IL-1 β* และ *IL-6* มีระดับการแสดงออกสูงขึ้นหลังจากได้รับ 10 ng/ml TNF- α ส่งผลกระทบเพิ่มความอักเสบในเซลล์เยื่อข้อเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อข้อกลุ่มควบคุม เป็นเพราะยีนกลุ่มนี้สร้างจากบริเวณเซลล์เยื่อข้อและการตรวจพบยีนกลุ่มนี้ปริมาณต่ำบริเวณกระดูกอ่อนผิวข้อ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Konstantinos Loupasakis และคณะ พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *IL-6* สูงขึ้นในเซลล์เยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ที่ได้รับการกระตุ้นของ TNF- α ⁽¹¹⁷⁾ ส่วนการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ *IL-1 β* มีผลกระทบต่อการสร้างสารกลุ่ม metalloprotease (MMP) ทำให้ในงานวิจัยนี้พบการแสดงออกของยีน *MMP-3* เป็นไซโตไคน์กลุ่ม extracellular matrix (ECM) degrading enzymes พบว่าระดับการแสดงออกสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อข้อ เช่นเดียวกับระดับการแสดงออกของยีน *VEGF* ที่มีระดับการแสดงออกสูงในเซลล์เยื่อข้อหลังจากได้รับ 10 ng/ml TNF- α เนื่องจาก *VEGF* มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการอักเสบของเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับการกระตุ้นจากสารไซโตไคน์^(36, 71) แต่ไม่พบความแตกต่างการแสดงออกของยีน *ADAMTs5* ในเซลล์เยื่อข้อหลังจากได้รับ 10 ng/ml TNF- α เนื่องจากยีนชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ aggrecanases เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสลาย aggrecan และ type II collagen ในกระดูกอ่อนผิวข้อทำให้พบการแสดงออกของยีนชนิดนี้ในบริเวณเซลล์เยื่อข้อต่ำ⁽⁶³⁾ ถึงแม้ผลการศึกษาของงานวิจัยนี้พบแนวโน้มของระดับ LINE-1 hypomethylation และการแสดงออกสูงขึ้นของยีน *IL-1 β* , *IL-6*, *MMP-3* และ *VEGF* ในเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α แต่ยังไม่สามารถสรุปว่ากระบวนการ methylation ของ LINE-1 มีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคข้อเข่าเสื่อม จากผลการศึกษา LINE-1 methylation และระดับการแสดงออกของยีนมีการเปลี่ยนแปลงไม่ชัดเจนในเซลล์เยื่อข้อที่

ได้รับ TNF- α , H₂O₂ และ pre-treatment ด้วย TA เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อาจเป็นเพราะผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีการรับประทานยาแก้ปวดกลุ่ม NSAIDs เป็นระยะเวลานานก่อนเข้ารับการรักษา ผ่าตัดเปลี่ยนข้อเทียม รวมถึงความเข้มข้นของสาร H₂O₂ และ TA ที่เติมในเซลล์เยื่อบุข้ออาจจะมี ความเข้มข้นที่น้อยจึงส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ LINE-1 methylation และการแสดงออกของ ยีนระดับต่ำ อีกทั้งเซลล์เยื่อบุข้อที่นำมาศึกษาเป็นของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมซึ่งอาจมีการแสดงออก ของยีนที่แตกต่างไปจากเซลล์เยื่อบุข้อของคนปกติ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน ในเซลล์เยื่อบุข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมหลังจากได้รับ TNF- α , H₂O₂ และ pre-treatment ด้วย TA ดังกล่าวอาจไม่สะท้อนถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในเซลล์เยื่อบุข้อของคนปกติ นอกจากนี้ อาจ ทำการศึกษายืนยันผลจากการตรวจวัด methylation บริเวณ promoter ของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรค ข้อเข่าเสื่อมเพื่อนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เยื่อบุ ข้อตัวอย่างเช่น การศึกษาที่ผ่านมามีการศึกษาในระดับ methylation บริเวณ IL-6 promoter ในเซลล์ เยื่อบุข้อ พบว่าในเซลล์เยื่อบุข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีระดับ DNA hypomethylation เมื่อ เปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อบุข้อของคนปกติ⁽³³⁾

จากผลระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์เยื่อบุข้อมีผลแนวโน้มน สอดคล้องกัน กล่าวคือมีระดับ LINE-1 methylation ต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้ เห็นว่าระดับ LINE-1 hypomethylation ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมอาจวัดระดับ methylation ของ LINE-1 จากเลือดของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเพื่อนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้ระยะความรุนแรงของการเกิดโรค ได้

ข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยนี้ทำการศึกษาในโรคข้อเข่าเสื่อมเป็นโรคที่เกิดเฉพาะบริเวณของอวัยวะและเป็น โรคที่มีการอักเสบระดับต่ำส่งผลต่อการตรวจวัดระดับ LINE-1 methylation และความยาวเทโลเมียร์ จากตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือด อาจใช้ขนาดของประชากรของกลุ่มโรคข้อเข่าเสื่อมให้มากขึ้น หรือการศึกษาระดับ LINE-1 methylation ในน้ำไขข้อเพื่อเป็นการยืนยันผลการศึกษาระดับ LINE-1 methylation ให้ชัดเจนขึ้น อีกทั้งผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมพบมากในกลุ่มผู้สูงอายุ ส่งผลต่อการหา กลุ่ม ควบคุมที่มีอายุใกล้เคียงกับกลุ่มประชากรที่ต้องการศึกษา นอกจากนี้ในการศึกษาระดับ methylation และการแสดงออกของยีนของเซลล์เยื่อบุข้ออาจเพิ่มจำนวนของผู้ป่วยในการศึกษา และการวิเคราะห์ผล methylation ในผู้ป่วยอาจตรวจวัดบริเวณ promoter ในตำแหน่ง CpG ต่างๆ

ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม รวมถึงการศึกษาของกลุ่มของไซโตไคน์ในเลือดของผู้ป่วยร่วมด้วย และในการศึกษา LINE-1 methylation และการแสดงออกของยีนควรทำการศึกษาเปรียบเทียบกับ เซลล์เยื่อข้อของคนสุขภาพแข็งแรงและ synovial fibroblasts cell line ร่วมด้วยเพื่อยืนยันผลการเปลี่ยนแปลงของตัวบ่งชี้ที่ชัดเจนยิ่งขึ้น ผลที่ได้อาจนำมาประกอบเป็นความรู้ใหม่ ทำให้เข้าใจกลไกการทำงานของ การเปลี่ยนแปลงกระบวนการเหนือพันธุกรรมและอาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้ของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

อย่างไรก็ตามในการเก็บข้อมูลผู้ป่วยมีบางส่วนที่เก็บไม่ครบส่งผลต่อการวิเคราะห์ข้อมูล ดังนั้นในอนาคตการเก็บข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยควรเก็บให้ครบถ้วนมากขึ้น เพื่อจะได้ทราบถึง ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม



รายการอ้างอิง

1. Hunter DJ, Felson DT. Osteoarthritis. *BMJ*. 2006;332: 639-42.
2. Toh WS, Brittberg M, Farr J, Foldager CB, Gomoll AH, Hui JH, et al. Cellular senescence in aging and osteoarthritis. *Acta Orthop*. 2016;87: 6-14.
3. Kuszel L, Trzeciak T, Richter M, Czarny-Ratajczak M. Osteoarthritis and telomere shortening. *J Appl Genet*. 2015;56: 169-76.
4. Zhang M, Wang J. Epigenetics and Osteoarthritis. *Genes Dis*. 2015;2: 69-75.
5. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum*. 2012;64: 1697-707.
6. Lu W, Zhang Y, Liu D, Songyang Z, Wan M. Telomeres-structure, function, and regulation. *Exp Cell Res*. 2013;319: 133-41.
7. Karouzakis E, Gay RE, Michel BA, Gay S, Neidhart M. DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2009;60: 3613-22.
8. Richardson SR, Doucet AJ, Kopera HC, Moldovan JB, Garcia-Perez JL, Moran JV. The Influence of LINE-1 and SINE Retrotransposons on Mammalian Genomes. *Microbiol Spectr*. 2015;3: MDNA3-0061-2014.
9. Barter MJ, Bui C, Young DA. Epigenetic mechanisms in cartilage and osteoarthritis: DNA methylation, histone modifications and microRNAs. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20: 339-49.
10. Martin-Nunez GM, Rubio-Martin E, Cabrera-Mulero R, Rojo-Martinez G, Olveira G, Valdes S, et al. Type 2 diabetes mellitus in relation to global LINE-1 DNA methylation in peripheral blood: a cohort study. *Epigenetics*. 2014;9: 1322-8.
11. Liu CC, Fang TJ, Ou TT, Wu CC, Li RN, Lin YC, et al. Global DNA methylation, DNMT1, and MBD2 in patients with rheumatoid arthritis. *Immunol Lett*. 2011;135: 96-9.
12. Alexeeff SE, Baccarelli AA, Halonen J, Coull BA, Wright RO, Tarantini L, et al. Association between blood pressure and DNA methylation of retrotransposons and pro-inflammatory genes. *Int J Epidemiol*. 2013;42: 270-80.

13. Nimit-arnun N. The Epidemiological Situation and Risk Assessment of Knee Osteoarthritis among Thai People. *Journal of The Royal Thai Army Nurses*. 2014;15: 185-94.
14. Woolf AD, Erwin J, March L. The need to address the burden of musculoskeletal conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2012;26: 183-224.
15. Jiang L, Rong J, Zhang Q, Hu F, Zhang S, Li X, et al. Prevalence and associated factors of knee osteoarthritis in a community-based population in Heilongjiang, Northeast China. *Rheumatol Int*. 2012;32: 1189-95.
16. Prieto-Alhambra D, Judge A, Javaid MK, Cooper C, Diez-Perez A, Arden NK. Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints. *Ann Rheum Dis*. 2014;73: 1659-64.
17. Robinson WH, Lepus CM, Wang Q, Raghu H, Mao R, Lindstrom TM, et al. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12: 580-92.
18. Scanzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone*. 2012;51: 249-57.
19. Wenham CY, Conaghan PG. The role of synovitis in osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2010;2: 349-59.
20. Sutton S, Clutterbuck A, Harris P, Gent T, Freeman S, Foster N, et al. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *Vet J*. 2009;179: 10-24.
21. Krasnokutsky S, Samuels J, Abramson SB. Osteoarthritis in 2007. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2007;65: 222-8.
22. Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Is osteoarthritis a disease involving only cartilage or other articular tissues? *Ekleml Hastalik Cerrahisi*. 2010;21: 2-14.
23. Pelletier JP, Raynauld JP, Caron J, Mineau F, Abram F, Dorais M, et al. Decrease in serum level of matrix metalloproteinases is predictive of the disease-modifying effect of osteoarthritis drugs assessed by quantitative MRI in patients with knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010;69: 2095-101.

24. Sharma AR, Jagga S, Lee SS, Nam JS. Interplay between cartilage and subchondral bone contributing to pathogenesis of osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 2013;14: 19805-30.
25. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Ann Rheum Dis.* 1957;16: 494-502.
26. Cakar M, Ayanoglu S, Cabuk H, Seyran M, Dedeoglu SS, Gurbuz H. Association between vitamin D concentrations and knee pain in patients with osteoarthritis. *PeerJ.* 2018;6: e4670.
27. Roos EM, Toksvig-Larsen S. Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) - validation and comparison to the WOMAC in total knee replacement. *Health Qual Life Outcomes.* 2003;1: 17.
28. Hawker GA, Mian S, Kendzerska T, French M. Measures of adult pain: Visual Analog Scale for Pain (VAS Pain), Numeric Rating Scale for Pain (NRS Pain), McGill Pain Questionnaire (MPQ), Short-Form McGill Pain Questionnaire (SF-MPQ), Chronic Pain Grade Scale (CPGS), Short Form-36 Bodily Pain Scale (SF-36 BPS), and Measure of Intermittent and Constant Osteoarthritis Pain (ICOAP). *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2011;63: S240-52.
29. Faucher M, Poiraudou S, Lefevre-Colau MM, Rannou F, Fermanian J, Revel M. Algo-functional assessment of knee osteoarthritis: comparison of the test-retest reliability and construct validity of the WOMAC and Lequesne indexes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;10: 602-10.
30. Lequesne MG. The algofunctional indices for hip and knee osteoarthritis. *J Rheumatol.* 1997;24: 779-81.
31. Bhattaram P, Chandrasekharan U. The joint synovium: A critical determinant of articular cartilage fate in inflammatory joint diseases. *Semin Cell Dev Biol.* 2017;62: 86-93.
32. Shen J, Abu-Amer Y, O'Keefe RJ, McAlinden A. Inflammation and epigenetic regulation in osteoarthritis. *Connect Tissue Res.* 2017;58: 49-63.
33. Yang F, Zhou S, Wang C, Huang Y, Li H, Wang Y, et al. Epigenetic modifications of interleukin-6 in synovial fibroblasts from osteoarthritis patients. *Sci Rep.* 2017;7: 43592.

34. Lin T-H, Tang C-H, Wu K, Fong Y-C, Yang R-S, Fu W-M. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin-J2 and ciglitazone inhibit TNF- α -induced matrix metalloproteinase 13 production via the antagonism of NF- κ B activation in human synovial fibroblasts. *J Cell Physiol.* 2011. 3242-50p.
35. Gupta A, Niger C, Buo AM, Eidelman ER, Chen RJ, Stains JP. Connexin43 enhances the expression of osteoarthritis-associated genes in synovial fibroblasts in culture. *BMC Musculoskelet Disord.* 2014;15: 425.
36. Hamilton JL, Nagao M, Levine BR, Chen D, Olsen BR, Im HJ. Targeting VEGF and Its Receptors for the Treatment of Osteoarthritis and Associated Pain. *J Bone Miner Res.* 2016;31: 911-24.
37. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45: 27-37.
38. Lotz M, Terkeltaub R, Villiger PM. Cartilage and joint inflammation. Regulation of IL-8 expression by human articular chondrocytes. *J Immunol.* 1992;148: 466-73.
39. Guerne PA, Carson DA, Lotz M. IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro. *J Immunol.* 1990;144: 499-505.
40. Mabey T, Honsawek S. Cytokines as biochemical markers for knee osteoarthritis. *World J Orthop.* 2015;6: 95-105.
41. Vincent HK, Percival SS, Conrad BP, Seay AN, Montero C, Vincent KR. Hyaluronic Acid (HA) Viscosupplementation on Synovial Fluid Inflammation in Knee Osteoarthritis: A Pilot Study. *Open Orthop J.* 2013;7: 378-84.
42. Penninx BW, Abbas H, Ambrosius W, Nicklas BJ, Davis C, Messier SP, et al. Inflammatory markers and physical function among older adults with knee osteoarthritis. *J Rheumatol.* 2004;31: 2027-31.
43. Pantsulaia I, Kalichman L, Kobylansky E. Association between radiographic hand osteoarthritis and RANKL, OPG and inflammatory markers. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18: 1448-53.

44. Stannus O, Jones G, Cicuttini F, Parameswaran V, Quinn S, Burgess J, et al. Circulating levels of IL-6 and TNF-alpha are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18: 1441-7.
45. Mosley B, Urdal DL, Prickett KS, Larsen A, Cosman D, Conlon PJ, et al. The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor. *J Biol Chem*. 1987;262: 2941-4.
46. Stove J, Huch K, Gunther KP, Scharf HP. Interleukin-1beta induces different gene expression of stromelysin, aggrecan and tumor-necrosis-factor-stimulated gene 6 in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *Pathobiology*. 2000;68: 144-9.
47. Chadjichristos C, Ghayor C, Kyriotou M, Martin G, Renard E, Ala-Kokko L, et al. Sp1 and Sp3 transcription factors mediate interleukin-1 beta down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes. *J Biol Chem*. 2003;278: 39762-72.
48. Ning L, Ishijima M, Kaneko H, Kurihara H, Arikawa-Hirasawa E, Kubota M, et al. Correlations between both the expression levels of inflammatory mediators and growth factor in medial perimeniscal synovial tissue and the severity of medial knee osteoarthritis. *Int Orthop*. 2011;35: 831-8.
49. E X, Cao Y, Meng H, Qi Y, Du G, Xu J, et al. Dendritic cells of synovium in experimental model of osteoarthritis of rabbits. *Cell Physiol Biochem*. 2012;30: 23-32.
50. Hammacher A, Ward LD, Weinstock J, Treutlein H, Yasukawa K, Simpson RJ. Structure-function analysis of human IL-6: identification of two distinct regions that are important for receptor binding. *Protein Sci*. 1994;3: 2280-93.
51. Poree B, Kyriotou M, Chadjichristos C, Beaufef G, Renard E, Legendre F, et al. Interleukin-6 (IL-6) and/or soluble IL-6 receptor down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes requires a decrease of Sp1.Sp3 ratio and of the binding activity of both factors to the COL2A1 promoter. *J Biol Chem*. 2008;283: 4850-65.

52. Rubenhagen R, Schuttrumpf JP, Sturmer KM, Frosch KH. Interleukin-7 levels in synovial fluid increase with age and MMP-1 levels decrease with progression of osteoarthritis. *Acta Orthop*. 2012;83: 59-64.
53. Bellamy N, Buchanan WW, Goldsmith CH, Campbell J, Stitt LW. Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *J Rheumatol*. 1988;15: 1833-40.
54. Wu X, Cao L, Li F, Ma C, Liu G, Wang Q. Interleukin-6 from subchondral bone mesenchymal stem cells contributes to the pathological phenotypes of experimental osteoarthritis. *Am J Transl Res*. 2018;10: 1143-54.
55. Bau B, Gebhard PM, Haag J, Knorr T, Bartnik E, Aigner T. Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis Rheum*. 2002;46: 2648-57.
56. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci*. 2006;11: 529-43.
57. Chen JJ, Huang JF, Du WX, Tong PJ. Expression and significance of MMP3 in synovium of knee joint at different stage in osteoarthritis patients. *Asian Pac J Trop Med*. 2014;7: 297-300.
58. Kang EH, Lee YJ, Kim TK, Chang CB, Chung JH, Shin K, et al. Adiponectin is a potential catabolic mediator in osteoarthritis cartilage. *Arthritis Res Ther*. 2010;12: R231.
59. Mehraban F, Lark MW, Ahmed FN, Xu F, Moskowitz RW. Increased secretion and activity of matrix metalloproteinase-3 in synovial tissues and chondrocytes from experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 1998;6: 286-94.
60. Lohmander LS, Brandt KD, Mazzuca SA, Katz BP, Larsson S, Struglics A, et al. Use of the plasma stromelysin (matrix metalloproteinase 3) concentration to predict joint space narrowing in knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2005;52: 3160-7.

61. Blaney Davidson EN, Vitters EL, van Lent PL, van de Loo FA, van den Berg WB, van der Kraan PM. Elevated extracellular matrix production and degradation upon bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) stimulation point toward a role for BMP-2 in cartilage repair and remodeling. *Arthritis Res Ther.* 2007;9: R102.
62. Zhang E, Yan X, Zhang M, Chang X, Bai Z, He Y, et al. Aggrecanases in the human synovial fluid at different stages of osteoarthritis. *Clin Rheumatol.* 2013;32: 797-803.
63. Gao SG, Zeng C, Song Y, Tian J, Cheng C, Yang T, et al. Effect of osteopontin on the mRNA expression of ADAMTS4 and ADAMTS5 in chondrocytes from patients with knee osteoarthritis. *Exp Ther Med.* 2015;9: 1979-83.
64. Seuffert F, Weidner D, Baum W, Schett G, Stock M. Upper zone of growth plate and cartilage matrix associated protein protects cartilage during inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2018;20: 88.
65. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004;25: 581-611.
66. Kim KS, Choi HM, Lee YA, Choi IA, Lee SH, Hong SJ, et al. Expression levels and association of gelatinases MMP-2 and MMP-9 and collagenases MMP-1 and MMP-13 with VEGF in synovial fluid of patients with arthritis. *Rheumatol Int.* 2011;31: 543-7.
67. Lee SS, Joo YS, Kim WU, Min DJ, Min JK, Park SH, et al. Vascular endothelial growth factor levels in the serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2001;19: 321-4.
68. Ozgonenel L, Cetin E, Tutun S, Tonbaklar P, Aral H, Guvenen G. The relation of serum vascular endothelial growth factor level with disease duration and activity in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2010;29: 473-7.
69. Pufe T, Petersen W, Tillmann B, Mentlein R. The splice variants VEGF121 and VEGF189 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor are expressed in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* 2001;44: 1082-8.
70. Corrado A, Neve A, Cantatore FP. Expression of vascular endothelial growth factor in normal, osteoarthritic and osteoporotic osteoblasts. *Clin Exp Med.* 2013;13: 81-4.

71. Nagao M, Hamilton JL, Kc R, Berendsen AD, Duan X, Cheong CW, et al. Vascular Endothelial Growth Factor in Cartilage Development and Osteoarthritis. *Sci Rep.* 2017;7: 13027.
72. Klein K, Ospelt C, Gay S. Epigenetic contributions in the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2012;14: 227.
73. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology.* 2013;38: 23-38.
74. Kazazian HH, Jr., Moran JV. The impact of L1 retrotransposons on the human genome. *Nat Genet.* 1998;19: 19-24.
75. Mavragani CP, Sagalovskiy I, Guo Q, Nezos A, Kapsogeorgou EK, Lu P, et al. Expression of Long Interspersed Nuclear Element 1 Retroelements and Induction of Type I Interferon in Patients With Systemic Autoimmune Disease. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68: 2686-96.
76. Hashimoto K, Otero M, Imagawa K, de Andres MC, Coico JM, Roach HI, et al. Regulated transcription of human matrix metalloproteinase 13 (MMP13) and interleukin-1beta (IL1B) genes in chondrocytes depends on methylation of specific proximal promoter CpG sites. *J Biol Chem.* 2013;288: 10061-72.
77. de Andres MC, Takahashi A, Oreffo RO. Demethylation of an NF-kappaB enhancer element orchestrates iNOS induction in osteoarthritis and is associated with altered chondrocyte cell cycle. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016;24: 1951-60.
78. Yooyongsatit S, Ruchusatsawat K, Noppakun N, Hirankarn N, Mutirangura A, Wongpiyabovorn J. Patterns and functional roles of LINE-1 and Alu methylation in the keratinocyte from patients with psoriasis vulgaris. *J Hum Genet.* 2015;60: 349-55.
79. Yooyongsatit S, Ruchusatsawat K, Supiyaphun P, Noppakun N, Mutirangura A, Wongpiyabovorn J. Alterations in the LINE-1 methylation pattern in patients with lichen simplex chronicus. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2013;31: 51-7.
80. Gadalla SM, Katki HA, Shebl FM, Giri N, Alter BP, Savage SA. The relationship between DNA methylation and telomere length in dyskeratosis congenita. *Aging Cell.* 2012;11: 24-8.

81. Nakano K, Boyle DL, Firestein GS. Regulation of DNA methylation in rheumatoid arthritis synoviocytes. *J Immunol.* 2013;190: 1297-303.
82. Nakkuntod J, Avihingsanon Y, Mutirangura A, Hirankarn N. Hypomethylation of LINE-1 but not Alu in lymphocyte subsets of systemic lupus erythematosus patients. *Clin Chim Acta.* 2011;412: 1457-61.
83. de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* 2005;19: 2100-10.
84. Grach AA. [Structural organization of telomeres in various kinds of organisms]. *Tsitologija.* 2009;51: 869-79.
85. Wu J, Tao Y, Shang A, Wang W, Zhang Y, Hu L, et al. Effect of the interaction between MiR-200b-3p and DNMT3A on cartilage cells of osteoarthritis patients. *J Cell Mol Med.* 2017;21: 2308-16.
86. Yehezkel S, Segev Y, Viegas-Pequignot E, Skorecki K, Selig S. Hypomethylation of subtelomeric regions in ICF syndrome is associated with abnormally short telomeres and enhanced transcription from telomeric regions. *Hum Mol Genet.* 2008;17: 2776-89.
87. Zhai G, Aviv A, Hunter DJ, Hart DJ, Gardner JP, Kimura M, et al. Reduction of leucocyte telomere length in radiographic hand osteoarthritis: a population-based study. *Ann Rheum Dis.* 2006;65: 1444-8.
88. Savale L, Chaouat A, Bastuji-Garin S, Marcos E, Boyer L, Maitre B, et al. Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179: 566-71.
89. Samani NJ, Boulton R, Butler R, Thompson JR, Goodall AH. Telomere shortening in atherosclerosis. *Lancet.* 2001;358: 472-3.
90. Martin JA, Klingelutz AJ, Moussavi-Harami F, Buckwalter JA. Effects of oxidative damage and telomerase activity on human articular cartilage chondrocyte senescence. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2004;59: 324-37.
91. Price JS, Waters JG, Darrah C, Pennington C, Edwards DR, Donnell ST, et al. The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell.* 2002;1: 57-65.

92. Tamayo M, Mosquera A, Rego I, Blanco FJ, Gosalvez J, Fernandez JL. Decreased length of telomeric DNA sequences and increased numerical chromosome aberrations in human osteoarthritic chondrocytes. *Mutat Res.* 2011;708: 50-8.
93. Chang HB, Zou JZ, He C, Zeng R, Li YY, Ma FF, et al. Association between Long Interspersed Nuclear Element-1 Methylation and Relative Telomere Length in Wilms Tumor. *Chin Med J (Engl).* 2015;128: 3055-61.
94. Poonpet T, Saetan N, Tanavalee A, Wilairatana V, Yuktanandana P, Honsawek S. Association between leukocyte telomere length and angiogenic cytokines in knee osteoarthritis. *Int J Rheum Dis.* 2018;21: 118-25.
95. Udomsinprasert W, Kitkumthorn N, Mutirangura A, Chongsrisawat V, Poovorawan Y, Honsawek S. Global methylation, oxidative stress, and relative telomere length in biliary atresia patients. *Sci Rep.* 2016;6: 26969.
96. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5: 9-19.
97. Loeser RF. The Role of Aging in the Development of Osteoarthritis. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2017;128: 44-54.
98. Pavanello S, Pesatori AC, Dioni L, Hoxha M, Bollati V, Siwinska E, et al. Shorter telomere length in peripheral blood lymphocytes of workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis.* 2010;31: 216-21.
99. Lopez-Pascual A, Lasa A, Portillo MP, Aros F, Mansego ML, Gonzalez-Muniesa P, et al. Low Oxygen Consumption is Related to a Hypomethylation and an Increased Secretion of IL-6 in Obese Subjects with Sleep Apnea-Hypopnea Syndrome. *Ann Nutr Metab.* 2017;71: 16-25.
100. Cochran WG. Methodological problems in the study of human populations. *Ann N Y Acad Sci.* 1963;107: 476-89.
101. Oguchi T, Ishiguro N. Differential stimulation of three forms of hyaluronan synthase by TGF-beta, IL-1beta, and TNF-alpha. *Connect Tissue Res.* 2004;45: 197-205.
102. Ding L, Hong X, Sun B, Huang Q, Wang X, Liu X, et al. IL-37 is associated with osteoarthritis disease activity and suppresses proinflammatory cytokines production in synovial cells. *Sci Rep.* 2017;7: 11601.

103. Avihingsanon Y, Benjachat T, Tassanarong A, Sodsai P, Kittikovit V, Hirankarn N. Decreased renal expression of vascular endothelial growth factor in lupus nephritis is associated with worse prognosis. *Kidney Int.* 2009;75: 1340-8.
104. Guarrera S, Fiorito G, Onland-Moret NC, Russo A, Agnoli C, Allione A, et al. Gene-specific DNA methylation profiles and LINE-1 hypomethylation are associated with myocardial infarction risk. *Clin Epigenetics.* 2015;7: 133.
105. Hantes ME, Natsaridis P, Koutalos AA, Ono Y, Doxariotis N, Malizos KN. Satisfactory functional and radiological outcomes can be expected in young patients under 45 years old after open wedge high tibial osteotomy in a long-term follow-up. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2017.
106. Saltzman BM, Cotter EJ, Stephens JP, Cvetanovich GL, Madden B, Wang K, et al. Preoperative Tibial Subchondral Bone Marrow Lesion Patterns and Associations With Outcomes After Isolated Meniscus Allograft Transplantation. *Am J Sports Med.* 2018;46: 1175-84.
107. Alkan G, Akgol G. Do vitamin D levels affect the clinical prognoses of patients with knee osteoarthritis? *J Back Musculoskelet Rehabil.* 2017;30(4):897-901.
108. Zou YC, Deng HY, Mao Z, Zhao C, Huang J, Liu G. Decreased synovial fluid ghrelin levels are linked with disease severity in primary knee osteoarthritis patients and are increased following laser therapy. *Clin Chim Acta.* 2017;470: 64-9.
109. Muraki K, Nyhan K, Han L, Murnane JP. Mechanisms of telomere loss and their consequences for chromosome instability. *Front Oncol.* 2012;2: 135.
110. Harbo M, Koelvraa S, Serakinci N, Bendix L. Telomere dynamics in human mesenchymal stem cells after exposure to acute oxidative stress. *DNA Repair (Amst).* 2012;11: 774-9.
111. Brandl A, Hartmann A, Bechmann V, Graf B, Nerlich M, Angele P. Oxidative stress induces senescence in chondrocytes. *J Orthop Res.* 2011;29(7):1114-20.
112. Rubio MA, Davalos AR, Campisi J. Telomere length mediates the effects of telomerase on the cellular response to genotoxic stress. *Exp Cell Res.* 2004;298: 17-27.

113. Li D, Yuan Q, Wang W. The role of telomeres in musculoskeletal diseases. *J Int Med Res.* 2012;40: 1242-50.
114. Ma D, Zhu W, Hu S, Yu X, Yang Y. Association between oxidative stress and telomere length in Type 1 and Type 2 diabetic patients. *J Endocrinol Invest.* 2013;36: 1032-7.
115. Wongpaiboonwattana W, Tosukhowong P, Dissayabutra T, Mutirangura A, Boonla C. Oxidative stress induces hypomethylation of LINE-1 and hypermethylation of the RUNX3 promoter in a bladder cancer cell line. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14: 3773-8.
116. Drigeard Desgarnier MC, Zinflou C, Mallet JD, Gendron SP, Methot SJ, Rochette PJ. Telomere Length Measurement in Different Ocular Structures: A Potential Implication in Corneal Endothelium Pathogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57: 5547-55.
117. Loupasakis K, Kuo D, Sokhi UK, Sohn C, Syracuse B, Giannopoulou EG, et al. Tumor Necrosis Factor dynamically regulates the mRNA stabilome in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *PLoS One.* 2017;12: e0179762.




ภาคผนวก ก

เอกสารข้อมูล และหนังสือแสดงความยินยอมในการเข้าร่วมโครงการวิจัย

1. เอกสารชี้แจงข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย (Information sheet for patients)
2. เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (Consent form)
3. แบบประเมิน Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS)
4. แบบประเมิน Index of severity for osteoarthritis for the knee (ISK) หรือ Lequesne index



	คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	เอกสารชี้แจงข้อมูลคำอธิบายสำหรับ ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย	AF 09-04/5.0
			หน้า 0/7

ชื่อโครงการวิจัย ดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเม็ดเลือดขาวและเซลล์เยื่อบุข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

ผู้สนับสนุนการวิจัย ไม่มี

ผู้วิจัยหลัก

ชื่อ นิกภรณ์ ธีระวัฒนพงศ์
ที่อยู่ทำงานหรือสถานศึกษาของผู้วิจัย ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ที่ทำงาน 02-2564718

เบอร์โทรศัพท์ติดต่อ 24 ชั่วโมง 087-6793449

ผู้วิจัยร่วม (ทุกท่าน)

1. ชื่อ ศ.นพ.สิทธิศักดิ์ หารธาเวก
ที่อยู่ทำงานหรือสถานศึกษาของผู้วิจัย ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ที่ทำงาน 02-256-4482

เบอร์โทรศัพท์ติดต่อ 24 ชั่วโมง 085-0425466

2. ชื่อ นพ.สีหัช งามอุโฆษ
ที่อยู่ทำงานหรือสถานศึกษาของผู้วิจัย ภาควิชาออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ที่ทำงาน 02-2564510

เบอร์โทรศัพท์ติดต่อ 24 ชั่วโมง 081-8181844

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านเป็นเป็นผู้ป่วยที่เข้ามารับการผ่าตัดรักษาอาการของโรคข้อเข่าเสื่อม ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย หรือแพทย์ผู้ร่วมทำวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่า จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

เหตุผลความเป็นมา

โรคข้อเสื่อม เป็นโรคที่พบอุบัติการณ์สูงในกลุ่มผู้สูงอายุมากกว่า 60 ปีขึ้นไป อาการของโรคส่งผลกระทบต่อการใช้ชีวิตประจำวันของผู้ป่วย ทำให้เคลื่อนที่ลำบากขึ้นกับระยะและความรุนแรงของโรค สาเหตุของการเกิดโรคนี้นี้สามารถแบ่งออกได้ 2 สาเหตุหลัก คือ ข้อเสื่อมปฐมภูมิ เป็นสาเหตุที่เกิดจากสาเหตุที่ยังไม่แน่ชัด เช่น พันธุกรรม อายุ และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัย epigenetics ข้อเสื่อมทุติยภูมิ เป็นข้อเสื่อมที่ทราบสาเหตุที่ส่งผลให้เกิดอาการข้อเสื่อมที่แน่ชัด เช่น ภาวะอ้วน การได้รับอุบัติเหตุ เพศ และสมดุลของเมแทบอลิซึมในร่างกาย เป็นต้น สาเหตุเหล่านี้ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของข้อเข่าบริเวณกระดูกอ่อนผิวข้อ (articular cartilage) กระดูกที่อยู่ใต้ผิวข้อ (subchondral bone) และการอักเสบบริเวณเยื่อข้อ เกิดจากการกระตุ้นของสารไซโตไคน์ เช่น interleukin-1 (IL-1), IL-6 และ tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) ทั้งนี้จากรายงานสถิติขององค์การอนามัยโลกคาดว่า พ.ศ. 2563 มีผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมเพิ่มขึ้นร้อยละ 14.3 จาก พ.ศ. 2551 และยังพบว่าประชากรตั้งแต่อายุ 45 ปี เริ่มพบอุบัติการณ์ของโรคข้อเข่าเสื่อม รวมถึงร้อยละ 50 จะพบในกลุ่มผู้ที่มีอายุมากกว่า 60 ปี และพบว่าเกิดโรคในผู้ป่วยเพศหญิงมากกว่าเพศชาย จากสถิติอุบัติการณ์ของโรคที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทำให้มีการศึกษามากมายถึงสาเหตุที่ส่งผลให้เกิดโรค ทั้งกลไกการควบคุมให้เกิดโรค การศึกษาสารเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องผ่านการทดสอบด้วยเทคนิคทางชีวเคมี และการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมกับพยาธิสภาพของโรค เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม การเกิดพยาธิสภาพและการดำเนินของโรคข้อเสื่อมมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องจำนวนมาก ซึ่งการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับดีเอ็นเอเมทิลเลชันในการควบคุมความสมดุลของจีโนม และควบคุมระดับการแสดงออกของยีนจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของเลือด (blood leukocytes) และเซลล์เยื่อข้อ (synovial fibroblasts) มีจำนวนน้อย ถึงแม้จะเป็นโรคที่ไม่อันตรายแก่ชีวิต แต่หากไม่ได้เข้ารับการรักษาที่ถูกต้องและทันเวลาจะส่งผลให้ผู้ป่วยพิการไม่สามารถเดินได้ ดังนั้น ความเข้าใจพยาธิกำเนิดของโรคข้อเสื่อมตลอดจนการศึกษาค้นหาตัวบ่งชี้ที่ช่วยในการวินิจฉัยโรคข้อเสื่อมมีความสำคัญต่อการพัฒนาการรักษาและพัฒนาคุณภาพชีวิตผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมให้ดีขึ้น

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

วัตถุประสงค์หลักของการศึกษานี้คือ เพื่อศึกษาระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุม โดยอาศัยเทคนิค quantitative combine bisulfite restriction analysis (qCOBRA) และเพื่อศึกษาผลของไซโตไคน์ TNF- α ต่อระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มข้อเสื่อมอักเสบและกลุ่มข้อเสื่อมไม่อักเสบ รวมถึงการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มข้อเสื่อมอักเสบและกลุ่มข้อเสื่อมไม่อักเสบหลังจากได้รับไซโตไคน์ TNF- α ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการพยากรณ์โรค โดยทำการเจาะเลือดผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและเก็บชิ้นเนื้อที่เป็นเยื่อข้อ มีจำนวนผู้เข้าร่วมโครงการ 96 คน การวิจัยนี้ใช้ชิ้นเนื้อที่ได้จากการผ่าตัดตามแผนการรักษา ไม่ต้องตัดชิ้นเนื้อเพิ่มแต่อย่างใด

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

หากท่านมีคุณสมบัติที่เหมาะสมและยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ในวันที่ท่านได้รับการนัดหมายให้มารับการผ่าตัดโดยแพทย์ผู้ให้การรักษา ผู้วิจัยจะขอเก็บเยื่อข้อขณะที่ท่านเข้ารับการผ่าตัด ซึ่งชิ้นเนื้อดังกล่าวต้องได้รับการผ่าตัดออกตามแผนการรักษาของทีมแพทย์ที่ดูแลรักษาผู้ป่วยอยู่แล้ว แม้ไม่เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ร่วมกับการเจาะเก็บเลือด ปริมาตร 7 มิลลิลิตร (1 ซ้อนชาครึ่ง) ก่อนการผ่าตัด เพื่อนำไปศึกษาระดับเมทิลเลชันของลำดับเบสในจีโนม ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับความเสียหายของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมและหาตัวบ่งชี้ถึงการเกิดข้อเสื่อมในผู้ป่วย (biomarkers) และใช้ติดตามผลการรักษาจากตัวอย่างเลือด

ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

เพื่อให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ ผู้ทำวิจัยใคร่ขอความร่วมมือจากท่าน โดยจะขอให้ท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัยอย่างเคร่งครัด รวมทั้งแจ้งอาการผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับท่านระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัยให้ผู้ทำวิจัยได้รับทราบ

ความเสี่ยงที่อาจได้รับ

ท่านมีโอกาสที่จะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก และโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะซึ่งพบได้น้อยมาก นอกจากนี้ท่านอาจจะได้รับความเสี่ยงและความไม่สะดวกสบายจากการเก็บชิ้นเนื้อเล็กน้อย เนื่องจากการเก็บชิ้นเนื้อดังกล่าวจะเก็บเมื่อท่านเข้ารับการผ่าตัดตามแผนการรักษาตามปกติ

ของทีมแพทย์ที่ดูแลรักษาผู้ป่วยเท่านั้น กรุณาแจ้งผู้ทำวิจัยในกรณีที่พบอาการดังกล่าวข้างต้น หรืออาการอื่น ๆ ที่พบร่วมด้วย ระหว่างที่อยู่ในโครงการวิจัย หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

ความเสี่ยงที่ได้รับการเจาะเลือด

ท่านมีโอกาสที่จะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก ข้าจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือดหรือหน้ามืด และโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดพบได้น้อยมาก

ความเสี่ยงที่ไม่ทราบแน่นอน

ท่านอาจเกิดอาการข้างเคียง หรือความไม่สบาย นอกเหนือจากที่ได้แสดงในเอกสารฉบับนี้ ซึ่งอาการข้างเคียงเหล่านี้เป็นอาการที่ไม่เคยพบมาก่อน เพื่อความปลอดภัยของท่าน ควรแจ้งผู้ทำวิจัยให้ทราบทันทีเมื่อเกิดความผิดปกติใดๆ เกิดขึ้น

หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

หากมีการค้นพบข้อมูลใหม่ ๆ ที่อาจมีผลต่อความปลอดภัยของท่านในระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัย ผู้ทำวิจัยจะแจ้งให้ท่านทราบทันที เพื่อให้ท่านตัดสินใจว่าจะอยู่ในโครงการวิจัยต่อไป หรือจะขอถอนตัวออกจากการวิจัย

การพบแพทย์นอกตารางนัดหมายในกรณีที่เกิดอาการข้างเคียง

หากมีอาการข้างเคียงใด ๆ เกิดขึ้นกับท่าน ขอให้ท่านรีบมาพบแพทย์ที่สถานพยาบาลทันที ถึงแม้ว่าจะอยู่นอกตารางการนัดหมาย เพื่อแพทย์จะได้ประเมินอาการข้างเคียงของท่าน และให้การรักษาที่เหมาะสมทันที หากอาการดังกล่าวเป็นผลจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะไม่เสียค่าใช้จ่าย

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

ท่านจะไม่ได้รับประโยชน์ใดๆ จากการเข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้ แต่ผลการศึกษาที่ได้จะเป็นความรู้พื้นฐานในการอธิบายสาเหตุและการดำเนินไปของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในอนาคต การเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ไม่ได้รับรองว่าสุขภาพของท่านจะต้องดีขึ้นหรือความรุนแรงของโรคจะลดลงอย่างแน่นอน

วิธีการและรูปแบบการรักษาอื่น ๆ ซึ่งมีอยู่สำหรับอาสาสมัคร

ท่านไม่จำเป็นต้องเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้เพื่อประโยชน์ในการรักษาโรคที่ท่านเป็นอยู่ เนื่องจากมีแนวทางการรักษาอื่น ๆ หลายแบบสำหรับรักษาโรคของท่านได้ ดังนั้นจึงควรปรึกษาแนวทางการรักษาวิธีอื่น ๆ กับแพทย์ผู้ให้การรักษาท่านก่อนตัดสินใจเข้าร่วมในการวิจัย

ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมในโครงการวิจัย

ขอให้ท่านปฏิบัติดังนี้

- ขอให้ท่านให้ข้อมูลทางการแพทย์ของท่านทั้งในอดีต และปัจจุบัน แก่ผู้ทำวิจัยด้วยความสัตย์จริง
- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่ท่านร่วมในโครงการวิจัย

อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยและความรับผิดชอบของผู้ทำวิจัย/

ผู้สนับสนุนการวิจัย

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการเข้าร่วมการวิจัย ท่านจะได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมทันที หากท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของทีมผู้ทำวิจัยแล้ว ผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัยยินดีจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของท่าน อีกทั้งจะได้รับการชดเชยการสูญเสียเวลา เสียรายได้ตามความเหมาะสม

ในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใด ๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ท่านสามารถติดต่อกับผู้ทำวิจัยคือ นางสาวนิภาภรณ์ ธีระวัฒนพงศ์ โทรศัพท์ 087-679-3449 และแพทย์ผู้ร่วมวิจัยคือ ศ. นพ. สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก โทรศัพท์ 02-256-4482, 085-042-5466 ได้ตลอด 24 ชั่วโมงได้ตลอด 24 ชั่วโมง

ค่าใช้จ่ายของท่านในการเข้าร่วมการวิจัย

ท่านไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายใดๆ จากการเข้าร่วมโครงการวิจัย โดยผู้วิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบค่าใช้จ่ายที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งหมด สำหรับค่าใช้จ่ายที่เกี่ยวกับการรักษาและการผ่าตัด เช่น ค่าธรรมเนียมทางการแพทย์ ค่าวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ท่านจะเป็นผู้รับผิดชอบเองตามปกติ

ค่าตอบแทนสำหรับผู้เข้าร่วมวิจัย

ท่านจะไม่ได้รับค่าตอบแทนจากการเข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอถอนตัวออกจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาโรคของท่านแต่อย่างใด

ผู้ทำวิจัยอาจถอนท่านออกจากโครงการวิจัย เพื่อเหตุผลด้านความปลอดภัยของท่าน หรือเมื่อผู้สนับสนุนการวิจัยยุติการดำเนินงานวิจัย หรือ ในกรณีดังต่อไปนี้

ท่านไม่สามารถปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัย

การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร

ข้อมูลที่สามารถนำไปสู่การเปิดเผยตัวท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

จากการลงนามยินยอมของท่าน ผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ผู้ตรวจสอบการวิจัย และหน่วยงานควบคุมระเบียบกฎหมาย สามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของท่านได้แม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม โดยไม่ละเมิดสิทธิของท่านในการรักษาความลับเกินขอบเขตที่กฎหมายและระเบียบกฎหมายอนุญาตไว้

จากการลงนามยินยอมของท่าน แพทย์ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดที่เกี่ยวข้องกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ของท่านให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

การยกเลิกการให้ความยินยอม

หากท่านต้องการยกเลิกการให้ความยินยอมดังกล่าว ท่านสามารถแจ้งผู้ทำวิจัยคือ นางสาว นิภาภรณ์ ธีระวัฒนพงศ์ โทรศัพท์ 087-679-3449 และแพทย์ผู้ร่วมวิจัยคือ นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก โทรศัพท์ 02-256-4482, 085-042-5466 หรือเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอม โดยส่งไปที่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 1873 ถ.พระรามสี่ เขตปทุมวัน กทม. 10330

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตาม ข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

การจัดการกับตัวอย่างชีวภาพที่เหลือ

ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ได้จากท่านซึ่งเป็นชิ้นเนื้อที่ต้องได้รับการผ่าตัดตามแผนการรักษาปกติ แม้ไม่เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ หลังเสร็จสิ้นการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะขอเก็บไว้ใช้ในอนาคต โดยจะขออนุญาตเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อที่เหลือไว้ในรูปนิรนาม โดยใช้รหัสที่สามารถเชื่อมโยงกับข้อมูลเดิมของท่านได้ แต่จะเก็บรักษาข้อมูลของท่านไว้เป็นความลับ ไม่เปิดเผยต่อสาธารณะและไม่มีการบันทึกข้อมูลส่วนตัวของท่านเพิ่มเติม เพื่อประโยชน์ในการศึกษาวิจัยในภายภาคหน้า โดยจะทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เป็นระยะเวลา 20 ปี ในกรณีที่ครบกำหนดระยะเวลาจัดเก็บผู้ทำวิจัยจะขอเก็บชิ้นเนื้อที่เหลือต่อไว้ในอนาคต โดยจะทำบันทึกขออนุญาตผ่านหัวหน้าภาควิชามายังคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย ทั้งนี้การศึกษาวิจัยในภายภาคหน้าทุกครั้งที่มีการใช้ชิ้นเนื้อที่เก็บไว้นี้ จะต้องแจ้งขออนุญาตและได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยทุกครั้ง โดยตัวอย่างชิ้นเนื้อที่เก็บไว้จะไม่มีการจำหน่ายหรือนำมาใช้ในเชิงพาณิชย์ ส่วนตัวอย่างเลือดที่เหลือจากการวิจัยจะถูกทำลายทั้งหมดตามขั้นตอนมาตรฐานของการกำจัดตัวอย่างทางชีวภาพ

สิทธิของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย


ในฐานะที่ท่านเป็นผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ รวมทั้งยาและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่จะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
5. ท่านจะได้รับการเปิดเผยถึงทางเลือกในการรักษาด้วยวิธีอื่น ยา หรืออุปกรณ์ซึ่งมีผลดีต่อท่านรวมทั้งประโยชน์และความเสี่ยงที่ท่านอาจได้รับ
6. ท่านจะได้รับทราบแนวทางในการรักษา ในกรณีที่พบโรคแทรกซ้อนภายหลังการเข้าร่วมในโครงการวิจัย
7. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
8. ท่านจะได้รับทราบว่ากรยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลกระทบใดๆ ทั้งสิ้น

9. ท่านจะได้รับเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยและสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
10. ท่านมีสิทธิ์ในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพลบังคับข่มขู่ หรือการหลอกลวง

หากท่านไม่ได้รับการชดเชยอันควรต่อการบาดเจ็บหรือเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นโดยตรงจากการวิจัย หรือท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถร้องเรียนได้ที่ สำนักงานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอานันทมหิตลชั้น 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์/โทรสาร 0-2256-4493 ในเวลาราชการ หรือ e-mail : medchulairb@chula.ac.th

การลงนามในเอกสารให้ความยินยอม ไม่ได้หมายความว่าท่านได้สละสิทธิ์ทางกฎหมายตามปกติที่ท่านพึงมี ขอขอบคุณในการให้ความร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

	คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วม โครงการสำหรับอาสาสมัคร	AF 09-05/5.0 หน้า 1/2

การวิจัยเรื่อง ดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเม็ดเลือดขาวและเซลล์เยื่อบุข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

วันให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....ที่

อยู่.....

ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่

..... และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนาม และ วันที่ พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอม ให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย และแนวทางรักษาโดยวิธีอื่นอย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว ข้าพเจ้าจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาอาจได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจและประมวลข้อมูลของข้าพเจ้า ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของข้าพเจ้าได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิ์ที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถยกเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นและมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีเข้าร่วมในการวิจัยด้วยความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมนี้

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม
(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

การจัดการกับตัวอย่างทางชีวภาพ

- ไม่มีตัวอย่างชีวภาพ
- มีแต่ไม่มีการขอเก็บ
- มีและขอเก็บตัวอย่างชีวภาพที่เหลือไว้เพื่อการวิจัยในอนาคต

ข้าพเจ้า ยินยอม
 ไม่ยินยอม

ให้เก็บตัวอย่างชีวภาพที่เหลือไว้เพื่อการวิจัยในอนาคต

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม
(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการไม่พึงประสงค์ หรือความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย อย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย

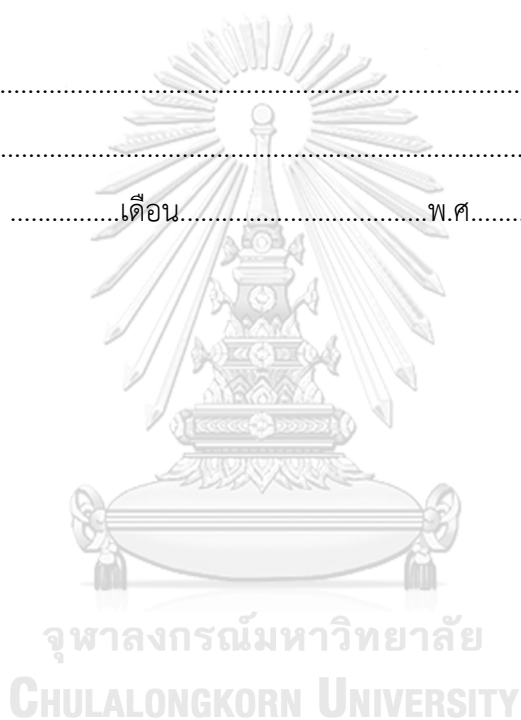
(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง

วันที่เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน

(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง

วันที่เดือน.....พ.ศ.....

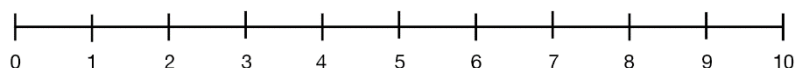


แบบประเมินผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

ชื่อผู้ตอบแบบประเมิน _____

อายุ _____ ปี เพศ ชาย หญิง วันที่ประเมิน _____

1. การประเมินประสิทธิภาพ (เกณฑ์การให้คะแนน)



ไม่ปวด

ปวดรุนแรงมาก

2. แบบประเมินข้อเข่า Knee and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS)

คำชี้แจง แบบประเมินนี้เป็นการสำรวจความคิดเห็นของท่านเกี่ยวกับข้อเข่า ข้อมูลนี้จะช่วยในการติดตามอาการที่เกิดขึ้น และประเมินระดับความสามารถในการเคลื่อนไหวของท่าน

	1.อาการ	ไม่มี/ทำไม่ได้ทุกครั้ง → ตลอดเวลา/ทำได้เลย				
		0	1	2	3	4
1	อาการบวมของข้อเข่า					
2	การเสียดสีของข้อเข่าขณะเคลื่อนไหว หรือมีเสียงเกิดขึ้นในข้อ					
3	อาการติด หรือยึดขณะเคลื่อนไหว					
4	การเหยียดขาได้สุด					
5	งอเข่าได้สุด					
	2.การฝืดขัดของข้อ	ไม่ขัด/ตึง → ขัด/ตึงมากที่สุด				
		0	1	2	3	4
1	ขัด หรือตึงหลังตื่นนอน					
2	ขัด หรือตึงระหว่างวัน					
	3.อาการปวด	ไม่ปวด → ปวดมาก				
		0	1	2	3	4
1	ความบ่อยของอาการปวดข้อเข่า					
2	หมุนบิดขาบนเข่าข้างที่ปวดขณะยืน					
3	เหยียดเข่าจนสุด					
4	งอเข่าจนสุด					
5	เดินบนพื้นราบ					
6	เดิน หรือลงบันได					
7	ขณะนอนอยู่บนเตียงตอนกลางคืน					
8	นั่ง หรือนอน					
9	ยืนตรง					

	4.การเคลื่อนไหวในกิจวัตรประจำวัน	ไม่ลำบาก → ลำบากมากที่สุด				
		0	1	2	3	4
1	เดินลงบันได					
2	เดินขึ้นบันได					
3	ลุกขึ้นจากเก้าอี้					
4	ยืนตรง					
5	ก้มหยิบของจากพื้น					
6	เดินบนพื้นราบ					
7	ก้าวขึ้นหรือลงจากรถ					
8	เดินไปซื้อของระยะใกล้ๆ					
9	สวมถุงน่องหรือถุงเท้า					
10	ลุกขึ้นจากเตียง					
11	ถอดถุงน่องหรือถุงเท้า					
12	นอนพลิกตัวบนเตียงโดยไม่ขยับเข่าก่อน					
13	ก้าวขาเข้าและออกจากห้องน้ำ					
14	นั่ง					
15	นั่งลง และลุกจากโถส้วม					
16	ทำงานบ้านหนักๆ เช่น เคลื่อนย้ายสิ่งของ ขัดพื้น					
17	ทำงานบ้านเบาๆ เช่น ทำกับข้าว กวาดพื้น					
	5.การเคลื่อนไหวในการออกกำลังกาย และการทำกิจกรรมอื่นๆ	ไม่ลำบาก → ลำบากมากที่สุด				
		0	1	2	3	4
1	ย่อเข่า/นั่งยองๆ					
2	วิ่ง					
3	กระโดด					
4	หมุนบิดขาบนเข่าข้างที่ปวด					
5	คุกเข่า					
	6.คุณภาพชีวิต	ไม่มีปัญหา/ไม่ลำบาก → ตลอดเวลา/ลำบากมาก				
		0	1	2	3	4
1	ท่านรู้สึกว่าการเข้าของท่านมีปัญหาบ่อยเพียงใด					
2	การปรับเปลี่ยนวิถีชีวิตและกิจวัตรประจำวันเพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้เกิดการบาดเจ็บของข้อเข่า					
3	ความมั่นใจต่อสภาพของข้อเข่า					
4	ความยากลำบากที่เกิดจากข้อเข่า					

แบบประเมินระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อม

Index of severity for osteoarthritis of the knee (Knee ISOA)

(Lequesne, 1997)

อาการปวด	คะแนน
1. ขณะนอนบนเตียงตอนกลางคืน	
ไม่มีอาการปวด	0
ปวดขณะมีการเคลื่อนไหว	1
ปวดขณะนอนเฉยๆ	2
2. ข้อฝืดแข็งหลังจากตื่นนอนตอนเช้า	
น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 นาที	0
ระหว่าง 1-15 นาที	1
มากกว่าหรือเท่ากับ 15 นาที	2
3. ปวดหลังจากยืนนาน 30 นาที	
ไม่มีอาการปวด	0
มีอาการปวด	1
4. ขณะเดิน	
ไม่มีอาการปวด	0
ปวดหลังจากเดินช่วงขณะหนึ่ง	1
ปวดตั้งแต่เริ่มเดิน	2
5. ปวดหลังจากลุกขึ้นยืนไม่ใช่แขนช่วยยัน	
ไม่มีอาการปวด	0
มีอาการปวด	1
ระยะทางสูงสุดที่เดินได้ อาจเดินได้ด้วยอาการปวดก็ได้	
ไม่จำกัด	0
มากกว่า 1 กม. แต่จำกัดระยะทาง	1
900-1,000 ม. (ประมาณ 15 นาที)	2
500-900 ม. (ประมาณ 8-15 นาที)	3

300-500 ม.	4
100-300 ม.	5
น้อยกว่า 100 ม.	6
ใช้เครื่องช่วยเดิน 1 ข้าง	1
ใช้เครื่องช่วยเดิน 2 ข้าง	2

การทำกิจวัตร

เดินขึ้นบันไดขึ้นมาตรฐานได้	0-2
เดินลงบันไดขึ้นมาตรฐานได้	0-2
นั่งยองๆได้	0-2
เดินบนพื้นไม่เรียบได้	0-2

หมายเหตุ :	0	หมายถึง	ทำได้ปกติ
	1	หมายถึง	ทำได้ด้วยความลำบาก
	2	หมายถึง	ไม่สามารถทำได้

จากคะแนนรวมในแบบทดสอบข้างต้น สามารถแบ่งระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมได้

ดังนี้

คะแนนรวม	ระดับความรุนแรง
มากกว่าหรือเท่ากับ 14	รุนแรงมากที่สุด (Extreme severe)
11 – 13	รุนแรงมาก (Very severe)
8 – 10	รุนแรง (Severe)
5 – 7	ปานกลาง (Moderate)
1 – 4	น้อย (Mild or minor)

ภาคผนวก ข

การเตรียมบัฟเฟอร์ และสารละลาย

1. สารละลาย 10X Tris-boric EDTA buffer (10X TBE buffer)

Tris base	121.1	g
Boric acid anhydrous	55.6	ml
0.5 M Na ₂ EDTA	40	ml
Distilled water	1,000	ml

หลังจากนั้นผสมสารละลายให้เข้ากัน และนำสารละลายปรับ pH เท่ากับ 8.3

2. 6X loading dye

Bromophenol blue	0.25	g
Xylene cyanol	0.25	g
Glycerol	50	ml
1 M Tris (pH 8.0)	1	ml
Distilled water	100	ml

ผสมสารละลายให้เข้ากัน และเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

3. สารละลาย 10% Ammonium persulfate

Ammonium persulfate	0.1	g
Distilled water	1	ml

ผสมสารละลายให้เข้ากันและเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

4. สารละลาย 1X Phosphate buffer saline (PBS)

NaCl	8.0	g
Na ₂ HPO ₄	1.16	g
KH ₂ PO ₄	0.2	g
KCL	0.2	g
Distilled water	1,000	ml

ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วทำการปรับ pH เป็น 7.2 หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. สารละลาย 10X Tris-acetate EDTA buffer (10X TAE buffer)

Tris-base	48.4	g
0.5 M EDTA, pH 8.0	20	ml
Glacial acetic acid	11.42	ml
Distilled water	1,000	ml

หลังจากนั้นผสมสารละลายให้เข้ากัน และนำสารละลายปรับ pH เท่ากับ 7.6-7.8

6. สารละลาย 2M Sodium acetate (2M NaOAc)

NaOAc	4.101	g
Distilled water	25	ml

ผสมสารละลายให้เข้ากันและเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

7. สารละลาย Lysis buffer

Tris-HCl	0.1050	g
EDTA	0.1245	g
SDS	0.3350	g
Distilled water	50	ml

ผสมสารละลายให้เข้ากันและเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อผู้วิจัยหลัก

(ภาษาไทย)

นางสาวนิภาภรณ์ ธีระวัฒนพงศ์

(ภาษาอังกฤษ)

Miss Nipaporn Teerawattanapong

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

366 ถนนจักรพงษ์ แขวงตลาดยอด เขตพระนคร กรุงเทพมหานคร 10200

โทรศัพท์ 087-6793449

การศึกษา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ. 2555-2559)

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ. 2559-2561)

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

เผยแพร่ผลงานวิจัยระดับชาติเรื่อง ระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เยื่อบุช่องของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม การศึกษานำร่องในจุฬาลงกรณ์เวชสาร

CHULALONGKORN UNIVERSITY