

ผลของยาแก้อักเสบคิโทโรเล็กต่อแอฟอปโทซิส
และการแสดงออกของยีนซ่อมแซมของเซลล์กระดูกอ่อน

นางสาวนารีรัตน์ รุ่งเรือง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์นี้ต้องปฏิบัติตามเงื่อนไขการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

EFFECTS OF THE ANTI-INFLAMMATORY DRUG, KETOROLAC,
ON CHONDROCYTE APOPTOSIS AND EXPRESSION OF REPAIR GENES

Miss Nareerat Rungruang

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

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลของยาแก้ไอเสบตีโทโรเล็กต่อแอปอปโทซิสและ
การแสดงออกของยีนซ่อมแซมของเซลล์กระดูกอ่อน

โดย นางสาวนารีรัตน์ รุ่งเรือง

สาขาวิชา พันธุศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

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

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนียจิต)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทพ. นครินทร์ กิตกำจร)

นารีรัตน์ รุ่งเรือง : ผลของยาแก้อักเสบคิโทโรเล็กต่อแอฟอปโทซิสและการแสดงออกของ ยีนซ่อมแซมของเซลล์กระดูกอ่อน . (EFFECTS OF THE ANTI-INFLAMMATORY DRUG, KETOROLAC, ON CHONDROCYTE APOPTOSIS AND EXPRESSION OF REPAIR GENES) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ, 63หน้า.

โรคข้อเสื่อม เป็นโรคในกลุ่มที่มีอาการผิดปกติของข้อกระดูก เกิดจากการเสื่อมของกระดูกอ่อนผิวข้อ ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ ยาคิโรเล็กจัดอยู่ในกลุ่มยาลดการอักเสบชนิดที่ไม่มี สเตียรอยด์ ในปัจจุบันยาคิโทโรเล็กนิยมใช้ในการลดการอักเสบและอาการปวดในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม และมีแนวคิดเกี่ยวกับการฉีดยาคิโทโรเล็กเข้าที่ระหว่างข้อเข้า วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ ศึกษาผลกระทบของยาแก้อักเสบคิโทโรเล็กที่มีต่อแอฟอปโทซิสและการแสดงออกของยีนซ่อมแซมของเซลล์กระดูกอ่อน ตัวอย่างกระดูกอ่อนผิวข้อถูกเก็บจากผู้ป่วย โรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่า จำนวน 9 คน ทดสอบเซลล์กระดูกอ่อนด้วยยาคิโทโรเล็กความเข้มข้น 0, 1, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตรวจสอบระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยเทคนิค MTT assay ตรวจสอบแอฟอปโทซิสของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยเทคนิค TUNEL assay ตรวจสอบการตายของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยเทคนิค Live/Dead assay ที่เวลา 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *ACAN* และ *BMP2* ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการซ่อมแซมเซลล์กระดูกอ่อนด้วยเทคนิค Real-time PCR เมื่อทดสอบเซลล์กระดูกอ่อนด้วยยาคิโทโรเล็ก เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าเปอร์เซ็นต์ระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อได้รับยาคิโทโรเล็กที่ความเข้มข้นสูงกว่า 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนพร้อมกับยาคิโทโรเล็ก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดแอฟอปโทซิสของเซลล์กระดูกอ่อนพบว่า เซลล์กระดูกอ่อนเกิดแอฟอปโทซิสเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของยาที่สูงขึ้น และเมื่อตรวจสอบการตายของเซลล์กระดูกอ่อนพบว่า เซลล์กระดูกอ่อนมีเปอร์เซ็นต์การตายสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ทุกความเข้มข้น ยกเว้น ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนั้นยาคิโทโรเล็กความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยังมีผลทำให้ระดับการแสดงออกของยีน *ACAN* มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับอันตรายในการใช้ยาคิโทโรเล็กในการฉีดเข้าที่ข้อเข่าโดยตรง

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์.....ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชา.....พันธุศาสตร์.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา...2555.....

5372272923 : MAJOR GENETICS

KEYWORDS : KETOROLAC / CHONDROCYTE / OSTEOARTHRITIS

NAREERAT RUNGRUANG : EFFECTS OF THE ANTI-INFLAMMATORY DRUG, KETOROLAC, ON CHONDROCYTE APOPTOSIS AND EXPRESSION OF REPAIR GENES. ADVISOR : ASST. PROF. RACHANEEKORN TAMMACHOTE, Ph.D., 63pp.

Osteoarthritis (OA) is classified in a group of joint diseases. It is caused by the degradation of articular cartilage which stimulates inflammatory responses. Ketorolac is a non-steroidal anti-inflammation drugs (NSAIDs). Nowadays, ketorolac is widely used to treat and relieve pain for OA patients. There is a conception of intra-articular injection of ketorolac. The objective of this research is to study the effects of ketorolac on chondrocyte apoptosis and expression of repair genes. Cartilage samples were obtained from nine OA patients who underwent total knee replacement surgery. Chondrocytes from the articular cartilage samples were cultured and treated with ketorolac at the concentrations of 0, 1, 5, 10 and 20 mg/ml for 24 and 48 hours. Chondrocyte viability was analyzed by MTT assay. Apoptotic cells were detected by TUNEL assay. Dead cells were detected by Live/Dead assay at 24 hours. Expression of the *ACAN* and *BMP2* genes were analyzed by real-time PCR. The chondrocyte viability was significantly decreased after treated with ketorolac at the concentration higher than 1 mg/ml for 24 and 48 hours. TUNEL assay results showed that cells underwent apoptosis in a dose-dependent manner. Live/Dead assay results showed that the cell percent mortality was significantly increased when the chondrocytes were treated with ketorolac at the concentration higher than 1 mg/ml for 24 hours. Furthermore, ketorolac at the concentration of 1 mg/ml significantly decreased the expression of the *ACAN* gene. Therefore, further study on safety of ketorolac for intra-articular injection is necessary.

Keywords: Ketorolac, Chondrocyte, Osteoarthritis

Department :Botany..... Student's Signature.....

Field of Study : ...Genetics..... Advisor's Signature.....

Academic Year : ..2012.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ และให้คำแนะนำตลอดการทำวิทยานิพนธ์ ช่วยตรวจสอบ และแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ รวมถึงให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ ที่เป็นประโยชน์ในการดำเนินชีวิต และการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ประกอบด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์ ประธานกรรมการ, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล กรรมการของหลักสูตรฯ, อาจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัสนียัจิต กรรมการของหลักสูตรฯ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทพ. นครินทร์ กิตกำจร กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ข้อเสนอแนะและข้อคิดเห็น รวมทั้งกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สีนันท ประสงค์สุข ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ในภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับคำแนะนำ และความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ นิสิตป.โท และ ป.เอก ทุกคนในห้องปฏิบัติการอนุพันธุศาสตร์มนุษย์ ที่ช่วยแนะนำ และให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีในการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อนาคินทร์ รุ่งเรือง และคุณแม่พานี รุ่งเรือง และทุกคนในครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนทางด้านการศึกษา และเป็นกำลังใจที่สำคัญในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้คุณความดีและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

สารบัญ

หน้า	
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
ข้อจำกัดในการวิจัย.....	2
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
วิธีดำเนินการวิจัย.....	4
ลำดับขั้นตอนในการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
กระดูกอ่อนผิวข้อ.....	6
โรคข้อเสื่อม.....	9
ยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม.....	11
เทคนิคที่ใช้ในการวิจัย.....	14
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	16
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	16
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	17
วิธีดำเนินการวิจัย.....	19
1. การขออนุมัติงานวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ.....	19
2. การเก็บตัวอย่างกระดูกอ่อนผิวข้อและการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน.....	19

หน้า

2.1	การเริ่มต้นเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนปฐมภูมิ (primary cell).....	20
2.2	การเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน	20
3.	พิสูจน์ว่าเซลล์ที่สกัดได้เป็นเซลล์กระดูกอ่อน.....	21
3.1	การสกัดอาร์เอ็นเอ.....	21
3.2	Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).....	22
3.3	การเพิ่มปริมาณยีน <i>COL2A1</i> ในส่วนที่ผลิตโปรตีน.....	23
3.4	อิเล็กโทรโฟริซิส.....	25
4.	ศึกษาผลของยาทีโทรแล็กที่มีต่อระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อน	
ด้วยวิธี	MTT assay	25
5.	ศึกษาผลของยาทีโทรแล็กที่มีต่อแอฟอพโทซิสของเซลล์กระดูกอ่อน	
ด้วยวิธี	TUNEL assay.....	26
6.	ศึกษาผลของยาทีโทรแล็กที่มีต่อการตายของเซลล์กระดูกอ่อน	
ด้วยวิธี	Live/Dead assay	27
7.	ศึกษาผลของยาทีโทรแล็กที่มีต่อการแสดงออกของยีนซ่อมแซม	
ของเซลล์กระดูกอ่อน	28
7.1	Real-time PCR.....	28
7.2	วิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน <i>ACAN</i> และ <i>BMP2</i>	31
บทที่ 4	ผลการศึกษา.....	32
1.	ผลการออกแบบไพรเมอร์.....	32
2.	การพิสูจน์ว่าเซลล์ที่สกัดได้เป็นเซลล์กระดูกอ่อนหรือไม่.....	33
3.	การศึกษาผลของยาทีโทรแล็กที่มีต่อระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อน	
ด้วยวิธี	MTT assay	34
4.	ศึกษาผลของยาทีโทรแล็กที่มีต่อแอฟอพโทซิสของเซลล์กระดูกอ่อน	
ด้วยวิธี	TUNEL assay.....	36
5.	ศึกษาผลของยาทีโทรแล็กที่มีต่อการตายของเซลล์กระดูกอ่อน	
ด้วยวิธี	Live/Dead assay	39
6.	ศึกษาผลของยาทีโทรแล็กที่มีต่อการแสดงออกของยีนซ่อมแซม	
ของเซลล์กระดูกอ่อน	40

หน้า	
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	44
อภิปรายผลการทดลอง.....	44
สรุปผลการวิจัย	48
ข้อเสนอแนะ	49
รายการอ้างอิง.....	50
ภาคผนวก	55
ภาคผนวก ก.....	56
ภาคผนวก ข	57
ภาคผนวก ค	60
ภาคผนวก ง	62
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	63

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1	สารที่ใช้ในการทำ RT-PCR.....	22
2	สภาวะในการทำ RT-PCR.....	23
3	สารที่ใช้ในการทำ PCR ของยีน <i>COL2A1</i>	24
4	สภาวะในการทำ PCR ของยีน <i>COL2A1</i>	24
5	ความเข้มข้นของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา real time PCR.....	29
6	สารที่ใช้ในการทำ real-time PCR.....	29
7	สภาวะในการทำ real-time PCR.....	30
8	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์.....	32
9	ข้อมูลค่า Ct cycle ของยีน <i>GAPDH</i>	57
10	ข้อมูลค่า Ct cycle ของยีน <i>ACAN</i>	58
11	ข้อมูลค่า Ct cycle ของยีน <i>BMP2</i>	59
12	ตารางจำนวน passage.....	62

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1	ลักษณะของเซลล์กระดูกอ่อนใน ECM.....	6
2	โครงสร้างยาคีโทโรเล็ก.....	12
3	เซลล์ที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนผิวข้อเมื่อเลี้ยงไป 1 passage.....	33
4	ผลการแสดงออกของยีน <i>COL2A1</i> และ <i>GAPDH</i>	34
5	ระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนเมื่อทดสอบด้วยยาคีโทโรเล็ก.....	35
6	ผลของยาคีโทโรเล็กที่มีต่อแอฟอพโทซิสของเซลล์กระดูกอ่อน.....	36
7	เปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์กระดูกอ่อนเมื่อทดสอบด้วยยาคีโทโรเล็ก.....	39
8	ค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยาของยีน <i>ACAN</i>	40
9	ค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยาของยีน <i>BMP2</i>	41
10	ค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยาของยีน <i>GAPDH</i>	41
11	ระดับการแสดงออกของยีน <i>ACAN</i> จากเซลล์กระดูกอ่อนเมื่อทดสอบด้วยยาคีโทโรเล็ก...	42
12	ระดับการแสดงออกของยีน <i>BMP2</i> จากเซลล์กระดูกอ่อนเมื่อทดสอบด้วยยาคีโทโรเล็ก...	43
13	เอกสารอนุมัติงานวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ.....	56
14	ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>COL2A1</i> จาก commercial chondrocyte.....	60
15	ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>COL2A1</i> ตัวอย่างที่ 1.....	60
16	ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>COL2A1</i> ตัวอย่างที่ 6.....	61

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

โรคข้อเสื่อม (osteoarthritis, OA) เป็นโรคในกลุ่มอาการผิดปกติของข้อกระดูกที่พบได้บ่อยที่สุดในประชากรผู้สูงอายุทั่วไป เป็นสาเหตุของภาวะทุพพลภาพอันดับ 8 และพบในชาวอเมริกันประมาณ 27 ล้านคน (Lawrence *et al.*, 2008) ความผิดปกตินี้เกิดจากการเสื่อมของกระดูกอ่อนผิวข้อ อาจรวมไปถึงการแสดงออกของยีนที่มีความเกี่ยวข้องในการซ่อมแซมกระดูกอ่อนมีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น ยีน *aggrecan (ACAN)* มีหน้าที่ในการสังเคราะห์อาร์กรีแคนซึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรติโอไกลแคน (proteoglycan) (Roughley and Lee, 1994) และยีน *bone morphogenetic protein 2 (BMP2)* ซึ่งมีหน้าที่ในการกระตุ้นให้เซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) มีการสร้าง extracellular matrix (ECM) (Cha *et al.*, 2012) หากยีนเหล่านี้มีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลง อาจทำให้เซลล์กระดูกอ่อนไม่สามารถสังเคราะห์ ECM ที่ใช้ในการซ่อมแซมกระดูกอ่อนผิวข้อได้ (Frenkel *et al.*, 2000) นอกจากนี้การเสื่อมของกระดูกอ่อนผิวข้อ ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงของกระดูกและเนื้อเยื่อรอบ ๆ ข้อมีการทำลายของเซลล์กระดูกอ่อนจนเกิดการแตกหลุดและมีเศษกระดูกอ่อนลอยอยู่ในข้อ (Birchfield, 2001) ซึ่งจะกระตุ้นเซลล์เยื่อข้อหลังสารที่ทำให้เกิดการอักเสบ และส่งผลให้เกิดอาการปวด (Aspden, 2008; Kee, 2000)

ข้อที่เสื่อมมีการหลั่งสาร prostaglandins ทำให้เกิดการอักเสบ และส่งผลให้เกิดอาการปวดเกิดขึ้นซึ่งในปัจจุบันได้มีการใช้ยาในกลุ่มของ non-steroidal anti-inflammation drugs (NSAIDs) เพื่อบรรเทาอาการปวดของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม (Frakes *et al.*, 2011) ยาคีโทโรเล็กซึ่งมีชื่อทางเคมีว่า 5-benzoyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolizine-1-carboxylic acid เป็นยาที่จัดอยู่ในกลุ่มของ NSAIDs ซึ่งเป็นที่นิยมใช้ (Di Massa *et al.*, 2000) เพราะเป็นยาที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและบรรเทาอาการปวด เนื่องจากยานี้จะทำหน้าที่ในการลดการสังเคราะห์สารเคมีที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยน arachidonic acid ไปเป็น prostaglandins ได้ จึงทำให้มีการสังเคราะห์ prostaglandins ลดลงส่งผลให้เกิดการอักเสบ

น้อยลงและสามารถบรรเทาอาการปวดในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมได้ (Irwin *et al.*, 1998; Alvarez-Soria *et al.*, 2008)

ในการปฏิบัติโดยทั่วไป แพทย์จะฉีดยาตีโทโรเล็กที่บริเวณกล้ามเนื้อ แต่ได้มีแนวความคิดว่าหากทำการฉีดยานี้ในบริเวณที่เป็นโรคข้อเสื่อมโดยตรงอาจทำให้ยาสามารถออกฤทธิ์ได้ดีและรวดเร็วยิ่งขึ้น เนื่องจากมีการศึกษาทดลองฉีดยา tenoxicam ซึ่งเป็นยาที่จัดอยู่ในกลุ่ม NSAIDs เช่นเดียวกับตีโทโรเล็ก โดยฉีดยา tenoxicam บริเวณข้อเข่าในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่าเมื่อฉีดยาบริเวณข้อเข่าโดยตรง สามารถบรรเทาอาการปวดได้ดีกว่าการรับประทานยา (Oztuna *et al.*, 2007) แต่มีความกังวลว่า อาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อกระดูกอ่อนในบริเวณดังกล่าวได้ เนื่องจาก มีการศึกษาผลกระทบของการฉีดยาตีโทโรเล็กที่อาจส่งผลกระทบต่อกระดูกอ่อนในสัตว์ทดลอง เช่น หนู และกระต่าย พบว่าทำให้เกิดการอักเสบอย่างรุนแรงในหนู (Irwin *et al.*, 1998) แต่ไม่พบความเสียหายของกระดูกอ่อนในกระต่าย ยกเว้นเมื่อศึกษาถึงรายละเอียดด้วยกล้องจุลทรรศน์จึงจะพบความเปลี่ยนแปลง โดยกระดูกอ่อนผิวข้อเกิดการรอยแตก และนอกจากนั้นเซลล์กระดูกอ่อนมีการจัดเรียงตัวที่เปลี่ยนแปลงไป (Shapiro *et al.*, 2007)

นอกจากนี้ ยังมีผลทางการศึกษาพบว่า ยาตีโทโรเล็กมีผลทำให้ยับยั้งการซ่อมแซมกระดูกอ่อนที่เสียหาย (Ho *et al.*, 1995) โดยอาจส่งผลต่อการแบ่งเซลล์และการตายของเซลล์กระดูกอ่อนจากหนู (Chang *et al.*, 2006)

อย่างไรก็ตาม การศึกษา ที่ผ่านมา ได้ทำในสัตว์ทดลอง และเซลล์กระดูกอ่อนของสัตว์ทดลองเท่านั้น ทำให้ไม่สามารถทราบได้แน่ชัดว่ายา ตีโทโรเล็กส่งผลอย่างไรกับเซลล์กระดูกอ่อนของมนุษย์ ดังนั้นการศึกษาถึงผลของยา ตีโทโรเล็ก ที่มีต่อแอฟอปโทซิสและการแสดงออกของยีนซ่อมแซมของเซลล์กระดูกอ่อน สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเพื่อประกอบการตัดสินใจของแพทย์ในการใช้ยาตีโทโรเล็กในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมได้ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษา ผลของยาตีโทโรเล็ก ที่มีต่อแอฟอปโทซิสและการแสดงออกของยีน ที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมของเซลล์กระดูกอ่อน

ขอบเขตของการวิจัย

เลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนจากกระดูกอ่อนของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนผิวข้อเข่า นำเซลล์กระดูกอ่อนมาทดสอบด้วยยาคีโทโรแล็กที่ความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อทดสอบวัดระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยเทคนิค MTT assay ตรวจสอบการเกิดแอพอปโทซิสของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยเทคนิค TUNEL assay ตรวจสอบการตายของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยเทคนิค Live/Dead assay และวิเคราะห์การแสดงออกของ *ACAN* และ *BMP2* ด้วยเทคนิค real-time PCR จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อจำกัดในการวิจัย

1. เนื่องจากกระดูกอ่อนของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนผิวข้อเข่าอาจมีบางส่วนที่ไม่สมบูรณ์ จึงต้องมีการคัดเลือกตัวอย่างที่มีกระดูกอ่อนเพียงพอเพื่อนำมาสกัดเซลล์กระดูกอ่อน นอกจากนั้นเซลล์กระดูกอ่อนตั้งต้นอาจมีปริมาณน้อย จึงต้องเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ที่จะนำมาใช้ในการทดสอบด้วยยาคีโทโรแล็ก
2. เซลล์กระดูกอ่อนที่นำมาทดสอบจะต้องอยู่ในไม่เกิน passage ที่ 2 เพื่อป้องกันการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนไป (Lin *et al.*, 2008)

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1. เซลล์กระดูกอ่อน เป็นเซลล์ที่อยู่ภายในกระดูกอ่อน ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรติโอไกลแคนและคอลลาเจน ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักที่สำคัญของ ECM
2. MTT assay คือ เทคนิคที่ใช้ในการวัดความมีชีวิตของเซลล์ โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถสร้างเอนไซม์ succinate dehydrogenase จากไมโทคอนเดรีย ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะสามารถเปลี่ยนสาร MTT ที่มีสีเหลือง ให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ formazan ที่มีสีม่วง ส่วนเซลล์ตายจะไม่สามารถสร้างเอนไซม์และเปลี่ยนสาร MTT ให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ formazan ได้
3. TUNEL assay คือ เทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบการเกิดแอพอปโทซิส โดยเซลล์ที่เกิดแอพอปโทซิส จะมีการแตกหักของดีเอ็นเอ ทำให้อนุพันธ์ dUTP ที่มีการติดฉลากเรืองแสงไป

แทรกอยู่บริเวณที่มีการแตกหักของดีเอ็นเอ ทำให้สามารถตรวจสอบการเกิดแอฟอพโทซิสได้

4. Live/Dead assay คือ เทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบเซลล์ตาย โดยเซลล์ที่ตายจะมีการเสียสภาพของเชื้อหุ้มเซลล์ และเชื้อหุ้มนิวเคลียส ดังนั้นเซลล์ตายจะติดสีแดงของ Ethidiumhomodimer-1 (EthD-1) ซึ่งจะจับกับดีเอ็นเอบริเวณ minor groove
5. Real-time PCR คือ เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน ในการทดลองนี้ใช้วิธี SYBR Green โดยอาศัยการใช้สารเรืองแสง ไปจับที่บริเวณ PCR product ทำให้สามารถวัดปริมาณของ PCR product ที่เกิดขึ้นได้

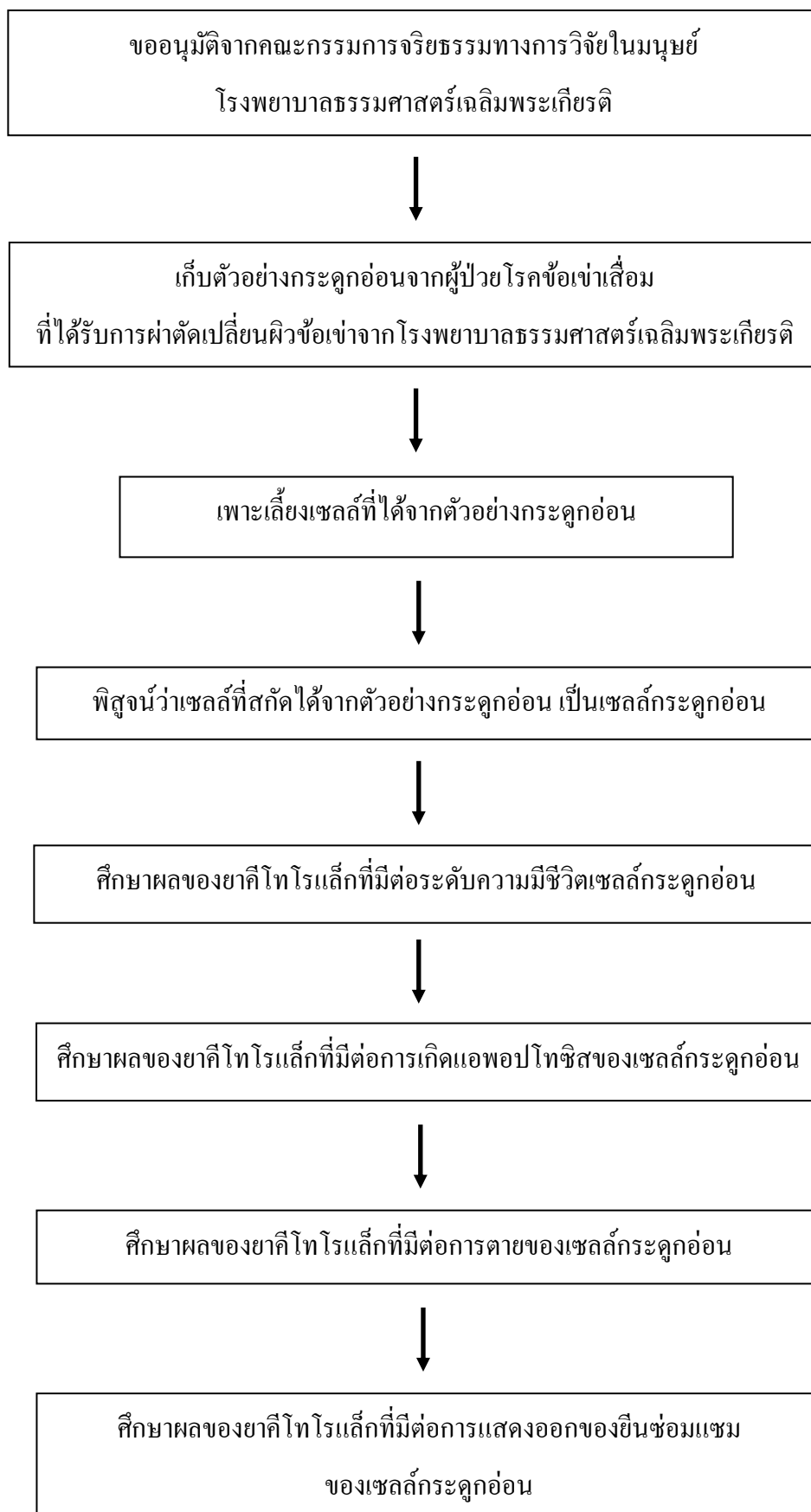
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำข้อมูลที่ได้ไป ใช้ เพื่อประกอบการตัดสินใจของแพทย์ในการใช้ยาต้านไวรัสโรครักษาเชื้อ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ
2. การเก็บตัวอย่างกระดูกอ่อนผิวข้อและการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน
3. พิสูจน์ว่าเซลล์ที่สกัดได้เป็นเซลล์กระดูกอ่อน
4. ศึกษาผลของยาต้านไวรัสที่มีต่อระดับความมีชีวิตเซลล์กระดูกอ่อนด้วยวิธี MTT assay
5. ศึกษาผลของยาต้านไวรัสที่มีต่อแอฟอพโทซิสของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยวิธี TUNEL assay
6. ศึกษาผลของยาต้านไวรัสที่มีต่อการตายของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยวิธี Live/Dead assay
7. ศึกษาผลของยาต้านไวรัสที่มีต่อการแสดงออกของยีน *ACAN* และ *BMP2* ที่มีความเกี่ยวข้องต่อการซ่อมแซมของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยวิธี real-time PCR

ลำดับขั้นตอนในการวิจัย



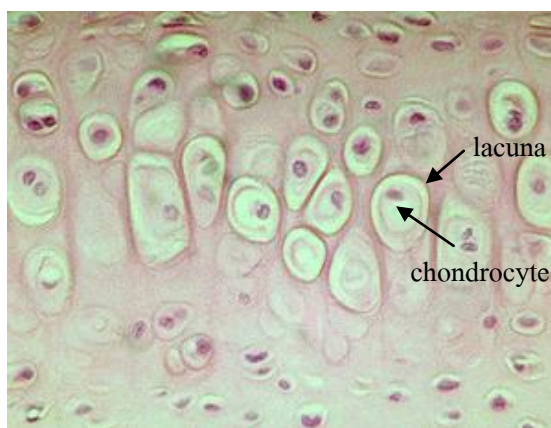
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กระดูกอ่อนผิวข้อ

กระดูกอ่อนผิวข้อ (articular cartilage) เป็นเนื้อเยื่อที่หุ้มอยู่บริเวณปลายกระดูกที่อยู่ภายในข้อเข้า ทำหน้าที่ลดแรงเสียดทาน ทำให้สามารถเคลื่อนไหวข้อเข้าได้โดยไม่เกิดการปวด อันเนื่องมาจากการเสียดสีของกระดูก เนื้อเยื่อของกระดูกอ่อนผิวข้อเป็นเนื้อเยื่อที่ไม่มีหลอดเลือด หลอดน้ำเหลือง และเส้นประสาท โครงสร้างของกระดูกอ่อนผิวข้อประกอบด้วยคอลลาเจน และโปรตีโอไกลแคน จึงทำให้กระดูกอ่อนผิวข้อมีโครงสร้างที่ยืดหยุ่น จึงช่วยลดแรงกระแทกและทำให้ข้อเคลื่อนไหวได้สะดวก (Buckwalter *et al.*, 2005)

ภายในกระดูกอ่อนผิวข้อประกอบด้วยเซลล์กระดูกอ่อน เซลล์กระดูกอ่อนเป็นเซลล์ที่พัฒนามาจาก mesenchymal cells (MSCs) โดยต้นกำเนิดของเซลล์ MSCs จะอยู่ภายในไขกระดูก (bone marrow) เซลล์ MSCs จะถูกกระตุ้นด้วยโปรตีน bone morphogenetic proteins (BMPs) ทำให้เซลล์ MSCs สามารถพัฒนาเป็นเซลล์กระดูกอ่อนได้ (Jiang *et al.*, 2002) กระจกอ่อนผิวข้อประกอบด้วยเซลล์กระดูกอ่อนกระจายตัวอยู่ใน ECM ประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ เซลล์จะอยู่ภายในช่องว่างที่เรียกว่า lacuna และถูกล้อมรอบด้วย ECM (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ลักษณะของเซลล์กระดูกอ่อนใน ECM

(ที่มา <http://www.uoguelph.ca/zoology/devobio/210labs/ct2.html>)

ECM ของกระดูกอ่อนผิวข้อประกอบด้วยของเหลวในเนื้อเยื่อ และ โครงสร้างของสาร โมเลกุลขนาดใหญ่ ซึ่งทำให้กระดูกอ่อนผิวข้อนั้นมีรูปร่างและสามารถคงตัวอยู่ได้ ด้วยสาเหตุนี้จึง ทำให้กระดูกอ่อนมีความยืดหยุ่นสูง น้ำเป็นองค์ประกอบที่อยู่ภายในกระดูกอ่อนผิวข้อสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเมื่อกระดูกอ่อนได้รับแรงกด น้ำจึงเคลื่อนที่ออกจากเนื้อเยื่อและอยู่บริเวณผิว กระดูกอ่อน จึงทำหน้าที่เหมือนระบบหล่อลื่นให้กับข้อ (Nimer *et al.*, 2003)

คอลลาเจน และ โปรติโอ ไกลแคนเป็นองค์ประกอบของกระดูกอ่อนผิวข้อประมาณ 20-40 เปอร์เซ็นต์ ภายในกระดูกอ่อนผิวข้อมีคอลลาเจนชนิดที่ 2 เป็นส่วนประกอบถึง 90-95 เปอร์เซ็นต์ โปรติโอไกลแคนและ โปรตีน อื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจน ซึ่งโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจนจะช่วยรักษา โครงสร้างของ ECM โดยโปรติโอไกลแคนและโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจนจะจับกับตาข่าย โครงสร้างของคอลลาเจน และน้ำจะแทรกตัวอยู่ระหว่าง โครงสร้างนี้ จึงทำให้กระดูกอ่อนมีความ ยืดหยุ่น สามารถทนต่อแรงดึง และเพิ่มความแข็งแรงให้กับกระดูกอ่อนผิวข้อ (Eyre, 2004)

มีการศึกษาถึงการแสดงออกของยีน *COL2A1* ซึ่งมีหน้าที่ในการสังเคราะห์คอลลาเจนชนิด ที่ 2 ในเซลล์กระดูกอ่อน พบว่าหากเซลล์กระดูกอ่อนสูญเสียคุณสมบัติความเป็นเซลล์กระดูกอ่อน จะมีการแสดงออกของยีน *COL2A1* น้อยลง หรือไม่มีการแสดงออกของยีน *COL2A1* เลย จึง สามารถใช้การแสดงผลของยีน *COL2A1* เป็นตัวบ่งชี้ถึงความเป็นเซลล์กระดูกอ่อนได้ (Stokes *et al.*, 2001)

กระดูกอ่อนผิวข้อประกอบด้วยโปรติโอไกลแคนที่สำคัญ 2 ชนิด คือ อากรีแคน (aggrecan) ซึ่งมีโมเลกุลขนาดใหญ่ และเดคอร์ิน (decorin) ไบโกลแคน (biglycan) ไฟโบรโมดูลิน (fibromodulin) ซึ่งมีโมเลกุลขนาดเล็ก (Hildebrand *et al.*, 1994) อากรีแคนเป็นองค์ประกอบของ โปรติโอไกลแคนประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ จากโปรติโอไกลแคนทั้งหมด โดยอากรีแคนจะจับกับ กรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid) และโปรตีนตัวเชื่อมเพื่อรวมเป็นโปรติโอไกลแคน โดยโปรติโอ ไกลแคนจะอยู่ในช่องว่างระหว่างเส้นใยคอลลาเจนของกระดูกอ่อนผิวข้อ ดังนั้นโปรติโอไกลแคน ที่ฝังอยู่ในกระดูกอ่อนผิวข้อ จึงช่วยป้องกันการเคลื่อนที่ของเนื้อเยื่อ ในขณะที่มีการเปลี่ยนรูปร่าง และรักษาการจับกันระหว่างโปรติโอไกลแคนและโครงสร้างของเส้นใยคอลลาเจนให้มีความมั่นคง (Roughley and Lee, 1994)

กระดูกอ่อนผิวข้อสามารถแบ่งออกเป็น 4 ชั้น โดยจะแบ่งตามการจัดเรียงตัวของเซลล์กระดูกอ่อน และลักษณะโครงสร้างของคอลลาเจน นอกจากนี้กระดูกอ่อนในแต่ละชั้นจะมีปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนและคอลลาเจนแตกต่างกัน จึงทำให้สามารถแบ่งกระดูกอ่อนผิวข้อออกเป็นชั้นได้ดังนี้ (Poole *et al.*, 2001)

1. Superficial zone

เป็นส่วนที่อยู่ชั้นบนสุดของกระดูกอ่อนผิวข้อ และเป็นชั้นที่บางที่สุด ภายในชั้นนี้ เซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) จะมีรูปร่างแบน หัวท้ายเรียวยาว มีลักษณะคล้ายเซลล์เกี่ยวพัน (fibroblast) เซลล์กระดูกอ่อนในชั้นนี้จะมีการสังเคราะห์ ECM ซึ่งมีปริมาณคอลลาเจนสูงกว่าชั้นอื่น นอกจากนี้คอลลาเจนจะรวมตัวเป็นแผ่นเพื่อคลุมกระดูกอ่อน มีหน้าที่จำกัดการผ่านเข้าออกของสาร เซลล์กระดูกอ่อนจะมีการเรียงตัวขนานกับพื้นผิว เช่นเดียวกับการเรียงตัวของคอลลาเจน ดังนั้นกระดูกอ่อนผิวข้อชั้น superficial zone จะมีความแข็งแรง และช่วยในลดแรงกระแทกในขณะเคลื่อนไหวข้อเข้า

2. Transitional zone

ชั้น transitional zone จะมีความหนามากกว่าชั้น superficial zone โดยเซลล์กระดูกอ่อนจะมีลักษณะกลม มีการสังเคราะห์คอลลาเจนที่มีขนาดใหญ่ แต่มีปริมาณคอลลาเจนน้อยกว่าชั้น superficial zone และคอลลาเจนมีการจัดเรียงตัวที่ไม่เป็นระเบียบทำให้กระดูกอ่อนผิวข้อในชั้นนี้มีความยืดหยุ่นน้อยกว่าชั้น superficial zone

3. Radial zone

เซลล์กระดูกอ่อนในชั้น radial zone มีลักษณะกลม เรียงตัวตั้งฉากกับพื้นผิว และมีคอลลาเจนที่มีขนาดใหญ่ที่สุด คอลลาเจนจะเรียงตัวในแนวตั้งฉากกับโครงสร้างของกระดูกอ่อนผิวข้อ เพื่อด้านทานต่อแรงเฉือนในขณะเคลื่อนไหวข้อ

4. Calcified zone

เป็นชั้นที่แยกระหว่างชั้นกระดูกอ่อนกับกระดูกใต้ผิวข้อ (subchondral bone) โดยเซลล์กระดูกอ่อนในชั้น calcified zone จะมีขนาดเล็กกว่าเซลล์กระดูกอ่อนในชั้นอื่น ซึ่งเซลล์กระดูกอ่อนในชั้นนี้จะมีการสังเคราะห์ ECM น้อยมาก หรือเซลล์กระดูกอ่อนอาจไม่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ ECM

โรคข้อเสื่อม

โรคข้อเสื่อมเป็นโรคในกลุ่มอาการผิดปกติของกระดูกข้อต่อที่พบได้บ่อยที่สุดในประชากรผู้สูงอายุทั่วไป โรคข้อเสื่อมเกิดจากการเสื่อมของกระดูกอ่อนผิวข้อ ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงของกระดูกและเนื้อเยื่อรอบข้อ มีการทำลายของกระดูกอ่อนจนเกิดการแตกหลุดและมีเศษกระดูกอ่อนลอยอยู่ในข้อ (Birchfield, 2001) นอกจากนี้ยังเกิดจากการที่เซลล์กระดูกอ่อนสูญเสียความสามารถในการสังเคราะห์ ECM ผู้ป่วยจะมีอาการปวดข้อเมื่อเคลื่อนไหวข้อ ข้อมีอาการบวม เมื่อเคลื่อนไหวข้อจะได้ยินเสียงกรอบแกรบ ข้อเกิดการผิดรูปเปลี่ยนไปจากปกติ พยาธิสภาพของโรคข้อเสื่อมจะมีช่องว่างระหว่างข้อแคบลง มีกระดูกงอก (osteophyte) ขึ้นจากข้อที่เกิดความเสียหาย และกระดูกใต้ผิวข้อหนาตัวขึ้น โดยสามารถยืนยันได้จากภาพถ่ายรังสี (Goldring and Goldring, 2010)

ปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคข้อเสื่อมมีหลายประการ เช่น เพศ อายุ น้ำหนัก สิ่งแวดล้อม และรวมไปถึงพันธุกรรม โดยเพศหญิงมีความเสี่ยงในการเป็นโรคข้อเสื่อมสูงกว่าเพศชาย เนื่องจากเพศหญิงในวัยหมดประจำเดือนมีปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนต่ำ ซึ่งฮอร์โมนเอสโตรเจนทำหน้าที่เป็น growth factor สำหรับเซลล์กระดูกอ่อนเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ ECM (Richette *et al.*, 2003)

อายุเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคข้อเสื่อม จากการศึกษาพบว่าเมื่ออายุมากขึ้นทำให้เซลล์กระดูกอ่อนที่อยู่ภายในกระดูกอ่อนผิวข้อทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ ECM ลดลง จึงเป็นสาเหตุให้กระดูกอ่อนได้รับแรงกดเพิ่มขึ้น นอกจากนี้เซลล์กระดูกอ่อนมีการเพิ่มจำนวนลดลง จึงทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์คอลลาเจน และ โพรตีโอไกลแคนได้เพียงพอที่จะนำไปใช้ในการซ่อมแซมกระดูกอ่อนผิวข้อที่เกิดความเสียหาย (Richette *et al.*, 2003)

จากการศึกษาพบว่า เมื่อมีน้ำหนักตัวมากกว่าปกติ ทำให้กระดูกอ่อนผิวข้อ ได้รับแรงกดจาก น้ำหนักตัวเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้กระดูกอ่อนผิวข้อเสื่อม ผลจากการที่มีน้ำหนัก ตัวมากจึงส่งผลให้เกิดโรคข้อเสื่อมสูงถึง 97 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับคนที่มีน้ำหนักตัวปกติ (Lee and Kean, 2012)

นอกจากนั้นยังมีการศึกษาถึงปัจจัยทางพันธุกรรมที่มีต่อโรคข้อเสื่อม ยีน *BMP2* จัดอยู่ใน กลุ่มของ transforming growth factor (TGF) β เป็นยีนที่มีความสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซม กระดูกอ่อนผิวข้อ ยีน *BMP2* มีหน้าที่กระตุ้นเซลล์กระดูกอ่อนให้มีการสังเคราะห์คอลลาเจนชนิดที่ 2 และ โพรตีโอไกลแคน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ ECM (Orazizadeh *et al.*, 2009) และยังกระตุ้น ให้เซลล์กระดูกอ่อนมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น (Cha *et al.*, 2012) เนื่องจากผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมมีการ ทำลาย ECM ทำให้เกิดการเสื่อมของกระดูกอ่อนผิวข้อ ดังนั้นยีน *BMP2* จึงมีบทบาทในการกระตุ้น ให้เซลล์กระดูกอ่อนมีการสังเคราะห์ ECM เพื่อซ่อมแซมกระดูกอ่อนผิวข้อที่เสียหาย (Glansbeek *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยีน *BMP2* ยังมีหน้าที่ยับยั้งไซโตไคน์เพื่อลดการทำงานของเอนไซม์ที่เป็น สาเหตุให้เกิดการเสื่อมของกระดูกอ่อนผิวข้อเพิ่มมากขึ้น (van der Kraan and van den Berg, 2000)

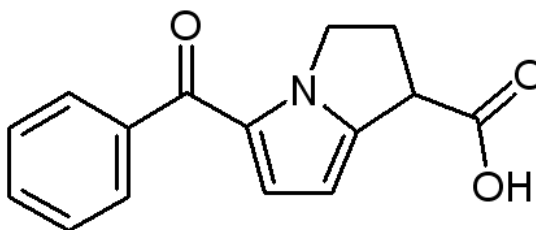
ยีนอีกหนึ่งยีนที่มีความสำคัญคือ ยีน *ACAN* เนื่องจากอาร์แกนเป็นส่วนประกอบหลักของ โพรตีโอไกลแคน ดังนั้นหากยีน *ACAN* มีการแสดงออกที่ลดลง จึงอาจส่งผลให้มีการซ่อมแซม กระดูกอ่อนผิวข้อช้าลง (Brew *et al.*, 2010) และอาจทำให้เกิด โรคข้อเสื่อมที่มีความรุนแรงมากขึ้น เนื่องจากเซลล์กระดูกอ่อนอาจสูญเสียคุณสมบัติในการสังเคราะห์โปรตีโอไกลแคน เพื่อนำมาใช้ใน การซ่อมแซมกระดูกอ่อนผิวข้อที่เกิดความเสียหาย (Eid *et al.*, 2006)

เนื่องจากโรคข้อเสื่อมมีสาเหตุมาจากกระดูกอ่อนผิวข้อเกิดการสึกกร่อนร่วมกับการ เปลี่ยนแปลงของกระดูกและเนื้อเยื่อรอบข้อ มีการทำลายของเซลล์กระดูกอ่อนจนเกิดการแตกหลุด และมีเศษกระดูกอ่อนลอยอยู่ในข้อ จึงกระตุ้นเซลล์เยื่อรอบข้อหลั่งสารที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันมีการส่งสัญญาณ ทำให้เซลล์มีการสังเคราะห์สาร prostaglandins ซึ่งสาร prostaglandins เป็นสารที่มีหน้าที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบเกิดขึ้น และนอกจากนั้นยังกระตุ้นการ สร้างเอนไซม์ proteinase เพื่อทำลายเศษกระดูกอ่อนที่หลุดอยู่ภายในข้อ แต่เอนไซม์ proteinase ยัง ไปทำลายกระดูกอ่อนผิวข้อให้มีการสึกมากขึ้น จึงทำให้เกิดการเสื่อมของกระดูกอ่อนผิวข้อเพิ่มขึ้น

เมื่อเกิดการอักเสบ และเป็นสาเหตุให้เกิดอาการปวดในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม (Aspden, 2008; Kee, 2000) จึงมีการใช้ยาต้านการอักเสบในการบรรเทาอาการปวดในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม

ยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม

ผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมในระยะแรก จะเกิดอาการปวด อันเนื่องมาจากการอักเสบบริเวณข้อเสื่อม เมื่อเกิดการอักเสบเซลล์เยื่อหุ้มข้อหลั่งสารไซโตไคน์ (cytokines) เช่น Interleukin-1 (IL-1) โดยสารไซโตไคน์จะกระตุ้นให้เอนไซม์ phospholipase ทำงาน ทำให้มีการเปลี่ยน phospholipid ซึ่งเป็นส่วนประกอบในน้ำไขข้อ (Bole, 1962) และเป็นโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ ให้เป็น arachidonic acid หลังจากนั้นเอนไซม์ cyclooxygenase จะเปลี่ยน arachidonic acid ให้เป็นสาร prostaglandins ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ (Hilaro *et al.*, 2006) ในปัจจุบันจึงได้มีการนิยมนำยา non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) เพื่อบรรเทาความเจ็บปวดในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม (Frakes *et al.*, 2011) ยาในกลุ่มของ NSAIDs ที่นิยมนำใช้คือ ยาคีโทโรแล็ก (ketorolac) หรือมีชื่อทางการค้าว่า Toradol ซึ่งมีชื่อทางเคมีว่า 5-benzoyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolizine-1-carboxylic acid (รูปที่ 2) ยาคีโทโรแล็กมีคุณสมบัติในการลดการสังเคราะห์สาร prostaglandins ยาคีโทโรแล็กจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase โดยยาจะซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในไซโตพลาสซึมและจับกับเอนไซม์ cyclooxygenase ตรงบริเวณ active site ซึ่งเป็นบริเวณที่ออกฤทธิ์ของเอนไซม์กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนจึงทำให้เอนไซม์ไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพที่สามารถทำงานได้ (irreversible inhibition) ดังนั้นเอนไซม์ cyclooxygenase จึงไม่สามารถจับกับ arachidonic acid จึงไม่สามารถเปลี่ยน arachidonic acid ไปเป็น prostaglandins ได้ ทำให้สามารถลดการอักเสบ และบรรเทาอาการปวดในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม (Luong *et al.*, 1996)



รูปที่ 2 โครงสร้างยาคีโทโรแล็ก

(ที่มา <http://en.wikipedia.org/wiki/Ketorolac>)

ในการปฏิบัติโดยทั่วไป แพทย์จะฉีดยาคีโทโรแล็กความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่บริเวณกล้ามเนื้อ โดยยาคีโทโรแล็กจะถูกดูดซึมเข้ากระแสเลือดใช้เวลาประมาณ 50 นาที และไหลเวียนทั่วร่างกายผ่านทางระบบโลหิต โดยมีความเข้มข้นยาคีโทโรแล็กประมาณ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นยาคีโทโรแล็กจะเผาผลาญที่ตับ และถูกขับออกจากร่างกายผ่านทางปัสสาวะ (Brocks and Jamali, 1992) เนื่องจากการฉีดยาคีโทโรแล็กที่บริเวณกล้ามเนื้อ ทำให้ยาคีโทโรแล็กมีความเข้มข้นลดลง และใช้เวลานานในการออกฤทธิ์ ดังนั้นจึงได้มีแนวความคิดว่าหากทำการฉีดยาคีโทโรแล็กในบริเวณที่เป็นโรคข้อเสื่อมโดยตรงอาจทำให้ยาสามารถออกฤทธิ์ได้ดีและเร็วยิ่งขึ้น เนื่องจากการศึกษาที่มีการฉีดยาคีโทโรแล็ก 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในบริเวณข้อเข่าของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดส่องกล้อง พบว่าสามารถบรรเทาอาการปวดในผู้ป่วยได้ทันทีหลังจากการฉีดยาคีโทโรแล็กในบริเวณดังกล่าว และเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงไม่พบผลข้างเคียงจากการฉีดยาคีโทโรแล็กในบริเวณข้อเข่า (Calmet *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่ฉีดยาคีโทโรแล็กร่วมกับ hyaluronic acid ในบริเวณข้อเข่าของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่าเมื่อฉีดยาคีโทโรแล็กร่วมกับ hyaluronic acid ให้ประสิทธิภาพในการบรรเทาอาการปวดได้ดี และเร็วกว่าการฉีด hyaluronic acid เพียงอย่างเดียว (Lee *et al.*, 2011) รวมไปถึงมีการศึกษาที่ฉีดยา tenoxicam ซึ่งเป็นยาที่จัดอยู่ในกลุ่ม NSAIDs เช่นเดียวกับคีโทโรแล็ก โดยฉีดยา tenoxicam บริเวณข้อเข่าในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่าเมื่อฉีดยาบริเวณข้อเข่าโดยตรง สามารถบรรเทาอาการปวดได้ดีกว่าการรับประทานยา (Oztuna *et al.*, 2007)

อย่างไรก็ดีได้มีการศึกษาพบว่าเมื่อทำการฉีดยาทีโทโรเล็กความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตรบริเวณข้อเข่าในหนู หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อในบริเวณข้อเข่า ประกอบด้วย กระดูกอ่อนผิว ข้อ เนื้อกระดูก และเยื่อข้อมาวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยา ไม่พบความเปลี่ยนแปลงหรือเกิดการ อักเสบของเนื้อเยื่อเมื่อเวลาผ่านไป 24 และ 48 ชั่วโมง แต่เมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน หลังจากฉีดยาทีโทโร เล็กพบว่าเกิดการอักเสบขั้นรุนแรง และเนื้อเยื่อในบริเวณข้อเข่าเกิดความเปลี่ยนแปลงเมื่อ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีด saline solution (Irwin *et al.*, 1998)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงผลของยาทีโทโรเล็กที่มีต่อกระดูกอ่อนผิวข้อในกระต่าย เมื่อ ฉีดยาทีโทโรเล็กความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 15 อาทิตย์หลังจากฉีดยาที โทโรเล็ก พบว่ายาทีโทโรเล็กกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ และเมื่อนำตัวอย่างกระดูกอ่อนผิวข้อมา วิเคราะห์ทางพยาธิวิทยา พบว่าเกิดความเสียหายบริเวณกระดูกอ่อนผิวข้อ โดยที่กระดูกอ่อนผิวข้อ เกิดเป็นรอยแตก และเซลล์กระดูกอ่อนมีการจัดเรียงตัวที่เปลี่ยนแปลงไป โดยเซลล์กระดูกอ่อนจะ รวมกลุ่มกัน เซลล์ไม่กระจายตัวในกระดูกอ่อนผิวข้อเหมือนกับกลุ่มควบคุมที่ฉีด saline solution (Shapiro *et al.*, 2007)

เมื่อนำเซลล์กระดูกอ่อนจากกระดูกอ่อนของหนูมาเพาะเลี้ยงและทำการทดสอบถึงผลของ ยาในกลุ่มของ NSAIDs พบว่ายาในกลุ่มของ NSAIDs กระตุ้นให้เซลล์กระดูกอ่อนเกิดแอฟอพโท ซิส นอกจากนี้ยังทำให้มีการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์กระดูกอ่อน จึงอาจเป็นสาเหตุให้การ ซ่อมแซมกระดูกอ่อนผิวข้อเป็นไปได้ช้า (Chang *et al.*, 2006)

เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ทำในสัตว์ทดลอง และเซลล์กระดูกอ่อนของสัตว์ทดลอง เท่านั้น ทำให้ไม่สามารถทราบได้แน่ชัดว่ายา ทีโทโรเล็ก ส่งผลอย่างไรกับเซลล์กระดูกอ่อนของ มนุษย์ ดังนั้นการศึกษาถึงผลของยา ทีโทโรเล็ก ที่มีต่อแอฟอพโทซิสและการแสดงออกของยีน ซ่อมแซมของเซลล์กระดูกอ่อนจึงสามารถนำข้อมูลไปใช้เพื่อประกอบการตัดสินใจของแพทย์ใน การใช้ยาทีโทโรเล็กในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

เทคนิคที่ใช้ในการวิจัย

1. MTT assay

เทคนิค MTT assay เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวัดระดับความมีชีวิตของเซลล์ โดยมีหลักการคือ เซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ succinate dehydrogenase จากไมโทคอนเดรียได้ ซึ่งจะ สามารถเปลี่ยนสาร MTT ที่มีสีเหลือง ให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ formazan ที่มีสีม่วง และสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นประมาณ 540-570 นาโนเมตร ในขณะที่เซลล์ตายไมโทคอนเดรียจะเสียสภาพ ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ succinate dehydrogenase เพื่อเปลี่ยนสาร MTT ให้เป็นผลิตภัณฑ์ formazan ได้ ดังนั้นจึงสามารถวัดระดับความมีชีวิตของเซลล์ได้โดยการใช้เทคนิค MTT assay (Sylvester, 2011)

2. Terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay

เมื่อเซลล์เกิดแอฟโปโทซิส สันฐานวิทยาของเซลล์จะเปลี่ยนแปลงไป โดยเยื่อหุ้มเซลล์จะโป่งพอง เกิดการหดตัวของโครมาทินและไซโตพลาสซึม มีการแตกหักของดีเอ็นเอ เซลล์มีการหดตัวหลังจากนั้นเซลล์จะแตกออกเป็นเซลล์เล็ก ๆ เรียกว่า apoptotic body (Elmore, 2007) ซึ่งเทคนิค TUNEL assay จะอาศัยการแตกหักของดีเอ็นเอในการตรวจสอบเซลล์ที่เกิดแอฟโปโทซิส โดยเมื่อเกิดการแตกหักของดีเอ็นเอเกิดขึ้น อนุพันธ์ dUTP ที่มีการติดฉลากเรืองแสงจะเข้าไปแทรกบริเวณปลาย 3' OH ด้วยเอนไซม์ terminal deoxynucleotidyltransferase ทำให้สามารถตรวจสอบเซลล์ที่เกิดแอฟโปโทซิสได้ (Lawry, 2004)

3. Live/Dead assay

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบเซลล์ที่มีชีวิต และเซลล์ตายได้พร้อมกัน โดยมีหลักการคือ สาร Calcein AM ที่ไม่สามารถเรืองแสงได้ จะสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในเซลล์ เนื่องจากสาร Calcein AM เป็นสารที่มีประจุ ดังนั้นเยื่อหุ้มเซลล์จึงยอมให้สาร Calcein AM เคลื่อนที่เข้าไปในเซลล์ จากนั้นเซลล์ที่มีชีวิตจะมีการสังเคราะห์เอนไซม์ intracellular esterase ซึ่งจะไปตัดหมู่ acetomethoxy ทำให้สาร Calcein AM เป็นสารที่ไม่มีประจุ ดังนั้นสาร Calcein AM จึงไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ออกไปได้ และนอกจากนั้นยังทำให้สาร Calcein AM เรืองแสงได้ ดังนั้นจึงทำให้เซลล์ที่มีชีวิตติดสีเขียวของสารเรืองแสง Calcein AM ส่วนเซลล์ตายนั้นจะมีการเสื่อมสภาพของเยื่อ

หุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มนิวเคลียส ดังนั้นจึงทำให้สาร EthD-1 สามารถเข้าไปจับกับที่ดีเอ็นเอที่บริเวณ minor groove ดังนั้นจึงทำให้เซลล์ตายติดสีแดงของ EthD-1

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. ไมโครปิเปต: P2 (0.2-2 μ l), P20 (2-20 μ l), P200 (20-200 μ l), P1000 (0.1-1ml) (Gilson, France)
2. ทิป : 10 μ l, 200 μ l, 1,000 μ l
3. หลอดชนิด Microcentrifuge : 0.2 ml, 1.5 ml
4. หลอดชนิด Polypropylene conical : 15 ml, 50 ml (Kartell, Italy)
5. บีกเกอร์: 250 ml (Pyrex, USA)
6. ขวดดูแรน: 100 ml, 1000 ml (Duran, Germany)
7. ขวดรูปชมพู่ : 250 ml (Pyrex, USA)
8. กระบอกตวง : 100 ml (Glassco, UK)
9. แท่นวางหลอด (rack)
10. พาราฟิล์ม (Bemis, USA)
11. ปิเปตดูดจ่ายสารอัตโนมัติ (Corning, USA)
12. หลอดชนิดยา : 10 ml, 20 ml (Nipro, Japan)
13. ฟิลเตอร์กรองอาหารขนาด 0.2 μ m (Corning, USA)
14. ขวดเลี้ยงเซลล์ : T-25, T-75 (Corning, USA)
15. จานเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (Corning, USA)
16. Cell strainer (SPL, Korea)
17. ปิเปตหลอดเชื้อ (Costar[®] Stripette) : 5 ml, 10 ml, 25 ml (Corning, USA)
18. สไลด์เลี้ยงเซลล์ 8 หลุม (Nunc, USA)
19. กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ สำหรับส่องเซลล์ (Inverted microscope) (Motic, Germany)

20. กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (Fluorescence microscope) (Olympus, Japan)
21. สไลด์นับเซลล์ (Haemocytometer) (BOECO, Germany)
22. เครื่องวอร์เท็กซ์ (WiseMix[®], Korea)
23. เครื่องเซนทริฟิวจ์สำหรับหลอดชนิด Microcentrifuge (Hettichzentrifugen, Germany)
24. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Biometra[®], Germany)
25. ถาดสำหรับเตรียมเจล พร้อมหัว (Bioer, China)
26. เครื่องอิเล็กโทรโพรซิส (Bioer, China)
27. ตู้สำหรับเลี้ยงเซลล์ (CO₂ incubator) (Thermo Scientific, USA)
28. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
29. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Microplate reader) (Dyner, USA)
30. คิวเวต
31. เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel Doc) (BIO-RAD, USA)
32. ตู้เย็น 4 °C (Sharp, Japan)
33. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C (Sanden Inter Cool, Thailand)
34. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 °C (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, USA)
35. วอเตอร์บัท (Major Science, Taiwan)
36. เครื่องนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (Autoclaved)
37. เครื่องไมโครเวฟ (Sharp, Japan)
38. เครื่องชั่งดิจิทัล (OHAUS[®], USA)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. สารเคมีทั่วไป
 - 1.1 Absolute ethanol (Merck, Germany)
 - 1.2 Agarose, molecular grade (ISC BioExpress, Spain)
 - 1.3 Ethidium bromide (Bio Basic inc, USA)

- 1.4 EDTA (Research organics, USA)
- 1.5 Boric acid (Research organics, USA)
- 1.6 Trisaminomerthane (Research organics, USA)
- 1.7 100 Base Pair DNA ladder (Biolab, Thailand)
2. สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR
 - 2.1 5x PCRBIO reaction buffer (Fermentas, USA)
 - 2.2 5 U/ μ l PCRBIO HS *Taq*DNA Polymerase (Fermentas, USA)
 - 2.3 Oligonucleotide primer (Biodesign, Thailand)
3. สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์
 - 3.1 Dulbecco's Modified Eagle Medium : Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) (GIBCO, USA)
 - 3.2 Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO, USA)
 - 3.2 Trypsin-EDTA (GIBCO, USA)
 - 3.4 100x Antibiotic-Antimycotic (GIBCO, USA)
 - 3.5 Phosphate Buffered Saline (GIBCO, USA)
 - 3.6 Tryphan Blue (GIBCO, USA)
 - 3.7 215 U/mg Collagenase Type II (GIBCO, USA)
 - 3.8 35 U/mg Protease (Invitrogen, USA)
 - 3.9 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) (GIBCO, USA)
4. ชุดสารเคมีสำเร็จรูปที่ใช้ในงานวิจัย
 - 4.1 RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, USA)
 - 4.2 SuperScript[™] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA)
 - 4.3 SsoFast[™] EvaGreen[®] Supermix (Bio-Rad, USA)
 - 4.4 PrestoBlue[®] Cell Viability Reagent (Invitrogen, USA)
 - 4.5 LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen, USA)
 - 4.6 DeadEnd[™] Fluorometric TUNEL System (Promega, USA)

วิธีดำเนินการวิจัย

8. ขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ
9. การเก็บตัวอย่างกระดูกอ่อนผิวข้อและการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน
10. พิสูจน์ว่าเซลล์ที่สกัดได้เป็นเซลล์กระดูกอ่อน
11. ศึกษาผลของยาตีโทโรแล็กที่มีต่อระดับความมีชีวิตเซลล์กระดูกอ่อนด้วยวิธี MTT assay
12. ศึกษาผลของยาตีโทโรแล็กที่มีต่อแอฟอพโทซิสของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยวิธี TUNEL assay
13. ศึกษาผลของยาตีโทโรแล็กที่มีต่อการตายของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยวิธี Live/Dead assay
14. ศึกษาผลของยาตีโทโรแล็กที่มีต่อการแสดงออกของยีน *ACAN* และ *BMP2* ที่มีความเกี่ยวข้องต่อการซ่อมแซมของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยวิธี real-time PCR

1. การ ขออนุมัติ งานวิจัย จากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ

ดำเนินการขออนุมัติงานวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์ ซึ่งมีสาระสำคัญคือ อาสาสมัครต้องยินยอมเข้าร่วมงานวิจัยด้วยความสมัครใจ และข้อมูลที่ได้จากอาสาสมัครจะถูกเก็บเป็นความลับ โดยงานวิจัยที่ได้รับการอนุมัติมีหนังสือรับรองเลขที่ 073/2555 และรหัสโครงการวิจัยเลขที่ MTU-EC-OT-4-062/55 (ภาคผนวก ก)

2. การเก็บตัวอย่างกระดูกอ่อนผิวข้อและการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน

เก็บตัวอย่างกระดูกอ่อนผิวข้อโดยแพทย์ ซึ่งเก็บจากผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนผิวข้อเข้าจำนวน 9 คน โดยผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยน ผิวข้อเข้า ผู้ป่วยจะต้องไม่มีประวัติในการใช้ยา กลุ่มของ NSAIDs ในบริเวณข้อเข้าโดยตรงเพื่อบรรเทาอาการปวดเป็นระยะเวลา 6 เดือนก่อนทำการผ่าตัดเปลี่ยนผิวข้อเข้า

2.1 การเริ่มต้นเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนปฐมภูมิ (Primary cell)

ในขั้นตอนการสกัดเซลล์กระดูกอ่อนจะต้องทำภายในตู้ปลอดเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อน เพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนตามวิธีของ Mary B. Goldring (Picot and Jones, 2005) โดยตัดกระดูกอ่อนให้เป็นชิ้นขนาดเล็กลงขนาดประมาณ $5 \times 5 \times 2$ มิลลิเมตร ด้วยใบมีดผ่าตัด นำชิ้นกระดูกอ่อนใส่ในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร ล้างกระดูกอ่อนด้วย PBS โดยควรถือเปิดขึ้นลงเบา ๆ หลังจากนั้นย่อยชิ้นส่วนกระดูกอ่อนโดยใช้เอนไซม์ protease 35 ยูนิตต่อมิลลิกรัม น้ำหนัก 50 มิลลิกรัม ละลายในอาหาร DMEM/F12 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่กรองด้วยฟิวเตอร์ขนาดรู 0.2 μm บ่มเป็นเวลา 30 นาที ล้างชิ้นส่วนกระดูกอ่อนด้วย PBS หลังจากนั้นย่อยชิ้นส่วนกระดูกอ่อนโดยใช้เอนไซม์ collagenase 215 ยูนิตต่อมิลลิกรัม น้ำหนัก 50 มิลลิกรัม ละลายในอาหาร DMEM/F12 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่กรองด้วยฟิวเตอร์ขนาดรู 0.2 μm บ่มเป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มครบเวลา กรองชิ้นส่วนกระดูกอ่อนโดยใช้ cell strainer ย้ายของเหลวที่ผ่านจากการกรองใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นตกเซลล์กระดูกอ่อนที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วย PBS ปั่นตกเซลล์กระดูกอ่อนอีกครั้ง ล้างด้วย PBS ที่จางในอาหาร DMEM/F12 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีตะกอนเซลล์กระดูกอ่อน ควรถือเปิดขึ้นลงเบา ๆ เพื่อให้ตะกอนเซลล์กระดูกอ่อนกระจายตัว หลังจากนั้นย้ายเซลล์กระดูกอ่อนไปเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาดพื้นที่หน้าตัด 25 ตารางเซนติเมตร (T-25) ที่มีอาหาร DMEM/F12 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของ FBS 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) และยาปฏิชีวนะ antibiotic-antimycotic 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนที่ได้ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีสภาวะก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน

เปลี่ยนอาหารให้เซลล์กระดูกอ่อนทุก 2-3 วัน โดยใช้เปิดปลอดเชื้อดูดอาหารเก่าจากขวดเลี้ยงเซลล์ออกจากนั้นใส่อาหาร DMEM/F12 ที่มีส่วนผสม FBS และยาปฏิชีวนะ antibiotic-antimycotic ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เมื่อเซลล์กระดูกอ่อนเพิ่มจำนวนประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่หน้าตัด จึงย้ายเซลล์กระดูกอ่อนไปเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีพื้นที่หน้าตัด 75 ตารางเซนติเมตร (T-75) เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์กระดูกอ่อน นำเซลล์กระดูกอ่อนออกจากขวดเลี้ยง

เซลล์โดยดูดอาหารเก่าในขวดเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย PBS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Trypsin-EDTA ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ประมาณ 5 นาที เติมอาหารปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาการทำงานของ trypsin เกาะขวดเลี้ยงเซลล์เบา ๆ เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากขวดเลี้ยงเซลล์ นำไปดูว่าเซลล์หลุดหรือไม่โดยนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ จากนั้นย้ายเซลล์กระดุกอ่อนไปเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด T-75 ที่มีอาหาร DMEM/F12 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3. พิสูจน์ว่าเซลล์ที่สกัดได้เป็นเซลล์กระดุกอ่อน

3.1 การสกัดอาร์เอ็นเอ

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์กระดุกอ่อนจนได้ปริมาณเซลล์กระดุกอ่อนประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่หน้าตัด นำเซลล์กระดุกอ่อนออกจากขวดเลี้ยงเซลล์ตั้งวิธีที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น จากนั้นปั่นตกเซลล์กระดุกอ่อนในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วย PBS ปั่นตกเซลล์กระดุกอ่อนอีกครั้งนำตะกอนเซลล์กระดุกอ่อนมาสกัดอาร์เอ็นเอด้วย RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, USA) ซึ่งมีขั้นตอนการสกัดดังนี้ เติมบัฟเฟอร์ RLT ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เพื่อให้เซลล์แตก ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง จนกระทั่งตะกอนเซลล์กระจายตัว นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุด เป็นเวลา 3 นาที ย้ายส่วนใสไปใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใส่เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง ย้ายของเหลวทั้งหมดลงใน RNeasy Mini spin column ซึ่งใส่อยู่ใน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาทีที่เศษส่วนใสที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้งเติมบัฟเฟอร์ RW1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงใน RNeasy Mini spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาทีที่เศษส่วนใสที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้งเติมบัฟเฟอร์ RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน RNeasy Mini spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาทีที่เศษส่วนใสที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้งเติมบัฟเฟอร์ RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตรเพื่อล้างอาร์เอ็นเออีกครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที นำ RNeasy Mini spin column วางลงบน collection tube หลอดใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้สารละลายที่เหลือไม่ติดอยู่บนเมมเบรน ย้าย RNeasy

Mini spin column วางลงบนหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม RNase-free water ลงบนเมมเบรนในหลอด RNeasy Mini spin column เพื่อละลายตะกอนอาร์เอ็นเอให้อยู่ในรูปสารละลาย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำการละลายตะกอนอาร์เอ็นเอซ้ำอีก 1 ครั้ง จนได้สารละลายอาร์เอ็นเอปริมาตร 60 ไมโครลิตร

3.2 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

นำอาร์เอ็นเอของเซลล์กระดูกอ่อนมาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่ผสม (cDNA) เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน *COL2A1* โดยใช้ชุดสำเร็จรูป SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA) สารที่ใช้ในการทำ RT-PCR และสภาวะที่ใช้ในการทำ RT-PCR แสดงในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ จากนั้นเก็บตัวอย่าง cDNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 1 สารที่ใช้ในการทำ RT-PCR

ชนิดของสาร	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. 50 ng/μl Random hexamers	2.5 ng	1.0
2. 10 mM dNTP	0.5 mM	1.0
3. 25 mM MgCl ₂	5 mM	4.0
4. 10X RT buffer	1X	2.0
5. 0.1 M DTT	0.01 M	2.0
7. 200 U/μl SuperScript™ III RT	10 U	1.0
8. 40 U/μl RNaseOUT™	2 U	1.0
9. 2 U/μl RNase H	0.1 U	1.0
10. RNA	2.5 ng	
11. DEPC-treated water		ปรับปริมาตรให้เป็น 20 μl
ปริมาตรรวมทั้งหมด		20.0

ตารางที่ 2 สภาวะในการทำ RT-PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1. Denature	65	5 นาที
2. Annealing	25	10 นาที
3. cDNA Synthesis	50	50 นาที
4. Terminate Reaction	85	5 นาที
5. Remove RNA	37	20 นาที

3.3 การเพิ่มปริมาณยีน *COL2A1* ในส่วนที่ผลิตโปรตีน

นำ cDNA ที่ได้จากเซลล์กระดูกอ่อนมาเป็นสายต้นแบบในการเพิ่มปริมาณยีน *COL2A1* ในส่วนที่มีการผลิตโปรตีน (coding region) ด้วยกระบวนการ Polymerase Chain Reaction (PCR) ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COL2A1* จากฐานข้อมูล NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>) ด้วยโปรแกรม Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) โดยให้ forward primer และ reverse primer จับในบริเวณรอยต่อของเอ็กซอน (exon) บนสายเอ็มอาร์เอ็นเอ forward primer และ reverse primer ต้องมีลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เกิน 25 นิวคลีโอไทด์ และ PCR product ต้องมีขนาดไม่เกิน 200 นิวคลีโอไทด์ เมื่อออกแบบไพรเมอร์เสร็จ นำไพรเมอร์ที่ได้มาตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *COL2A1* ด้วยโปรแกรม BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) แล้วส่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ไปสังเคราะห์ที่บริษัท Biodesign และใช้ *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* เป็นยีนควบคุม ยืนยันผลจาก PCR product ที่ได้ โดยการส่ง sequence ที่บริษัท Macrogen สารที่ใช้ในการทำ PCR และสภาวะที่ใช้ในการทำ PCR แสดงในตารางที่ 3 และ 4 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 สารที่ใช้ในการทำ PCR ของยีน *COL2A1*

ชนิดของสาร	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. 10X PCR buffer	1X	2.0
2. 10 mM dNTP	0.5 mM	1.0
3. 25 mM MgCl ₂	2 mM	1.6
4. 5 µm Forward primer	0.2 µm	0.8
5. 5 µm Reverse primer	0.2 µm	0.8
6. 5 U/µl <i>Taq</i> Polymerase	0.02 U	0.08
7. Distilled water		11.72
8. cDNA	0.25 ng	2
ปริมาตรรวมทั้งหมด		20.0

ตารางที่ 4 สภาวะในการทำ PCR ของยีน *COL2A1*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1. Initial denaturation	94	5 นาที
2. PCR cycle (36 รอบ)		
- Denature	94	30 วินาที
- Annealing	60	30 วินาที
- Extension	72	1 นาที
3. Final extension	72	5 นาที

3.4 อิเล็กโทรโฟรีซิส

นำ PCR product มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อตรวจหา ยีน *COL2A1* ที่ได้จากการทำ PCR บนแผ่น agarose gel 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยใช้บัฟเฟอร์ TE และใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นย้อมแผ่นเจลด้วย ethidium bromide ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล

4. ศึกษาผลของยาคีโตโรเล็กที่มีต่อระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยวิธี MTT assay

เมื่อเซลล์กระดูกอ่อนมีจำนวนประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่หน้าตัดขวดเลี้ยงเซลล์ ขนาด T-75 ใสอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างเซลล์กระดูกอ่อนด้วย PBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ trypsin ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เคาขวดเลี้ยงเซลล์เบา ๆ เพื่อให้เซลล์กระดูกอ่อนหลุดออกจากพื้นขวดเลี้ยงเซลล์ เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาการทำงานของ trypsin ใส pipette ลงเบา ๆ เพื่อทำให้เซลล์กระจายตัว หลังจากนั้นย้ายใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน เซลล์กระดูกอ่อนที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 2 ครั้ง ดูดของเหลวที่อยู่ในหลอดทิ้ง เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส pipette ลงเบา ๆ เพื่อให้เซลล์กระจายตัว จากนั้นนับจำนวนเซลล์ด้วยสไลด์นับเซลล์ (Haemocytometer) เมื่อทราบความหนาแน่นของเซลล์กระดูกอ่อน ปรับความหนาแน่นโดยให้มีเซลล์กระดูกอ่อนความเข้มข้น 150,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนในถาดเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม โดยใส่หลุมละ 100 ไมโครลิตร (เซลล์กระดูกอ่อนจำนวน 15,000 เซลล์ต่อหลุม) เลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีสภาวะก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงเมื่อครบเวลา ดูดอาหารจากในหลุมทิ้ง หยอดยาคีโตโรเล็กความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เจือจางด้วยอาหาร DMEM/F12 และใช้ saline solution ที่เจือจางด้วยอาหาร DMEM/F12 เป็นกลุ่มควบคุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้น บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด หยอด PrestoBlue® Cell Viability Reagent (Invitrogen, USA) ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปวัดระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง

โดยใช้ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรหลังจากนั้นนำผลมาวิเคราะห์เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ระดับความมีชีวิตจากสมการ

$$\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์กระดูกอ่อนที่ทดสอบด้วยยาคีโทโรเล็ก (ค่าเฉลี่ย)}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์กระดูกอ่อนในกลุ่มควบคุม (ค่าเฉลี่ย)}} \times 100$$

จากนั้นนำเปอร์เซ็นต์ระดับความมีชีวิตมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนที่ทดสอบด้วยยาคีโทโรเล็กในแต่ละความเข้มข้นเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติวิธี Paired T-test ในโปรแกรม Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA)

5. ศึกษาผลของยาคีโทโรเล็กที่มีต่อ แอพอปโทซิส ของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยวิธี TUNEL assay

เมื่อเซลล์กระดูกอ่อนมีจำนวนประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่หน้าตัดขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด T-75 นำเซลล์กระดูกอ่อนออกจากขวดเลี้ยงเซลล์โดยใช้วิธีการเดียวกันกับการทดลองวิธี MTT แต่ความหนาแน่นของเซลล์กระดูกอ่อนที่ใช้คือ 200,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนในสไลด์ 8 หลุม โดยใส่หลุมละ 200 ไมโครลิตร (เซลล์กระดูกอ่อนจำนวน 40,000 เซลล์ต่อหลุม) นำเซลล์กระดูกอ่อนไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีสภาวะก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา คูดอาหารจากในหลุมทั้งหมด ยกยาคีโทโรเล็กความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เจือจางด้วยอาหาร DMEM/F12 และใช้ saline solution ที่เจือจางด้วยอาหาร DMEM/F12 เป็นกลุ่มควบคุม ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด คูดยาคีโทโรเล็กออกจากหลุม จากนั้นย้อมเซลล์โดยใช้ DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, USA) โดยหยอด formaldehyde ที่เจือจางด้วย PBS ให้มีความเข้มข้นของ formaldehyde 4 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที คูด formaldehyde ที่ล้างสไลด์ด้วย PBS 2 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที คูด PBS ที่ จากนั้นหยอด Triton® X-100 ที่เจือจางด้วย PBS ให้มีความเข้มข้นของ Triton® X-100 0.2 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ดูด Triton[®] X-100 ที่ล้างสไลด์ด้วย PBS 2 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นหยอดบัฟเฟอร์ Equilibration ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที หยอด TdT reaction mix ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และหลีกเลี่ยงไม่ให้สไลด์โดนแสง เมื่อครบเวลา ดูด TdT reaction mix ที่เจือจางด้วย PBS (v/v) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ดูด 2X SSC ที่ล้างสไลด์ด้วย PBS 3 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสไลด์ไปตรวจสอบการเกิดแอฟอพโทซิสของเซลล์กระดูกอ่อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง กำลังขยาย 20 เท่า โดยใช้ฟิลเตอร์ที่มีความยาวคลื่น 495-515 นาโนเมตร

6. ศึกษาผลของยาเคมีโรเล็กที่มีต่อการตายของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยวิธี Live/Dead assay

เมื่อเซลล์กระดูกอ่อนมีจำนวนประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่หน้าตัดขวดเลี้ยงเซลล์ ขนาด T-75 นำเซลล์กระดูกอ่อนออกจากขวดเลี้ยงเซลล์โดยใช้วิธีการเดียวกันกับการทดลองวิธี MTT แต่ความหนาแน่นของเซลล์กระดูกอ่อนที่ใช้คือ 200,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนในสไลด์แบบ 8 หลุม โดยใส่หลุมละ 200 ไมโครลิตร (เซลล์กระดูกอ่อนจำนวน 40,000 เซลล์ต่อหลุม) นำเซลล์กระดูกอ่อนไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีสภาวะก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูอาหารจากในหลุมที่หยอดยาเคมีโรเล็กความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เจือจางด้วยอาหาร DMEM/F12 และใช้ saline solution ที่เจือจางด้วยอาหาร DMEM/F12 เป็นกลุ่มควบคุม ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด ดูยาเคมีโรเล็กออกจากหลุม ล้างเซลล์ด้วย D-PBS ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อหลุม ดูด D-PBS ที่ จากนั้นข้อมเซลล์โดยใช้ LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen, USA) โดยเตรียมสารละลายเพื่อข้อมเซลล์กระดูกอ่อน ดูด D-PBS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร ใส่ 2mM EthD-1 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นใส่ 4mM Calcein AM ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องวอร์เท็กซ์ จากนั้นดูสารละลายผสมใส่หลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 30-45 นาที จากนั้นนำสไลด์ไปตรวจสอบการตายของเซลล์กระดูกอ่อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง กำลังขยาย 20 เท่า โดยใช้ฟิลเตอร์ที่มีความ

ยาวคลื่น 495-515 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบเซลล์ที่มีชีวิต และฟลูออโรสโคปที่มีความยาวคลื่น 495-635 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบเซลล์ตาย จำนวน 5 บริเวณ ต่อสไลด์ 1 หลุม หลังจากนั้นหาเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์กระดูกอ่อนจากสมการ

$$\frac{\text{จำนวนเซลล์ตาย (ค่าเฉลี่ย)}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด (ค่าเฉลี่ย)}} \times 100$$

จากนั้นนำเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์กระดูกอ่อนมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์กระดูกอ่อนที่ทดสอบด้วยยาเคมีโทโรเล็กในแต่ละความเข้มข้นเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นมากกว่า 95เปอร์เซ็นต์ โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติวิธี Paired T-test ในโปรแกรม Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA)

7. ศึกษาผลของยาเคมีโทโรเล็กที่มีต่อการแสดงออกของยีนซ่อมแซมของเซลล์กระดูกอ่อน

เมื่อเซลล์กระดูกอ่อนมีจำนวนประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่หน้าตัดขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด T-25 จำนวน 9 ขวด ให้อาหารในขวดทิ้ง ล้างเซลล์กระดูกอ่อนด้วย PBS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ยาเคมีโทโรเล็กความเข้มข้น 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เจือจางด้วยอาหาร DMEM/F12 และใช้ saline solution ที่เจือจางด้วยอาหาร DMEM/F12 เป็นกลุ่มควบคุม โดยในแต่ละความเข้มข้นจะใช้เซลล์กระดูกอ่อนจากขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด T-25 ปริมาณความเข้มข้นละ 3 ขวด โดยใส่ยาเคมีโทโรเล็กปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อขวด บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเซลล์กระดูกอ่อนมาสกัดอาร์เอ็นเอ เปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น cDNA ด้วยวิธี RT-PCR ตามวิธีที่กล่าวไปในข้างต้น

7.1 Real-time PCR

ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ACAN* และ *BMP2* จากฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม Primer3 ใช้ *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* เป็นยีนควบคุมเมื่อออกแบบไพรเมอร์เสร็จ นำไพรเมอร์ที่ได้มาตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *ACAN* และ *BMP2* ด้วยโปรแกรม BLAST ส่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ไปยังเคราะหที่บริษัท Biodesign โดยใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา real

time PCR ดังตารางที่ 5 จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) เพื่อหาประสิทธิภาพของปฏิกิริยาของ PCR ด้วย CFX96™ (Bio-Rad, USA) โดยใช้ตัวอย่าง cDNA ความเข้มข้นตั้งต้น 1X (กำหนดให้ตัวอย่าง cDNA จากการทำ RT-PCR โดยใช้อาร์เอ็นเอตั้งต้น 50 นาโนกรัมมีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 1X) เจือจางตัวอย่าง cDNA ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1/2x 1/4x 1/8x 1/16x และ 1/32x ใช้สารในการทำปฏิกิริยา real-time PCR ดังตารางที่ 6 และสภาวะที่ใช้ในการทำ real-time PCR ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา real time PCR

ชื่อยีน	Accession number	ความเข้มข้น (nM)
<i>ACAN</i>	NM_001135.3	300
<i>BMP2</i>	NM_001200.2	300
<i>GAPDH</i>	NM_001256799.1	250

ตารางที่ 6 สารที่ใช้ในการทำ real-time PCR

ชนิดของสาร	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. SsoFast™ EvaGreen® Supermix		10.0
2. 5 µM Forward primer	250-300 nM	ดังตารางที่ 5
3. 5 µM Reverse primer	250-300 nM	ดังตารางที่ 5
4. Distilled water		ปรับปริมาตรเป็น 20
5. cDNA	0.25 ng	2.0
รวมปริมาตร		20.0

ตารางที่ 7 สภาวะในการทำ real-time PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1. Enzyme activation	95	30 วินาที
2. PCR cycle (40 รอบ)		
- Denaturation	95	5 วินาที
- Annealing/Extension	56	5 วินาที
3. Melt curve	65-95 (เพิ่มขึ้นทีละ 0.5)	2-5 วินาที

การทดสอบค่าประสิทธิภาพ (efficiency) ที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐาน สามารถอธิบายถึงความสัมพันธ์ของรอบที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อให้ได้ปริมาณ PCR product ที่ต้องการ (Ct cycle) โดยที่ค่า efficiency ควรมีค่าเข้าใกล้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงว่าปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มขึ้นใกล้เคียงสองเท่าในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR (exponential) การกำหนดค่า threshold ควรกำหนดรอบปฏิกิริยาที่ใช้ในการทำ PCR น้อยที่สุด โดยที่จะต้องไม่เกิด primer dimer และความเข้มข้นของ cDNA จะต้องมีความเหมาะสมต่อปฏิกิริยาเพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นสองเท่า สามารถคำนวณค่า efficiency ดังสมการที่ 1 (Livak and Schmittgen, 2001)

สมการที่ 1 เปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในแต่ละคู่ไพรเมอร์

$$\% \text{ efficiency} = (E - 1) \times 100\%$$

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

เมื่อ E คือ ประสิทธิภาพของปฏิกิริยา PCR ในแต่ละคู่ไพรเมอร์

slope คือ ความชันของกราฟ

หาค่า efficiency ของปฏิกิริยาด้วย Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad, USA) โดยค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2) ควรมีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่าข้อมูลส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กันในแนวเส้นตรงทำให้ค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยามีความน่าเชื่อถือ ดังนั้นจึงใช้สภาวะที่มีค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยาที่อยู่ในช่วง เข้าใกล้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในการศึกษาการแสดงออกของยีน

7.2 วิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน *ACAN* และ *BMP2*

ศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนแบบ comparative quantification ด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$ เพื่อวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน *ACAN* และ *BMP2* และใช้ *GAPDH* ซึ่งเป็นยีนควบคุม ดังสมการที่ 2 โดยเปรียบเทียบค่า Ct ระหว่างเซลล์กระดูกอ่อนที่ไม่ได้ทดสอบด้วยยาเคโรเล็ก (กลุ่มควบคุม) กับเซลล์กระดูกอ่อนที่เลี้ยงพร้อมยาเคโรเล็กความเข้มข้น 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การแสดงออกของยีน จะถูกวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยใช้ Paired T-test ใน โปรแกรม Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA) เพื่อวิเคราะห์หาผลการแสดงออกของยีนที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเซลล์กระดูกอ่อนที่ทดสอบด้วยยาเคโรเล็กเข้มข้น 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ระดับความเชื่อมั่นมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์

สมการที่ 2 Comparative quantification

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

เมื่อ $Ct (\text{target, test})$ คือ Ct ของยีนเป้าหมายจากเซลล์กระดูกอ่อนที่ทดสอบด้วยยาเคโรเล็ก
 $Ct (\text{ref, test})$ คือ Ct ของ *GAPDH* จากเซลล์กระดูกอ่อนที่ทดสอบด้วยยาเคโรเล็ก
 $Ct (\text{target, calibrator})$ คือ Ct ของยีนเป้าหมายจากกลุ่มควบคุม
 $Ct (\text{ref, calibrator})$ คือ Ct ของ *GAPDH* จากกลุ่มควบคุม

บทที่ 4

ผลการศึกษา

1. ผลการออกแบบไพรเมอร์

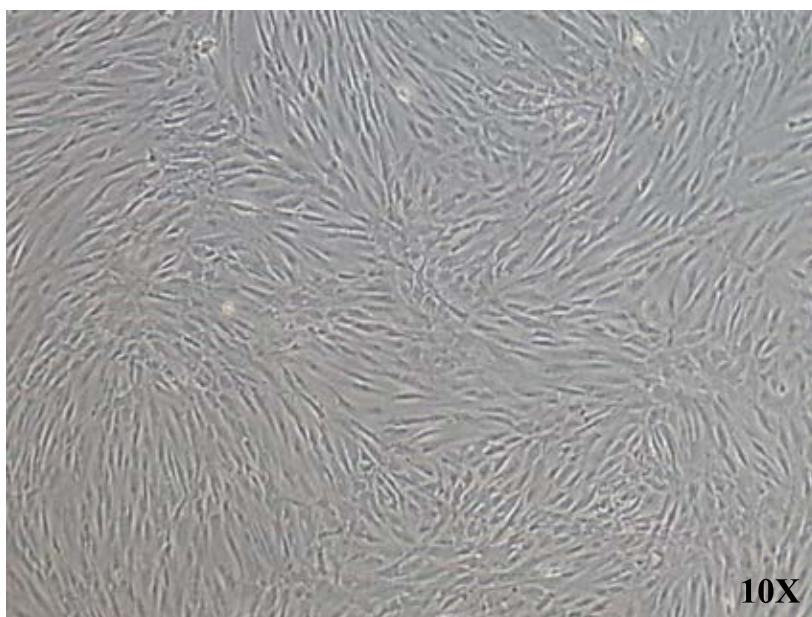
ผลจากการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Primer 3 ยีน *COL2A1* มี PCR product ขนาด 127 bp ยีน *ACAN* มี PCR product ขนาด 149 bp ยีน *BMP2* มี PCR product ขนาด 152 bp และยีน *GAPDH* มี PCR product ขนาด 226 bp ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

ชื่อยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (5' → 3')	Tm
<i>COL2A1</i>	F : GACAAAGGTGAAAAAGGTGCCCC	67.80
	R : CAGCAAAGTTTCCACCAAGACCAG	61.40
<i>ACAN</i>	F : AGACTGTCAGATACCCCATC	55.72
	R : AAAGACCTCACCTCCATCTC	58.81
<i>BMP2</i>	F : CGCAGCTTCCACCATGAAGAATC	62.32
	R : GCATCTTGCATCTGTTCTCGG	59.67
<i>GAPDH</i>	F : GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	57.18
	R : GAAGATGGTGATGGGATTTTC	53.72

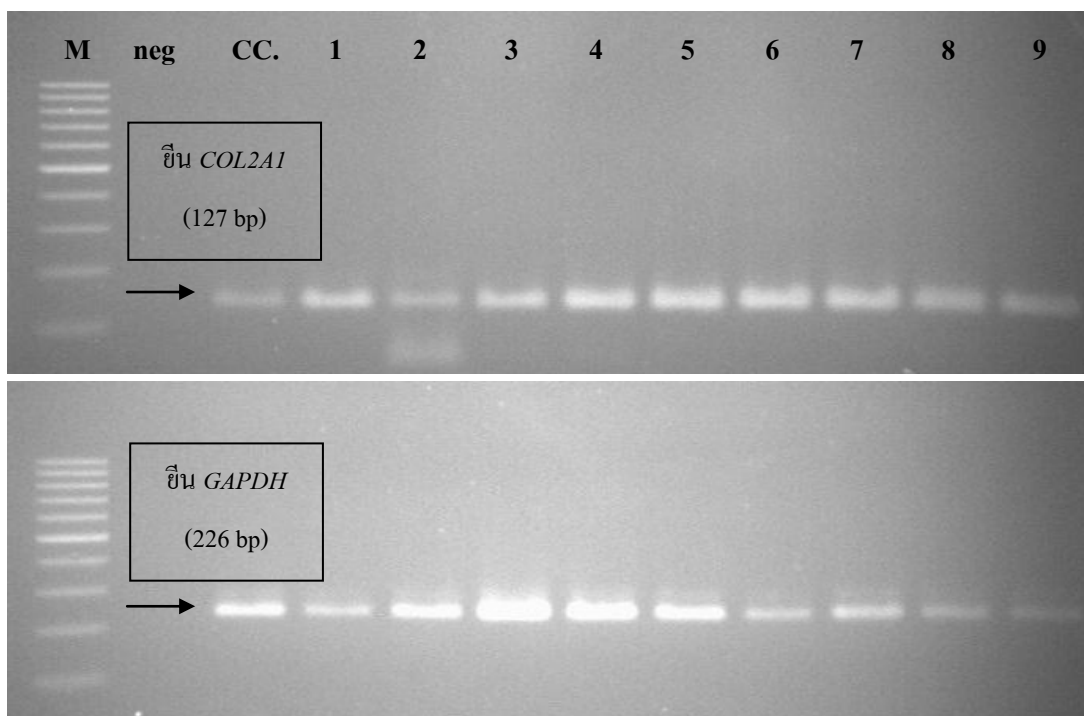
2. การพิสูจน์ว่าเซลล์ที่สกัดได้เป็นเซลล์กระดูกอ่อน

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการสกัดกระดูกอ่อนผิวข้อพบว่าเซลล์ที่สกัดได้มีลักษณะเรียวยาว คล้ายเซลล์เกี่ยวพัน (fibroblast) และมีลักษณะเป็นเซลล์เกาะพื้นผิว ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 เซลล์ที่สกัดได้จากรกระดูกอ่อนผิวข้อเมื่อเลี้ยงไป 1 passage

เมื่อนำเซลล์ไปสกัดอาร์เอ็นเอ และนำมาทำ RT-PCR เพื่อเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น cDNA จากนั้นจึงใช้ cDNA เป็นต้นแบบในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *COL2A1* แล้วนำ PCR product มาผ่านเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบว่าเซลล์ที่สกัดได้เป็นเซลล์กระดูกอ่อนหรือไม่ พบว่าทุกตัวอย่างจากเซลล์ที่สกัดได้จากรกระดูกอ่อนผิวข้อจากผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนผิวข้อเข้า มีการแสดงออกของยีน *COL2A1* เช่นเดียวกับ commercial chondrocyte โดยเกิดแถบที่ชัดเจนขนาด 127 bp ซึ่งตรงกับขนาดของไพรเมอร์ที่มีการออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *COL2A1* นอกจากนั้นยืนยันผลโดยการส่ง sequence พบว่า PCR product ที่ได้คือยีน *COL2A1* ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 ผลการแสดงออกของยีน *COL2A1* และ *GAPDH*

จาก cDNA ของเซลล์ที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนผิวข้อ

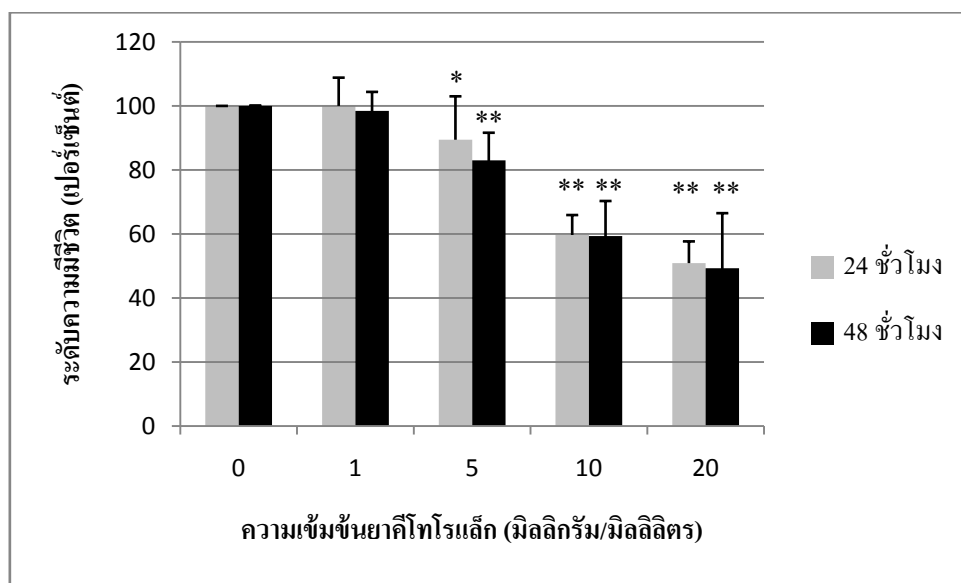
โดย M คือ Marker, neg คือ negative control, CC. คือ commercial chondrocyte,

1-9 คือ เซลล์ที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนของผู้ป่วย

3. การศึกษาผลของยาเคมีโรเล็กที่มีต่อระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยวิธี MTT assay

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม และทดสอบเซลล์กระดูกอ่อนด้วยยาเคมีโรเล็กความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ saline solution เป็นกลุ่มควบคุมเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่าระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนมีค่า 100, 89, 59 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยที่ยาเคมีโรเล็กความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เปอร์เซ็นต์ระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และยาเคมีโรเล็กความเข้มข้น 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เปอร์เซ็นต์ระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($P < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง พบว่าเปอร์เซ็นต์ระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนมีค่า 98, 83, 59 และ 49 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งยาเคทีโทโรเล็ก ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เปอร์เซ็นต์ระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 ระดับความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์) ของเซลล์กระดูกอ่อนเมื่อทดสอบด้วยยาเคทีโทโรเล็ก

ความเข้มข้น 0, 1, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

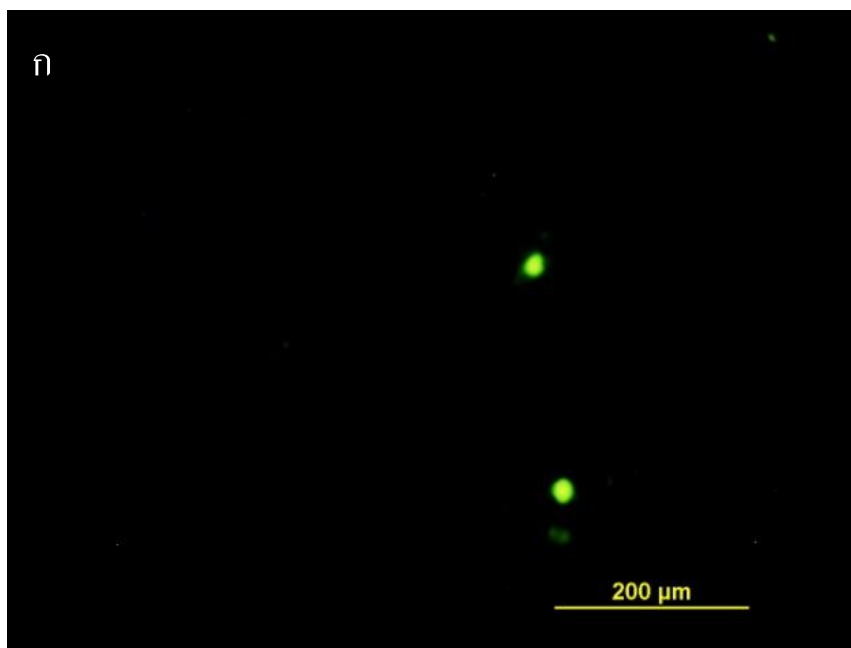
เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับยา

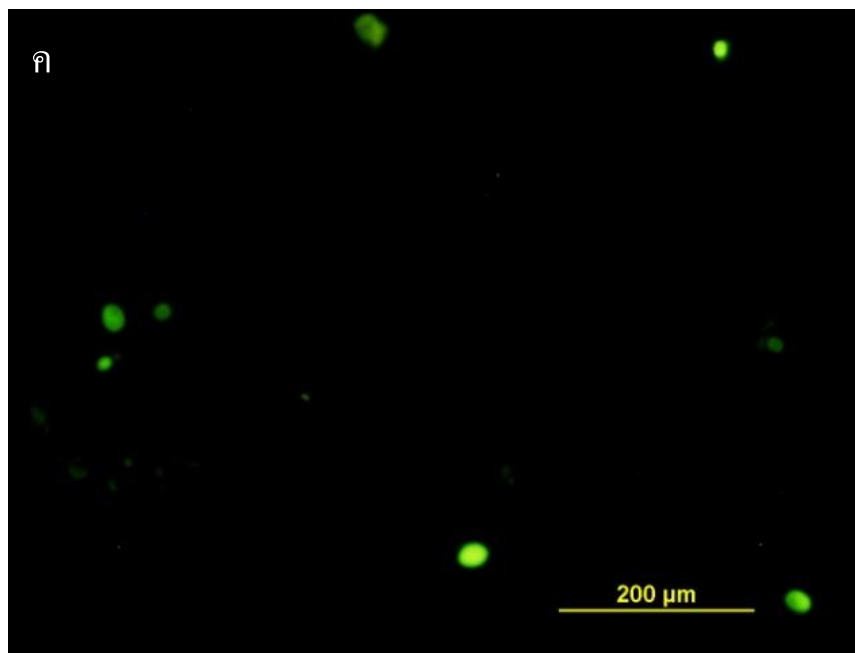
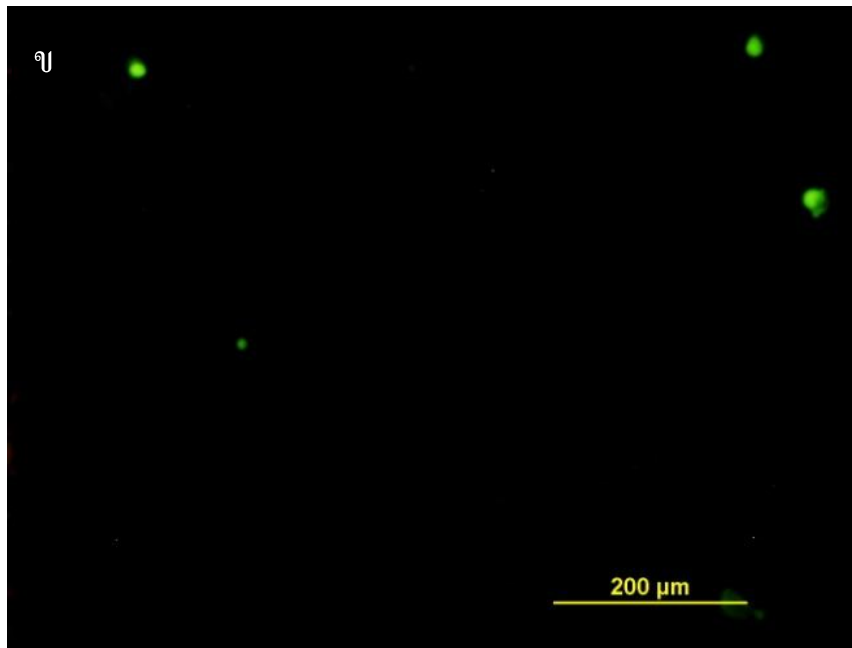
* แสดงถึงค่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

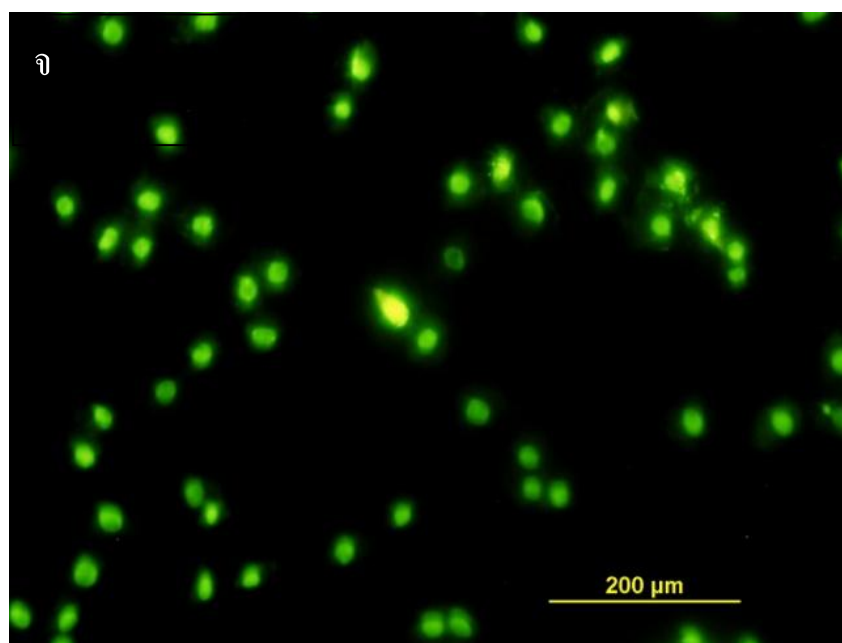
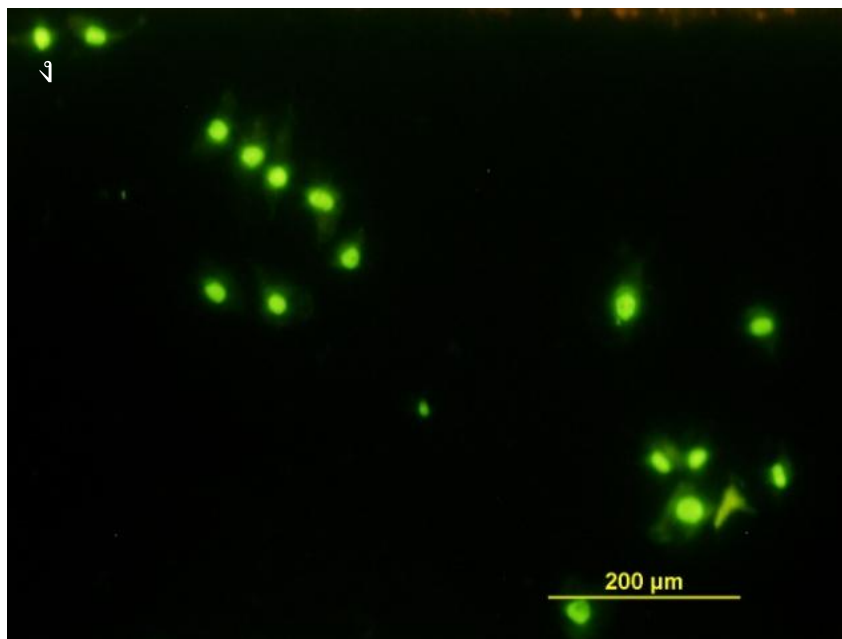
** แสดงถึงค่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.01$

4. การศึกษาผลของยาคีโทโรแล็กที่มีต่อแอฟอพโทซิสของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยวิธี TUNEL assay

จากผลการศึกษาระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยวิธี MTT assay จะเห็นได้ว่าเมื่อทำการทดสอบผลของยาคีโทโรแล็กความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์ระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเปอร์เซ็นต์ระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ไม่มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นในการศึกษาถึงผลของยาคีโทโรแล็กที่มีต่อแอฟอพโทซิสของเซลล์กระดูกอ่อนนั้น จึงศึกษาถึงผลของยาคีโทโรแล็กความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมงเท่านั้น พบว่าเมื่อความเข้มข้นยาคีโทโรแล็กเพิ่มขึ้น ทำให้เซลล์กระดูกอ่อนเกิดแอฟอพโทซิสเพิ่มมากขึ้น ดังรูปที่ 6







รูปที่ 6 ผลของยาทีโทโรเล็กที่มีต่อแอฟอปโทซิสของเซลล์กระดูกอ่อน

โดย รูป 6 ก คือ กลุ่มควบคุม (saline solution)

รูป 6 ข คือ เซลล์กระดูกอ่อนเมื่อทดสอบด้วยยาทีโทโรเล็กความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

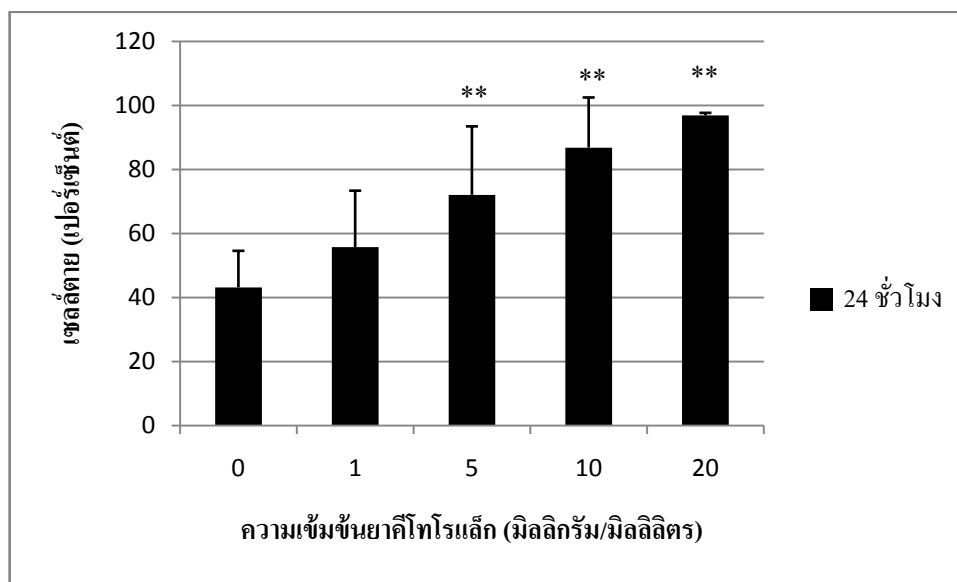
รูป 6 ค คือ เซลล์กระดูกอ่อนเมื่อทดสอบด้วยยาทีโทโรเล็กความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

รูป 6 ง คือ เซลล์กระดูกอ่อนเมื่อทดสอบด้วยยาทีโทโรเล็กความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

รูป 6 จ คือ เซลล์กระดูกอ่อนเมื่อทดสอบด้วยยาทีโทโรเล็กความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5. การศึกษาผลของยาคีโทโรแล็กที่มีต่อการตายของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยวิธี Live/Dead assay

จากผลการศึกษาระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยวิธี MTT assay จะเห็นได้ว่าเมื่อทำการทดสอบผลของยาคีโทโรแล็กความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์ระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและเปอร์เซ็นต์ระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ไม่มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นในการศึกษาถึงผลของยาคีโทโรแล็กที่มีต่อการตายของเซลล์กระดูกอ่อนนั้น จึงศึกษาถึงผลของยาคีโทโรแล็กความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมงเท่านั้น พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์กระดูกอ่อนมีค่าเพิ่ม 12, 28, 43 และ 53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยที่เปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์กระดูกอ่อนมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของยาคีโทโรแล็กเพิ่มขึ้น โดยที่ยาคีโทโรแล็กความเข้มข้น 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์กระดูกอ่อนมีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังรูปที่ 7

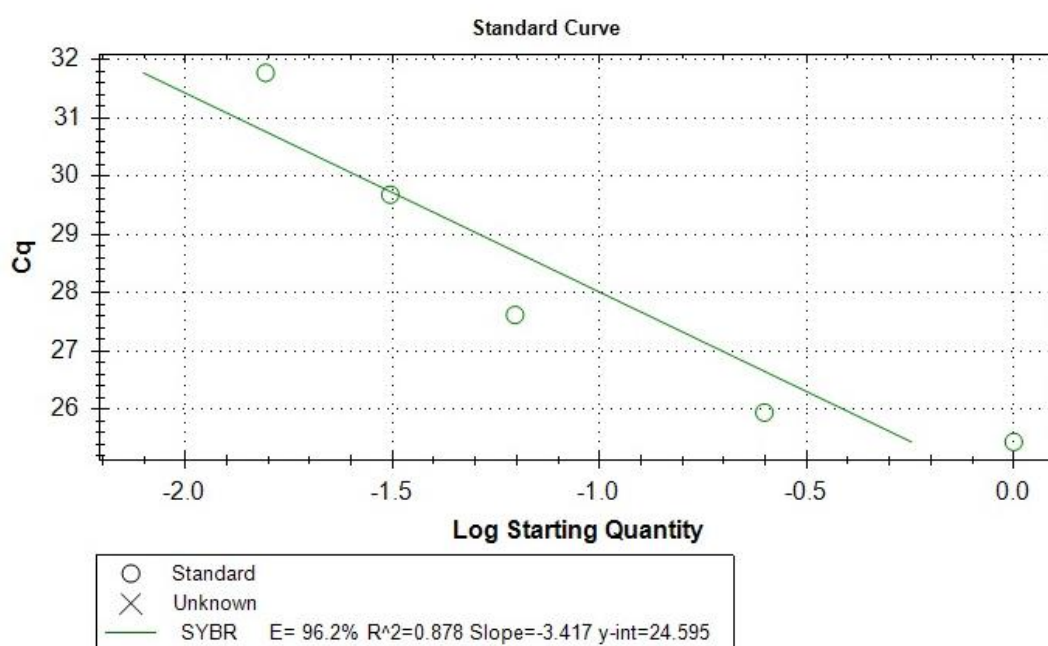


รูปที่ 7 เปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์กระดูกอ่อนเมื่อทดสอบด้วยยาคีโทโรแล็กความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับยา

** แสดงถึงค่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.01$

6. การศึกษาผลของยาตีโทโรเล็กที่มีต่อ การแสดงออกของยีนซ่อมแซมของเซลล์กระดูกอ่อน ด้วยวิธี Real-time PCR

จากผลการศึกษาระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยวิธี MTT assay และผลการศึกษาผลของยาตีโทโรเล็กที่มีต่อการตายของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยวิธี Live/Dead assay จะเห็นได้ว่ายาตีโทโรเล็กความเข้มข้น 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เปอร์เซ็นต์ระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนลดลง และทำให้เปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์กระดูกอ่อนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นในการศึกษาถึงผลของยาตีโทโรเล็กที่มีต่อการแสดงออกของยีนซ่อมแซมของเซลล์กระดูกอ่อนจึงศึกษาผลของยาตีโทโรเล็กความเข้มข้น 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยการศึกษาการแสดงออกของยีน *ACAN* และ *BMP2* ใช้ยีน *GAPDH* เป็นยีนควบคุม จากการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยา พบว่ามีค่า 96.2, 96.7 และ 106.6 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 8, 9 และ 10 ตามลำดับ

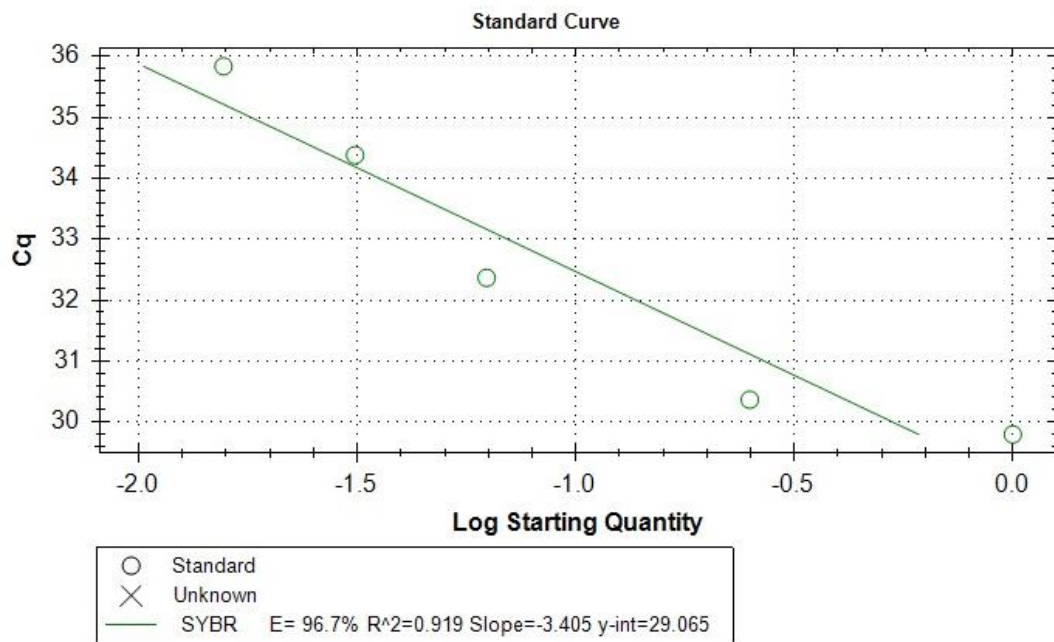


รูปที่ 8 ค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยาของยีน *ACAN*

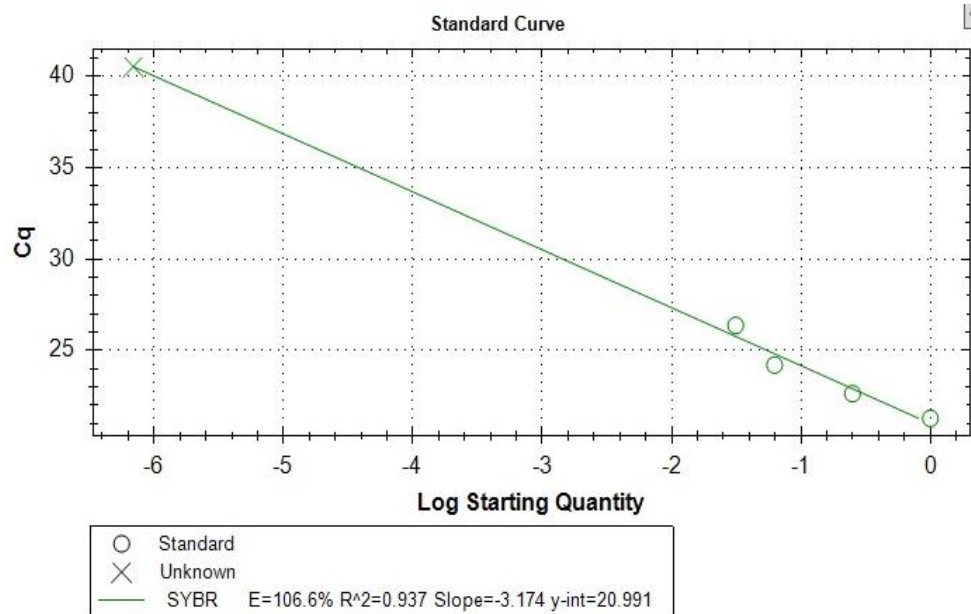
โดยแกน X คือ Ct cycle

แกน Y คือ ระดับความเข้มข้นของ cDNA

ค่า E คือค่าประสิทธิภาพ (efficiency)

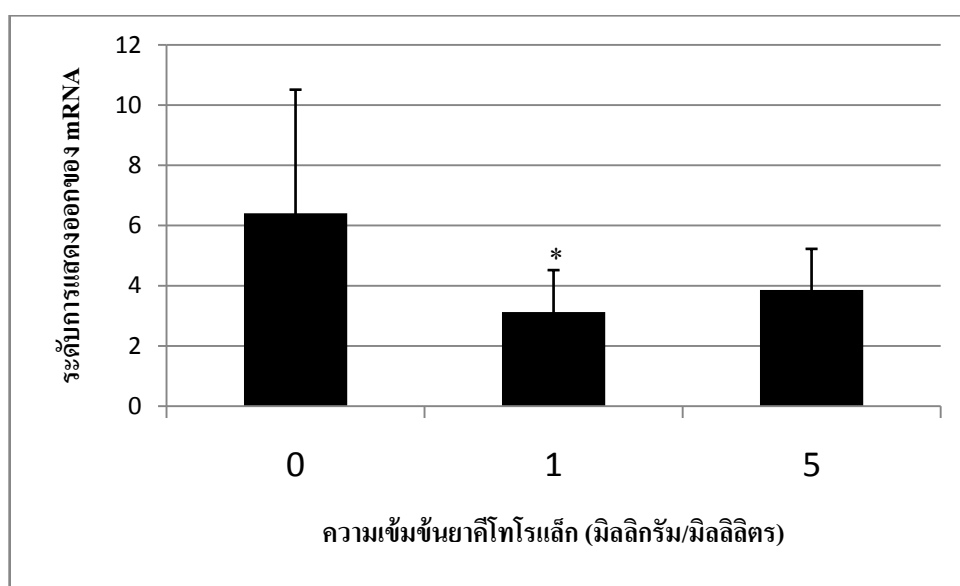


รูปที่ 9 ค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยาของยีน *BMP2*



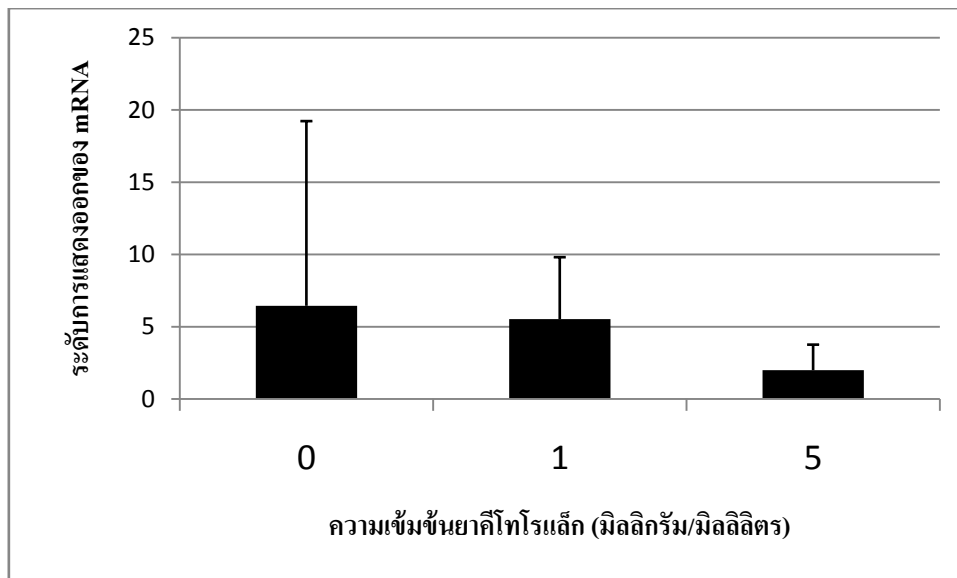
รูปที่ 10 ค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยาของยีน *GAPDH*

เมื่อศึกษาอัตราการแสดงออกของยีนที่มีความเกี่ยวข้องในการซ่อมแซมของเซลล์กระดูกอ่อน พบว่ายาเคทีโทโรเล็กความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้อัตราการแสดงออกของยีน *ACAN* มีค่าลดลงประมาณ 2 เท่า ซึ่งมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังรูปที่ 11 แต่อัตราการแสดงออกของยีน *BMP2* ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังรูปที่ 12



รูปที่ 11 ระดับการแสดงออกของยีน *ACAN* จากเซลล์กระดูกอ่อนเมื่อทดสอบด้วยยาเคทีโทโรเล็กความเข้มข้น 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับยา

* แสดงถึงค่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$



รูปที่ 12 ระดับการแสดงออกของยีน *BMP2* จากเซลล์กระดูกอ่อนเมื่อทดสอบด้วยยาดีทริกซ์ความเข้มข้น 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับยา

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการทดลอง

โรคข้อเสื่อมเป็นโรคที่พบบ่อยในประชากรผู้สูงอายุ (Buckwalter and Mankin, 1998) ผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมส่วนใหญ่มักเกิดอาการปวด (Aspden, 2008) จึงต้องมีการให้ยาเพื่อบรรเทาอาการปวดโดยในงานวิจัยนี้สนใจการใช้ยาตีโทโรเล็ก ยาตีโทเล็กจัดอยู่ในกลุ่มของยา NSAIDs ซึ่งนิยมใช้บรรเทาอาการปวด (Di Massa *et al.*, 2000) เนื่องจากยาตีโทโรเล็กไม่ใช่สเตียรอยด์ ดังนั้นจึงทำให้มีผลข้างเคียงน้อยกว่ายาในกลุ่มสเตียรอยด์ หากต้องมีการใช้ยาเป็นเวลานาน นอกจากนั้นยาตีโทโรเล็กยังสามารถบรรเทาอาการปวดได้นานกว่าการใช้ยา และสามารถลดการอักเสบได้อีกด้วย (Lee *et al.*, 2011) งานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของยาตีโทโรเล็กที่มีต่อแอฟอพโทซิสและการแสดงออกของยีนซ่อมแซมของ เซลล์กระดูกอ่อน เซลล์กระดูกอ่อนที่ใช้ในงานวิจัยได้จากกระดูกอ่อนของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนผิวข้อเข่า อาจทำให้กระดูกอ่อนผิวข้อมีจำนวนเซลล์กระดูกอ่อนในปริมาณน้อยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่กระดูกอ่อนผิวข้อเกิดการเสื่อมมาก และอาจทำให้เซลล์กระดูกอ่อนที่ได้ไม่สมบูรณ์ เมื่อทดสอบเซลล์กระดูกอ่อนด้วยยาตีโทโรเล็กเพื่อศึกษาระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยเทคนิค MTT assay พบว่า เมื่อความเข้มข้นยาตีโทโรเล็กเพิ่มขึ้นส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนมีค่าลดลง ได้มีการศึกษาผลของยาในกลุ่ม NSAIDs ต่อเซลล์ไลน์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่ายาที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ โดยมีผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย ยาในกลุ่มของ NSAIDs จะยับยั้งการเกิด oxidative phosphorylation ทำให้ไมโทคอนเดรียไม่สามารถสร้าง ATP ให้กับเซลล์ได้ จึงกระตุ้นให้เซลล์ตาย (Moreno-Sanchez *et al.*, 1999) ดังนั้นเปอร์เซ็นต์ระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนมีค่าลดลงเมื่อทดสอบด้วยยาตีโทโรเล็กอาจเนื่องมาจากสาเหตุดังกล่าว

นอกจากนั้นยาตีโทโรเล็กส่งผลให้เซลล์กระดูกอ่อนเกิดแอฟอพโทซิส อาจมีสาเหตุมาจากยาตีโทโรเล็กยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยน arachidonic acid ไปเป็น prostaglandin ได้ ดังนั้น arachidonic acid จึงมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ทำให้ arachidonic

acid ไปกระตุ้นเอนไซม์ sphingomyelinase ให้มีการเปลี่ยน sphingomyelin ซึ่งเป็นสารที่เป็นส่วนประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์ ให้กลายเป็น ceramide (Chan *et al.*, 1998) หลังจากนั้น ceramide จะกระตุ้นให้โปรตีน Bax ทำงาน ทำให้เซลล์เกิดแอพออโทซิส (von Haefen *et al.*, 2002)

เพื่อเป็นการยืนยันผลจากการศึกษาผลของยาตีโทโรเล็กที่มีต่อระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยเทคนิค MTT assay จึงตรวจสอบการตายของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยเทคนิค Live/Dead assay เนื่องจากยาตีโทโรเล็กอาจทำให้เซลล์เข้าสู่กระบวนการตาย แต่ไมโทคอนเดรียยังสามารถสังเคราะห์เอนไซม์เพื่อเปลี่ยนสาร MTT ให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ formazan ได้ ดังนั้นผลจาก MTT assay อาจไม่สามารถยืนยันเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ที่ถูกต้องได้ แต่เทคนิค Live/Dead assay นั้นจะสามารถตรวจสอบเซลล์ตายได้ โดยเซลล์ที่ตายจะเกิดการเสียสภาพของเยื่อหุ้มนิวเคลียสและเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นเซลล์ตายจึงติดสีแดงของ EthD-1 ซึ่งผลที่ได้จากการทำ MTT assay มีความสอดคล้องกับการศึกษาผลของยาตีโทโรเล็กที่มีต่อการตายของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยเทคนิค Live/Dead assay เมื่อตรวจสอบการตายของเซลล์กระดูกอ่อนด้วยการนับเซลล์ที่ติดสีแดงของ EthD-1 พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์กระดูกอ่อนมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นยาตีโทโรเล็กมีค่าสูงขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง โดยผลจากการศึกษานี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาถึงผลของยาในกลุ่ม NSAIDs ที่มีผลต่อเซลล์กระดูกอ่อนจากหนูทดลอง โดยที่ยาในกลุ่ม NSAIDs ทำให้เซลล์กระดูกอ่อนจากหนูทดลองมีเปอร์เซ็นต์การตายเพิ่มขึ้น นอกจากนั้นยังอาจเป็นผลเนื่องมาจากยาในกลุ่มของ NSAIDs มีผลไปยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์กระดูกอ่อน จึงอาจทำให้ระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนลดลงด้วย (Chang *et al.*, 2006) อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษาผลของยาตีโทโรเล็กที่มีต่อการตายของเซลล์กระดูกอ่อนในงานวิจัยนี้ พบว่าในกลุ่มควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์กระดูกอ่อนเพิ่มขึ้นเช่นกัน อาจเนื่องมาจากมีจำนวนเซลล์กระดูกอ่อนมากเกินไปในแต่ละหลุม หรืออาหารเลี้ยงเซลล์มีปริมาณน้อยเกินไป เซลล์กระดูกอ่อนจึงใช้สารอาหารจากอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ไม่เพียงพอ จึงอาจทำให้เซลล์กระดูกอ่อนตายได้ ถึงแม้ว่าจะไม่ได้ถูกทดสอบด้วยยาตีโทโรเล็กก็ตาม นอกจากนั้นอาจเป็นผลมาจากการแช่แข็งเซลล์กระดูกอ่อนเก็บไว้เพื่อนำมาเพาะเลี้ยงใหม่ เนื่องจากการศึกษาพบว่า เมื่อนำเซลล์ไปแช่แข็งจะทำให้เซลล์เกิดความเสียหาย และทำให้เซลล์อ่อนแอได้ (McGann *et al.*, 1988)

จากนั้นได้ศึกษาผลของยา คีโทโรเล็กที่มีต่อระดับการแสดงออกของยีน *ACAN* ซึ่งยีน *ACAN* เป็นยีนที่มีหน้าที่ผลิตโปรตีนอากริแคนที่เป็นส่วนประกอบหลักที่สำคัญของโปรตีโอไกลแคน ที่อยู่ใน ECM ภายในกระดูกอ่อนผิวข้อ (Roughley and Lee, 1994) ดังนั้นจึงเป็นยีนสำคัญที่มีความเกี่ยวข้องในการซ่อมแซมกระดูกอ่อน เมื่อทดสอบเซลล์กระดูกอ่อนด้วยยา คีโทโรเล็กพบว่า ยา คีโทโรเล็กความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ทำให้การแสดงออกของยีน *ACAN* มีค่าลดลง ซึ่งผลที่ได้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีการศึกษาถึงผลของยาประเภท NSAIDs มีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีโอไกลแคนจากเซลล์กระดูกอ่อน ทำให้มีค่าลดลงประมาณ 80 – 90 เปอร์เซ็นต์ (Fujii *et al.*, 1989) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาโดยฉีดยา คีโทโรเล็กในบริเวณข้อเข้ากระดูก โดยเมื่อนำกระดูกอ่อนผิวข้อมาวิเคราะห์ผลทางพยาธิวิทยา พบว่ากระดูกอ่อนผิวข้อเกิดความเสียหาย และนอกจากนั้นเซลล์กระดูกอ่อนยังมีการจัดเรียงตัวที่เปลี่ยนไป (Shapiro *et al.*, 2007) ซึ่งอาจเกิดจากเซลล์กระดูกอ่อน พัฒนาย้อนกลับไปเป็นเซลล์ MSCs จึงทำให้เซลล์กระดูกอ่อนสูญเสียหน้าที่เฉพาะในการสังเคราะห์ อากริแคน และ คอลลาเจน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ ECM (Yoon *et al.*, 2002) ดังนั้นทำให้เซลล์กระดูกอ่อน ไม่สามารถสังเคราะห์ อากริแคน และ คอลลาเจน ได้เพียงพอเพื่อใช้ในการซ่อมแซมกระดูกอ่อนผิวข้อ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจาก ยา คีโทโรเล็กกกดการแสดงออกของยีน *ACAN* ในขณะที่เดียวกันได้ศึกษาถึงผลของยา คีโทโรเล็กที่มีต่อระดับการแสดงออกของยีน *BMP2* ซึ่งยีน *BMP2* มีหน้าที่หน้าที่กระตุ้นให้เซลล์กระดูกอ่อนให้มีการสังเคราะห์คอลลาเจน และโปรตีโอไกลแคน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ ECM (Orazizadeh *et al.*, 2009) พบว่าเซลล์กระดูกอ่อนที่ทดสอบด้วยยา คีโทโรเล็กมีระดับการแสดงออกของยีน *BMP2* มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อาจเนื่องมาจาก ตัวอย่างเซลล์กระดูกอ่อนที่ได้จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม มีระดับการแสดงออกของยีน *BMP2* ที่แตกต่างกันมาก

อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ทำการทดสอบยา คีโทโรเล็กกับเซลล์กระดูกอ่อนในรูปแบบของการเพาะเลี้ยงเซลล์ จึงทำให้ยา คีโทโรเล็ก สัมผัสกับเซลล์กระดูกอ่อนโดยตรง แต่ภายในข้อเข่า เซลล์กระดูกอ่อนจะฝังตัวอยู่ใน ECM ทำให้เซลล์กระดูกอ่อนไม่ได้สัมผัสกับยา คีโทโรเล็กโดยตรง และนอกจากนั้นภายในข้อเข่ายังมีน้ำไขข้อที่ช่วยในการหล่อลื่นข้อเข่าให้เคลื่อนไหวได้

สะดวก จึงอาจทำให้ความรุนแรงของยาที่มีต่อเซลล์กระดูกอ่อนลดลง ดังนั้นเซลล์กระดูกอ่อนในรูปแบบของ การเพาะเลี้ยงเซลล์ จึงอาจได้รับผลกระทบของยา คีโทโรเล็ก มากกว่า นอกจากนั้น โดยทั่วไป แพทย์จะฉีดยาคีโทโรเล็ก ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่บริเวณกล้ามเนื้อ หลังจากนั้นยาคีโทโรเล็กจะไหลเวียนทั่วร่างกายผ่านทางระบบโลหิต โดยมีทำให้ความเข้มข้นยาคีโทโรเล็กเมื่อไปถึงบริเวณที่เป็น โรคข้อเสื่อมแก่ประมาณ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Brocks and Jamali, 1992) ดังนั้นความเข้มข้นของยาคีโทโรเล็กที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีความเข้มข้นมากกว่าความเข้มข้นยาในกระแสเลือด จึงอาจทำให้ยาคีโทโรเล็กส่งผลต่อเซลล์กระดูกอ่อนมากกว่าการฉีดยาคีโทโรเล็กที่บริเวณกล้ามเนื้อ

สรุปผลการวิจัย

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนและนำมาทดสอบด้วยยาทีโทโรแล็กความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อศึกษาถึงผลของยาทีโทโรแล็กที่มีต่อระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนนั้น พบว่ายาทีโทโรแล็กความเข้มข้น 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 24 ชั่วโมง ส่งผลให้ระดับความมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และนอกจากนั้นยาทีโทโรแล็กยังส่งผลให้เซลล์กระดูกอ่อนมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อศึกษาถึงระดับการแสดงออกของยีน *ACAN* และ *BMP2* จากเซลล์กระดูกอ่อนที่ทดสอบด้วยยาทีโทโรแล็กความเข้มข้น 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่ายาทีโทโรแล็กความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลถึงระดับการแสดงออกของยีน *ACAN* ซึ่งยาทีโทโรแล็กทำให้ระดับการแสดงออกของยีน *ACAN* ซึ่งเป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมกระดูกอ่อนผิวข้อ มีค่าลดลงประมาณ 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแต่ไม่มีผลต่อระดับการแสดงออกของยีน *BMP2* ดังนั้นในการใช้ยาทีโทโรแล็กเพื่อลดการอักเสบ และบรรเทาอาการปวดในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมนั้นควรอยู่ภายใต้ความดูแลของแพทย์ เพื่อลดความเสี่ยงในการใช้ยาทีโทโรแล็ก ทำให้การออกฤทธิ์ของยาทีโทโรแล็กมีประสิทธิภาพสูงสุด

ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาถึงยาในกลุ่มของ NSAIDs เพิ่มมากขึ้น เพื่อเปรียบเทียบว่าเซลล์กระดูกอ่อนมีการตอบสนองต่อยาแต่ละชนิดแตกต่างกันหรือไม่ และอาจใช้ระดับช่วงความเข้มข้นของยาและเวลาที่ใช้ในการทดสอบที่มีค่าใกล้เคียงกัน เนื่องจากอาจจะสามารถหาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม โดยไม่ทำให้เซลล์กระดูกอ่อนตาย และยังทำให้ยาออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ควรมีการเพิ่มจำนวนตัวอย่าง เนื่องจากตัวอย่างที่นำมาศึกษาอาจน้อยเกินไป จึงอาจทำให้ไม่สามารถสรุปได้อย่างแน่ชัดว่ายาคีโตโรเล็กนั้น มีผลต่อการตายของเซลล์กระดูกอ่อนและมีการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปจริงหรือไม่

กลุ่มตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษา ควรเลือกกลุ่มตัวอย่างที่มีอายุใกล้เคียงกัน เพื่อลดปัจจัยที่จะทำให้มีค่าการแสดงออกของยีนแตกต่างกัน ซึ่งเป็นผลมาจากอายุที่แตกต่างกัน

การตรวจสอบรูปที่ได้จากการทำ Live/Dead assay ควรใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการวิเคราะห์สีว่าปริมาณจำนวนเซลล์กระดูกอ่อนที่ตายมากน้อยเพียงใด เพื่อให้มีการวิเคราะห์ผลมีความแม่นยำสูง และยังสามารถวิเคราะห์ผลได้สะดวกและรวดเร็วมากยิ่งขึ้น

การใช้ยาคีโตโรเล็กเพื่อบรรเทาอาการปวดในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมนั้น โดยปกติแล้วจะทำการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ โดยใช้เวลาความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่ายาคีโตโรเล็กความเข้มข้นสูง มีผลต่อเซลล์กระดูกอ่อน ดังนั้นหากฉีดยาคีโตโรเล็กในบริเวณที่เกิดข้อเสื่อมโดยตรง เพื่อให้ยาสามารถออกฤทธิ์ได้เร็วขึ้น หรือทำให้ยามีประสิทธิภาพในการบรรเทาอาการปวดมากขึ้น ควรใช้ยาคีโตโรเล็กที่ความเข้มข้นต่ำ เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์กระดูกอ่อนถูกทำลาย

เอกสารอ้างอิง

- Alvarez-Soria, M. A., *et al.* 2008. Long-term NSAID treatment directly decreases COX-2 and mPGES-1 production in the articular cartilage of patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 16: 1484-1493.
- Aspden, R. M. 2008. Osteoarthritis: a problem of growth not decay? *Rheumatology* 47: 1452-1460.
- Birchfield, P. C. 2001. Osteoarthritis overview. *Geriatric Nursing* 22: 124-130.
- Bole, G. G. 1962. Synovial fluid lipids in normal individuals and patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 5: 589-601.
- Brew, C. J., Clegg, P. D., Boot-Handford, R. P., Andrew, J. G. and Hardingham, T. 2010. Gene expression in human chondrocytes in late osteoarthritis is changed in both fibrillated and intact cartilage without evidence of generalised chondrocyte hypertrophy. *Annals of the Rheumatic Disease* 69: 234-240.
- Brocks, D. R. and Jamali, F. 1992. Clinical pharmacokinetics of ketorolac tromethamine. *Clinical Pharmacokinetics* 23: 415-427.
- Buckwalter, J. A. and Mankin, H. J. 1998. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instructional Course Lectures* 47: 487-504.
- Calmet, J., Esteve, C., Boada, S. and Gine, J. 2004. Analgesic effect of intra-articular ketorolac in knee arthroscopy: comparison of morphine and bupivacaine. *Knee Surgery, Sports Traumatology Arthroscopy* 12: 552-555.
- Cha, B. H., *et al.* 2012. Cartilage tissue formation from dedifferentiated chondrocytes by codelivery of BMP-2 and SOX-9 genes encoding bicistronic vector. *Cell Transplant*: DOI: 10.3727/096368912X647261

- Chan, T. A., Morin, P. J., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. 1998. Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proceeding of the National Academy Sciences of the United states of America* 95: 681-686.
- Chang, J. K., Wu, S. C., Wang, G. J., Cho, M. H. and Ho, M. L. 2006. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cell proliferation and death in cultured epiphyseal-articular chondrocytes of fetal rats. *Toxicology* 228: 111-123.
- Di Massa, A., Scardigli, M., Bruni, L. and Valentino, L. 2000. Ketorolac for paediatric postoperative pain. A review. *Minerva Anestesiologica* 66: 749-756.
- Eid, K., Thornhill, T. S. and Glowacki, J. 2006. Chondrocyte gene expression in osteoarthritis: Correlation with disease severity. *Journal of Orthopaedic Research* 24: 1062-1068.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicology Pathology* 35: 495-516.
- Eyre, D. R. 2004. Collagens and cartilage matrix homeostasis. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 427: S118-122.
- Frakes, E. P., Risser, R. C., Ball, T. D., Hochberg, M. C. and Wohlreich, M. M. 2011. Duloxetine added to oral nonsteroidal anti-inflammatory drugs for treatment of knee pain due to osteoarthritis: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Current Medical Research and Opinion* 27: 2361-2372.
- Frenkel, S. R., *et al.* 2000. Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling. *Plastic and Reconstructive Surgery* 105: 980-990.
- Fujii, K., Tajiri, K., Kajiwara, T., Tanaka, T. and Murota, K. 1989. Effects of NSAID on collagen and proteoglycan synthesis of cultured chondrocytes. *Journal of Rheumatology* S18: 28-31.
- Glansbeek, H. L., van Beuningen, H. M., Vitters, E. L., Morris, E. A., van der Kraan, P. M. and van den Berg, W. B. 1997. Bone morphogenetic protein 2 stimulates articular cartilage

- proteoglycan synthesis in vivo but does not counteract interleukin-1 α effects on proteoglycan synthesis and content. *Arthritis & Rheumatism* 40: 1020-1028.
- Goldring, M. B. and Goldring, S. R. 2010. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1192: 230-237.
- Hilario, M. O., Terreri, M. T. and Len, C. A. 2006. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. *Journal of Pediatrics* 82: 206-212.
- Hildebrand, A., *et al.* 1994. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochemical Journal* 302: 527-534.
- Ho, M. L., Chang, J. K. and Wang, G. J. 1995. Antiinflammatory drug effects on bone repair and remodeling in rabbits. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 313: 270-278.
- Irwin, M. G., Cheung, K. M., Nicholls, J. M. and Thompson, N. 1998. Intra-articular injection of ketorolac in the rat knee joint: effect on articular cartilage and synovium. *British Journal of Anaesthesia* 80: 837-839.
- Jiang, Y., *et al.* 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418: 41-49.
- Kee, C. C. 2000. Osteoarthritis: manageable scourge of aging. *Nursing Clinics of North America* 35: 199-208.
- Lawrence, R. C., *et al.* 2008. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis & Rheumatism* 58: 26-35.
- Lawry, J. 2004. Detection of apoptosis by the TUNEL assay. *Methods in Molecular Medicine* 88: 183-190.
- Lee, R. and Kean, W. F. 2012. Obesity and knee osteoarthritis. *Inflammopharmacology* 20: 53-58.

- Lee, S. C., Rha, D. W. and Chang, W. H. 2011. Rapid analgesic onset of intra-articular hyaluronic acid with ketorolac in osteoarthritis of the knee. *Journal of Back Musculoskeletal Rehabilitation* 24: 31-38.
- Lin, Z., *et al.* 2008. Gene expression profiles of human chondrocytes during passaged monolayer cultivation. *Journal of Orthopaedic Research* 26: 1230-1237.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
- Luong, C., Miller, A., Barnett, J., Chow, J., Ramesha, C. and Browner, M. F. 1996. Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nature Structural & Biology* 3: 927-933.
- McGann, L. E., Yang, H. Y. and Walterson, M. 1988. Manifestations of cell damage after freezing and thawing. *Cryobiology* 25: 178-185.
- Moreno-Sanchez, R., Bravo, C., Vasquez, C., Ayala, G., Silveira, L. H. and Martinez-Lavin, M. 1999. Inhibition and uncoupling of oxidative phosphorylation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: study in mitochondria, submitochondrial particles, cells, and whole heart. *Biochemical Pharmacology* 57: 743-752.
- Nimer, E., Schneiderman, R. and Maroudas, A. 2003. Diffusion and partition of solutes in cartilage under static load. *Biophysical Chemistry* 106: 125-146.
- Orazizadeh, M., Hashemitabar, M., Fakoor, M. and Moghadam, M. T. 2009. Effect of bone morphogenetic protein-2 on normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 12: 1194-1199.
- Oztuna, V., Eskandari, M., Bugdayci, R. and Kuyurtar, F. 2007. Intra-articular injection of tenoxicam in osteoarthritic knee joints with effusion. *Orthopedics* 30: 1039-1042.
- Picot, J., and Jones, G.E. (2005). *Human Cell Culture Protocols*, 2nd edn, Totowa, NJ : Humana Press.

- Poole, A. R., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M. and Lavery, S. 2001. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 391: 26-33.
- Richette, P., Corvol, M. and Bardin, T. 2003. Estrogens, cartilage, and osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 70: 257-262.
- Roughley, P. J. and Lee, E. R. 1994. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microscopy Research and Technique* 28: 385-397.
- Shapiro, P. S., Rohde, R. S., Froimson, M. I., Lash, R. H., Postak, P. and Greenwald, A. S. 2007. The effect of local corticosteroid or ketorolac exposure on histologic and biomechanical properties of rabbit tendon and cartilage. *Hand (New York)* 2: 165-172.
- Stokes, D. G., Liu, G., Dharmavaram, R., Hawkins, D., Piera-Velazquez, S. and Jimenez, S. A. 2001. Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (SOX) transcription factors. *Biochemical Journal* 360: 461-470.
- Sylvester, P. W. 2011. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods in Molecular Biology* 716: 157-168.
- van der Kraan, P. M. and van den Berg, W. B. 2000. Anabolic and destructive mediators in osteoarthritis. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolism Care* 3: 205-211.
- von Haefen, C., *et al.* 2002. Ceramide induces mitochondrial activation and apoptosis via a Bax-dependent pathway in human carcinoma cells. *Oncogene* 21: 4009-4019.
- Yoon, Y. M., *et al.* 2002. Maintenance of differentiated phenotype of articular chondrocytes by protein kinase C and extracellular signal-regulated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 277: 8412-8420.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ใบอนุมัติงานวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์

โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ



คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ชุดที่ 1 คณะแพทยศาสตร์

หนังสือรับรองเลขที่ 073/2555

โครงการวิจัยเรื่อง ผลของยาแก้อักเสบที่โพรแอสแตคตินและต่อเอพอโทซิสและการแสดงออกของยีนซ่อมแซมเซลล์กระดูกอ่อน : Effects of the anti-inflammatory drug, Ketorolac, on chondrocyte apoptosis and expression of repair genes

รหัสโครงการวิจัย MTU-EC-OT-4-062/55

ผู้วิจัย

1. อาจารย์ ดร. รัชนิกร ชรรวมโชติ
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ฌัฐพล ชรรวมโชติ
3. นางสาวนริศรัตน์ รุ่งเรือง

หน่วยงานที่รับผิดชอบ โครงการจัดตั้งภาควิชาศัลยศาสตร์ออร์โธปิดิกส์
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
โทร. 02-926-9775

เอกสารที่รับรอง

1. แบบเสนอโครงการวิจัย
 - แบบคำชี้แจงอาสาสมัคร (Patient or subject information sheet)
 - ใบยินยอมของอาสาสมัคร (Consent form)

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ชุดที่ 1 คณะแพทยศาสตร์ ได้พิจารณาอนุมัติ
ด้านจริยธรรมการทำวิจัยในคนไว้ดำเนินการวิจัยข้างต้นได้ ตามมติการประชุมครั้งที่ 6/2555 วันที่ 22 มิถุนายน 2555
ระยะเวลาที่อนุมัติ 3 ปี

กำหนดส่งรายงานความก้าวหน้า 1 ปี วันที่ 22 กรกฎาคม 2556

ลงชื่อ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไพบรณ จันทวีวัฒน์)
ประธานคณะกรรมการ

ลงชื่อ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ทิพาพร ชาระวานิช)
อนุกรรมการและเลขานุการ

รูปที่ 13 เอกสารอนุมัติงานวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์

โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ

ภาคผนวก ข

ตารางค่า Ct cycle ที่ได้จากการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี real-time PCR

ตารางที่ 9 ข้อมูลค่า Ct cycle ของยีน *GAPDH*

ยีน <i>GAPDH</i>			
ตัวอย่างที่	Ct cycle		
	ความเข้มข้นยา 0 mg/ml	ความเข้มข้นยา 1 mg/ml	ความเข้มข้นยา 5 mg/ml
1	31.51	30.32	30.52
2	29.45	29.21	29.30
3	31.83	29.58	31.28
4	33.73	28.87	30.21
5	28.45	28.50	28.74
6	29.14	27.84	28.65
7	27.48	27.81	28.42
8	29.73	29.54	30.04
9	29.60	28.67	29.26

ตารางที่ 10 ข้อมูลค่า Ct cycle ของยีน *ACAN*

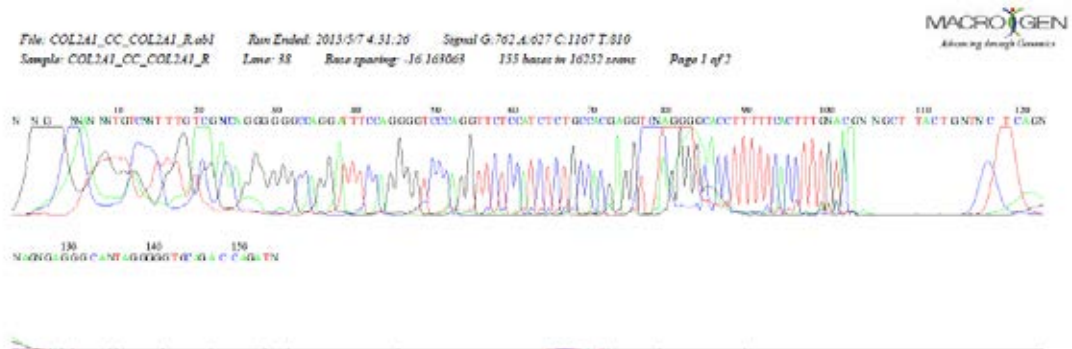
ยีน <i>ACAN</i>			
ตัวอย่างที่	Ct cycle		
	ความเข้มข้นยา 0 mg/ml	ความเข้มข้นยา 1 mg/ml	ความเข้มข้นยา 5 mg/ml
1	31.27	29.84	29.45
2	28.47	29.27	28.93
3	29.59	28.39	30.61
4	31.75	29.26	29.60
5	25.52	26.90	26.89
6	27.39	27.46	28.17
7	27.53	27.41	27.39
8	28.76	29.15	29.04
9	27.79	27.75	28.22

ตารางที่ 11 ข้อมูลค่า Ct cycle ของยีน *BMP2*

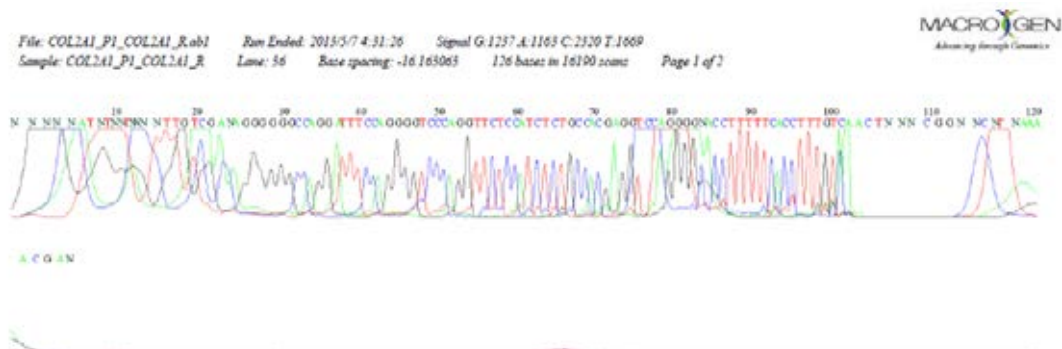
ยีน <i>BMP2</i>			
ตัวอย่างที่	Ct cycle		
	ความเข้มข้นยา 0 mg/ml	ความเข้มข้นยา 1 mg/ml	ความเข้มข้นยา 5 mg/ml
1	38.48	32.30	38.22
2	35.52	32.07	35.50
3	34.48	33.31	35.34
4	34.33	31.94	33.61
5	34.80	33.11	35.28
6	33.51	31.51	33.36
7	32.53	31.91	32.95
8	35.69	34.02	35.62
9	35.51	34.35	35.67

ภาคผนวก ก

ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในขั้นตอนการสังเคราะห์ยีน *COL2A1*
จาก commercial chondrocyte และตัวอย่างเซลล์ที่สกัดได้จากผู้ป่วย



รูปที่ 14 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COL2A1* จาก commercial chondrocyte



รูปที่ 15 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COL2A1* จากเซลล์ที่สกัดได้จากผู้ป่วย
ตัวอย่างที่ 1

ภาคผนวก ง

ตารางจำนวน passage ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 12 ตารางจำนวน passage

ตัวอย่างที่	เพศ	passage ที่ใช้ ในการวิจัย
1	หญิง	2
2	หญิง	2
3	หญิง	1
4	หญิง	2
5	หญิง	0
6	หญิง	0
7	หญิง	0
8	หญิง	0
9	หญิง	0

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ – นามสกุล นางสาวนารีรัตน์ รุ่งเรือง

วันเดือนปีเกิด 15 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2531

สถานที่เกิด จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ที่อยู่ปัจจุบัน 7 ซอยลาดพร้าว94 ถนนลาดพร้าว แขวงพลับพลา เขตวังทองหลาง กทม.
10310

เบอร์โทรศัพท์ 081-4464263

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต พ.ศ. 2552

จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประวัติเผยแพร่ผลงาน เผยแพร่ผลงานวิจัยการประชุมวิชาการระดับชาติสวนดุสิต : วันนักวิจัย

วิทยาศาสตร์ 2013 หัวข้อเรื่อง ผลของยาแก้แอสเพอรินที่มียา

การตายของเซลล์กระดูกอ่อน