



# รายงานการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) บทบาทของ cytotoxic molecule ในการเกิดพยาธิสภาพของโรคข้อเสื่อม

(ภาษาอังกฤษ) The role of cytotoxic molecules in the pathogenesis of osteoarthritis

หน่วยงาน: หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายชื่อผู้วิจัย: 1. อ.พญ.ดร. รังสิมา เจริญตระกูล (ผู้วิจัยหลัก)

หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. อ.นพ. จิรันดร อภินันท์ (ผู้วิจัยร่วม)

ภาควิชาออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ศ.นพ.อารี ตनावลี (ผู้วิจัยร่วม)

ภาควิชาออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## **Acknowledgement (กิตติกรรมประกาศ)**

โครงการวิจัยในรายงานการวิจัยฉบับนี้ ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยจากรัฐบาล  
ประจำปีงบประมาณ 2561 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (This research is funded by Chulalongkorn  
University.)

## บทคัดย่อ (ภาษาไทย)

โรคข้อเข่าเสื่อมเป็นโรคที่เกิดจากการเสื่อมสลายของส่วนประกอบต่างๆบริเวณข้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแตกสลายตรงบริเวณกระดูกอ่อนผิวข้อ ส่งผลให้ **chondrocyte** ซึ่งเป็นเซลล์สำคัญในบริเวณนี้สูญเสียคุณสมบัติในการควบคุมสมดุลในการสร้างและสลายกระดูกอ่อนไป ทำให้เกิดอาการเสื่อมของข้อ นอกจากนี้ตัว **chondrocyte** เองยังสามารถกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน อาทิเช่น **T cell** ในผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมได้ ซึ่งอาจจะเป็นตัวแปรสำคัญที่ทำให้เกิดความรุนแรงของโรคในผู้ป่วยได้ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่า **chondrocyte** มีกลไก ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้อย่างไร ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาหาปัจจัยที่ทำให้ **chondrocyte** ในผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมเปลี่ยนคุณสมบัติไป รวมทั้งต้องการที่จะศึกษากลไกที่ **chondrocyte** ใช้กระตุ้น **T cell** ด้วย โดยจากการศึกษาพบว่า **chondrocyte** ของผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมจะมีการแสดงออกของ **MHC class I** และ **II** บนผิวเซลล์มากขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วย **Interferon gamma (IFN $\gamma$ )** รวมทั้งเมื่อกระตุ้นเซลล์ร่วมกับ **proteoglycan aggrecan peptide** พบว่า **p263-280** สามารถเหนี่ยวนำให้ **chondrocyte** มีการแสดงออกของ **CD86** บนผิวเซลล์มากขึ้นเช่นกัน ซึ่งชี้ให้เห็นว่า **p263-280** อาจจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ **chondrocyte** เปลี่ยนคุณสมบัติไปเป็น **antigen presenting cell** ได้ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังคงต้องดำเนินต่อไปเพื่อดูว่า **chondrocyte** จะสามารถ นำเสนอ **p263-280** ให้แก่ **T cell** ได้หรือไม่และมีกลไกการกระตุ้น **T cell** อย่างไร และผลการศึกษาที่ได้จะเป็นความรู้ที่สำคัญที่จะนำไปพัฒนาการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมได้มากยิ่งขึ้น

## Abstract

Osteoarthritis (OA) is an inflammatory disorder characterized by degeneration of joint components, especially cartilage. Chondrocyte is one of the cell type found in cartilage playing a role in cartilage production and degradation. Several studies found that, not only control the metabolism of cartilage, but the chondrocyte also play a role in immune response that perpetuate the osteoarthritis in OA patients. However, the mechanism of chondrocyte to stimulate T cell or other immune cells has still limited. In this study, we need to investigate the factors that can stimulate chondrocyte and identify the mechanism that the chondrocyte stimulate T cell in OA. We found that OA chondrocyte express MHC class I and II on their surface in high level after IFN gamma stimulation. Also, proteoglycan aggrecan peptides, especially p 263-280, can stimulate chondrocyte to express CD86, which is an important marker for antigen presentation, on their surface. These data indicated that IFN gamma combined with proteoglycan aggrecan peptide p263-280 can induce antigen presentation function of chondrocyte in OA condition. However, the ability of chondrocyte to present antigen p263-280 to autologous T cell and their mechanism will be further investigate to fulfill the knowledge of OA disease and used as a platform for further clinical development.

## สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

Acknowledgement (กิตติกรรมประกาศ) .....	2
บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	3
Abstract.....	4
สารบัญภาพ (List of Illustrations) .....	6
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations).....	7
บทนำ (Introduction).....	8
เนื้อเรื่อง (Main Body) .....	10
วิธีการทดลอง (Materials and methods) .....	10
ผลการทดลอง (Results) .....	13
อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion) .....	24
ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ เกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป (Conclusion and Further Directions) .....	24
Bibliography .....	24

## สารบัญภาพ (List of Illustrations)

<b>รูปที่ 1</b> แสดง Chondrocyte cell line (passage ที่ 9) .....	13
<b>รูปที่ 2</b> แสดงการกระตุ้น chondrocyte cell line ด้วย granulysin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง .....	14
<b>รูปที่ 3</b> แสดงการกระตุ้น chondrocyte cell line ด้วย granulysin เป็นเวลา 48 ชั่วโมง .....	15
<b>รูปที่ 4</b> การแสดงออกของ HLA-ABC (MHC class I) และ HLA-DR (MHC class II) บนผิวของ chondrocyte cell line เมื่อถูกกระตุ้นด้วย recombinant granulysin .....	16
<b>รูปที่ 5</b> แสดงผลการหลั่ง cytokine IL1 $\beta$ และ TNF $\alpha$ ภายใน chondrocyte cell line หลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วย granulysin .....	17
<b>รูปที่ 6</b> แสดงผลการแยก chondrocyte primary cell จากกระดูกอ่อนของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม .....	18
<b>รูปที่ 7</b> แสดงผลการตรวจสอบคุณสมบัติของ primary chondrocyte โดยการตรวจวัดการผลิต collagen type II .....	19
<b>รูปที่ 8</b> การแสดงออกของ HLA-ABC (MHC class I) และ HLA-DR (MHC class II) บนผิวของ chondrocyte primary cell เมื่อกระตุ้นด้วย recombinant IFN $\gamma$ ร่วมกับ proteoglycan aggrecan peptide .....	20
<b>รูปที่ 9</b> แสดง Fold change ของ mean fluorescence intensity เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ HLA-ABC (MHC class I) และ HLA-DR (MHC class II) บนผิวของ chondrocyte primary cell .....	21
<b>รูปที่ 10</b> การแสดงออกของ Costimulatory protein (CD40, CD80 และ CD86) บนผิวของ chondrocyte primary cell เมื่อกระตุ้นด้วย recombinant IFN $\gamma$ ร่วมกับ proteoglycan aggrecan peptide .....	22
<b>รูปที่ 11</b> แสดง Fold change ของ mean fluorescence intensity เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ Costimulatory protein (CD40, CD80 และ CD86) บนผิวของ chondrocyte primary cell .....	23

## คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

CD	:	Cluster of differentiation
CO <sub>2</sub>	:	Carbon dioxide
DMSO	:	Dimethyl sulfoxide
EDTA	:	Ethylenediaminetetraacetic acid
FACS	:	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	:	Fetal bovine serum
HLA	:	Human leukocyte antigen
IFN $\gamma$	:	Interferon gamma
IL	:	Interleukin
ml	:	Milliliter
ng	:	Nanogram
PBS	:	Phosphate-buffered saline
rpm	:	Round per minute
TNF $\alpha$	:	Tumor necrosis factor alpha
$\mu$ g	:	Microgram
$\mu$ l	:	Microliter

## บทนำ(Introduction)

โรคข้อเข่าเสื่อม (osteoarthritis) เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากการเสื่อมสภาพของข้อเข่า ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยหลากหลาย เช่น อายุ เพศ น้ำหนักตัวที่มากเกินไป พันธุกรรม อุบัติเหตุ การหกล้มหรือการกระแทก จนทำให้เกิดการสึกกร่อนของกระดูกอ่อนผิวข้อ (articular cartilage) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ช่วยในการเคลื่อนไหว หากเป็นมากและยังไม่ได้ได้รับการรักษาอาจลุกลามไปยังกระดูกใต้ชั้นกระดูกอ่อน (subchondral bone) และอาจเป็นสาเหตุให้เกิดการอักเสบของผิวข้อ (synovial membrane) หากเศษกระดูกอ่อนเหล่านี้หลุดเข้าไปในน้ำไขข้อ (synovial fluid) ก็อาจไปตีบแทงส่วนของเนื้อเยื่อในบริเวณรอบๆ ข้อเข่า ส่งผลให้เกิดอาการเจ็บปวด ข้อบวม เคลื่อนไหวติดขัด บางรายอาจมีการผิดรูปของข้อร่วมด้วย ซึ่งจะส่งผลให้เกิดความยากลำบากในการดำเนินชีวิตของผู้ป่วย (1)

ในปัจจุบันพบว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคข้อเสื่อมนั้นมีเป็นจำนวนมาก และมากกว่า 70% ของผู้ป่วยเหล่านี้มีอาการเสื่อมที่บริเวณข้อเข่า ซึ่งโรคเหล่านี้เป็นโรคที่สร้างความเจ็บปวดทรมานแก่ผู้ป่วยและยังไม่สามารถหาวิธีรักษาให้หายได้แม้ในผู้ป่วยที่ยังมีอาการไม่รุนแรงก็ตาม นอกเสียจากจะทำการผ่าตัดเปลี่ยนเข่า ซึ่งก็ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง และอันตราย (2) ทั้งนี้มีงานวิจัยจำนวนมากที่พยายามจะศึกษาถึงกลไกของโรคข้อเข่าเสื่อมตลอดจนสาเหตุของการเกิดอาการเจ็บปวดในผู้ป่วย เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการรักษาต่อไป

ระบบภูมิคุ้มกันเป็นกระบวนการหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญต่ออาการเจ็บปวดของผู้ป่วยเป็นอย่างมาก โดยสาเหตุหลักเกิดจากการสูญเสียการทำงานของ chondrocyte ซึ่งเป็นเซลล์ที่สำคัญในกระดูกอ่อนผิวข้อ ทำหน้าที่ในการสร้างและสลายกระดูกอ่อนและทำให้กระดูกอ่อนนั้นคงสภาพอยู่ได้ เมื่อ chondrocyte ถูกทำลายหรือสูญเสียการทำงานก็จะทำให้ร่างกายไม่สามารถสร้างหรือซ่อมแซมกระดูกอ่อนที่ชำรุดบริเวณข้อได้ (3, 4) รวมทั้งเมื่อเศษกระดูกอ่อนที่หลุดออกมาไปสัมผัสกับเนื้อเยื่อที่ผิวข้อจะเปรียบเสมือนสิ่งแปลกปลอมของร่างกายที่กระตุ้นให้เซลล์บริเวณนั้นๆ ได้แก่ synovial cell, fibroblast และ macrophage หลั่งสารต่างๆ เช่น cytokines หรือ prostaglandin ไปกระตุ้นเซลล์อื่นๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน อาทิ เช่น T cell, B cell, macrophage และ NK cell โดยปริมาณเซลล์เหล่านี้จะแปรผันตามระดับความรุนแรงของโรค (5-7) จึงทำให้พบ cytokines เช่น TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  (8, 9) และ cytotoxic molecule เช่น granzysin, granzyme และ fas ligand (10) ในผิวข้อและน้ำไขข้อของผู้ป่วยเป็นจำนวนมากเมื่อเทียบกับคนปกติ ซึ่งโมเลกุลเหล่านี้จะช่วยกระตุ้นกระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) (11) ทำให้เกิดความเสียหายแก่เนื้อเยื่อเพิ่มขึ้น รวมถึงกระตุ้น chondrocyte ให้หลั่งเอนไซม์ matrix metalloproteinases (MMPs) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการสลายกระดูกอ่อนด้วย (12) นอกจากนี้แล้วในน้ำไขข้อของผู้ป่วยยังพบว่ามี



proteoglycan และ aggrecan peptide ซึ่งเกิดจากการสลายของเนื้อกระดูกอ่อน (13) ที่สามารถกระตุ้น เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันโดยเฉพาะอย่างยิ่ง T cell ได้เช่นเดียวกัน โดยงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า proteoglycan aggrecan peptide p263-280 และ p16-30 สามารถกระตุ้น T cell ของผู้ป่วยข้อเสื่อมให้ สร้าง cytokine IFN $\gamma$  ได้มากกว่าในคนปกติ (14) แต่อย่างไรก็ตามการที่ peptide จะกระตุ้น T cell ได้นั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะ peptide นั้นจะต้องถูกนำเสนอผ่าน antigen presenting cell

Chondrocyte นอกจากจะเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมเมตาบอลิซึมของกระดูกอ่อน บริเวณข้อเข่าแล้ว มันยังมีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย โดยในการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า chondrocyte ของผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมสามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย IL1 $\beta$  โดยการผลิต cytokine จำนวนมาก เช่น IL1 $\alpha$ , IL2, IL3, IL4, IL5 และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง IL1 $\beta$ , IL6 และ IL7 (15) รวมทั้งยัง พบว่า chondrocyte สามารถกระตุ้น T cell ในเลือดให้มีการเพิ่มจำนวนขึ้นได้ และในทางกลับกัน T cell ของผู้ป่วยที่เป็นโรคข้อเสื่อมก็สามารถกระตุ้น chondrocyte ให้มีการสร้างเอนไซม์ matrix metalloproteinases (MMPs) เพื่อย่อยผิวกระดูกอ่อนมากขึ้น(16) รวมทั้งผลิต chemokine เช่น RANTES หรือ CCL5 ซึ่งเป็น chemokine สำคัญในการเรียกให้ T cell มายังบริเวณนั้นมากขึ้นด้วย (17) นอกจากนี้ยังพบว่า chondrocyte ของผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม มีการแสดงออกของ major histocompatibility complex (MHC) class I และ class II บนผิวเซลล์มากกว่าในคนปกติด้วย (18) ซึ่งการแสดงออกของ โมเลกุล MHC นั้นเป็นลักษณะสำคัญของ antigen presenting cell จึงชี้ให้เห็นว่า chondrocyte สามารถ ทำหน้าที่เป็น antigen presenting cell ได้ รวมทั้งยังพบว่า chondrocyte ในผู้ป่วย Ankylosing spondylitis มีการแสดงออกของ MHC class I HLA-B27 ได้มากขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วย IFN- $\gamma$  และเมื่อนำ chondrocyte ที่ถูกกระตุ้นนี้ มากระตุ้นด้วย Epstein Barr viral peptide EBNA258-266 แล้วนำไป co-culture กับ autologous T cell พบว่า สามารถกระตุ้นให้ T cell มีการหลั่ง IFN- $\gamma$  เพิ่มขึ้น และใน ขณะเดียวกันก็มีการสร้าง perforin และ granzyme B มากขึ้นด้วย เมื่อเทียบกับสถานะที่ไม่มี peptide มา กระตุ้น (19) จากงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่า chondrocyte สามารถนำเสนอ antigen ให้แก่ T cell ซึ่งเมื่อ เทียบกับคนปกติแล้ว chondrocyte ของคนปกติไม่สามารถเกิดเหตุการณ์เช่นนี้ได้

จากการศึกษาทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่า chondrocyte มีบทบาทสำคัญอย่างมากในการขับเคลื่อนให้ เกิดความรุนแรงของโรคได้ในผู้ป่วย แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาใดที่จะระบุถึงปัจจัยที่ทำให้ chondrocyte นั้นสูญเสียความสามารถในการสร้างกระดูกอ่อน และเปลี่ยนไปเป็น antigen presenting cell ได้ รวมทั้งยังไม่ทราบแน่ชัดว่า chondrocyte นั้นมีกลไกที่สามารถกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยข้อ เข่าเสื่อมได้อย่างไร ดังนั้นในการศึกษารุ่นนี้จึงมุ่งเน้นที่จะหาโมเลกุล หรือปัจจัยที่สามารถเปลี่ยนคุณสมบัติ

ของ chondrocyte จากกระดูกอ่อนผิวข้อของผู้ป่วยให้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ รวมทั้งจะศึกษากลไก (mechanism) ของ chondrocyte ในการกระตุ้น T cell ตลอดจนกลไกของ T cell ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นนั้นว่าผ่านกลไกใดบ้าง ซึ่งหากสามารถหากลไก หรือ pathway ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ หรือ หากทราบได้ว่าโมเลกุลใดเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของ chondrocyte ก็จะสามารถนำความรู้ที่ได้ไปพัฒนาเพื่อผลิตยามาต้านการเกิดโรคในผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมได้โดยตรงด้วย

## เนื้อเรื่อง (Main Body)

### วิธีการทดลอง (Materials and methods)

#### 1. วิธีการเลี้ยง chondrocyte cell line

นำ chondrocyte cell line passage ที่ 7 ซึ่งได้จากห้องแล็บของทางอาจารย์สุพรรณมาเลี้ยงใน T-75 flask ที่มีอาหาร DMEM อยู่ 20 ml จากนั้นนำไปเลี้ยงที่ 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 5 วัน จนเมื่อส่องดูภายใต้กล้องแล้วเซลล์มีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็น 80% จากนั้นทำการ passage เซลล์ โดยดูดอาหารออกจาก flask แล้วใส่ 0.05% Trypsin/EDTA solution ลงใน flask บ่มที่ 37 °C ประมาณ 3-5 นาที จนมองเห็นว่าเซลล์หลุดจาก flask หมดแล้วจึงเติมอาหารปริมาตร 10 ml ลงไปเพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ จากนั้นล้างเซลล์โดยการนำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ 1500 rpm นาน 10 นาที แล้วนำเซลล์ที่ได้มาเติมด้วยอาหาร 15 ml เพื่อปรับความเข้มข้นเป็น 20,000 cell/ml แล้วดูดเซลล์ 5 ml ใส่ลงใน flask T-175 อันใหม่ที่มีอาหารอยู่ 30 ml จากนั้นก็เลี้ยงเซลล์ต่อเพื่อใช้สำหรับการทดลองต่อไป เซลล์ส่วนหนึ่งจะถูกแบ่งเก็บเป็น stock โดยใส่ใน 10% DMSO และ 90% FBS จากนั้นเก็บลงใน liquid nitrogen

#### 2. กระตุ้น chondrocyte cell line ด้วย recombinant granulysin

นำ chondrocyte cell line จำนวน 50,000 cell มาเลี้ยงใน 24 well plate ซึ่งมีอาหาร DMEM อยู่ปริมาตร 500 µl เลี้ยงเซลล์ที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะกับ plate โดยสมบูรณ์ จากนั้นใส่ recombinant granulysin ลงในแต่ละ well เป็นความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0, 1, 10 และ 25 ng/ml อีก 1 ชั่วโมงต่อมา ใส่ brefeldin เข้มข้น 20 µg/ml จากนั้นเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 หรือ 48 ชั่วโมง จึงทำการ trypsinize เซลล์ แล้วนำไปย้อมด้วย antibody เพื่อดู marker ต่างๆ

### 3. การย้อมผิวเซลล์ของ **chondrocyte cell line**

หลังจาก trypsinize เซลล์ให้หลุดออกจาก flask แล้ว เซลล์จะถูกนำไปใส่ใน 96 well-V bottom plate จากนั้นปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ 1500 rpm นาน 5 นาทีเพื่อกำจัดอาหารทิ้งไป เซลล์ที่อยู่ก้น plate จะถูกนำมา ย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CD40, CD80, CD86, HLA-ABC และ HLA-DR ซึ่งที่แอนติบอดีจะมี สี fluorescence ติดอยู่ จากนั้นบ่มที่ 4°C นาน 30 นาทีโดย ในขั้นตอนนี้ห้ามโดนแสง แล้วจึงทำการล้างเซลล์ และ resuspend เซลล์ ใน FACS wash buffer (PBS ที่มี 2% FBS) และนำเซลล์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วย flow cytometer

### 4. การย้อม cytokine ภายในเซลล์

หลังจากกระตุ้นเซลล์ด้วย granulysin ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ เพื่อศึกษา cytokine ที่ถูกสร้างขึ้นจึงนำ chondrocyte cell line มาย้อมผิวเซลล์ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HLA-ABC, CD40 และ CD80 โดยบ่มในน้ำแข็งนาน 30 นาที ในที่มีด จากนั้นล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วย FACS wash buffer หลุมละ 200  $\mu$ l และปั่นเหวี่ยงที่ 4 °C ความเร็วรอบ 1,500 rpm นาน 5 นาที จากนั้นใส่ 1% formaldehyde หลุมละ 200  $\mu$ l เพื่อรักษาสภาพของเซลล์ โดยบ่มที่ 4°C นาน 30 นาที จากนั้นปั่นล้างเซลล์และทำการเจาะรูเซลล์ ด้วย 0.3% saponin พร้อมทั้งทำการย้อม cytokine ภายในเซลล์ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ cytokine IL1 $\beta$  และ TNF $\alpha$  โดยบ่มในน้ำแข็งนาน 45 นาที แล้วจึงล้างเซลล์ 2 ครั้งและ resuspend เซลล์ด้วย FACS wash แล้วจึงนำไปตรวจสอบด้วย flow cytometer

### 5. วิธีแยก **primary chondrocyte** จาก **cartilage** ของผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม

นำกระดูกอ่อนของผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมที่ได้จากห้องผ่าตัดมาแช่ใน PBS นาน 15 นาที เพื่อกำจัดเซลล์เม็ดเลือดแดงที่อาจปนเปื้อนมาจ จากนั้นตัดกระดูกอ่อนเป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 2-3 มิลลิเมตร แล้วจึงนำชิ้นกระดูกอ่อนที่ตัดแล้วไปย่อยด้วย 0.15 mg pronase ใน อาหาร DMEM 15 ml แล้วนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำ ชิ้นส่วนกระดูกอ่อนมาล้างด้วย อาหาร DMEM 20 ml 2 ครั้ง แล้วนำไปใส่ในอาหาร DMEM 15 ml ที่มี collagenase type II อยู่ 0.05 mg ซึ่งอยู่ใน cell culture plate จากนั้นนำ plate ไปบ่มที่ตู้เลี้ยงเซลล์ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยการกรองเซลล์ผ่าน cell strainer ขนาด 40  $\mu$ m แล้วล้างเซลล์ด้วย DMEM 20 ml อีก 2 ครั้ง จากนั้นทำการเลี้ยงเซลล์ใน 12 well plate โดยใส่เซลล์ที่มีความเข้มข้น  $5 \times 10^5$  cells/ml/well และเลี้ยงเซลล์เป็นเวลานาน 5-6 วัน จึงเริ่มทำการทดลอง

## 6. การย้อม collagen type II ใน primary cell

Primary chondrocyte ที่แยกได้ และเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 วัน 9 วัน และเซลล์ใน passage 1 จะถูกนำมาตรวจสอบการผลิต collagen type II ภายในเซลล์ โดยเริ่มจากล้างเซลล์ใน plate ด้วย 500  $\mu$ l PBS 3 ครั้ง จากนั้น Fix cell ด้วย 4% formaldehyde ใน PBS 500  $\mu$ l นาน 15 นาที ที่ 37°C แล้วล้างเซลล์ด้วย 500  $\mu$ l PBS 3 ครั้ง แล้วทำการเจาะรูเซลล์ด้วย 0.1% triton X-100 ใน PBS 500  $\mu$ l นาน 10 นาที ที่ 4°C แล้วล้างเซลล์ด้วย 500  $\mu$ l PBS 3 ครั้ง จากนั้น block cell ด้วย 2% BSA ใน PBS 500  $\mu$ l ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างเซลล์ด้วย 500  $\mu$ l จากนั้นย้อมเซลล์ด้วย 1  $\mu$ g/ml primary antibody ที่จำเพาะต่อ collagen type II แล้วบ่มที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วล้างเซลล์ด้วย 500  $\mu$ l PBS 3 ครั้ง จากนั้นย้อมเซลล์อีกครั้งด้วย secondary antibody ที่ติดสี fluorescence AF-488 ความเข้มข้น 1/1000 นาน 1 ชั่วโมง โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง ห้ามโดนแสง แล้วล้างเซลล์ด้วย 500  $\mu$ l PBS 3 ครั้ง จากนั้นไปตรวจวัด collagen type II ได้โดยใช้ flow cytometer หรือ fluorescence microscope

## 7. กระตุ้น primary chondrocyte ด้วย IFN $\gamma$ และ proteoglycan aggrecan peptide

หลังจากที่แยก primary chondrocyte ได้แล้ว นำเซลล์  $5 \times 10^5$  cells มาเลี้ยงใน 12 well ซึ่งมีอาหาร DMEM อยู่ 1 ml เป็นระยะเวลา 6 วัน ที่ 37 °C เพื่อให้เซลล์เกาะกับ plate โดยสมบูรณ์ จากนั้นกระตุ้นเซลล์ด้วย proteoglycan aggrecan peptide P263-280, P16-31 หรือ P237-2394 (ความเข้มข้น 10  $\mu$ g/ml) ในสภาวะที่มีและไม่มี recombinant IFN $\gamma$  (ความเข้มข้น 10 ng/ml) จากนั้นเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงทำการ trypsinize เซลล์ แล้วนำไปย้อมด้วย antibody เพื่อดูการแสดงออกของ marker ต่างๆ

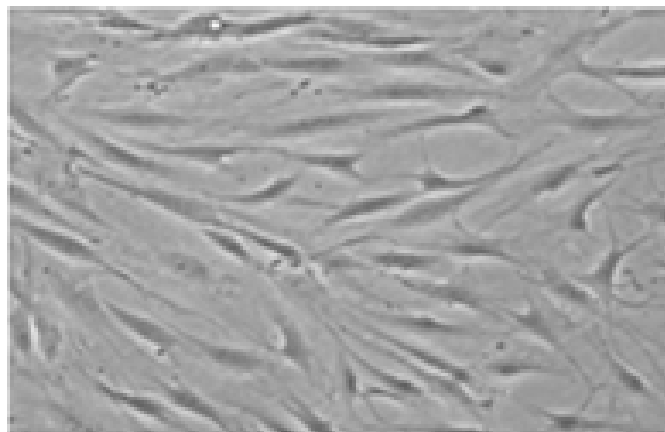
## 8. การย้อมผิวเซลล์ของ primary chondrocyte

หลังจากกระบวนการ trypsinization แล้ว primary chondrocyte ( $5 \times 10^5$  cells/well) จะถูกนำไปใส่ใน 96 well-V bottom plate จากนั้นปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ 1500 rpm นาน 5 นาที เพื่อกำจัดอาหารทิ้งไป เซลล์ที่อยู่กัน plate จะถูกนำมาย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CD40, CD80, CD86, HLA-ABC และ HLA-DR ซึ่งที่แอนติบอดีจะมีสี fluorescence ติดอยู่ จากนั้นบ่มที่ 4°C นาน 30 นาทีโดยในขั้นตอนนี้ห้ามโดนแสง หลังจากนั้นจึงทำการล้างเซลล์ และ resuspend เซลล์ ใน Fixation buffer (PBS ที่มี 2% FBS และ 1% formaldehyde) และนำเซลล์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วย flow cytometer

## ผลการทดลอง (Results)

### การศึกษาใน chondrocyte cell line

Chondrocyte cell line ที่ได้มาจากแลปอื่นเป็นเซลล์ที่อยู่ใน passage ที่ 7 ซึ่งจำเป็นต้องนำมาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพเซลล์ ให้เซลล์ไม่แก่เกินไปและพร้อมที่จะใช้ในการทำการทดลองต่อไป โดยในส่วนนี้ เซลล์จะถูกนำมา passage เพื่อส่วนหนึ่งจะถูกเก็บไว้เป็น cell stock และส่วนหนึ่งจะถูกเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน และเซลล์ที่เลี้ยงได้และนำมาใช้ในการทดลองคือเซลล์ใน passage ที่ 9 แต่สิ่งที่ต้องระวังสำหรับเซลล์ชนิดนี้คือเซลล์จะสามารถเปลี่ยนเป็น fibroblast ได้ หากเลี้ยงไปใน passage ที่มากขึ้น ซึ่งอาจจะมีผลต่อ metabolic ภายในเซลล์ได้ ดังนั้นจึงต้องตรวจสอบลักษณะของเซลล์อยู่เสมอ อย่างไรก็ตามเมื่อนำมาส่องดูภายใต้กล้องพบว่า chondrocyte cell line ใน passage ที่ 9 นี้ เซลล์ยังมีลักษณะเป็น dendrite ยังไม่เปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็น fibroblast จึงยังสามารถใช้ในการทดลองได้อยู่ ดังแสดงในรูปที่ 1

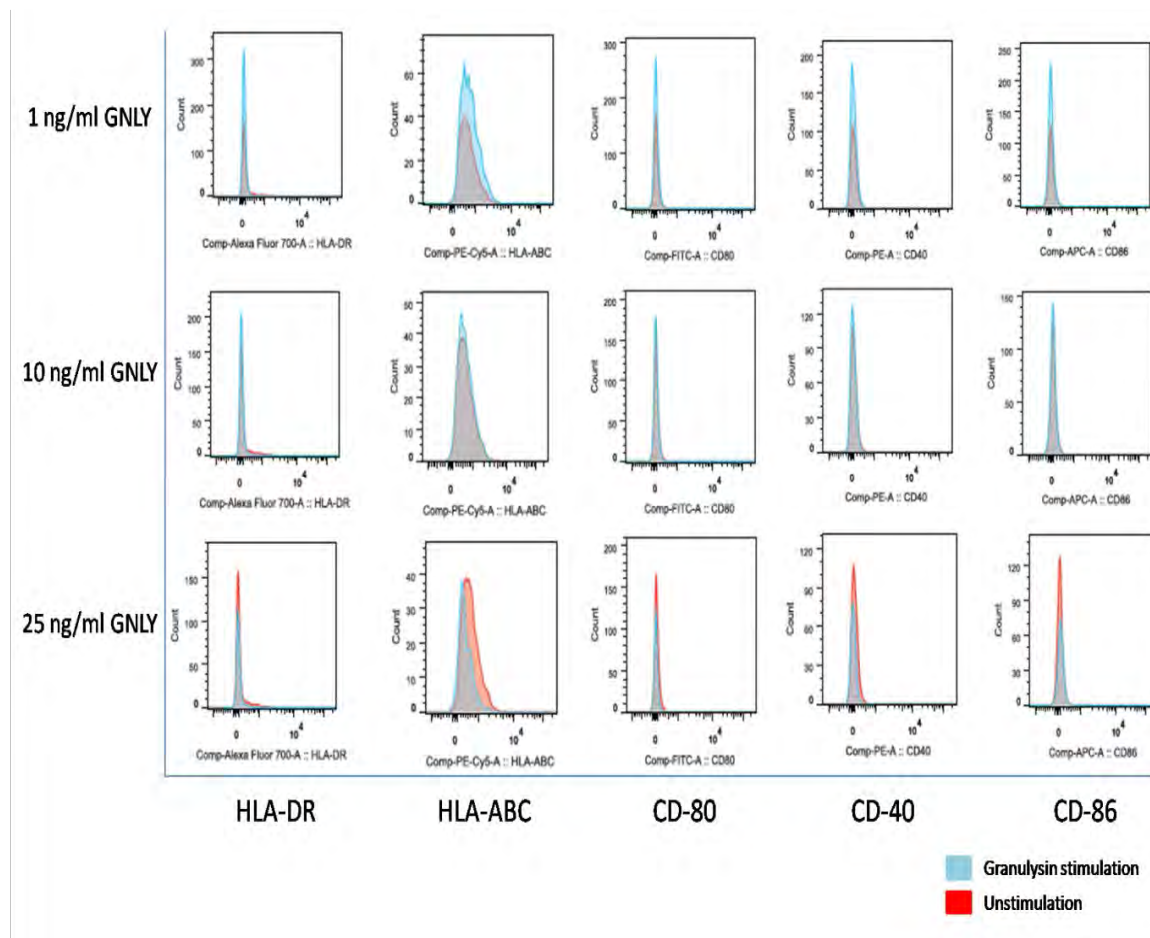


รูปที่ 1 แสดง Chondrocyte cell line (passage ที่ 9)

เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า chondrocyte ในคนไขข้ออักเสบสามารถ ทำหน้าที่เป็น antigen presenting cell ให้กับ T cell ในระบบภูมิคุ้มกันได้ แต่กลไกเป็นอย่างไรนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ประกอบกับการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าใน synovial fluid ของผู้ป่วยมี cytotoxic molecule ซึ่งได้แก่ granulysin และ granzyme B ดังนั้นเพื่อตรวจสอบว่า cytotoxic molecule มีผลต่อการทำงานของ chondrocyte ในการทำหน้าที่เป็น antigen presenting cell ได้จึงได้ล่องนำ chondrocyte cell line มากระตุ้นด้วย recombinant granulysin แล้วดูการแสดงออกของ antigen presenting cell marker บนผิวเซลล์ ซึ่งได้แก่ CD40, CD80, CD86, HLA-ABC และ HLA-DR โดยในการทดลองนี้จะทำกระตุ้น

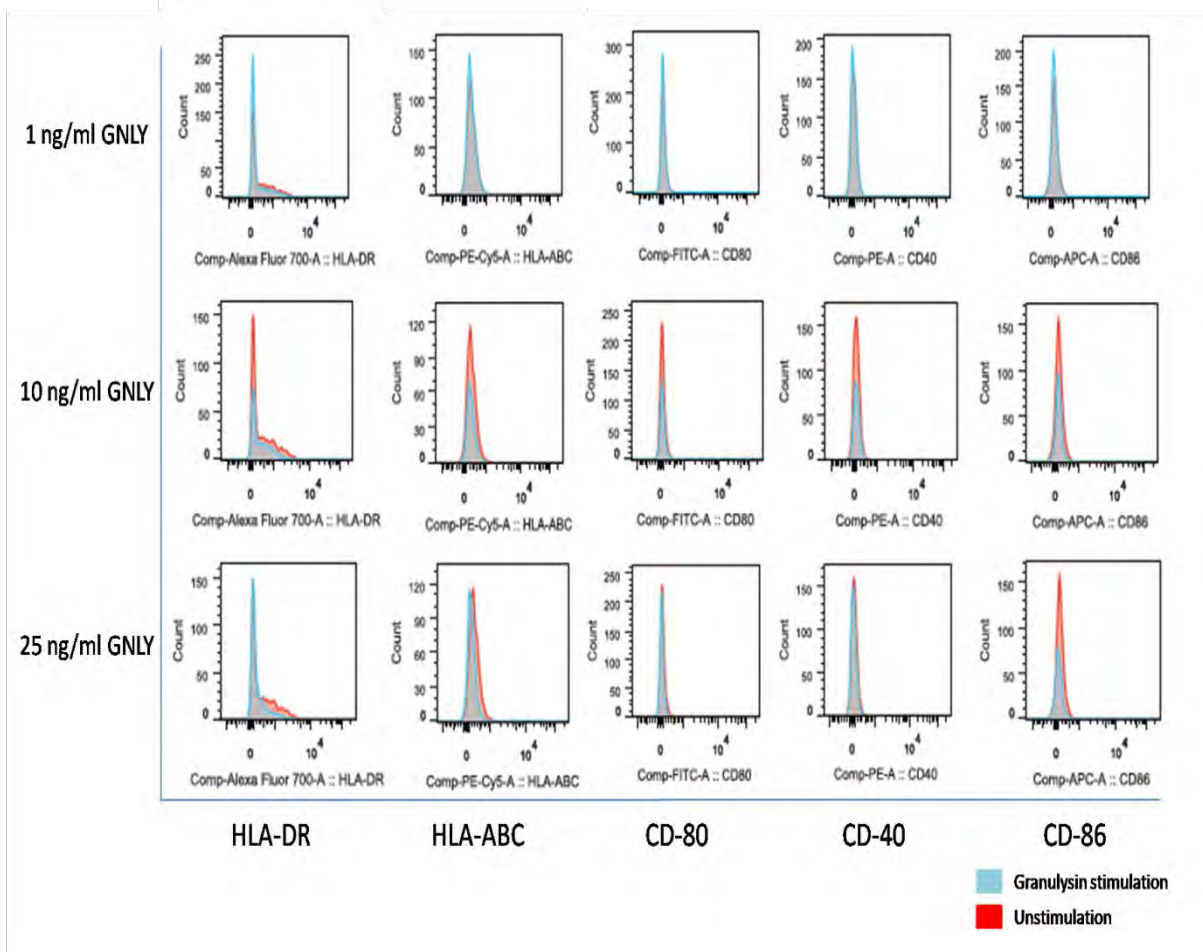
chondrocyte cell line ด้วย granulysin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1, 10 และ 25 ng/ml โดยทำการกระตุ้นนาน 24 และ 48 ชั่วโมง และตรวจสอบการแสดงออกของ surface marker ด้วย flow cytometer

ผลการทดลองที่ 24 ชั่วโมง พบว่า การแสดงออกของ HLA-DR, CD40, CD80 และ CD86 บนผิวของ chondrocyte cell line ที่ถูกกระตุ้นด้วย recombinant granulysin ความเข้มข้นต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกัน มีเพียง HLA-ABC ที่ถูกกระตุ้นด้วย 1 ng/ml granulysin เท่านั้นที่มีการแสดงออกมากกว่าเมื่อเทียบกับในสถานะที่ไม่ถูกกระตุ้น ดังแสดงในรูปที่ 2 และที่ความเข้มข้น 25 ng/ml granulysin พบว่า surface marker ทุกตัวมีการแสดงออกที่ลดลง เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย



รูปที่ 2 แสดงการกระตุ้น chondrocyte cell line ด้วย granulysin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเปรียบเทียบการแสดงออกของ CD40, CD80, CD86, HLA-DR และ HLA-ABC บนผิวของ chondrocyte cell line ในสถานะปกติ (histogram สีแดง) และในสถานะที่ถูกกระตุ้นด้วย recombinant granulysin ที่มีความเข้มข้น 1, 10 และ 25 ng/ml (histogram สีฟ้า)

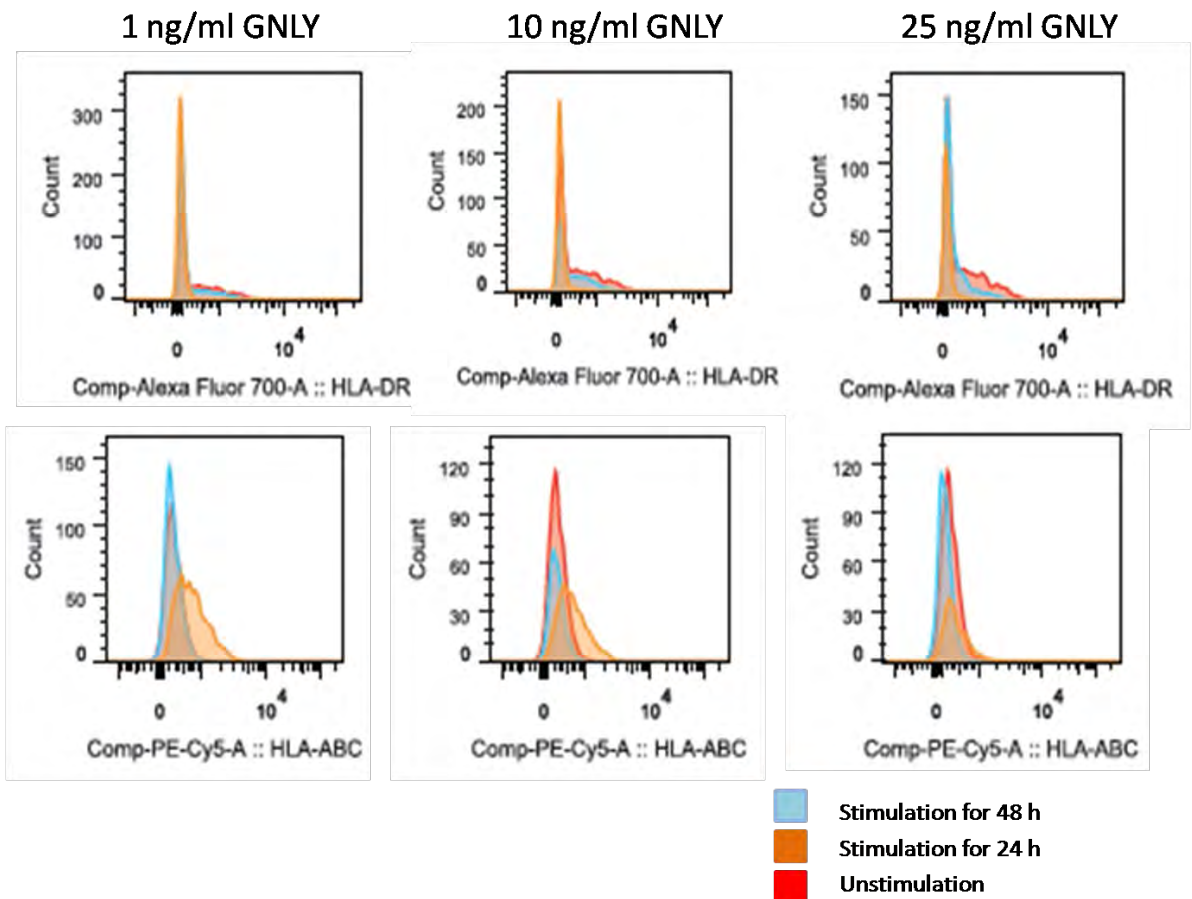
ในขณะที่ผลการทดลองที่ 48 ชั่วโมงหลังการกระตุ้นพบว่า chondrocyte cell line มีการแสดงออกของ HLA-ABC, HLA-DR, CD40, CD80 และ CD86 ในระดับที่ไม่แตกต่างกันเลยทั้งในสภาวะที่ถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นด้วย recombinant granulysin และ ยิ่งใช้ granulysin ในความเข้มข้นที่สูงในการกระตุ้น ก็ยิ่งทำให้ chondrocyte cell line มีการแสดงออกของ surface marker ต่างๆ ลดลงด้วย ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงการกระตุ้น chondrocyte cell line ด้วย granulysin เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเปรียบเทียบการ แสดงออกของ CD40, CD80, CD86, HLA-DR และ HLA-ABC บนผิวของ chondrocyte cell line ในสภาวะปกติ (histogram สีแดง) และในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย recombinant granulysin ที่มีความเข้มข้น 1, 10 และ 25 ng/ml (histogram สีฟ้า)

จากการทดลองพบว่า ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากการกระตุ้น chondrocyte cell line ด้วย recombinant granulysin แล้วมี marker เพียงตัวเดียวที่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับสภาวะที่เซลล์ไม่ได้

ถูกกระตุ้น นั่นคือ HLA-ABC และเมื่อนำผลการทดลองจากที่ 24 และ 48 ชั่วโมงมาเทียบกันดังรูปที่ 4 พบว่า ที่สภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย 1 และ 10 ng/ml ของ granulysin ที่ 24 ชั่วโมงนั้น HLA-ABC จะมีการแสดงออกในปริมาณที่มากกว่าที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งจากการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่า chondrocyte อาจทำหน้าที่เป็น antigen presenting cell ได้ เนื่องจากมีการแสดงออกของ MHC class I ซึ่งก็คือ HLA-ABC บนผิวเซลล์ และคุณลักษณะนี้สามารถถูกกระตุ้นได้โดย cytotoxic molecule อย่าง granulysin โดยสภาวะที่เหมาะสมที่จะใช้ในการทดลองต่อไป คือ 1 ng/ml และกระตุ้นนาน 24 ชั่วโมง

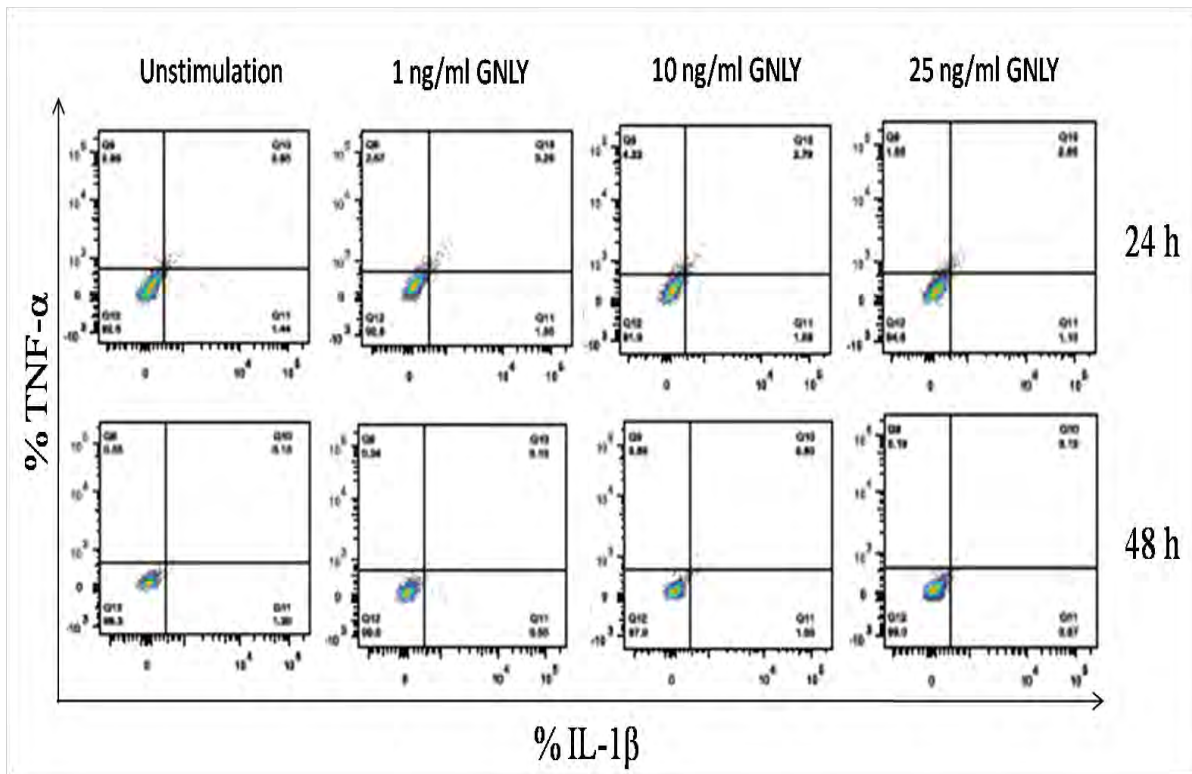


รูปที่ 4 การแสดงออกของ HLA-ABC (MHC class I) และ HLA-DR (MHC class II) บนผิวของ chondrocyte cell line เมื่อถูกกระตุ้นด้วย recombinant granulysin ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 25 ng/ml เป็นระยะเวลา 24 (histogram สีส้ม) และ 48 ชั่วโมง (histogram สีฟ้า) เทียบกับ chondrocyte cell line ในสภาวะปกติ (histogram สีแดง)

จากนั้นจะดูความสามารถในการตอบสนองของ chondrocyte ต่อการกระตุ้นด้วย cytotoxic molecule จึงได้ทำการตรวจวัดการหลั่ง cytokine ซึ่งได้แก่ IL1 $\beta$  และ TNF $\alpha$  ภายใน chondrocyte cell line ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย recombinant granulysin ความเข้มข้น 1 ng/ml นาน 24 ชั่วโมง สามารถกระตุ้นให้ chondrocyte หลั่ง cytokine ได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่ได้กระตุ้น



และสถานะที่ถูกกระตุ้นด้วยความเข้มข้นอื่นๆ โดยหลัง IL-1 $\beta$  ได้ 1.36% หลัง TNF $\alpha$  ได้ 2.57% และ หลัง ทั้ง IL-1 $\beta$  และ TNF $\alpha$  ได้ 3.26% ดังแสดงในรูปที่ 5



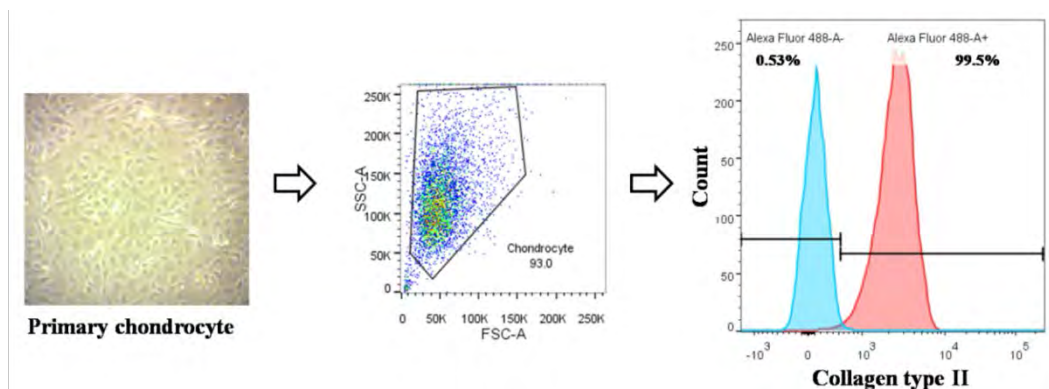
รูปที่ 5 แสดงผลการหลัง cytokine IL1 $\beta$  และ TNF $\alpha$  ภายใน chondrocyte cell line หลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วย granulysin ความเข้มข้น 1, 10 และ 25 ng/ml เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แกน X และ แกน Y แสดงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่หลัง IL1 $\beta$  และ TNF $\alpha$  ตามลำดับ

จากการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า chondrocyte สามารถแสดงออก MHC โดยเฉพาะ HLA-ABC บนผิวเซลล์ จึงน่าจะทำหน้าที่เป็น antigen presenting cell ให้แก่ immune cell ได้ และ คุณสมบัตินี้สามารถถูกกระตุ้นด้วย recombinant granulysin ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อบ่งชี้ได้ว่า cytotoxic molecule สามารถกระตุ้น chondrocyte ได้และความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะใช้ในการทดลองต่อไปคือ 1 ng/ml granulysin และกระตุ้นนาน 24 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองยังไม่ค่อยชัดเจน จึงยังต้องมีการปรับต่อไปเพื่อให้ได้ผลที่ชัดเจนและน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

### การศึกษาใน primary chondrocyte

เนื่องจาก chondrocyte cell line ที่ใช้ในการทดลองนั้นเป็น passage ที่ 9 ซึ่งเซลล์ส่วนใหญ่อาจจะเปลี่ยนเป็น fibroblast และสูญเสียคุณสมบัติบางประการไปแล้ว ดังนั้นจึงได้เปลี่ยนการทดลองมาทำใน

primary chondrocyte จากกระดูกอ่อนบริเวณเข่าของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่มารับการผ่าตัดที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์แทน โดยหลังจากที่ได้รับกระดูกอ่อนของผู้ป่วยมานั้นก็นำมาแยกเซลล์ chondrocyte โดยใช้เอนไซม์ pronase และ collagenase type II เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นก็นำเซลล์ที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมโดยเลี้ยงที่ 37°C เนื่องจาก human chondrocyte มีคุณสมบัติที่สามารถผลิต collagen type II ได้ จึงใช้คุณลักษณะนี้เป็นตัวชี้วัดความบริสุทธิ์ของเซลล์ที่แยกออกมาได้ โดยการนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงมาได้ 5-6 วันมาข้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ collagen type II แล้วตรวจวัดด้วย flow cytometer พบว่าเซลล์ที่แยกออกมาได้นั้นเป็นเซลล์ที่สามารถผลิต collagen type II มากถึง 99.5% (รูปที่ 6) ดังนั้นการแยก primary chondrocyte ด้วยวิธีนี้จึงเหมาะสม และได้ primary chondrocyte ที่บริสุทธิ์มาก

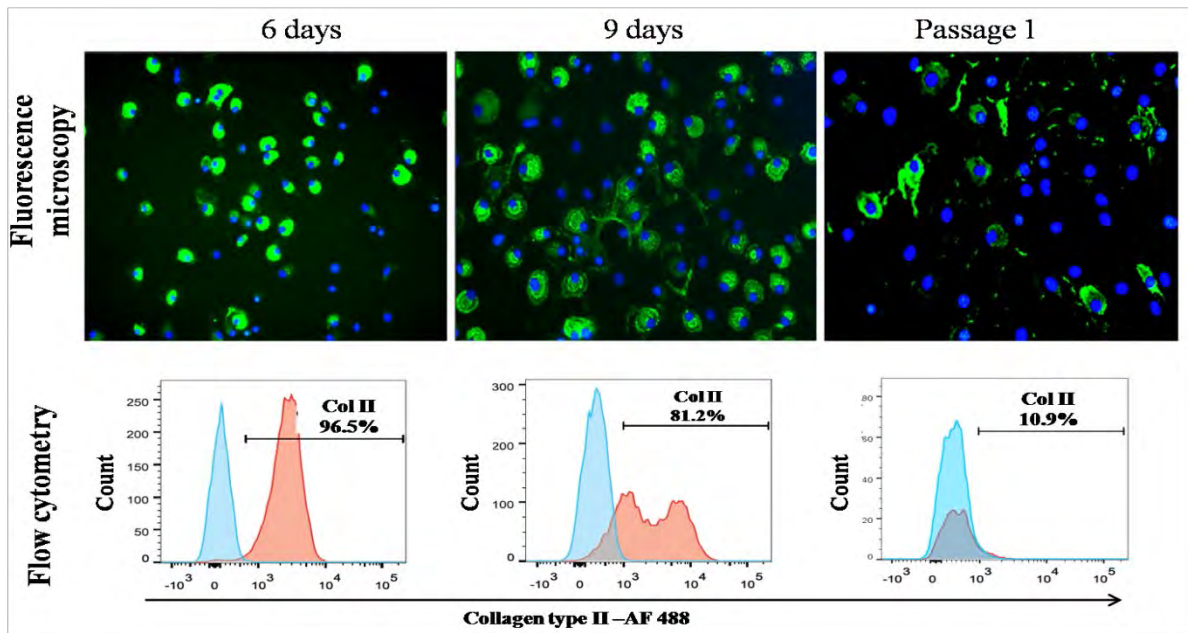


รูปที่ 6 แสดงผลการแยก chondrocyte primary cell จากกระดูกอ่อนของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และตรวจสอบความสามารถในการผลิตโปรตีน collagen type II ของเซลล์ด้วยเทคนิค flow cytometry โดยการข้อมด้วย fluorescence conjugated antibody ที่จำเพาะต่อ collagen type II (histogram สีชมพู) เทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ข้อม antibody (histogram สีฟ้า)

อย่างไรก็ตาม primary chondrocyte ที่แยกออกมาได้นั้นเมื่อเลี้ยงไปเป็นระยะเวลาานก็จะเปลี่ยนเป็น fibroblast ได้เช่นเดียวกับ chondrocyte cell line ดังนั้นจึงต้องทำการตรวจสอบคุณสมบัติของ primary chondrocyte ตามระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์ เพื่อหาเวลาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองต่อไปเนื่องจากถ้าเซลล์เปลี่ยนไปเป็น fibroblast อาจจะทำให้ผลการทดลองในขั้นต่อไปนั้นไม่ถูกต้องได้ โดยในขั้นนี้จะทำการแยกเซลล์ออกมาจากกระดูกอ่อน จากนั้นทำการเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 6 วัน 9 วันและเลี้ยงจนกระทั่งเซลล์นั้นมี confluence มากกว่า 80% แล้วทำการ passage เมื่อได้เซลล์ตามระยะเวลาที่ต้องการแล้ว ก็จะมาข้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ collagen type II อีกครั้ง แล้วตรวจสอบด้วย Fluorescence microscope พบว่า primary chondrocyte ที่เลี้ยงมาได้ 6 วัน และ 9 วันหลังจากการแยกนั้นสามารถผลิต collagen type II ได้ค่อนข้างมากเนื่องจากข้อมติดสีเขียวของ collagen type II antibody แต่เมื่อทำการ passage เซลล์ไปแล้ว 1 ครั้ง พบว่าเซลล์นั้นข้อมติดสีเขียวของ collagen type II

antibody ได้น้อยลงมาก และเมื่อตรวจสอบด้วย flow cytometry ก็ให้ผลที่สอดคล้องกันโดยพบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงที่ 6 และ 9 หลังจากแยกออกมาจากกระดูกอ่อนนั้นเป็นเซลล์ที่สามารถผลิต collagen type II ได้มากถึง 96.5% และ 81.2% ตามลำดับ แต่เซลล์หลัง passage 1 นั้น สามารถผลิต collagen type II ได้ลดลงเหลือเพียง 10.9% เท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 7

จากผลการทดลองในขั้นนี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพาะเลี้ยง primary chondrocyte เป็นระยะเวลาที่นานขึ้น primary chondrocyte จะมีคุณสมบัติที่เปลี่ยนไป ส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากเซลล์ primary chondrocyte เปลี่ยนไปเป็น fibroblast จึงไม่สามารถผลิต collagen type II ได้เหมือนเดิม ซึ่งอาจจะมีผลต่อคุณสมบัติด้านอื่นๆด้วย ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมที่จะนำ primary chondrocyte ไปทำการทดลองนั้นควรเป็น primary cell ที่เลี้ยงไว้มีระยะเวลาไม่เกิน 9-10 วัน นับจากวันที่ทำการแยกเซลล์

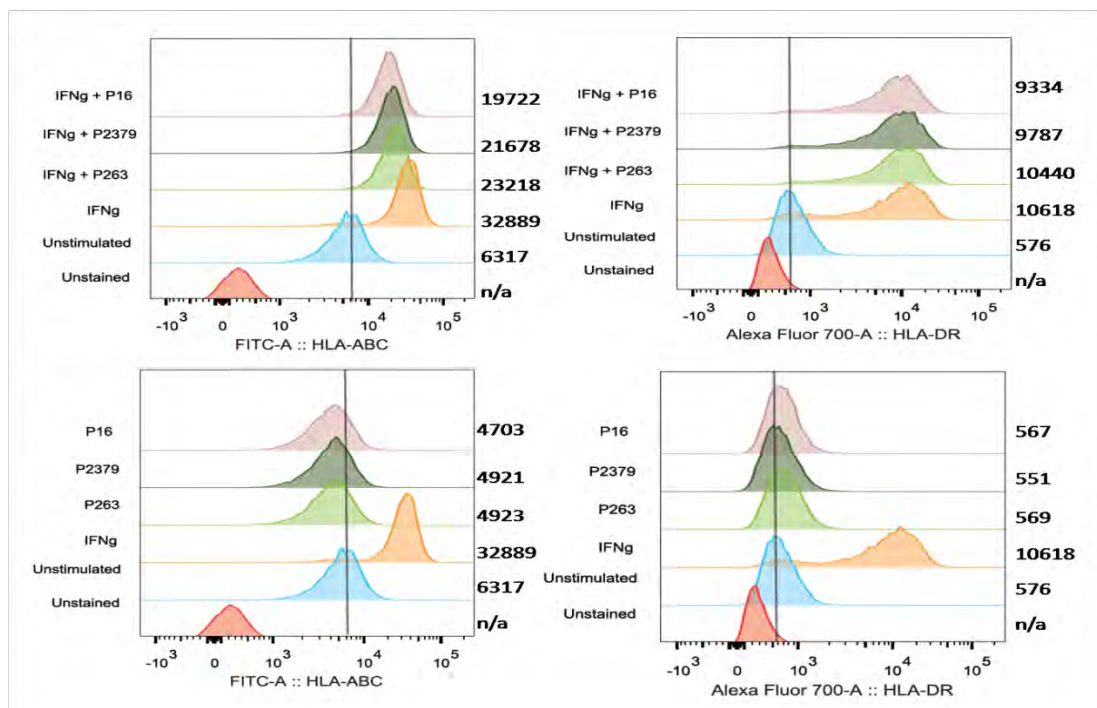


รูปที่ 7 แสดงผลการตรวจสอบคุณสมบัติของ primary chondrocyte โดยการตรวจวัดการผลิต collagen type II ภายในเซลล์ ตามเวลาเพาะเลี้ยงที่ 6 วัน, 9 วัน และที่ passage 1 โดยทำการย้อมภายในเซลล์ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ collagen type II ภาพบนแสดงผลตรวจวัดค่าการปล่อยแสง Fluorescence ด้วยเทคนิค Fluorescence microscope โดยส่วนของนิวเคลียสย้อมด้วย DAPI ติดสีน้ำเงิน ส่วนของ collagen type II ติดสีเขียว ภาพล่างแสดงผลการตรวจวัดค่าการปล่อยแสง Fluorescence ด้วยเทคนิค Flow cytometry โดย histogram สีชมพูแสดงเซลล์ที่ผลิต collagen type II ในเซลล์ ส่วน histogram สีฟ้าแทนเซลล์ที่ไม่ได้ย้อมแอนติบอดี

หลังจากที่ทำการแยกและเลี้ยง primary chondrocyte ให้อยู่ในช่วงเวลาที่เหมาะสมแล้วก็จะทำการทดลองเช่นเดียวกับใน chondrocyte cell line แต่เนื่องจาก ผลการลองของ cell line ที่ถูกกระตุ้นด้วย

granulysin นั้นไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆเลย จึงเปลี่ยนตัวกระตุ้นจาก recombinant granulysin มาเป็น recombinant IFN $\gamma$  แทน ประกอบกับการทดลองก่อนหน้านี้พบว่า proteoglycan aggrecan peptide บางตัวที่พบมากในบริเวณข้อได้แก่ P263-280, P16-31 และ P2379-2394 สามารถกระตุ้น T cell ในเลือดของผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมได้ด้วย แต่ยังไม่พบข้อมูลที่แน่ชัดในส่วนของ T cell ในเนื้อเยื่อบริเวณข้อเข่า ซึ่ง peptide เหล่านี้อาจจะมีผลต่อ primary chondrocyte ด้วย ดังนั้นจึงได้ทำการกระตุ้น primary cell ด้วย peptide P263-280, P16-31 และ P2379-2394 ร่วมกับ IFN $\gamma$  ด้วย จากนั้นดูการแสดงออกของ MHC-class I, MHC-class II, CD40, CD80 และ CD86 บนผิวเซลล์ด้วย flow cytometry

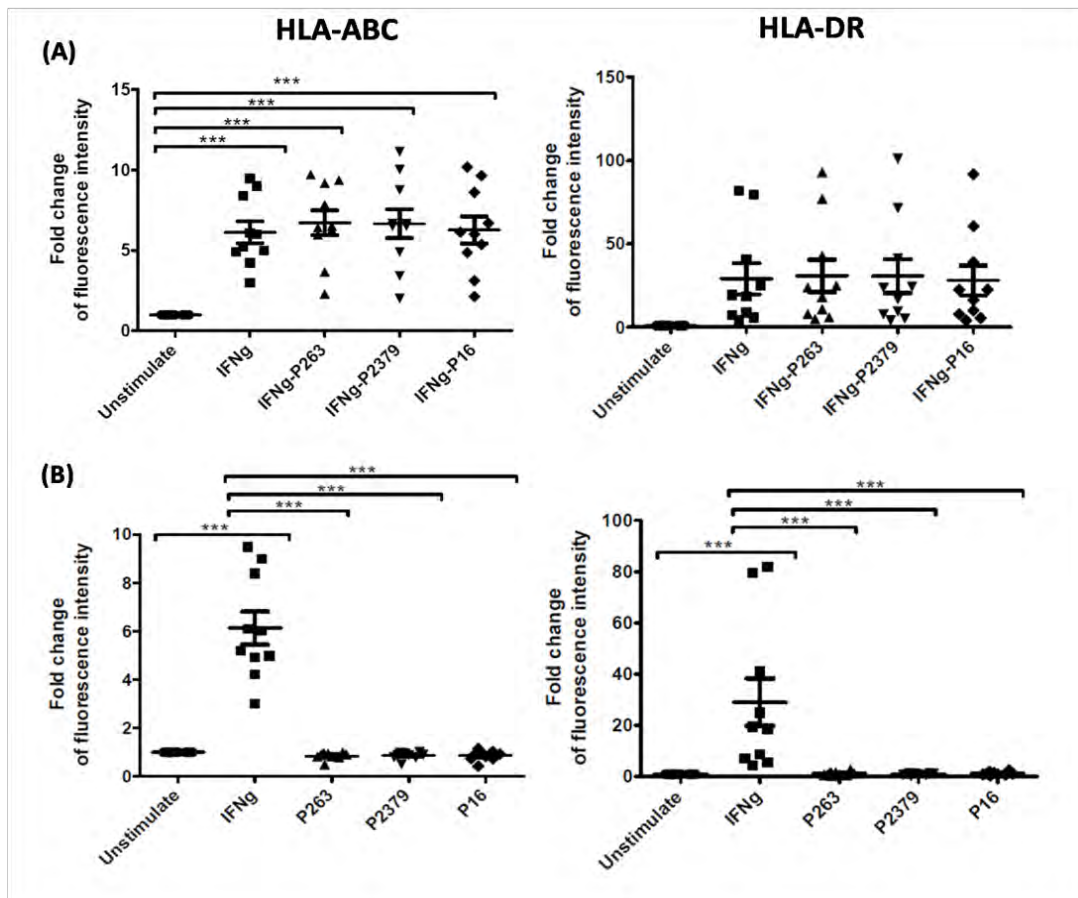
ผลการทดลองพบว่าเมื่อ primary chondrocyte ที่ได้จากคนไข้นั้นมีการแสดงออกของ MHC class I บนผิวเซลล์อยู่แล้ว ในขณะที่ MHC class II นั้นมีการแสดงออกเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย IFN $\gamma$  การแสดงออกของ MHC class I และ II จะสูงมากขึ้น อย่างไรก็ตามในสภาวะที่มี peptide P263-280, P16-31 และ P2379-2394 กระตุ้นร่วมกับ IFN $\gamma$  นั้น MHC ที่อยู่บนผิวเซลล์ไม่ได้แตกต่างไปจากสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย IFN $\gamma$  เพียงอย่างเดียว และการกระตุ้นด้วย peptide เพียงอย่างเดียวก็ไม่สามารถเพิ่มการแสดงออกของ MHC ได้เหมือน IFN $\gamma$  (รูปที่ 8 และ 9) แสดงให้เห็นว่า primary chondrocyte สามารถเพิ่มความสามารถในการเป็น antigen presenting เซลล์ได้มากขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วย IFN $\gamma$



รูปที่ 8 การแสดงออกของ HLA-ABC (MHC class I) และ HLA-DR (MHC class II) บนผิวของ chondrocyte primary cell เมื่อกระตุ้นด้วย recombinant IFN $\gamma$  (20 ng/ml) ร่วมกับ



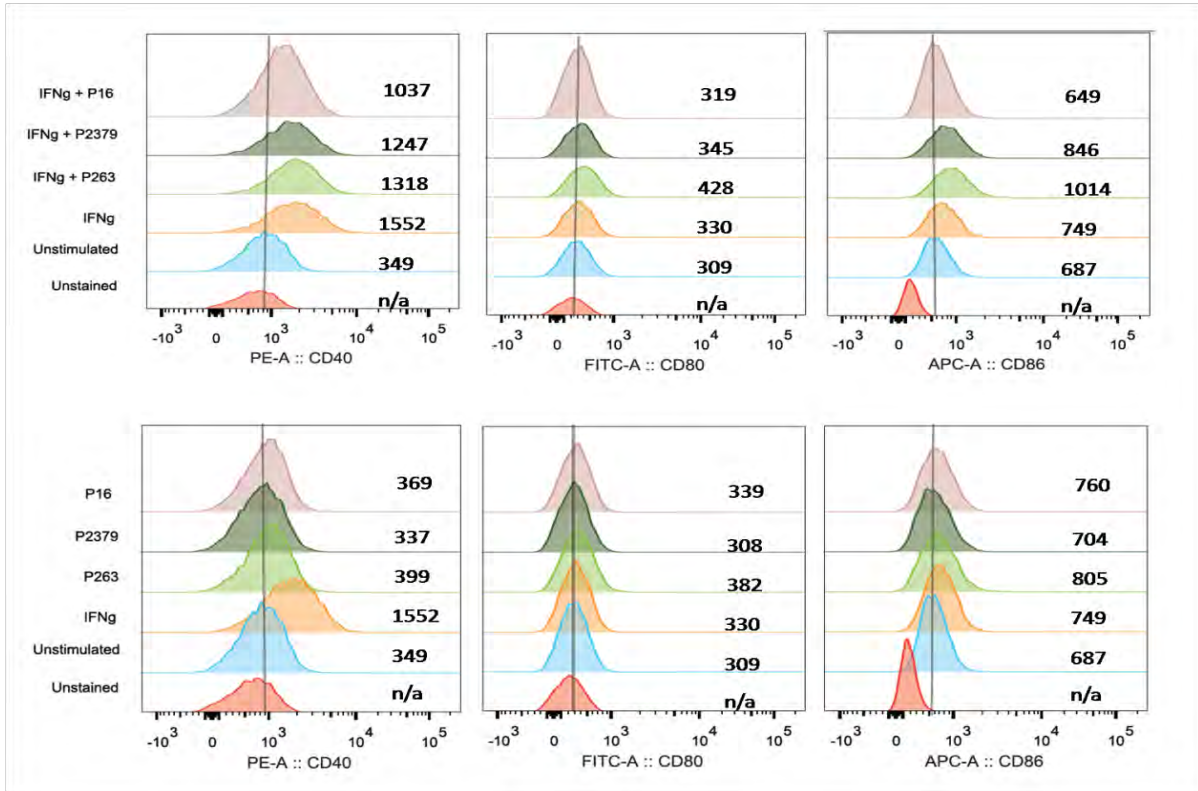
proteoglycan aggrecan peptide (P263-280, P16-31 และ P2379-2394) ที่ความเข้มข้น 10 ng/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตัวเลขท้ายตารางแสดงค่า Mean fluorescence intensity



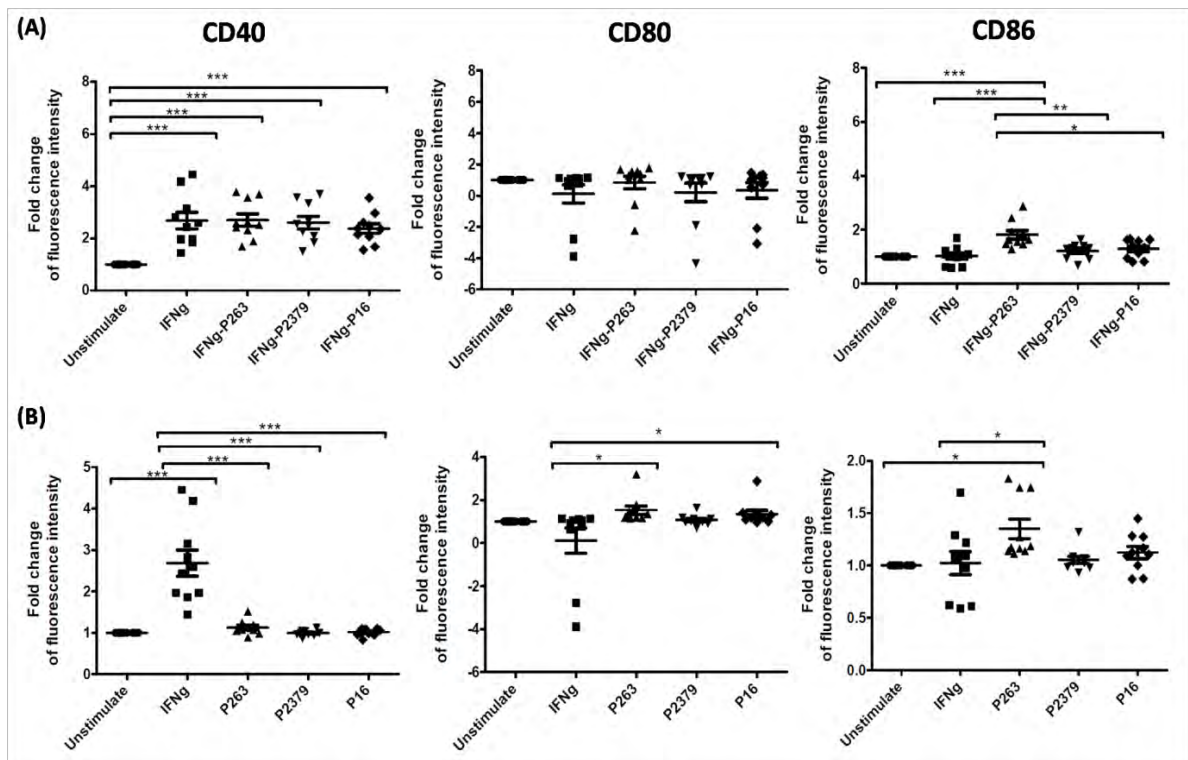
รูปที่ 9 แสดง Fold change ของ mean fluorescence intensity เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ HLA-ABC (MHC class I) และ HLA-DR (MHC class II) บนผิวของ chondrocyte primary cell เมื่อกระตุ้นด้วย recombinant IFN $\gamma$  (20 ng/ml) ร่วมกับ proteoglycan aggrecan peptide (P263-280, P16-31 และ P2379-2394) ที่ความเข้มข้น 10 ng/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมงในคนไขโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 10 คน

เมื่อศึกษาการแสดงออกของ costimulatory protein ได้แก่ CD40, CD80 และ CD86 บนผิวเซลล์ พบว่า primary chondrocyte จากข้อเข่าของคนไข้ข้อเข่าเสื่อมมีการแสดงออกของ CD86 เล็กน้อยบนผิวเซลล์ แต่เมื่อ cell ถูกกระตุ้นด้วย IFN $\gamma$  เพียงอย่างเดียวจะมีการแสดงออกของ CD40 สูงถึงเกือบ 3 เท่า เมื่อเทียบกับกับเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น และในสภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย P263-280, P16-31 หรือ P2379-2394 เพียงอย่างเดียว พบว่า P263-280 สามารถกระตุ้นให้ CD80 และ CD86 มีการแสดงออกที่สูงขึ้นด้วย แต่เมื่อกระตุ้นด้วย IFN $\gamma$  ร่วมกับ peptide มีเพียง IFN $\gamma$ -P263 สามารถกระตุ้นให้ CD86 มีการแสดงออกที่

สูงขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเทียบกับสถานะที่ไม่ได้กระตุ้นหรือกระตุ้นด้วย IFN $\gamma$  เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ 10 และ 11



รูปที่ 10 การแสดงออกของ Costimulatory protein (CD40, CD80 และ CD86) บนผิวของ chondrocyte primary cell เมื่อกระตุ้นด้วย recombinant IFN $\gamma$  (20 ng/ml) ร่วมกับ proteoglycan aggrecan peptide (P263-280, P16-31 และ P2379-2394) ที่ความเข้มข้น 10 ng/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมงตัวเลขท้ายตารางแสดงค่า Mean fluorescence intensity



รูปที่ 11 แสดง Fold change ของ mean fluorescence intensity เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ Costimulatory protein (CD40, CD80 และ CD86) บนผิวของ chondrocyte primary cell เมื่อกระตุ้นด้วย recombinant IFN $\gamma$  (20 ng/ml) ร่วมกับ proteoglycan aggrecan peptide (P263-280, P16-31 และ P2379-2394) ที่ความเข้มข้น 10 ng/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมงในคนไข้โรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 10 คน

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการกระตุ้น primary chondrocyte ด้วย IFN $\gamma$  ร่วมกับ P263-280 สามารถทำให้เซลล์มีคุณสมบัติของ antigen presenting cell มากขึ้น และมีการแสดงออกของ CD80 และ CD86 มากขึ้นด้วย ซึ่ง costimulatory molecule ทั้ง 2 ตัวนี้ เป็นตัวสำคัญที่ทำให้เกิดการกระตุ้น T cell ได้ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า peptide P263-280 อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดกระบวนการ T cell stimulation และ immune response โดยมี chondrocyte เป็น antigen presenting cell ที่สำคัญในโรคข้อเข่าเสื่อม แต่อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการศึกษาถึงกระบวนการนำเสนอ antigen ให้ T cell และกลไกกระตุ้น T cell โดย chondrocyte ต่อไป

## อภิปราย/วิจารณ์(Discussion)

การวิจัยในครั้งนี้ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับการทดลองของนักวิจัยท่านอื่น โดยพบว่า primary chondrocyte เมื่อถูกกระตุ้นด้วย IFN $\gamma$  จะทำให้มี Immunogenic characteristic ที่เพิ่มมากขึ้น คือมีการแสดงออกของ MHC บนผิวเซลล์มากขึ้นเช่นเดียวกับในผู้ป่วย ankylosing spondylitis และเมื่อถูกกระตุ้นด้วย proteoglycan aggrecan peptide ก็พบว่า P263-280 กระตุ้นให้ primary chondrocyte มีการแสดงออกของ CD86 มากขึ้น ซึ่งเป็นส่วนสำคัญต่อการกระตุ้น T cell และการทดลองนี้ก็สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่พบว่า P263-380 สามารถกระตุ้นให้ T cell ในเลือดของผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมให้มีการ proliferation ที่มากขึ้น เมื่อเทียบกับคนปกติ จึงแสดงให้เห็นว่า P263-280 น่าจะเป็นปัจจัยสำคัญที่อาจทำให้เกิด immune response ในข้อเข่าของผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมได้

## ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ เกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป(Conclusion and Further Directions)

เพื่อให้ทราบถึงบทบาทและกลไกการทำงานของ primary chondrocyte ในผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมมากขึ้น จะต้องนำ chondrocyte ที่ถูกกระตุ้นด้วย IFN $\gamma$  และ Peptide P263-280 แล้ว มาเลี้ยงร่วมกับ T cell ที่แยกจากเนื้อเยื่อบริเวณเข่า ได้แก่ infrapatellar fat pad แล้วศึกษา T cell function ในการผลิต cytokine หรือ cytotoxic molecule หาก peptide ตัวนี้สามารถกระตุ้น T cell ผ่านการจับกับ MHC บน primary chondrocyte ได้จริง ก็จะทำให้การระบุ MHC ต่อไปว่าเป็นตัวใด จากนั้นจะทำการ block CD80 หรือ CD86 ต่อไปเพื่อศึกษา chondrocyte –T cell signaling ต่อไป

## Bibliography

1. Felson DT. Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. N Engl J Med. 2006;354(8):841-8.
2. de Lange-Brokaar BJ, Ioan-Facsinay A, van Osch GJ, Zuurmond AM, Schoones J, Toes RE, et al. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. Osteoarthritis Cartilage. 2012;20(12):1484-99.
3. Akkiraju H, Nohe A. Role of Chondrocytes in Cartilage Formation, Progression of Osteoarthritis and Cartilage Regeneration. Journal of developmental biology. 2015;3(4):177-92.
4. Goldring MB. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. Therapeutic advances in musculoskeletal disease. 2012;4(4):269-85.



5. Shen PC, Wu CL, Jou IM, Lee CH, Juan HY, Lee PJ, et al. T helper cells promote disease progression of osteoarthritis by inducing macrophage inflammatory protein-1gamma. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011;19(6):728-36.
6. Hsieh JL, Shiau AL, Lee CH, Yang SJ, Lee BO, Jou IM, et al. CD8+ T cell-induced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 exacerbated osteoarthritis. *Int J Mol Sci*. 2013;14(10):19951-70.
7. Sakkas LI, Platsoucas CD. The role of T cells in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56(2):409-24.
8. Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(9):1263-7.
9. Smith MD, Triantafyllou S, Parker A, Youssef PP, Coleman M. Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. *J Rheumatol*. 1997;24(2):365-71.
10. Kehler T, Laskarin G, Massari D, Dominovic M, Persic V, Rosovic I, et al. Possible role of granulysin in pathogenesis of osteoarthritis. *Med Hypotheses*. 2015;85(6):850-3.
11. Veljkovic Vujaklija D, Dominovic M, Gulic T, Mahmutefendic H, Haller H, Saito S, et al. Granulysin expression and the interplay of granulysin and perforin at the maternal-fetal interface. *J Reprod Immunol*. 2013;97(2):186-96.
12. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis Cartilage*. 2013;21(1):16-21.
13. Balakrishnan L, Nirujogi RS, Ahmad S, Bhattacharjee M, Manda SS, Renuse S, et al. Proteomic analysis of human osteoarthritis synovial fluid. *Clin Proteomics*. 2014;11(1):6.
14. de Jong H, Berlo SE, Hombrink P, Otten HG, van Eden W, Lafeber FP, et al. Cartilage proteoglycan aggrecan epitopes induce proinflammatory autoreactive T-cell responses in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(1):255-62.
15. Wojdasiewicz P, Poniatowski LA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:561459.
16. Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum*. 2001;44(3):585-94.
17. Alaaeddine N, Olee T, Hashimoto S, Creighton-Achermann L, Lotz M. Production of the chemokine RANTES by articular chondrocytes and role in cartilage degradation. *Arthritis Rheum*. 2001;44(7):1633-43.

18. Sakata M, Masuko-Hongo K, Nakamura H, Onuma H, Tsuruha JI, Aoki H, et al. Osteoarthritic articular chondrocytes stimulate autologous T cell responses in vitro. Clin Exp Rheumatol. 2003;21(6):704-10.
19. Spondylitis A. HLA-B27-Restricted Antigen Presentation by Human Chondrocytes to CD8+ T Cells. Arthritis Rheum. 2009;60(6):1635-46.

### ประวัตินักวิจัย

ผู้วิจัยหลัก

ชื่อ - นามสกุล อ.พญ.ดร. รังสิมา เจริญตระกุล

ชื่อ - นามสกุล **Dr. Rangsimareantragoon, M.D., Ph.D.**

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ A-5 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

ภาควิชาจุลชีววิทยา ตึก อ.ป.ร. ชั้น 17

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หมายเลขโทรศัพท์ 02-256-4132 ต่อ 623

หมายเลขโทรสาร 02-252-5952

Email: [rangsimareantragoon@gmail.com](mailto:rangsimareantragoon@gmail.com), [Rangsimar.R@chula.ac.th](mailto:Rangsimar.R@chula.ac.th)

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2557 (6 เดือน) Postdoctoral training at Peter Doherty Institute of Infection and Immunity, Melbourne, Australia

พ.ศ. 2553-2557 PhD in Microbiology and Immunology, University of Melbourne, Australia

พ.ศ. 2549-2555 Doctor of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

**T cell immunology, MR1-MAIT TCR interaction, generation of tetramers, flow cytometry, cell culture**

### Publications:

#### Functional and T Cell Receptor Repertoire Analyses of Peripheral Blood and Infrapatellar Fat Pad T Cells in Knee Osteoarthritis.

รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการวิจัย บทบาทของ cytotoxic molecule ในการเกิดพยาธิสภาพของโรคข้อเสื่อม  
อ.พญ.ดร. รังสิมา เจริญตระกุล ทนงประมาณแผ่นดิน ปี 2561

Sae-Jung T, Sengprasert P, Apinun J, Ngarmukos S, Yuktanandana P, Tanavalee A, **Reantragoon R**.

*J Rheumatol*. 2018 Oct 15. pii: jrheum.170775. doi: 10.3899/jrheum.170775.

**Monitoring Anti-*Pythium insidiosum* IgG Antibodies and (1->3)- $\beta$ -D-Glucan in Vascular Pythiosis.**

Worasilchai N, Permpalung N, Chongsathidkiet P, Leelahavanichkul A, Mendoza AL, Palaga T, **Reantragoon R**, Finkelman M, Sutcharitchan P, Chindamporn A.

*J Clin Microbiol*. 2018 May 30. pii: JCM.00610-18. doi: 10.1128/JCM.00610-18.

**Transcriptomic profiling in human mesangial cells using patient-derived lupus autoantibodies identified miR-10a as a potential regulator of IL8.**

Tangtanatakul P, Thammasate B, Jacquet A, **Reantragoon R**, Pisitkun T, Avihingsanon Y, Leelahavanichkul A, Hirankarn N.

*Sci Rep*. 2017 Nov 6;7(1):14517. doi: 10.1038/s41598-017-15160-8.

**Immune Mediators in Osteoarthritis: Infrapatellar Fat Pad-Infiltrating CD8+ T Cells Are Increased in Osteoarthritic Patients with Higher Clinical Radiographic Grading**

Apinun J, Sengprasert P, Yuktanandana P, Ngarmukos S, Tanavalee A, **Reantragoon R**  
*International Journal of Rheumatology; Volume 2016 (2016)*, Article ID 9525724, 8 pages  
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/9525724>

**Mucosal-associated invariant T cells in clinical diseases.**

**Reantragoon R**, Boonpattanaporn N, Corbett AJ, McCluskey J.

*Asian Pac J Allergy Immunol*. 2016 Mar;34(1):3-10. Review.

**The frequency of mucosal-associated invariant T cells is selectively increased in dermatitis herpetiformis.**

Li J, **Reantragoon R**, Kostenko L, Corbett AJ, Varigos G, Carbone FR.

*Australas J Dermatol*. 2016 Mar 4. doi: 10.1111/ajd.12456.

**A molecular basis underpinning the T cell receptor heterogeneity of mucosal-associated invariant T cells.**

Eckle SB, Birkinshaw RW, Kostenko L, Corbett AJ, McWilliam HE, **Reantragoon R**, Chen Z, Gherardin NA, Beddoe T, Liu L, Patel O, Meehan B, Fairlie DP, Villadangos JA, Godfrey DI, Kjer-Nielsen L, McCluskey J, Rossjohn J. *J Exp Med*. 2014 Jul 28;211(8):1585-600.

**T-cell activation by transitory neo-antigens derived from distinct microbial pathways.**

Corbett AJ, Eckle SB, Birkinshaw RW, Liu L, Patel O, Mahony J, Chen Z, **Reantragoon R**, Meehan B, Cao H, Williamson NA, Strugnell RA, Van Sinderen D, Mak JY, Fairlie DP, Kjer-Nielsen L, Rossjohn J, McCluskey J. *Nature*. 2014 May 15;509(7500):361-5.

**Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells.**

**Reantragoon R**, Corbett AJ, Sakala IG, Gherardin NA, Furness JB, Chen Z, Eckle SB, Uldrich AP, Birkinshaw RW, Patel O, Kostenko L, Meehan B, Kedzierska K, Liu L, Fairlie DP, Hansen TH, Godfrey DI, Rossjohn J, McCluskey J, Kjer-Nielsen L. *J Exp Med*. 2013 Oct 21;210(11):2305-20.

**Recognition of vitamin B metabolites by mucosal-associated invariant T cells.**

Patel O, Kjer-Nielsen L, Le Nours J, Eckle SB, Birkinshaw R, Beddoe T, Corbett AJ, Liu L, Miles JJ, Meehan B, **Reantragoon R**, Sandoval-Romero ML, Sullivan LC, Brooks AG, Chen Z, Fairlie DP, McCluskey J, Rossjohn J. *Nat Commun.* 2013;4:2142.

**MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells.**

Kjer-Nielsen L, Patel O, Corbett AJ, Le Nours J, Meehan B, Liu L, Bhati M, Chen Z, Kostenko L, **Reantragoon R**, Williamson NA, Purcell AW, Dudek NL, McConville MJ, O'Hair RA, Khairallah GN, Godfrey DI, Fairlie DP, Rossjohn J, McCluskey J. *Nature.* 2012 Nov 29;491(7426):717-23.

**Structural insight into MR1-mediated recognition of the mucosal associated invariant T cell receptor.**

**Reantragoon R**, Kjer-Nielsen L, Patel O, Chen Z, Illing PT, Bhati M, Kostenko L, Bharadwaj M, Meehan B, Hansen TH, Godfrey DI, Rossjohn J, McCluskey J. *J Exp Med.* 2012 Apr 9;209(4):761-74.

**Asthma research performance in Asia-Pacific: a bibliometric analysis by searching PubMed database.**

Klaewsongkram J, **Reantragoon R**. *J Asthma.* 2009 Dec;46(10):1013-20.

**อ.นพ.จිරันตร์ อภินันท์**

ชื่อ-นามสกุล นพ. จิรันตร์ อภินันท์

ชื่อ-นามสกุล **Dr. Jirun Apinun**

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำภาควิชาออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติการศึกษา

การศึกษาหลังปริญญา

พ.ศ. 2557 Foot and Ankle, Avon Orthopaedic Center Southmead Hospital, Bristol, United Kingdom

พ.ศ. 2556 Foot and Ankle, Department of Foot and Ankle Surgery in Groupe Chirurgical Republique and the Clinique des Alpes in Grenoble, France และ Foot and Ankle, Schulthess Klinik Muskulo - Skelettal Zentrum

พ.ศ. 2555 Trauma Surgery, Universitatsklinikum Carl Gustav Carus

พ.ศ. 2551- 2552 ศัลยกรรมเวชศาสตร์การกีฬา, โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

แพทย์ประจำบ้าน

พ.ศ. 2547-2551 ศัลยศาสตร์ออร์โธปิดิกส์, โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ปริญญาบัตร

พ.ศ. 2543 แพทยศาสตรบัณฑิต(เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง), จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,

ความเชี่ยวชาญพิเศษ : ศัลยศาสตร์กระดูกและข้อ, การผ่าตัดเท้าและข้อเท้า, การบาดเจ็บจากการเล่นกีฬา

### **Publications:**

#### **Functional and T Cell Receptor Repertoire Analyses of Peripheral Blood and Infrapatellar Fat Pad T Cells in Knee Osteoarthritis.**

Sae-Jung T, Sengprasert P, Apinun J, Ngarmukos S, Yuktanandana P, Tanavalee A, Reantragoon R. J Rheumatol. 2018 Oct 15. pii: jrheum.170775. doi: 10.3899/jrheum.170775

#### **Foot function after surgically treated intraarticular calcaneal fractures. Correlation of clinical and pedographic results of 65 patients followed for 8 years.**

Dürr C, Apinun J, Mittlmeier T, Rammelt S. J Orthop Trauma. 2018 Sep 10. doi: 10.1097/BOT.0000000000001325

#### **Immune Mediators in Osteoarthritis: Infrapatellar Fat Pad-Infiltrating CD8+ T Cells Are Increased in Osteoarthritic Patients with Higher Clinical Radiographic Grading.**

Apinun J, Sengprasert P, Yuktanandana P, Ngarmukos S, Tanavalee A, Reantragoon R. Int J Rheumatol. 2016;2016:9525724. doi: 10.1155/2016/9525724.

### **ศ.นพ.อารี ตनावาลี**

ชื่อ - นามสกุล ศ.นพ.อารี ตनावาลี

ชื่อ - นามสกุล **Prof. Dr. Aree Tanavalee**

ตำแหน่งปัจจุบัน หัวหน้าภาควิชาออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หมายเลขโทรศัพท์ 02-256-4230

ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail) areetang@orthochula.com

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2545 Certificate in Adult Reconstructive Knee Surgery, Institute For Advanced Orthopaedic Study, UMDNJ, New Brunswick, New Jersey, U.S.A.

พ.ศ. 2541 Certificate in Knee Reconstruction, Beth Israel Medical Center, New York, New York, U.S.A.

พ.ศ. 2535 วุฒิปริญญาตรี ศัลยศาสตร์ออร์โธปิดิกส์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2529 พ.บ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความเชี่ยวชาญพิเศษ : ข้อสะโพกและข้อเข่า (Arthroplasty)

## **Publications (2016-2018) :**

### **Hip and Knee Section, Diagnosis, Reimplantation: Proceedings of International Consensus on Orthopedic Infections.**

Aalirezaie A, Bauer TW, Fayaz H, Griffin W, Higuera CA, Krenn V, Krenn V, Molano M, Moojen DJ, Restrepo C, Shahi A, Shubnyakov I, Sporer S, Tanavalee A, Teloken M, Velázquez Moren JD.

J Arthroplasty. 2018 Oct 19. pii: S0883-5403(18)30802-7. doi: 10.1016/j.arth.2018.09.021

### **Functional and T Cell Receptor Repertoire Analyses of Peripheral Blood and Infrapatellar Fat Pad T Cells in Knee Osteoarthritis.**

Sae-Jung T, Sengprasert P, Apinun J, Ngarmukos S, Yuktanandana P, Tanavalee A, Reantragoon R.

J Rheumatol. 2018 Oct 15. pii: jrheum.170775. doi: 10.3899/jrheum.170775.

### **Circulating and Synovial Fluid Heat Shock Protein 70 Are Correlated with Severity in Knee Osteoarthritis.**

Ngarmukos S, Scaramuzza S, Theerawattanapong N, Tanavalee A, Honsawek S.

Cartilage. 2018 Jul 1;1947603518790075. doi: 10.1177/1947603518790075

### **Does Adductor Canal Block Have a Synergistic Effect with Local Infiltration Analgesia for Enhancing Ambulation and Improving Analgesia after Total Knee Arthroplasty?**

Kampitak W, Tanavalee A, Ngarmukos S, Amarase C, Apihansakorn R, Vorapalux P.

Knee Surg Relat Res. 2018 Jun 1;30(2):133-141. doi: 10.5792/ksrr.17.088.

### **Association of adiponectin gene polymorphisms with knee osteoarthritis.**

Zhan D, Thumtecho S, Tanavalee A, Yuktanandana P, Anomasiri W, Honsawek S.

World J Orthop. 2017 Sep 18;8(9):719-725. doi: 10.5312/wjo.v8.i9.719.

### **Vitamin D Supplementation Improves Quality of Life and Physical Performance in Osteoarthritis Patients.**

Manoy P, Yuktanandana P, Tanavalee A, Anomasiri W, Ngarmukos S, Tanpowpong T, Honsawek S.

Nutrients. 2017 Jul 26;9(8). pii: E799. doi: 10.3390/nu9080799.

### **Effect of vitamin E on oxidative stress level in blood, synovial fluid, and synovial tissue in severe knee osteoarthritis: a randomized controlled study.**

Tantavisut S, Tanavalee A, Honsawek S, Suantawee T, Ngarmukos S, Adisakwatana S, Callaghan JJ.

BMC Musculoskelet Disord. 2017 Jun 29;18(1):281. doi: 10.1186/s12891-017-1637-7.

### **Elevated serum leptin levels are associated with low vitamin D, sarcopenic obesity, poor muscle strength, and physical performance in knee osteoarthritis.**

Manoy P, Anomasiri W, Yuktanandana P, Tanavalee A, Ngarmukos S, Tanpowpong T, Honsawek S.

Biomarkers. 2017 Dec;22(8):723-730. doi: 10.1080/1354750X.2017.1315615.

### **Association between leukocyte telomere length and angiogenic cytokines in knee osteoarthritis.**

Poonpet T, Saetan N, Tanavalee A, Wilairatana V, Yuktanandana P, Honsawek S.

รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการวิจัย บทบาทของ cytotoxic molecule ในการเกิดพยาธิสภาพของโรคข้อเสื่อม  
อ.พญ.ดร. รังสิมา เจริญฤทธะกุล ทนงบประมาณแผ่นดิน ปี 2561

Int J Rheum Dis. 2018 Jan;21(1):118-125. doi: 10.1111/1756-185X.12988.

**Immune Mediators in Osteoarthritis: Infrapatellar Fat Pad-Infiltrating CD8+ T Cells Are Increased in Osteoarthritic Patients with Higher Clinical Radiographic Grading.**

Apinun J, Sengprasert P, Yuktanandana P, Ngarmukos S, Tanavalee A, Reantragoon R.

Int J Rheumatol. 2016;2016:9525724. doi: 10.1155/2016/9525724.

**Area of Skin Numbness After Total Knee Arthroplasty: Does Minimally Invasive Approach Make Any Difference From Standard Approach?**

Tanavalee A, Limtrakul A, Veerasethsiri P, Amarase C, Ngarmukos S.

J Arthroplasty. 2016 Nov;31(11):2499-2503. doi: 10.1016/j.arth.2016.04.002.

**Plasma and synovial fluid inflammatory cytokine profiles in primary knee osteoarthritis.**

Mabey T, Honsawek S, Tanavalee A, Yuktanandana P, Wilairatana V, Poovorawan Y.

Biomarkers. 2016 Nov;21(7):639-44. doi: 10.3109/1354750X.2016.1171907.