



การหลั่งของฮีทช็อกโปรตีน 60 จากเซลล์สร้างกระดูกและผลต่อการสร้าง  
ทูเมอร์เนโครซิสแฟคเตอร์-แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจ

**The Release of Heat Shock Protein 60 from Osteoblasts and its Effect on  
Tumor Necrosis Factor-alpha Synthesis from Macrophages**

บารมี ชาญชยานนท์

**Baramee Chanchayanon**

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการวิจัยทางทันตแพทยศาสตร์  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements for the Degree of  
Master of Science in Dental Research**

**Prince of Songkla University**

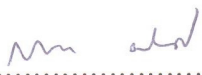
**2557**

**ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์**

ชื่อวิทยานิพนธ์      การหลั่งของฮีทชอคโปรตีน 60 จากเซลล์สร้างกระดูกและผลต่อการสร้าง  
 ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์ - แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจ  
 ผู้เขียน                นายบารมี ชาญชฎานนท์  
 สาขาวิชา              การวิจัยทางทันตแพทยศาสตร์


อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

  
 .....  
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกวรรณ ปัญญาองค์)

  
 .....ประธานกรรมการ  
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกษรา ปัทมพันธ์)

  
 .....กรรมการ  
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกวรรณ ปัญญาองค์)

  
 .....กรรมการ  
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศรีสุรางค์ สุทธิปริยาศรี)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
 ของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการวิจัยทางทันตแพทยศาสตร์

.....  
 (รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ..... *ม.ล.* .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกวรรณ ปัญญาขงค์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ..... *บารมี ช่างบุญนนท์* .....

(นายบารมี ช่างบุญนนท์)

นักศึกษา

(4)

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ  
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ..... บารมี ชาญชยานนท์ .....

(นายบารมี ชาญชยานนท์)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การหลังของอีทชอคโปรตีน 60 จากเซลล์สร้างกระดูกและผลต่อการสร้างทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจ
ผู้เขียน	นายบารมี ชาญชฎานนท์
สาขาวิชา	การวิจัยทางทันตแพทยศาสตร์
ปีการศึกษา	2556

### บทคัดย่อ

การทำสัลยกรรมกระดูกและการใช้ยาอาจส่งผลกระทบต่อการซ่อมแซมกระดูกภายหลังบาดเจ็บ อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบกระบวนการที่แน่ชัด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความเครียดจากความร้อนและยาต้านอักเสบในกลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ต่อการหลังอีทชอคโปรตีน 60 จากเซลล์สร้างกระดูกและผลต่อการสร้างทีเอ็นเอฟ-แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูก (MC3T3-E1) และทดสอบด้วยความร้อนหรือยาไอบูโพรเฟนในปริมาณที่สูง จากนั้นทำการวิเคราะห์การรั่วไหลของสารประกอบต่างๆภายในเซลล์ด้วยการวัดปริมาณแลคเตทดีไฮโดรจีเนส วิเคราะห์การตายของเซลล์ด้วยเทคนิคการย้อมด้วยแอนเนกซินไฟว์/โพรพิเดียมไอโอดด์ และทำการวิเคราะห์การหลังอีทชอคโปรตีน 60 ด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอต นอกจากนี้ทำการวิเคราะห์ผลของอาหารเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกที่ได้รับความเครียดต่อเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) โดยการวิเคราะห์การหลังทีเอ็นเอฟ-แอลฟาด้วยเทคนิคอีไลซา จากผลการทดลองพบว่า ความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีหรือยาไอบูโพรเฟนในปริมาณสูงทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการรั่ว อย่างไรก็ตามไม่สามารถตรวจพบการหลังออกมาออกเซลล์หรือการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ของอีทชอคโปรตีน 60 และเมื่อนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับความร้อนหรือยาไอบูโพรเฟนในปริมาณสูงไปทำการทดสอบกับเซลล์แมคโครฟาจ พบว่า อาหารเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มที่เซลล์ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สามารถกระตุ้นการสร้างทีเอ็นเอฟ-แอลฟาได้จากเซลล์แมคโครฟาจได้ ในขณะที่อาหารเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มที่เซลล์ได้รับยาไอบูโพรเฟนหรือความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีไม่มีผลกระตุ้นการสร้างทีเอ็นเอฟ-แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจ อย่างไรก็ตามการเติมแอนติบอดีต่ออีทชอคโปรตีน 60 มีผลลดการกระตุ้นการสร้างทีเอ็นเอฟ-แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจ นอกจากนี้พบว่าความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีทำให้เกิดการตายของเซลล์สร้างกระดูกทั้งแบบอะพอพโทซิสและแบบเนโครซิสมากกว่ายาไอบูโพรเฟนในปริมาณสูงทันที ภายหลังการทดสอบ ในขณะที่โดยความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำให้เกิดการตายของเซลล์ในปริมาณที่น้อยกว่าและช้ากว่า สรุปได้ว่า ความเครียดจากความร้อนที่อุณหภูมิ 47

องศาเซลเซียส และยาไอบูโพรเฟนในปริมาณสูงทำให้เกิดการตายของเซลล์สร้างกระดูก โดยความเครียดจากความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีทำให้เกิดการรั่วไหลและการหลั่งโมเลกุลจากเซลล์สร้างกระดูกซึ่งสามารถกระตุ้นการสร้างทีเอ็นเอฟ-แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจได้ ในขณะที่ความเครียดจากความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีและยาไอบูโพรเฟนในปริมาณสูง ไม่มีผลกระตุ้นการสร้างทีเอ็นเอฟ-แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจ นอกจากนี้ฮีทชอกโปรตีน 60 อาจมีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจากเซลล์แมคโครฟาจ

คำสำคัญ : ฮีทชอกโปรตีน 60, ทีเอ็นเอฟ-แอลฟา, เซลล์สร้างกระดูก, เซลล์แมคโครฟาจ, ความเครียดจากความร้อน, ยาไอบูโพรเฟน

**Thesis Title** The Release of Heat Shock Protein 60 from Osteoblasts and its Effect  
Tumor Necrosis Factor-alpha Synthesis from Macrophages

**Author** Mr. Baramee Chanchayanon

**Major Program** Dental Research

**Academic Year** 2013

### ABSTRACT

Bone surgery and medications may influence bone repairing processes. However, the mechanisms are not clearly understood. The aims of this study were to investigate the effects of heat stress and non-steroidal anti-inflammatory drugs on the release of heat shock protein 60 from osteoblasts and their effects on the synthesis of TNF-alpha from macrophages. The MC3T3-E1 osteoblasts were cultured and exposed to lethal heat stress or high dose of ibuprofen. Then, the membrane leakage was analyzed by LDH release assay, the cell death was visualized by Annexin-V/Propidium iodide staining and the release of heat shock protein 60 was analyzed by Western blot analysis. In addition, the effect of conditioned-media from stressed osteoblasts on the synthesis of TNF-alpha from macrophages was analyzed by ELISA. The results demonstrated that heat stress at 47°C for 30 min or high dose of ibuprofen resulted in the membrane leakage of osteoblasts. However, the release of heat shock protein 60 in the conditioned media or the changes in the intracellular heat shock protein 60 of osteoblasts was not detectable. The treatment of RAW 264.7 macrophages with conditioned media from osteoblasts that exposed to heat stress at 47°C for 30 min resulted in the increase in TNF-alpha synthesis while the conditioned media from osteoblasts that exposed to ibuprofen or heat stress at 47°C for 5 min have no effects on TNF-alpha synthesis from macrophages. The addition of antibody to heat shock protein 60 inhibited the stimulatory effects of conditioned media on TNF-alpha synthesis from macrophages. Furthermore, heat stress at 47°C for 30 min rapidly induced more osteoblast cell death, both apoptosis and necrosis, than ibuprofen immediately after treatment. Heat stress at 47°C for 5 min resulted in less cell death and needed more time to show effects. In conclusion, stress from heat stress at 47°C or high dose of ibuprofen resulted in osteoblast cell death. Heat stress at 47°C for 30 min resulted in the membrane leakage and the release of intracellular molecules from osteoblasts which stimulated TNF-alpha synthesis from

macrophages whereas heat stress at 47°C for 5 min and ibuprofen at high dose had no effects on TNF-alpha production from macrophages. In addition, heat shock protein 60 might be involved in the induction of the pro-inflammatory cytokine synthesis from macrophages.

Keyword : Heat shock protein 60, TNF-alpha, Osteoblasts, Macrophages, Heat stress, Ibuprofen



## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยในหัวข้อ “การหลังของฮีทชอคโปรตีน 60 จากเซลล์สร้างกระดูกและผลต่อการสร้างทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจ” สำเร็จลุล่วงลงได้ดีด้วยความกรุณาและความอนุเคราะห์ช่วยเหลือเป็นอย่างดีจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทันตแพทย์หญิง กนกวรรณ ปัญญาพงศ์ ที่ท่านได้กรุณารับเป็นที่ปรึกษา ให้คำแนะนำ ข้อคิด และแนวทางการทำวิจัยที่ถูกต้องตามระเบียบวิธี ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้เสร็จสมบูรณ์ไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยาช่องปากและระบบการบดเคี้ยว และคลินิกรังสี ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์สำหรับการวิจัย ตลอดจนคณาจารย์และบุคลากรทุกท่านที่คอยให้คำแนะนำและความช่วยเหลืออื่นๆ จนทำให้งานชิ้นนี้สำเร็จได้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่เป็นกำลังใจ ตลอดจนเพื่อน ๆ ที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจเสมอมา จนการศึกษาครั้งนี้สำเร็จไปด้วยดี

บารมี ชาญชฎานนท์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	(5)
Abstract.....	(7)
กิตติกรรมประกาศ.....	(9)
สารบัญ.....	(10)
รายการตาราง.....	(11)
รายการรูป.....	(12)
1. บทนำ.....	
ความสำคัญและที่มาของการวิจัย.....	1
การทบทวนวรรณกรรม.....	2
วัตถุประสงค์.....	15
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ.....	17
3. ผลการวิจัย.....	26
4. บทวิจารณ์.....	43
5. สรุป.....	47
เอกสารอ้างอิง.....	48
ภาคผนวก.....	56
ประวัติผู้เขียน.....	69

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1 วัสดุสารเคมี.....	17
2 อุปกรณ์และเครื่องมือ .....	20

## รายการรูป

รูปที่	หน้า
1 แผนภาพแสดงตำแหน่งและบทบาทของฮีทชอกโปรตีน 60 ภายในเซลล์.....	3
2 แผนภาพแสดงฮีทชอกโปรตีนที่ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์.....	4
3 แผนภาพโมเลกุลที่ถูกหลั่งออกมาจากไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่เกิดการตายแบบ.....	7
อะพอพโทติก	
4 แผนภาพการตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันต่อเซลล์ที่เกิดการตายแบบ.....	8
อะพอพโทติกและเนโครติก	
5 แผนภาพแสดงภาพเซลล์ในสภาวะปกติ เซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทติก และเนโครติก.....	9
6 แผนภาพแสดงภาพเซลล์แมคโครฟาจโอบจับเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทติกและเนโครติก	11
7 แผนภาพแสดงบทบาทของเซลล์แมคโครฟาจและทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา.....	15
ในการเกิดเซลล์ละลายกระดูก	
8 กราฟแสดงปริมาณการหลั่งแอลดีเอช (LDH release) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์สร้าง..	27
กระดูกด้วย Cytotoxic Detection kit ที่เวลา 0 ชั่วโมง ภายหลังจากการได้รับความเครียดแบบต่าง ๆ	
9 กราฟแสดงการหลั่งแอลดีเอช (LDH release) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์สร้างกระดูก...	28
ด้วย Cytotoxic Detection kit ที่เวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังจากการได้รับความเครียดแบบต่างๆ	
10 ภาพแสดงปริมาณของฮีทชอกโปรตีน 60 (HSP60) ที่หลั่งออกมาอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง.....	29
เซลล์ (conditioned media) และที่อยู่ภายในเซลล์ (cell lysate) ของเซลล์สร้างกระดูกด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอต ที่เวลา 0 ชั่วโมง ภายหลังจากการได้รับความเครียดแบบต่างๆ	
11 กราฟแสดงปริมาณการแสดงออกของฮีทชอกโปรตีน 60 (HSP60) ที่อยู่ภายในเซลล์.....	30
(cell lysate) ของเซลล์สร้างกระดูก เทียบกับปริมาณเบต้า-แอคติน (beta-actin) ด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอต ที่เวลา 0 ชั่วโมง ภายหลังจากการได้รับความเครียดแบบต่างๆ	
12 ภาพแสดงปริมาณของฮีทชอกโปรตีน 60 (HSP60) ที่หลั่งออกมาอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง....	31
เซลล์ (conditioned media) และที่อยู่ภายในเซลล์ (cell lysate) ของเซลล์สร้างกระดูกด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอต ที่เวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังจากการได้รับความเครียดแบบต่างๆ	
13 กราฟแสดงปริมาณการแสดงออกของฮีทชอกโปรตีน 60 (HSP60) ที่อยู่ภายในเซลล์.....	32
(cell lysate) ของเซลล์สร้างกระดูก เทียบกับปริมาณเบต้า-แอคติน (beta-actin) ด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอต ที่เวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังจากการได้รับความเครียดแบบต่างๆ	

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
14	กราฟแสดงปริมาณการสร้างทีเอ็นเอฟ-แอลฟา (TNF-alpha) จากเซลล์แมคโครฟาจ ..... 34 ด้วยเทคนิคอิลไลซา ภายหลังจากทำการทดสอบด้วยโปรตีนลูกผสมฮีทชอคโปรตีน 60 (rHSP60)
15	กราฟแสดงปริมาณการสร้างทีเอ็นเอฟ-แอลฟา (TNF-alpha production) จากเซลล์ ..... 36 แมคโครฟาจ ด้วยเทคนิคอิลไลซา ที่เวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังจากกระตุ้นด้วยอาหาร เลี้ยงเซลล์ (conditioned media) จากเซลล์สร้างกระดูกที่ได้รับความเครียดจากรูปแบบต่างๆ และเติมแอนติบอดีต่อฮีทชอคโปรตีน 60
16	ภาพแสดงเซลล์สร้างกระดูกที่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสและ/หรือเนโครซิส ..... 38 ที่เวลา 0 ชั่วโมง ภายหลังจากการได้รับความเครียดแบบต่างๆ และข้อมด้วยแอนเนกซินไฟว์ /โพรพิเดียมไอโอไดค์
17	กราฟแสดงจำนวนเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสและ/หรือเนโครซิสด้วย ..... 39 เทคนิคการข้อมแอนเนกซินไฟว์/โพรพิเดียมไอโอไดค์ ที่เวลา 0 ชั่วโมง ภายหลังจาก การได้รับความเครียดแบบต่างๆ
18	ภาพแสดงเซลล์สร้างกระดูกที่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสและ/หรือเนโครซิส ..... 41 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังจากการได้รับความเครียดแบบต่างๆ และข้อมด้วยแอนเนกซินไฟว์/ โพรพิเดียมไอโอไดค์
19	กราฟแสดงจำนวนเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสและ/หรือเนโครซิส ..... 42 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังจากการได้รับความเครียดแบบต่างๆ
20	กราฟแสดงปริมาณเซลล์สร้างกระดูกที่มีชีวิต ภายหลังจากทดสอบด้วยยาไอบูโพรเฟน..... 68 ที่ 1-500 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

## บทที่ 1

### ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

การบาดเจ็บของกระดูกและการหายของกระดูกเกี่ยวข้องกับขบวนการต่าง ๆ และเซลล์หลายชนิด นอกจากนี้ยังมีปัจจัยต่าง ๆ ทั้งปัจจัยเฉพาะที่และปัจจัยทางระบบที่ควบคุมขบวนการเหล่านี้ เช่น การเกิดการติดเชื้อ หรือการได้รับยาบางชนิด เป็นต้น โดยภายหลังจากการเกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อ มักเกิดสภาวะที่ทำให้มีความเครียดต่อเซลล์หรือเกิดการตายของเซลล์ ซึ่งเซลล์ที่ได้รับ ความเครียดมักตอบสนองโดยเพิ่มการแสดงออกของยีนต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนในกลุ่ม ฮีทช็อกโปรตีน (heat shock proteins) สำหรับฮีทช็อกโปรตีนเป็น โปรตีนที่ทำหน้าที่ภายในเซลล์ในการ ป้องกันการเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพธรรมชาติของโปรตีน (protein denaturation) และช่วยในการจัด รูปร่างของโปรตีน (protein folding)

เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการค้นพบหน้าที่ของฮีทช็อกโปรตีนภายนอกเซลล์ในสภาวะที่ เกิดการอักเสบจากการบาดเจ็บ โดยการหลั่งของฮีทช็อกโปรตีนเกิดจากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นโดยความเครียด และ/หรือเซลล์ที่เกิดการตายแบบเนโครติก (necrotic) และฮีทช็อกโปรตีนที่ถูกหลั่งออกมาจะทำหน้าที่ เป็นสัญญาณอันตรายจากภายใน (endogenous danger signal) ซึ่งสามารถกระตุ้นเซลล์แมโครฟาจ (macrophage) และเซลล์เดนไดรติก (dendritic cells) ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการอักเสบและควบคุม การทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยกำเนิดและภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะที่เกิดขึ้นภายหลัง (innate และ adaptive immunity) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าฮีทช็อกโปรตีนนอกเซลล์สามารถควบคุมการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายชนิด เช่น ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา (Tumor Necrosis Factor-alpha หรือ TNF- $\alpha$ ) และอินเตอร์ลิวคิน-ซิกซ์ (Interleukin-6 หรือ IL-6) ซึ่งฮีทช็อกโปรตีน 60 เป็นหนึ่งในบรรดาฮีทช็อกโปรตีนต่าง ๆ ที่สามารถกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจะมีรายงานการศึกษาถึงบทบาทของฮีทช็อกโปรตีนในการ กระตุ้นขบวนการเกิดการอักเสบภายหลังการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ แต่ยังไม่มียาจนถึงการหลั่งฮีทช็อก โปรตีน 60 จากเซลล์สร้างกระดูก ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบการเพิ่มขึ้นของระดับฮีทช็อก โปรตีน 60 ในกระแสเลือดของหญิงวัยหมดประจำเดือนแต่ยังไม่ทราบที่มาของฮีทช็อกโปรตีนนี้ และ ยังพบว่าโปรตีนลูกผสมฮีทช็อกโปรตีน 60 (recombinant HSP60) สามารถกระตุ้นการละลายกระดูก และทำให้เซลล์สร้างกระดูกเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ได้ นอกจากนี้ในขบวนการ ซ่อมแซมเนื้อเยื่อกระดูกภายหลังการบาดเจ็บมักเกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบในระยะเริ่มต้นก่อนที่จะ เข้าสู่ระยะการสร้างเนื้อเยื่อกระดูก ดังนั้นการศึกษาถึงกลไกที่เกิดขึ้นหรือสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการ

ควบคุมขบวนการอักเสบของกระดูกจึงมีความสำคัญ เพื่อนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้หรือวิจัยต่อยอด เพื่อประโยชน์ในการรักษาการบาดเจ็บของกระดูกต่อไปในอนาคต

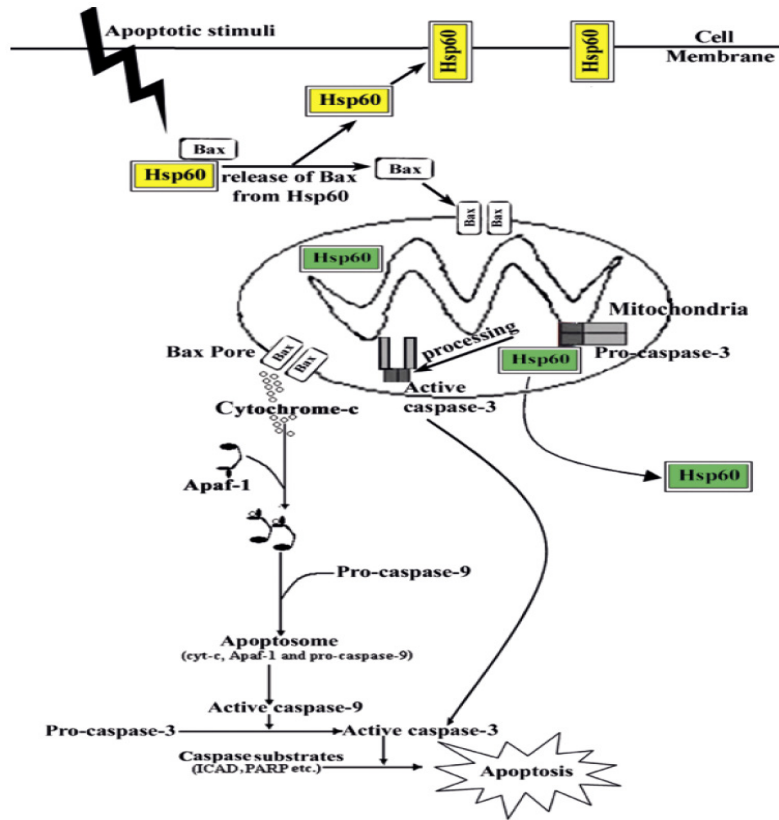
## การทบทวนวรรณกรรม

### ฮีตชอคโปรตีน

#### บทบาทของฮีตชอคโปรตีนภายในเซลล์

เซลล์ต่างๆ ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีกลไกต่าง ๆ ในการรับมือกับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอก (Environmental stress) โดยการกระตุ้นการสร้างและการทำงานของโปรตีนในกลุ่มฮีตชอคโปรตีน ซึ่งเป็นโปรตีนที่ตอบสนองต่อความเครียด (stress proteins) ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิสูง (hyperthermia), ขาดออกซิเจน (hypoxia), การอักเสบ, การติดเชื้อ, แอลกอฮอล์ และยาบางชนิด เช่น ยาปฏิชีวนะ เป็นต้น<sup>(1,2)</sup> สำหรับฮีตชอคโปรตีน เป็นกลุ่มโปรตีนที่สามารถแบ่งตามขนาดของโมเลกุลได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ กลุ่มฮีตชอคโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ได้แก่ ฮีตชอคโปรตีน 60, ฮีตชอคโปรตีน 70 และ ฮีตชอคโปรตีน 90 เป็นต้น และกลุ่มฮีตชอคโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ได้แก่ ฮีตชอคโปรตีน 27 เป็นต้น

สำหรับหน้าที่ของฮีตชอคโปรตีนภายในเซลล์เหล่านี้มีหน้าที่หลักในการทำให้เซลล์รอดชีวิตในสภาวะที่เกิดความเครียดด้วยการช่วยในขบวนการจัดรูปร่างของโปรตีนที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพธรรมชาติให้เหมาะสมหรือป้องกันการเสียสภาพและการรวมกลุ่มของโปรตีน<sup>(3)</sup> นอกจากนี้ฮีตชอคโปรตีนยังทำหน้าที่ในการปกป้องเซลล์ โดยการยับยั้งการเกิดอะพอพโทซิส และเพิ่มการมีชีวิตรอดของเซลล์ในภาวะที่เกิดความเครียด<sup>(4)</sup> ในทางตรงข้ามฮีตชอคโปรตีนบางชนิดสามารถมีผลในการกระตุ้นให้เซลล์ตายได้เช่นกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์และตำแหน่งที่เกิดพันธะสำหรับฮีตชอคโปรตีน 60 มีบทบาททั้งในการต้านการเกิดอะพอพโทซิสหรือทำให้เกิดอะพอพโทซิส ขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่อยู่ในเซลล์และการทำงานร่วมกับโปรตีนอื่น<sup>(5,6)</sup> ยกตัวอย่างเช่น ฮีตชอคโปรตีน 60 ในไซโตพลาสซึมทำหน้าที่ต้านการเกิดอะพอพโทซิส โดยไปจับกับโปรตีนแบกซ์ (Bax) และป้องกันไม่ให้เกิดการรั่วไหลของสารในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ในขณะที่ฮีตชอคโปรตีน 60 ในไมโทคอนเดรียส่งเสริมการเกิดอะพอพโทซิส โดยไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์แคสเพส-3 (caspase-3) ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แผนภาพแสดงตำแหน่งและบทบาทของฮีทช็อกโปรตีน 60 ภายในเซลล์<sup>(5)</sup>

ที่มา: Arya และคณะ (2007)

หมายเหตุ – Bax : Bax Protein, Hsp60 : Heat Shock Protein 60, Apaf-1 : Apoptotic protease activating factor 1

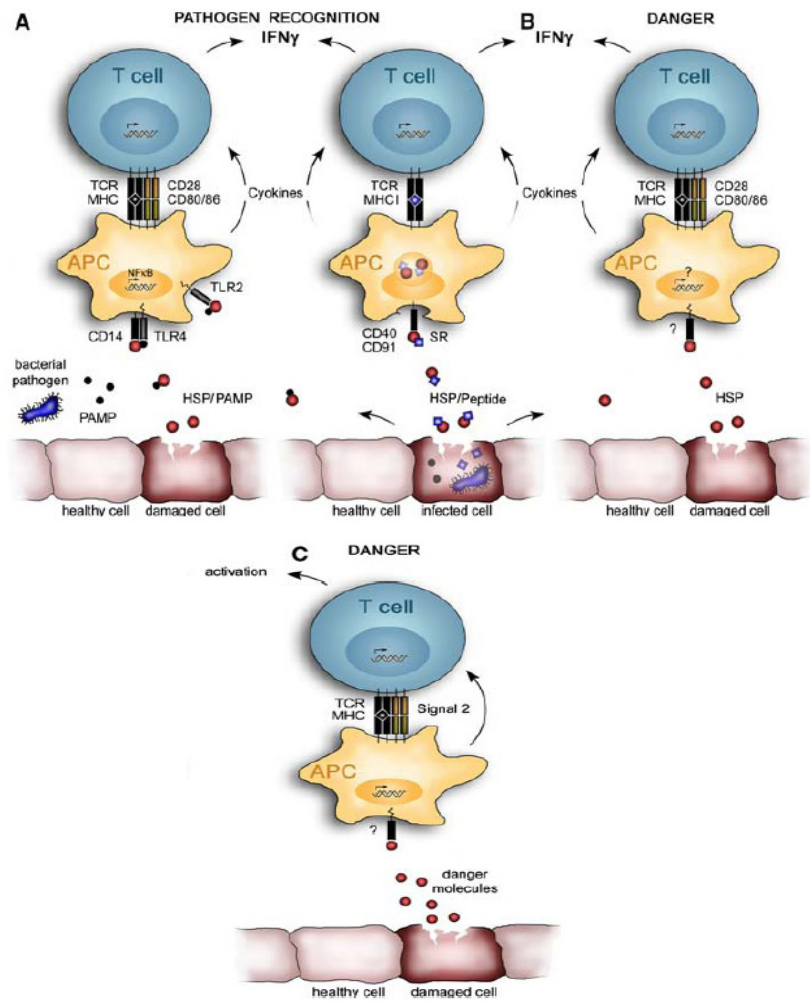
**บทบาทของฮีทช็อกโปรตีนภายนอกเซลล์**

นอกจากฮีทช็อกโปรตีนจะทำหน้าที่ภายในเซลล์แล้ว ฮีทช็อกโปรตีนยังสามารถถูกกระตุ้นให้หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ เช่น ในขณะที่เซลล์ได้รับความร้อนสูงหรือได้รับสารพิษที่เป็นอันตรายต่อเซลล์จนเกิดการรั่วไหลของเยื่อหุ้มเซลล์<sup>(7-9)</sup> ซึ่งฮีทช็อกโปรตีนที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์สามารถทำหน้าที่ในการกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน<sup>(10)</sup> โดยพบว่าเมื่อมีการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อและมีการตายของเซลล์เกิดขึ้น จะทำให้โปรตีนจากภายในเซลล์จำนวนมากถูกหลั่งออกมาอย่างรวดเร็วก่อนเกิดขบวนการอักเสบ เช่น ไฮโมบิลิตีกรู๊ปบ็อกซ์วัน (high-mobility group box 1 หรือ HMGB1)<sup>(11)</sup> ดีเฟนซิน (defensins)<sup>(12)</sup> รวมทั้งฮีทช็อกโปรตีน<sup>(13)</sup>

สำหรับฮีทช็อกโปรตีนมีบทบาทในขบวนการเกิดการอักเสบภายหลังเกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ ซึ่งอาจเกิดได้ 2 ลักษณะ ได้แก่ การอักเสบแบบปราศจากเชื้อ (sterile inflammation) ที่เกิด



จากการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้วยสัญญาณจากภายในร่างกาย ในกรณีนี้ฮีทชอคโปรตีนที่ถูกหลั่งออกมาจะมีคุณสมบัติเป็น Pathogen – Associated Molecular Pattern (PAMP) ไปจับกับเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน อีกลักษณะหนึ่งคือ การอักเสบแบบติดเชื้อ (septic inflammation) ที่เกิดจากเชื้อก่อโรคต่าง ๆ ซึ่งพบว่าฮีทชอคโปรตีนจะถูกหลั่งออกมาและไปจับกับเปปไทด์ของแบคทีเรียหรือไวรัส และถูกตรวจพบด้วยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อส่งสัญญาณให้เซลล์อื่นที่เกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบต่อไป โดยในทั้ง 2 กรณีฮีทชอคโปรตีนจะถูกหลั่งออกมาในลักษณะที่ไม่จำเพาะจากเซลล์ที่ตายแบบเนโครติค<sup>(7, 14)</sup> ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 แผนภาพแสดงฮีทชอคโปรตีนที่ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ โดยรูป A แสดงฮีทชอคโปรตีนที่ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ในกรณีที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัส, รูป B แสดงฮีทชอคโปรตีนที่ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ในกรณีที่ไม่มีการติดเชื้อ, และรูป C แสดงฮีทชอคโปรตีนที่ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ไปกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน<sup>(15)</sup>

ที่มา: Osterloh และคณะ (2009)

หมายเหตุ – APC : Antigen-presenting cells, PAMP : Pathogen-associated molecular pattern, MHC : Major Histocompatibility Class, TLR : Toll-like Receptor, SR : Scavenger Receptors

นอกจากการหลั่งของอีทซอกโปรตีนแบบไม่จำเพาะจากเซลล์ที่ตายแล้ว หลายการศึกษาพบการหลั่งของอีทซอกโปรตีนจากเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ในลักษณะที่จำเพาะและควบคุมได้<sup>(16-18)</sup> ซึ่งการที่อีทซอกโปรตีนถูกหลั่งออกมาจากเซลล์นี้จะทำหน้าที่เป็นสัญญาณอันตรายจากภายในซึ่งสามารถกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้<sup>(13, 19, 20)</sup> นอกจากนี้มีหลายการศึกษารายงานว่าเซลล์ที่ได้รับความเครียดจะมีการเพิ่มการแสดงออกของอีทซอกโปรตีนที่ผิวเซลล์และการหลั่งของอีทซอกโปรตีนออกมานอกเซลล์ ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต่าง ๆ<sup>(21-24)</sup> โดยผ่านทาง การกระตุ้นตัวรับ (receptors) ซึ่งส่งผลให้เกิดการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหรือถูกนำเข้าไปในเซลล์นำเสนอแอนติเจน (antigen-presenting cells)<sup>(25)</sup> ดังนั้นการหลั่งของอีทซอกโปรตีนจากเซลล์ที่ตายแบบเนโครติกหรือเซลล์ที่มีชีวิตแต่มีความเสียหายสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immune response) ของร่างกายได้

มีรายงานการวิจัยจำนวนมากถึงการทำงานของอีทซอกโปรตีนภายนอกเซลล์ โดยในกรณีของอีทซอกโปรตีน 60 เมื่อถูกหลั่งออกมานอกเซลล์สามารถกระตุ้นการดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาว (chemotaxis) ควบคุมการทำงานของเซลล์นิวโทรฟิล (neutrophil) และกระตุ้นการเกิดการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis)<sup>(15, 21)</sup> นอกจากนี้อีทซอกโปรตีน 60 สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตและการหลั่งไซโตไคน์จากเซลล์เดนไดรติก (dendritic cells)<sup>(26, 27)</sup> ควบคุมการเกิดการอักเสบจากการทำงานของเซลล์ทีลิมโฟไซต์ (T-lymphocyte)<sup>(28)</sup> และกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide), ทัมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา (TNF- $\alpha$ ), อินเตอร์ลิวคิน-ซิกส์ (IL-6) และอินเตอร์ลิวคิน-วันเบต้า (IL-1 $\beta$ )<sup>(10)</sup> นอกจากนี้มีรายงานว่าอีทซอกโปรตีนในปริมาณที่สูงจะทำหน้าที่ในการกระตุ้นการอักเสบ โดยเกิดจากการจับกับตัวรับ (receptor) ชนิดทอลล์ไลค์ (Toll-like receptors หรือ TLR) เช่น ตัวรับทอลล์ไลค์-2 (TLR2) และตัวรับทอลล์ไลค์-4 (TLR4) ทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ<sup>(3, 10, 29)</sup> ในขณะที่อีทซอกโปรตีนในปริมาณที่ต่ำจะทำหน้าที่ต่อต้านการเกิดการอักเสบเพื่อรักษาสมดุลของระบบภูมิคุ้มกัน<sup>(30)</sup> และเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการวิจัยพบว่าอีทซอกโปรตีน 60 สามารถกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์และทำให้เกิดการสร้างโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide), ทัมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา (TNF- $\alpha$ ), อินเตอร์ลิวคิน-ซิกส์ (IL-6), อินเตอร์ลิวคิน-ทเวล์ฟ (IL-12), อินเตอร์ลิวคิน-ฟิฟทีน (IL-15) และอินเตอร์ลิวคิน-วันเบต้า (IL-1 $\beta$ )<sup>(30)</sup> สำหรับการศึกษาทางคลินิกได้มีรายงานการพบระดับที่สูงขึ้นของอีทซอกโปรตีน 60 ภายใน 30 นาทีภายหลังจากผู้ป่วยได้รับการบาดเจ็บ ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิดความเสียหายต่อปอดแบบเฉียบพลันในผู้ใหญ่<sup>(31)</sup> นอกจากนี้ยังพบว่า

อีทชอคโปรตีน 60 ภายนอกเซลล์มีความเกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบในโรคต่าง ๆ เช่น โรคข้ออักเสบ (Arthritis)<sup>(32)</sup> และโรคเบาหวาน (Diabetes)<sup>(33)</sup> เป็นต้น

### **บทบาทของการตายของเซลล์แบบเนโครติกและอะพอพโทติกจากการได้รับความเครียดต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน**

เซลล์ของสิ่งมีชีวิตมักจะได้รับแรงกดดัน ความเครียดจากทั้งปัจจัยภายในและภายนอกทางด้านฟิสิกส์ เคมีและชีวภาพอยู่ตลอดเวลา<sup>(5)</sup> ร่างกายจึงมีกระบวนการทำลายเซลล์ที่เกิดการเสียหายออกไป กระบวนการตายที่พบได้บ่อย คือ การตายของเซลล์แบบเนโครติกและอะพอพโทติก ซึ่งการตายของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดนี้ มีความเกี่ยวข้องในกระบวนการกระตุ้นให้เซลล์ภูมิคุ้มกันของร่างกายออกมาทำหน้าที่และชักนำให้เซลล์ชนิดอื่นออกมาซ่อมแซมเนื้อเยื่อส่วนที่ถูกทำลาย

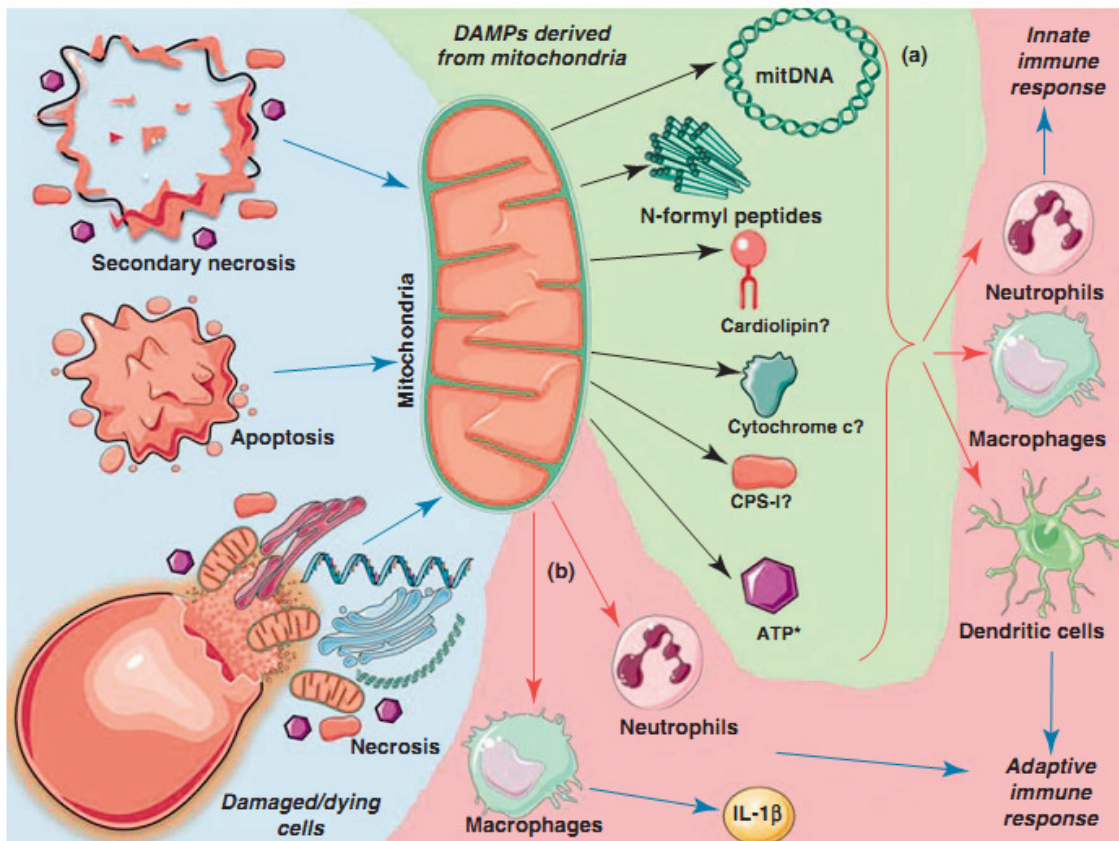
#### **การตายของเซลล์แบบเนโครติก**

การตายแบบเนโครติก เกิดขึ้นได้เมื่อเซลล์ได้รับความเครียดและแรงกดดันอย่างรุนแรง เช่น การได้รับสารไตรตอนเอ็กซ์ (Triton-X) การแช่แข็งและละลายเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดการบวมโต เพิ่มขยายขนาดมากขึ้น จนกระทั่งเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการรั่ว สูญเสียการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารที่อยู่ภายในและภายนอกเซลล์ ซึ่งเมื่อมีการตายแบบเนโครติกเกิดขึ้น จะเกิดการหลั่งสารออกมาหลายชนิด เช่น ไฮโมบิลิตีกรุปบ็อกซ์วัน (High mobility group box 1 หรือ HMG-B1), เฮปาโตมาติโรไฟโกรทแฟคเตอร์ (Hepatoma-derived growth factor หรือ HDGF), อะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP), และอีทชอคโปรตีน เป็นต้น โดยสารเหล่านี้สามารถกระตุ้นการรวมกลุ่มและเพิ่มจำนวนของเซลล์ภูมิคุ้มกันในบริเวณที่เกิดการตายของเซลล์ ส่งผลทำให้เกิดการอักเสบตามมาเนื่องจากการหลั่งของสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเพิ่มขึ้น<sup>(34)</sup>

#### **การตายของเซลล์แบบอะพอพโทติก**

การตายแบบอะพอพโทติก เกิดขึ้นได้เมื่อเซลล์ได้รับการฉายด้วยรังสียูวี การเพิ่มความร้อนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส การขาดออกซิเจน การได้รับสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) การขาดอาหารและแร่ธาตุ การได้รับยาและสารเคมี เป็นต้น การกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพอพโทติก สามารถกระตุ้นผ่านทางกระบวนการ 2 กระบวนการ คือ กระบวนการภายใน (Intrinsic pathway) ซึ่งเกิดจากการรั่วไหลของสารที่อยู่ภายในไมโทคอนเดรียออกมายังไซโตพลาสซึม และกระบวนการภายนอก (Extrinsic pathway) ซึ่งเกิดจากการกระตุ้นตัวรับบนผิวเซลล์ (Receptor) เช่น ฟาสรีเซปเตอร์ (Fas Receptors หรือ FasR), ดีคอยรีเซปเตอร์ 4/5 (Decoy Receptor หรือ DR4/5), ทูเมอร์เนโครซิสแฟคเตอร์รีเซปเตอร์วัน (Tumor Necrosis Factor Receptor 1 หรือ TNFR1) เป็นต้น แล้ว

เกิดการเหนี่ยวนำภายในเซลล์ให้เกิดกระบวนการตายแบบอะพอโทติกขึ้น ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ในการตายแบบอะพอโทติกจะเกิดการหลั่งโมเลกุลจากไมโทคอนเดรียที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย หรือเรียกว่า Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) ออกมานอกเซลล์ ตัวอย่างของโมเลกุลเหล่านี้ ได้แก่ ไซโตโครมซี (Cytochrome c), คาร์ดิโอไลปิน (Cardiolipin), รีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์ (Reactive oxygen species), และอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (Adenosine 5-Triphosphate หรือ ATP) <sup>(34)</sup> ดังแสดงในรูปที่ 3



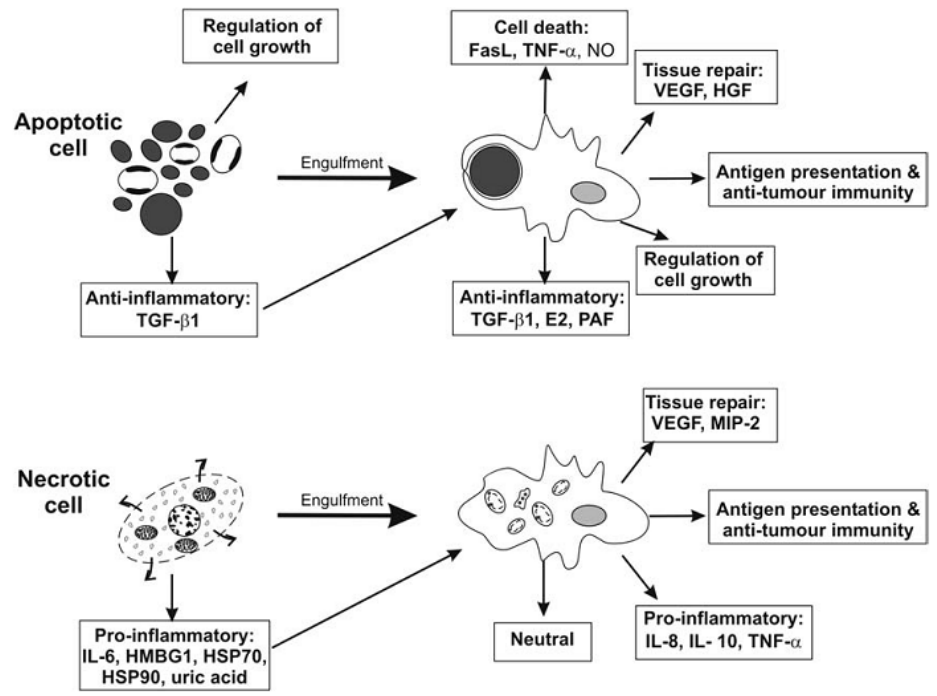
รูปที่ 3 แผนภาพแสดงโมเลกุลที่ถูกหลั่งออกมาจากไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอโทติก <sup>(34)</sup>

ที่มา: Krysko และคณะ (2011)

นอกจากการหลั่งโมเลกุลในไมโทคอนเดรียออกมาภายนอกเซลล์แล้ว การตายแบบอะพอโทติกยังสามารถกระตุ้นหรือควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้โดยการหลั่งโมเลกุลภายในไซโตพลาสซึม ออกมาหลายชนิด <sup>(35)</sup> เช่น ทรอมโบสปอนดิน (Thrombospondin 1 หรือ TSP 1), ไลโซฟอสฟาติลโคลีน (Lysophosphatidylcholine หรือ LPC) และแลคโตเฟอริน (Lactoferrin หรือ LTF) เป็นต้น ซึ่งสารที่ถูกหลั่งออกมาจะทำหน้าที่ในการดึงดูดและกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันของร่างกายในปริมาณที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดการกำจัดเซลล์ที่ตายแบบอะพอโทติกภายในระยะเวลาอันรวดเร็ว

นอกจากนี้ยังมีส่วนช่วยลดและยับยั้งการสร้างสรรค์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ ทุเมอร์เน โครซิส แฟคเตอร์-แอลฟา (TNF- $\alpha$ ), อินเตอร์ลิวคิน-วัน (IL-1), และอินเตอร์ลิวคิน-ซิกซ์ (IL-6)

จากข้อมูลข้างต้น สามารถสรุปได้ว่าการตายแบบอะพอพโทติกและเนโครติกมีกระบวนการเกิดและกลไกการกระตุ้นตอบสนองของเซลล์ที่เกี่ยวข้องในลักษณะที่แตกต่างกัน โดยเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทติกจะเกิดการกระตุ้นของสารที่เกี่ยวข้องกับการต่อต้านการอักเสบและสารที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนหรือการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับซ่อมแซมในบริเวณที่ถูกทำลายไป แต่เซลล์ที่เกิดการตายแบบเนโครติกจะไปกระตุ้นกลไกที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 แผนภาพแสดงการตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันต่อเซลล์ที่ที่เกิดการตายแบบอะพอพโทติกและเนโครติก<sup>(36)</sup>

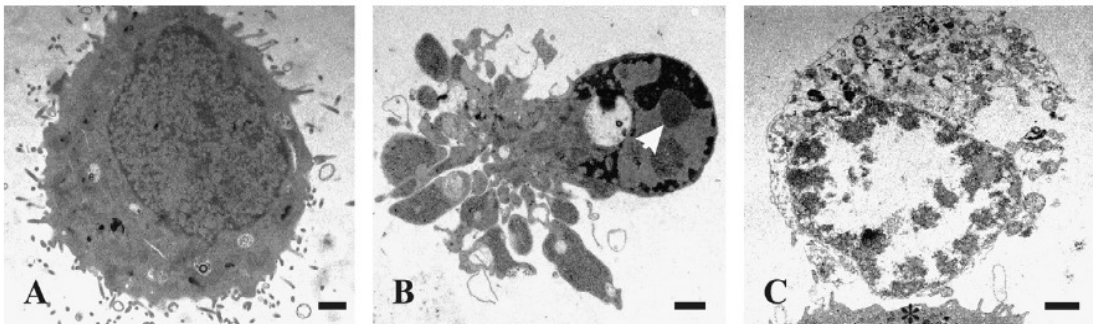
ที่มา: Krysko และคณะ (2006)

### การตรวจสอบการตายของเซลล์แบบเนโครติกและอะพอพโทติก

การตายแบบเนโครติกและอะพอพโทติก สามารถแยกความแตกต่างออกจากกันได้ โดยการวิเคราะห์รูปร่างและทางกระบวนการชีวเคมีที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน<sup>(37)</sup> ซึ่งวิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ห้มีดังต่อไปนี้

### 1) วิเคราะห์คุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เซลล์ปกติทั่วไปจะมีไมโครวิลไล (microvilli) ยื่นออกมาบริเวณพื้นผิวตลอดทั้งเซลล์ โครมาติน (chromatin) ในนิวเคลียส และออร์แกเนล (organelles) ที่อยู่ในไซโตพลาสซึมที่สมบูรณ์ แต่เมื่อเกิดการตายแบบอะพอพโทติก รูปร่างของเซลล์จะเกิดการบิดและขดเข้าหากัน เกิดการอัดแน่นของโครมาติน ในขณะที่เมื่อเกิดการตายแบบเนโครติก ไมโทคอนเดรียในเซลล์จะเกิดการบวมโต เซลล์เมมเบรนจะเกิดการขาดออกจากกัน เชื่อมต่อกันไม่สมบูรณ์ ดังที่แสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 แผนภาพแสดงภาพเซลล์ในสภาวะปกติ เซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทติก และเนโครติก <sup>(37)</sup>

ที่มา: Krysko และคณะ (2008)

### 2) การวิเคราะห์คุณลักษณะของผิวเซลล์

เซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอพโทติกจะมีการพลิกสลับของฟอสฟาติดีลเซอริน (Phosphatidylserine หรือ PS) จากบริเวณด้านในของผิวเซลล์ออกมาสู่ด้านนอกของผิวเซลล์ ส่วนเซลล์ที่เกิดการตายแบบเนโครติก จะเกิดการรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ มีการแลกเปลี่ยนสารระหว่างภายนอกและภายในได้ง่าย ซึ่งการวิเคราะห์ทำได้โดยการย้อมด้วยแอนเนกซินไฟว์ (Annexin V) ที่เชื่อมต่อกับสารฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent) ตรงบริเวณฟอสฟาติดีลเซอรินบนผิวของเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทติก หรือย้อมด้วยสีโพรพิเดียมไอโอไดด์ (Propidium iodide) ซึ่งจะสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีการรั่วและไปจับที่กรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ของเซลล์ที่เกิดการตายแบบเนโครติก

### 3) การแสดงออกของสารที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์

การตายแบบอะพอพโทติกจะเริ่มต้นจากเอนไซม์แคสเพส (caspases) ภายในเซลล์ และชักนำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์แคสเพส-3 (caspase-3) และแคสเพส-7 (caspase-7) ออกมาภายนอกเซลล์ ส่วนการตายแบบเนโครติก จะเกิดการหลั่งของเอนไซม์แลคเตทเดไฮโดรจีเนส

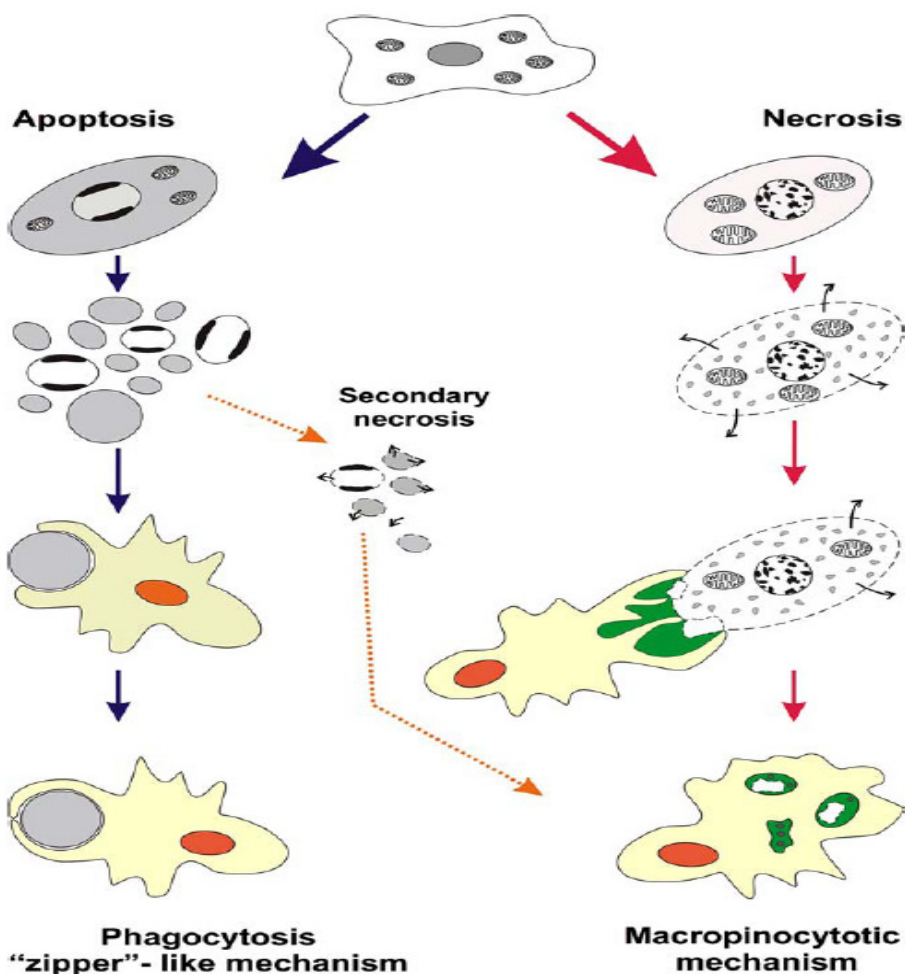
(Lactate dehydrogenase หรือ LDH) ออกมาภายนอกเซลล์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่เชื่อมต่อกันไม่สมบูรณ์ สำหรับสารที่หลั่งออกมาจากเซลล์นี้สามารถตรวจหาได้จากเทคนิคอิมมูโนออสซา (ELISA) วิเคราะห์โปรตีนด้วยเวสเทิร์นบลอต (Western blot) หรือการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แคสเพส (Caspase activation)

#### 4) การแสดงออกของสารที่อยู่ภายในเซลล์

การตายแบบอะพอพโทติกจะเกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) การรั่วไหลของไซโทโครม ซี (Cytochrome c) ออกจากไมโทคอนเดรียเข้าสู่ไซโตพลาสซึม การทำงานของเอนไซม์แคสเพสชนิดต่างๆ ซึ่งสามารถวิเคราะห์ด้วยเทคนิควิเคราะห์โปรตีนเวสเทิร์นบลอต, การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์, การวิเคราะห์เซลล์ด้วยฟลูออริโดเมตรี (flow cytometry) แต่การตายแบบเนโครติก จะไม่มีการแสดงออกของลักษณะข้างต้น

#### 5) ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์

เซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวจะมีการตอบสนองต่อเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอพโทติกและเนโครติก แตกต่างกัน โดยเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอพโทติกจะถูกโอบกั้นด้วยเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด ไม่เหลือส่วนใดส่วนหนึ่งของเซลล์ออกมาภายนอกเลย หรือเรียกว่า กลไกการกลืนกินของเซลล์ที่สมบูรณ์ (Phagocytosis zipper-like mechanism) แต่เซลล์ที่ตายแบบเนโครติกจะเกิดการรั่วไหลของสารออกมาภายนอกเซลล์ จึงถูกโอบกั้นได้เพียงบางส่วน หรือเรียกว่า กลไกการกลืนกินของเซลล์ที่ไม่สมบูรณ์ (Macropinocytotic mechanism) ซึ่งทำการวิเคราะห์ได้โดยการย้อมเซลล์ด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ ดังที่แสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 แผนภาพแสดงภาพเซลล์แมคโครฟาจโอบจับเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทติกและเนโครติก

ที่มา : Krysko และคณะ (2006)

### ผลของความเครียดจากอุณหภูมิสูงและยาต้านการอักเสบในกลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) ต่ออีทชอคโปรตีน

ความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอกที่มีผลต่อเซลล์อาจเกิดได้หลายลักษณะ อย่างไรก็ตามในกรณีของเนื้อเยื่อกระดูกพบว่า การทำศัลยกรรมกระดูกมักก่อให้เกิดการบาดเจ็บต่อเนื้อเยื่อกระดูกในลักษณะต่าง ๆ รวมทั้งอาจเกิดการบาดเจ็บจากอุณหภูมิที่สูงมากผิดปกติระหว่างการกรอกระดูกโดยเฉพาะอย่างยิ่งกระดูกที่มีเนื้อแน่น<sup>(38)</sup> ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ความร้อนสูงที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานกว่า 1 นาที สามารถทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์กระดูก ส่งผลทำให้เกิดการละลายของกระดูก ตลอดจนรบกวนการซ่อมแซมของกระดูกได้ อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบกลไกที่เกี่ยวข้องแน่ชัด โดยมีหลายการศึกษาแสดงให้เห็นว่าความร้อนสูงที่ 42-46 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 ถึง 60 นาทีสามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้หลายชนิด<sup>(39-42)</sup> ซึ่ง Li และคณะ ในปี



1999<sup>(43)</sup> พบว่า เมื่อทดสอบเซลล์สร้างกระดูกจากกะโหลกหนูด้วยความร้อนสูงที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส จะทำให้เกิดการตายของเซลล์ทั้งแบบเนโครซิสและแบบอะพอพโทซิส ในขณะที่ความร้อนที่อุณหภูมิ 42 หรือ 45 องศาเซลเซียส ไม่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในเซลล์สร้างกระดูกของมนุษย์พบว่า ความร้อนที่อุณหภูมิสูง 43 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์สร้างกระดูกได้<sup>(44)</sup> อย่างไรก็ตามมีการรายงานถึงผลในเชิงบวกของความร้อนที่อุณหภูมิ 41-44 องศาเซลเซียส ในการกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคมอล (mesenchymal stem cell) ของมนุษย์ให้มีการเกิดดิฟเฟอเรนซิเอชัน (differentiation) มากขึ้น<sup>(45)</sup>

ถึงแม้ว่าความร้อนที่อุณหภูมิสูงจะทำให้เกิดการตายของเซลล์ มีการศึกษาพบว่า อุณหภูมิที่สูงในระดับที่ไม่ทำให้เซลล์ตายสามารถกระตุ้นการสร้างโปรตีนในกลุ่มฮีทชอกโปรตีนหรือกระตุ้นการแสดงออกของยีนฮีทชอกโปรตีน เช่น ฮีทชอกโปรตีน 27, 60, และ 70 ได้<sup>(7, 19, 46)</sup> และมีรายงานการเพิ่มปริมาณของฮีทชอกโปรตีนภายหลังการกระตุ้นเซลล์เยื่อบุผิวที่อุณหภูมิสูง 42 ถึง 47 องศาเซลเซียส<sup>(47, 48)</sup> โดย Saito และคณะ ในปี 2005 พบว่าความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงสามารถกระตุ้นการแสดงออกของฮีทชอกโปรตีน 27, 40 และ 70 ในเซลล์ฮีลา (HeLa) ได้<sup>(7)</sup> ในขณะที่ Trieb และคณะ ในปี 2007 รายงานว่ามีการเพิ่มการแสดงออกของฮีทชอกโปรตีน 70 ภายหลังจากที่เซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ได้รับความร้อนที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง<sup>(46)</sup> อย่างไรก็ตามสำหรับฮีทชอกโปรตีน 60 พบว่า ไม่พบการกระตุ้นการแสดงออกของฮีทชอกโปรตีน 60 ในเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 43 หรือ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ถึง 30 นาที<sup>(44)</sup> นอกจากนี้มีรายงานว่ากระตุ้นการแสดงออกของฮีทชอกโปรตีนจะเห็นได้ชัดเมื่อเซลล์ที่ทำการทดสอบได้รับความร้อนเป็นระยะเวลา 1-2 ชั่วโมง<sup>(1)</sup> สำหรับการกระตุ้นการหลั่งฮีทชอกโปรตีน 60 พบว่า สามารถตรวจพบฮีทชอกโปรตีน 60 หลังออกมาภายใน 48 ชั่วโมง ภายหลังจากทำการทดสอบเซลล์ฮีลา (HeLa) ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงและทำให้เกิดเนโครซิสด้วยการแข่งสลับกับการละลาย<sup>(7, 14)</sup> สำหรับเซลล์สร้างกระดูกไม่พบการหลั่งฮีทชอกโปรตีนออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ภายหลังการได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 43 ถึง 46 องศาเซลเซียส<sup>(44)</sup>

สำหรับยาต้านการอักเสบในกลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์เป็นยาที่มีการใช้ร่วมในการบรรเทาอาการปวดและการอักเสบต่างๆ รวมทั้งภายหลังการเกิดกระดูกหักหรือการทำศัลยกรรมกระดูก<sup>(49)</sup> อย่างไรก็ตามพบว่ายาในกลุ่มนี้มีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการซ่อมแซมของกระดูกในสัตว์ทดลอง<sup>(50-53)</sup> ซึ่งฤทธิ์ของยาในกลุ่มนี้จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพรอสตาแกลนดินอีทู (Prostaglandin E<sub>2</sub> หรือ PGE<sub>2</sub>) ได้แก่ ไซโคลออกซิเจเนส-วัน (cyclo-oxygenase-1) และ ไซโคลออกซิเจเนส-ทู (cyclo-oxygenase-2) ตัวอย่างของยาในกลุ่มนี้ เช่น ไอบูโพรเฟน (Ibuprofen) เป็นต้น โดยยาไอบูโพรเฟนเป็นยาในกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไซโคลออกซิเจเนสทั้ง 2 ชนิด สำหรับ

การศึกษาถึงผลข้างเคียงของยาต้านการอักเสบในกลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ในการทำให้การซ่อมแซมของกระดูกล่าช้ายังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัด โดยพบว่า ยาต้านการอักเสบในกลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำให้เกิดการตายของเซลล์สร้างกระดูกที่เพาะเลี้ยงได้<sup>(54-58)</sup> นอกจากนี้การศึกษาในสัตว์ทดลองแสดงให้เห็นว่า ยาต้านการอักเสบในกลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์มีผลข้างเคียงต่อระยะการเกิดการอักเสบแต่ไม่มีผลต่อการเกิดการสร้างและสะสมแร่ธาตุของกระดูกในกระบวนการซ่อมแซมกระดูก<sup>(59, 60)</sup> นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ยาต้านการอักเสบในกลุ่มที่ไม่ใช่ สเตียรอยด์เป็นระยะเวลาสั้นมีผลกระทบต่อกระบวนการซ่อมแซมกระดูกน้อย ในขณะที่การใช้ยาในกลุ่มนี้เป็นเวลานานส่งผลให้เกิดการเกิดการซ่อมแซมกระดูกได้ช้าลง<sup>(61-64)</sup> นอกจากนี้ยังมีหลายการศึกษาในสัตว์ทดลองซึ่งพบว่ายาต้านการอักเสบในกลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ไม่มีผลต่อการซ่อมแซมกระดูก<sup>(65-67)</sup> อย่างไรก็ตามผลการศึกษาในมนุษย์ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดถึงผลข้างเคียงของยาต้านการอักเสบในกลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ต่อการซ่อมแซมกระดูก<sup>(68)</sup> สำหรับผลของยาต้านการอักเสบในกลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ต่ออิทธิพลของโปรตีน ได้มีการศึกษาพบว่ายาต้านการอักเสบในกลุ่มนี้สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดความเครียดและตอบสนองโดยการกระตุ้นอิทธิพลของโปรตีนได้เช่นกัน<sup>(69, 70)</sup> ตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Mortaz และคณะในปี 2006 พบว่าการใช้ยาอะซิติลซาลิไซลิก แอซิด (acetylsalicylic acid) สามารถกระตุ้นการหลั่งอิทธิพลของโปรตีนจากเซลล์แมสต์ (mast cells) ได้และส่งผลให้เกิดการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบอื่น ๆ เพิ่มขึ้นตามมา เช่น ทัมเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา (TNF- $\alpha$ ) และอินเตอร์ลิวคิน-ซิกซ์ (IL-6) อย่างไรก็ตามยังไม่พบการศึกษาถึงการหลั่งอิทธิพลของโปรตีนจากเซลล์กระดูกหลังจากได้รับยาในกลุ่มนี้

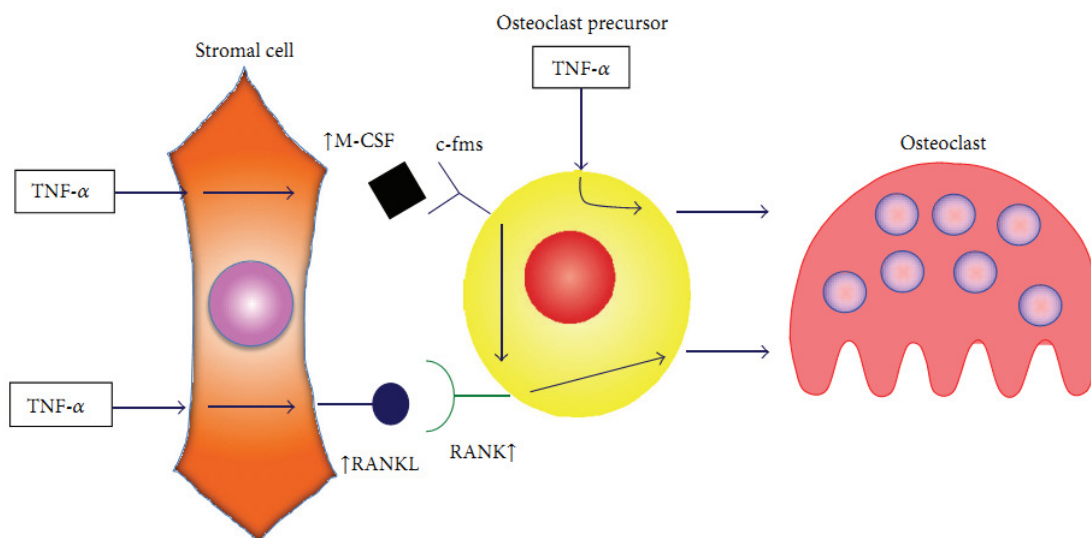
#### บทบาทของอิทธิพลของโปรตีนและไซโตไคน์ต่อกระดูก

ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาจำนวนมากถึงบทบาทของอิทธิพลของโปรตีนในเนื้อเยื่อหลายชนิด แต่ยังมีศึกษาน้อยมากถึงบทบาทของอิทธิพลของโปรตีนในเนื้อเยื่อกระดูก โดยการศึกษาส่วนใหญ่รายงานถึงการกระตุ้นอิทธิพลของโปรตีน 27 ในเซลล์สร้างกระดูก MC3T3-E1 ภายหลังจากทดสอบด้วยทรานสฟอร์มมิงโกรทแฟกเตอร์เบต้า (Transforming Growth Factor-beta หรือ TGF- $\beta$ )<sup>(71)</sup> หรือพรอสตาแกลนดินอีทู (Prostaglandin E<sub>2</sub> หรือ PGE<sub>2</sub>)<sup>(72)</sup> รวมทั้งมีรายงานการแสดงผลของอิทธิพลของโปรตีน 27, 47, และ 70 ในเซลล์กระดูกภายในร่างกาย<sup>(73)</sup> นอกจากนี้ได้มีรายงานถึงการพบระดับที่เพิ่มขึ้นของอิทธิพลของโปรตีน 60 ในหญิงวัยหมดประจำเดือนแต่ไม่ทราบที่มาของอิทธิพลของโปรตีนเหล่านี้<sup>(74)</sup> และจากการศึกษาถึงผลของโปรตีนลูกผสมอิทธิพลของโปรตีน 60 (recombinant HSP60) ต่อเซลล์สโตรมาลในไขกระดูก (human bone marrow stromal cells) พบว่า อิทธิพลของโปรตีน 60 ที่ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เซลล์สร้างกระดูกเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในห้องปฏิบัติการ ในขณะที่การใช้อิทธิพลของโปรตีน 60 ร่วมกับรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปบาบีลิแกนด (Receptor

Activator of Nuclear Factor-kappa B Ligand หรือ RANKL) จะกระตุ้นการสร้างและการเจริญเติบโตของเซลล์หลายกระดูกได้<sup>(74, 75)</sup>

สำหรับบทบาทของอีทซอคโปรตีนในการซ่อมแซมของกระดูกยังไม่พบการรายงาน อย่างไรก็ตามเนื่องจากในขบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อภายหลังจากเกิดความเสียหายต่อกระดูกหรือการทำสัลยกรรมกระดูก มักเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในขบวนการอักเสบซึ่งจะเกิดขึ้นในระยะแรก<sup>(76)</sup> โดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดจะทำหน้าที่ในการกำจัดเนื้อเยื่อที่เกิดการตายจากการบาดเจ็บและเกิดการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายชนิดภายหลังเกิดการบาดเจ็บ เพื่อไปกระตุ้นการทำงานของเซลล์โมโนไซต์ (monocytes) หรือแมโครฟาจ เช่น อินเตอร์ลิวคินวัน (IL-1), อินเตอร์ลิวคินซิกซ์ (IL-6) และทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา (TNF- $\alpha$ ) เป็นต้น ดังนั้นขบวนการอักเสบจึงมีบทบาทสำคัญในการเกิดการซ่อมแซมเนื้อเยื่อกระดูก แต่หากการอักเสบเกิดขึ้นเป็นระยะเวลาานอาจส่งผลให้เกิดความล่าช้าในการซ่อมแซมกระดูกได้ สำหรับทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา (TNF- $\alpha$ ) เป็นไซโตไคน์ที่นอกจากจะเกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบแล้ว ยังทำหน้าที่ชักนำเซลล์ตั้งต้นของเซลล์หลายกระดูกมายังบริเวณที่อักเสบ ทำให้เกิดการหลั่งแมโครฟาจโคลอนีสติมูเลตติ้งแฟกเตอร์ (Macrophage Colony Stimulating Factor หรือ M-CSF) และรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีลิแกนด (RANKL) จากเซลล์สโตรมอล ส่งผลให้เซลล์ตั้งต้นของเซลล์หลายกระดูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์หลายกระดูกที่สมบูรณ์<sup>(77)</sup> ดังแสดงในรูปที่ 7

อย่างไรก็ตามเมื่อไม่นานมานี้มีงานวิจัยพบว่าทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟาอาจมีผลกระตุ้นเซลล์สร้างกระดูกได้ โดยพบว่า ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟาที่ความเข้มข้น 20 ถึง 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถกระตุ้นการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส<sup>(78)</sup> ในขณะที่ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟาที่ความเข้มข้น 0.01 ถึง 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรมีผลยับยั้งการกระตุ้นเซลล์สร้างกระดูกและการสะสมแร่ธาตุ<sup>(79)</sup> ดังนั้นการหลั่งของทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟาในปริมาณที่เหมาะสม อาจช่วยควบคุมให้ขบวนการอักเสบเกิดขึ้นในปริมาณและระยะเวลาที่เหมาะสม ส่งผลให้เกิดการซ่อมแซมของกระดูกที่สมบูรณ์ภายในระยะเวลาที่เหมาะสมต่อไป



รูปที่ 7 แผนภาพแสดงบทบาทของเซลล์แมคโครฟาจและทูเมอร์เนโครซิสแฟคเตอร์-แอลฟาในการเกิดเซลล์ละลายกระดูก<sup>(77)</sup>

ที่มา: Kitaura และคณะ (2013)

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการหลั่งฮีทชอคโปรตีน 60 จากเซลล์สร้างกระดูกที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ในสถานะที่ได้รับความเครียดรูปแบบต่าง ๆ ในระดับที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์
2. เพื่อศึกษาผลของเซลล์สร้างกระดูกที่ได้รับความเครียดต่อการสร้างทูเมอร์เนโครซิสแฟคเตอร์-แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจ
3. เพื่อศึกษารูปแบบการตายของเซลล์สร้างกระดูกที่ได้รับความเครียดในรูปแบบต่าง ๆ

### สมมติฐาน

เซลล์สร้างกระดูกที่ได้รับความเครียดในลักษณะที่ทำให้เกิดการตายแบบเนโครติกสามารถหลั่งฮีทชอคโปรตีน 60 ออกมาภายนอกเซลล์ และสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างทีเอ็นเอฟ-แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจมากขึ้น

### ขอบเขตการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาการหลั่งของฮีทชอคโปรตีน 60 จากเซลล์สร้างกระดูกนอกร่างกาย โดยทำการให้ความเครียดกับเซลล์ในรูปแบบต่าง ๆ ในระดับที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์และวิเคราะห์การหลั่งของฮีทชอคโปรตีน 60 ด้วยเทคนิคเวสต์เทิร์นบลอต สำหรับกลไกการตายของเซลล์จะ

ทำการวิเคราะห์การหลังแลคเตทดีไฮโดรจิเนส และการเปลี่ยนแปลงของเชื้อหุ้มเซลล์โดยเทคนิคการย้อมด้วยแอนเนกซินไฟว์/โพรพิเดียมไอโอไดด์ สำหรับการวิเคราะห์การสร้างทีเอนเอฟ-แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจ จะทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอีไลซา

### **ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

ทราบถึงการหลังอิทธิพลของโปรตีน 60 จากเซลล์สร้างกระดูกที่ได้รับความเครียดในรูปแบบต่าง ๆ และผลต่อการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบ เพื่อเป็นความรู้พื้นฐานและนำไปสู่การวิจัยในการป้องกันหรือบรรเทาการเกิดกรอักเสบที่มีสาเหตุมาจากการบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์สร้างกระดูกในสภาวะต่าง ๆ

## บทที่ 2

### วัสดุสารเคมีและอุปกรณ์

#### วัสดุสารเคมีและอุปกรณ์

วัสดุสารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ห้ระบุใน ตารางที่ 1 และ ตารางที่ 2 ตามลำดับ

#### ตารางที่ 1 วัสดุสารเคมี

วัสดุสารเคมี	บริษัท/ประเทศ
1. อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดัลเบคโค โมดิฟายด์อีเกิลมีเดียม (Dulbecco ' s modified eagle medium หรือ DMEM) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.3	Life Technology Corporation, USA
2. แอล-กลูตามีน (L-glutamine )	Life Technology Corporation, USA
3. ยาปฏิชีวนะและยาด้านเชื้อรา (Antibiotics-Antimycotics)	Life Technology Corporation, USA
4. ซีรั่มฟอสเฟต (Fetal Bovine Serum หรือ FBS)	Life Technology Corporation, USA
5. ไตรทอนเอกซ์ – 100 (Triton X – 100)	Fluka, Switzerland
6. ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris –Hydrochloride)	Sigma, Germany
7. โซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate หรือ $\text{NaHCO}_3$ )	MERCK, Germany
8. ชุดตรวจสำเร็จรูป Annexin -V- FLUOS staining kit	Roche Applied Science, USA
9. เอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ (Trypsin – EDTA)	Life Technology Corporation, USA
10. โซเดียมฟลูออไรด์ (Sodium Fluoride)	Carlo Erba, Italy
11. ไดไทโธเรอิตอล (Dithiothreitol หรือ DTT )	Fluka, Switzerland
12. อีดีทีเอ (EDTA)	Fluka, Switzerland
13. อะคริลลาไมด์ ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ (30% Acrylamide)	Bio-RAD, USA
14. โบรโมฟินอลบลู (Bromophenol blue)	Sigma, Germany
15. เมทานอล (Methanol)	MERCK, Germany
16. มวลโมเลกุลโปรตีนมาตรฐาน	Bio-RAD, USA
17. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium Persulfate หรือ APS)	BDH, England

ตารางที่ 1 (ต่อ)

วัสดุสารเคมี	บริษัท/ประเทศ
18. นมผงไร้ไขมัน (Non – fat dry milk) (Kaleidoscope prestained standards)	Bio-RAD, USA
19. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride)	MERCK, Germany
20. โซเดียมไพโรฟอสเฟต (Sodium pyrophosphate)	Sigma, Germany
21. ทวิน-20 (Tween 20)	Fluka, Switzerland
22. ชุดตรวจสำเร็จรูป Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Applied Science, USA
23. ชุดตรวจปริมาณโปรตีนแบบบีซีเอ (BCA Protein assay kit)	Pierce, USA
24. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate หรือ SDS)	Sigma, Germany
25. กลีเซอรอล (Glycerol)	Fluka, Switzerland
26. แอนติบอดีต่อฮีทชอกโปรตีน 60 จากหนู (Mouse HSP 60 antibody)	Chemicon, USA
27. แอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินจีของหนูที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์ฮอราดิชเปอร์ออกซิเดส (Horseradish Peroxidase (HRP)-conjugated anti –mouse IgG)	Jackson Immunoresearch, USA
28. แอนติบอดีต่อเบต้า-แอคติน (Mouse beta-actin antibody)	Cell Signaling, USA
29. ซับสเตรทแบบเคมีลูมิเนสเซนส์ระดับพิโคกรัม (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate)	Pierce, USA
30. ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide หรือ LPS)	Sigma, Germany
31. ตะแกรงแยกเซลล์ (Cell strainer)	BD Falcon, USA
32. จานหลุมแบบ 96 หลุม	NUNC, Denmark
33. โปรตีนลูกผสมฮีทชอกโปรตีน 60 (Recombinant HSP 60 หรือ rHSP60)	Stressgen, USA
34. ชุดตรวจอีไลซ่าสำหรับทีเอ็นเอฟแอลฟาของหนู (Mouse TNF- $\alpha$ ELISA)	eBioscience, USA
35. โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride หรือ KCl)	Ajax Fine Chem, Australia

ตารางที่ 1 (ต่อ)

วัสดุสารเคมี	บริษัท/ประเทศ
36. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate หรือ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	MERCK, Germany
37. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (di-Sodium hydrogen phosphate หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	MERCK, Germany
38. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต (Sodium dihydrogen phosphate dehydrate หรือ $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Fluka, Switzerland
39. ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร (75 cm <sup>2</sup> tissue culture flask)	Corning Incorporated , USA
40. จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 100 มิลลิเมตร (100 mm tissue culture dish)	Corning Incorporated, USA
41. ถาดหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุมและ 24 หลุม (6-well plate และ 24-well plate)	Corning Incorporated, USA
42. หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Microcentrifuge tube)	Biologix Research Company, USA
43. หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร	Corning, USA
44. เครื่องมือขูดเซลล์ (Cell scraper)	SPL Life Sciences, Korea
45. สไลด์และกระจกปิดสไลด์	Sail Brand, China
46. ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane)	Bio-RAD, USA
47. ฟิล์มเอ็กซ์เรย์ (Clear blue X – ray film)	Thermo Scientific, USA



## ตารางที่ 2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัท/ประเทศ
1. ตู้ปลอดเชื้อระดับ 2 (Class II Bio Safety Cabinet)	ABS 1200	Bioquell, UK
2. ตู้เลี้ยงเซลล์ (Incubator)	HERAcell 240	Heraeus, Germany
3. สไลด์นับเซลล์เม็ดเลือด (Haemocytometer)	-	BOECO, Germany
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบปรับอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)	HSC 15R	Thermo Scientific, USA
5. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ แบบเฟสคอนทราสต์ (Phase contrast inverted microscope)	TMS-F	Nikon, Japan
6. เครื่องทำแห้งด้วยความเย็น (Lyophilizer)	Alpha2-4 LSC	Martin Christ, Germany
7. ตู้แช่เย็น 4 องศาเซลเซียส	J-elegance	Mitsubishi, Japan
8. ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส	UF 756	Dometic, USA
9. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส	SF-C997	Sanyo, Japan
10. หม้อนึ่งอัตโนมัติ (Autoclave)	SS-325	Tomy, Japan
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	W350	Memmert, Germany
12. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)	D-78532	Hettich, Germany
13. เครื่องเขย่าสาร (Vortex)	G-560E	ScientificIndustries,USA
14. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	520A	ORION, USA
15. เครื่องถ่ายภาพได้แสงยูวี (UV transilluminator)	TS-312A	Spectroline, USA
16. กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescent microscope)	DP71	Olympus, Japan
17. เครื่องอ่านจานหลุมแบบ 96 หลุม (Microplate reader)	MK II	Titertek, UK
18. เครื่องทำน้ำกลั่นบริสุทธิ์	PURELAB Classic	ELGA, UK
19. ชุดเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Mini gel electrophoresis system)	AE-6450	ATTO, Japan

ตารางที่ 2 (ต่อ)

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัท/ประเทศ
20. ชุดถ่ายโอนโปรตีนด้วยไฟฟ้า (Mini trans – blot electrophoretic transfer system)	Mini Trans-blot	Bio-RAD, USA
21. เครื่องล้างฟิล์ม (Film processor)	Dent-X 9000	ADA, USA
22. เครื่องวัดความเข้มของฟิล์ม (Densitometer)	Molecular Analyst V.1.4.1	Bio-RAD, USA
23. เครื่องดูด-จ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Microplate washer)	S8/12	Titertek, UK

## วิธีการวิจัย

### การเพาะเลี้ยงเซลล์

#### 1. เซลล์สร้างกระดูก

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษา คือ เซลล์ MC3T3-E1 ซึ่งเป็นเซลล์ pre-osteoblast จากกะโหลกศีรษะของหนู จากบริษัท ATCC ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดแอลฟา-เอ็มอีเอ็ม ( $\alpha$ -MEM) ที่ประกอบด้วยฟิแทลโบไวน์ซีรัม (Fetal Bovine Serum) ร้อยละ 10, แอล-กลูตามีน (L-glutamine) 2 มิลลิโมลาร์, ยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลินจี (Penicillin G), สเตربتโตมัยซินซัลเฟต (Streptomycin sulfate) และยาฆ่าเชื้อราแอมโฟเทอริซินบี (Amphotericin B) ในปริมาณ 100 หน่วยสากลต่อมิลลิลิตร, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้น ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนกระทั่งมีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 80-95 จะถูกนำมาแยกออกจากขวดเพาะเลี้ยง โดยใช้เอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 จากนั้นนับเซลล์ด้วยสไลด์นับเซลล์เม็ดเลือด และหว่านเซลล์ลงไปเพาะเลี้ยงในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ จนได้เซลล์ที่มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 90 ของพื้นที่ ก่อนนำเซลล์ที่ได้ไปทดสอบต่อไป

#### 2. เซลล์แมคโครฟาจ

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษา คือ เซลล์ RAW 264.7 ซึ่งเป็นเซลล์โมโนไซต์/แมคโครฟาจ (monocyte/macrophage) ของหนู จากบริษัท ATCC ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM) ที่ประกอบด้วยฟิแทลโบไวน์ซีรัมร้อยละ 10 และมียาปฏิชีวนะเพนนิซิลลินจี, สเตربتโตมัยซินซัลเฟต และยาฆ่าเชื้อราแอมโฟเทอริซินบี ในปริมาณ 100 หน่วยสากลต่อมิลลิลิตร, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้น ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนกระทั่งมีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 90-95 จะถูกนำมาแยกออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้เครื่องมือชุดเซลล์กวาดลงบนบริเวณพื้นผิวของจานเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนับเซลล์ด้วยสไลด์นับเซลล์เม็ดเลือด และหว่านเซลล์ลงไปเพาะเลี้ยงในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ จนได้เซลล์ที่มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 90-95 ของพื้นที่ ก่อนนำเซลล์ที่ได้ไปทดสอบต่อไป

### การทดสอบเซลล์

ในการทดสอบผลของความเครียดในรูปแบบต่าง ๆ ต่อเซลล์สร้างกระดูก ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ MC3T3-E1 ในจานหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์ จนกระทั่งเกิดการเจริญเต็มหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์ ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นแอลฟา-เอ็มอีเอ็มที่ไม่มีส่วนประกอบของฟีทัลโบไวน์ซีรัม จากนั้นนำถาดหลุมที่มีเซลล์ไปทำการทดสอบดังต่อไปนี้

- กลุ่มที่ 1 ฉายด้วยรังสียูวีเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง
- กลุ่มที่ 2 แชน้ำแข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที สลับกับละลายที่อุณหภูมิห้อง นาน 40 นาที เป็นจำนวน 4 ครั้ง
- กลุ่มที่ 3 ทดสอบด้วยยาไอบูโพรเฟน ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- กลุ่มที่ 4 ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที
- กลุ่มที่ 5 ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที

ในการทดสอบผลของอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์สร้างกระดูก (conditioned media) ที่ได้รับความเครียดต่อเซลล์แมคโครฟาจ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ในจานหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์ จนกระทั่งเกิดการเจริญเต็มหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำถาดหลุมที่มีเซลล์ไปทำการทดสอบและนำเซลล์กลับไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ต่ออีก 24 ชั่วโมง ดังต่อไปนี้

- กลุ่ม A ทำการเติมโปรตีนลูกผสมฮีทชอคโปรตีน 60 (recombinant HSP60 หรือ rHSP60) ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ
- กลุ่ม B ทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์สร้างกระดูกที่ได้รับความเครียดแบบต่างๆ ลงในหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ
- กลุ่ม C ทำการเติมแอนติบอดีต่อฮีทชอคโปรตีน 60 จากหนู (Mouse HSP 60 antibody) ที่ความเข้มข้น 30 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์สร้างกระดูกที่ได้รับความเครียดแบบต่างๆ ลงในหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ

**การทดสอบการหลั่งแลคเตทไฮโดรจีเนส (Lactate Dehydrogenase หรือ LDH) จากเซลล์ที่เกิดการร่วของเยื่อหุ้มเซลล์**

นำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์สร้างกระดูก (conditioned media) ที่ผ่านทดสอบเซลล์ในรูปแบบต่าง ๆ ไปทำปฏิกิริยากับสารเคมีในชุดตรวจ Cytotoxicity Detection Kit ตามคำแนะนำของบริษัท โดยเติมสารละลายสำหรับทดสอบลงในตัวอย่างในจานหลุมแบบ 96 หลุม ทำการบ่มเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้องในสภาวะมืด จากนั้นเติมสารละลายเพื่อหยุดปฏิกิริยาและเขย่าจานหลุมเป็นเวลา 10 วินาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านจานหลุมแบบ 96 หลุม (Microplate reader) ที่ความยาวคลื่น 492 และ 690 นาโนเมตร

### การทดสอบรูปแบบการตายของเซลล์ด้วยเทคนิคการย้อมแอนเนกซินไฟว์/โพรพิเดียมไอโอไดด์ (Annexin-V/Propidium iodide)

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บนแผ่นกระจกปิดสไลด์ที่วางอยู่ในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ จากนั้นทำการทดสอบเซลล์ในรูปแบบต่าง ๆ ก่อนนำเซลล์ไปย้อมด้วยชุดตรวจ Annexin -V- FLUOS ตามคำแนะนำของบริษัท โดยทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (Phosphate Buffer Saline หรือ PBS) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.4 จากนั้นย้อมด้วยแอนเนกซินไฟว์ (Annexin-V) ซึ่งเชื่อมต่อกับสารฟลูออเรสซิน (Fluorescein) เพื่อตรวจสอบเซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิส (apoptosis) และย้อมด้วยโพรพิเดียมไอโอไดด์ (Propidium iodide) เพื่อตรวจสอบเซลล์ที่เกิดเนโครซิส (necrosis) เป็นเวลา 10-15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำแผ่นกระจกที่มีเซลล์ไปวางคว่ำลงบนแผ่นสไลด์ บันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescent microscope)

### การวิเคราะห์ปริมาณฮีตชอกโปรตีน 60 (HSP60) ด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอต (Western blot)

ทำการเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์สร้างกระดูก (conditioned media) และสารละลายจากเซลล์ (cell lysate) ที่ผ่านทดสอบเซลล์ในรูปแบบต่าง ๆ และทำการวิเคราะห์ดังนี้

#### 1. การวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์สร้างกระดูก (conditioned media)

นำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งด้วยความเย็น (Lyophilizer) เมื่อตัวอย่างแห้งสนิทแล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (SDS-PAGE) ที่ใช้โพลีอะคริลามิด (Acrylamide) ความเข้มข้นร้อยละ 4 และ 10 ตามลำดับ โดยใช้กระแสไฟฟ้า 30 มิลลิแอมแปร์ นาน 90 นาที เมื่อโปรตีนมาตรฐานเคลื่อนที่แยกออกจากกันแล้ว จึงเคลื่อนย้ายโปรตีนทั้งหมดที่อยู่ในแผ่นเจลลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 80 มิลลิแอมแปร์ นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนที่ทำการเคลื่อนย้ายโปรตีนสำเร็จแล้ว มาบ่มด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ที่ประกอบด้วยนมผงไร้ไขมันร้อยละ 5 จากนั้นตรวจจับด้วยแอนติบอดีต่อฮีตชอกโปรตีน 60 (HSP 60 antibody) และแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินจีของหนูที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์ฮอสมเรดิชเปอร์ออกซิเดส (HRP-conjugated anti-mouse IgG) ตามลำดับ ก่อนนำไปทำปฏิกิริยากับซับสเตรทแบบเคมีลูมิเนสเซนส์ระดับพิโคกรัม (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate) และตรวจหาสัญญาณด้วยการประกบฟิล์มเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดความเข้มของสัญญาณด้วยเครื่องวัดความเข้มของฟิล์ม (Densitometer) ต่อไป

## 2. การวิเคราะห์สารละลายจากเซลล์ (cell lysate)

ทำการเติมสารละลายไลซิส (lysis buffer) ลงไปในหลุมเลี้ยงเซลล์ และใช้เครื่องมือดูดเซลล์จากบนบริเวณพื้นผิวของจานเลี้ยงเซลล์จนกระทั่งเซลล์หลุดออกมา นำส่วนที่เป็นของเหลวทั้งหมดไปใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 x g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกส่วนที่เป็นของเหลวออกจากเศษเซลล์ ทำการวัดปริมาณ โปรตีนที่ละลายอยู่ในส่วนที่เป็นของเหลวด้วยชุดตรวจปริมาณโปรตีน (BCA Protein assay) โดยคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน เมื่อทราบปริมาณความเข้มข้นของ โปรตีนตัวอย่างจากเซลล์แล้ว จึงนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า และตรวจจับด้วยแอนติบอดีต่ออีทชอคโปรตีน 60 เช่นเดียวกับที่กล่าวมาข้างต้น นอกจากนี้ทำการตรวจจับสัญญาณของเบต้า-แอคติน (beta-actin) เพื่อใช้ในการคำนวณเปรียบเทียบปริมาณของอีทชอคโปรตีน 60 ต่อไป

### การวิเคราะห์การสร้างทีเอ็นเอฟแอลฟา (TNF-alpha) ด้วยเทคนิคอีไลซา (ELISA)

หลังจากทำการทดสอบเซลล์แมคโครฟาจแล้ว ทำการวัดปริมาณของทีเอ็นเอฟแอลฟา ที่ถูกปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยชุดตรวจ TNF-alpha ELISA ตามคำแนะนำของบริษัท โดยเคลือบจานหลุมด้วยแอนติบอดีตัวจับ (capture antibody) จากนั้นตรวจจับทีเอ็นเอฟแอลฟาด้วยแอนติบอดีตัวตรวจ (detection antibody), อะวีดิน-เอซอาร์พี (Avidin-HRP) และสารละลายซับสเตรท (substrate solution) ก่อนเติมสารละลายเพื่อหยุดปฏิกิริยา (stop solution) และนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านจานหลุมแบบ 96 หลุม ที่ความยาวคลื่น 450 และ 570 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณหาปริมาณของทีเอ็นเอฟแอลฟาด้วยการเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐานที่ทราบปริมาณความเข้มข้น

### การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณแลคเตทคิไฮโดรจินเนส, อีทชอคโปรตีน 60 และ ทีเอ็นเอฟแอลฟา ด้วย One – way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม (multiple comparison) ด้วย Dunnett's หรือ Tukey's multiple comparison test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในแต่ละกลุ่มในแต่ละการทดลองมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 3 แต่ละการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง

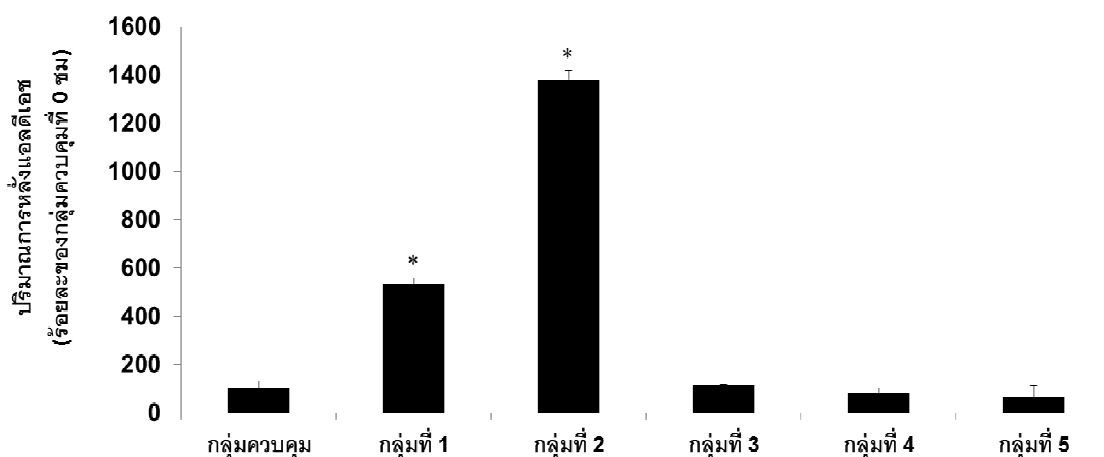
### บทที่ 3

#### ผลการวิจัย

##### ผลของความเครียดในระดับที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ต่อการรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์สร้างกระดูก

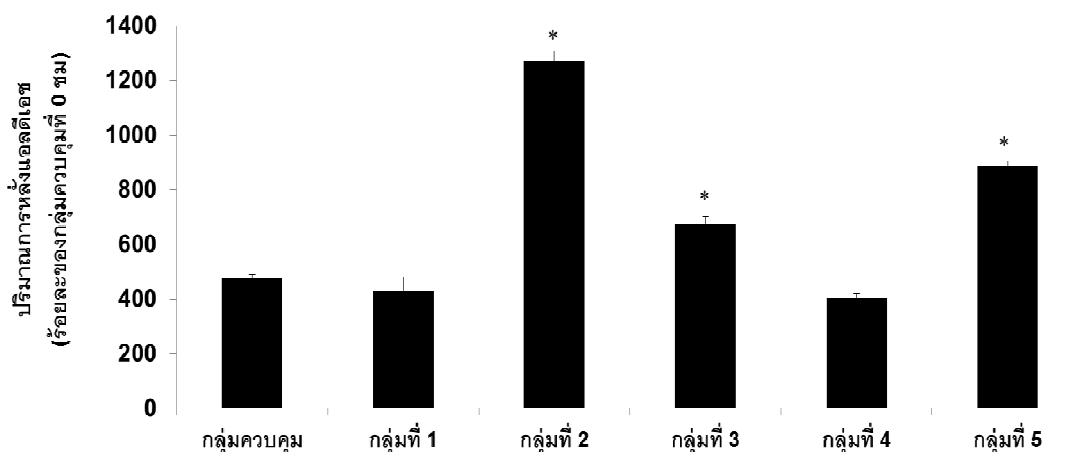
เมื่อทดสอบความเครียดในรูปแบบต่าง ๆ ในระดับที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์กับเซลล์สร้างกระดูก เพื่อศึกษาการรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยทดสอบการหลั่งแลคเตทดีไฮโดรจีเนสหรือแอลดีเอช (LDH) พบว่า ทันทีภายหลังจากการทดสอบเซลล์สร้างกระดูกด้วยรังสียูวีหรือการแช่แข็ง สลับกับการละลาย พบการหลั่งของแอลดีเอชออกมาภายนอกเซลล์ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ ) โดยเซลล์กลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งสลับกับการละลายมีปริมาณการรั่วไหลของแอลดีเอชมากที่สุด ในขณะที่เซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มที่ได้รับยาไอบูโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ หรือได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หรือ 30 นาที ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการหลั่งของแอลดีเอชจากเซลล์สร้างกระดูก ดังแสดงในรูปที่ 8

เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ภายหลังจากการทดสอบ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลดีเอชที่หลั่งจากเซลล์สร้างกระดูก โดยเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับยาไอบูโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ หรือได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีมีการหลั่งแอลดีเอชออกมาภายนอกเซลล์ในปริมาณที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และปริมาณแอลดีเอชในอาหารเลี้ยงเซลล์ของกลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีมีปริมาณมากกว่ากลุ่มที่ได้รับยาไอบูโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ อย่างไรก็ตามเซลล์กลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งสลับกับการละลายซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก ยังคงมีปริมาณแอลดีเอชที่ตรวจพบในอาหารเลี้ยงเซลล์มากที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเกิดการรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ในปริมาณสูงที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 8 กราฟแสดงปริมาณการหลั่งแลคติกเดไฮโดรเจส (LDH release) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์สร้างกระดูกที่วิเคราะห์ด้วย Cytotoxic Detection kit ที่เวลา 0 ชั่วโมง ภายหลังจากการได้รับความเครียดแบบต่างๆ โดยมี กลุ่มควบคุม, กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มที่ได้รับรังสียูวี, กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งสลับกับการละลาย, กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มที่ได้รับยาไอบูโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์, กลุ่มที่ 4 คือ กลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที, กลุ่มที่ 5 คือ กลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ( $p < 0.05$ ; \* เปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น) จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในแต่ละกลุ่มมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 3 และการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง



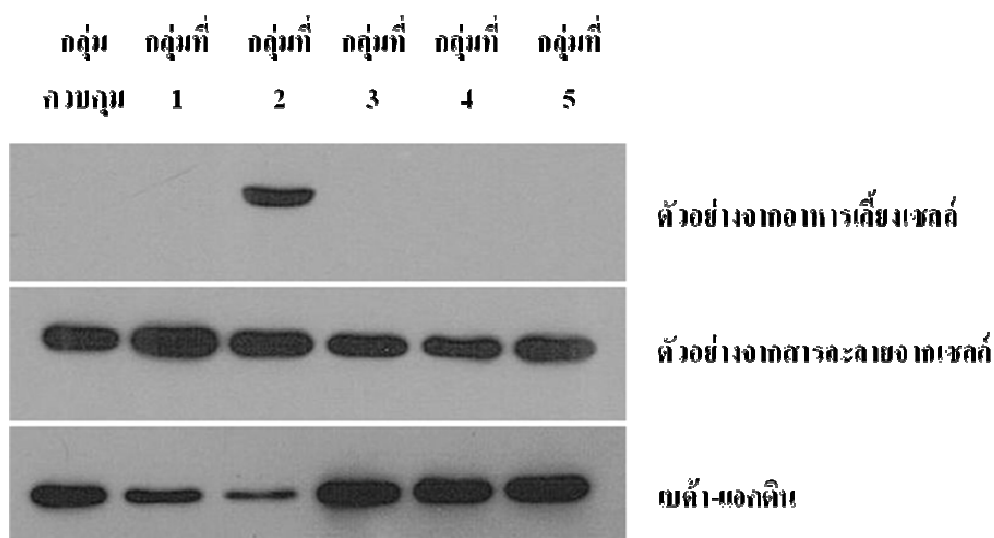


รูปที่ 9 กราฟแสดงการหลั่งแอลดีเอช (LDH release) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์สร้างกระดูกที่วิเคราะห์ด้วย Cytotoxic Detection kit ที่เวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังจากการได้รับความเครียดแบบต่างๆ โดยมี กลุ่มควบคุม, กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มที่ได้รับรังสียูวี, กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งสลับกับการละลาย, กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มที่ได้รับยาไอบูโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์, กลุ่มที่ 4 คือ กลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที, กลุ่มที่ 5 คือ กลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ( $p < 0.05$ ; \* เปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น) จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในแต่ละกลุ่มมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 3 และการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ยาไอบูโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ หรือ ความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เกิดการร้าวของเยื่อหุ้มเซลล์สร้างกระดูกภายใน 24 ชั่วโมง ในขณะที่ความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ไม่มีผลต่อการร้าวของเยื่อหุ้มเซลล์สร้างกระดูก

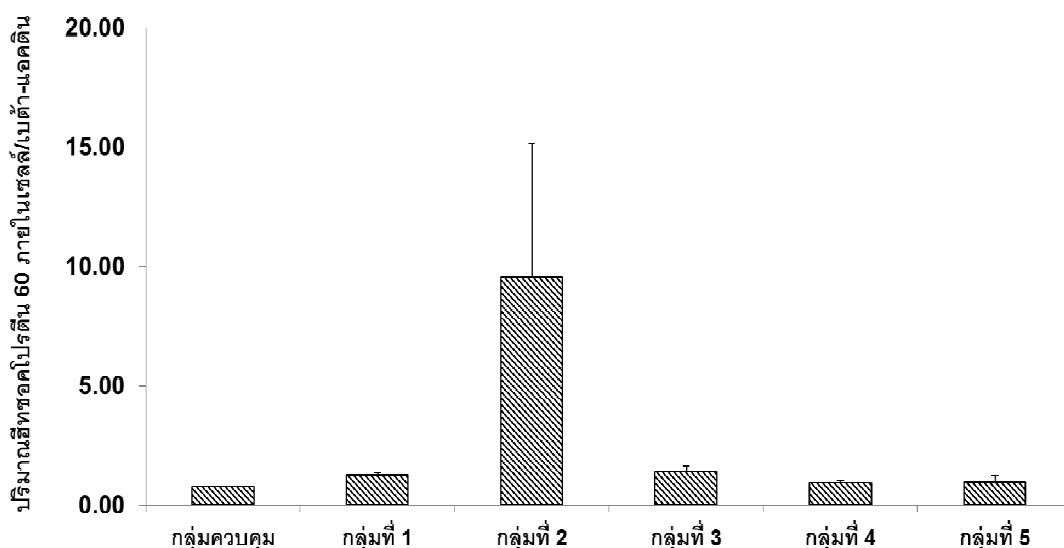
### ผลของความเครียดในระดับที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ต่อการหลั่งและการแสดงออกของฮีทชอกโปรตีน 60 จากเซลล์สร้างกระดูกด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอต

จากการวิเคราะห์ปริมาณของฮีทชอกโปรตีน 60 ในส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์และสารละลายจากเซลล์สร้างกระดูกด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอต ภายหลังจากทดสอบเซลล์ด้วยความเครียดในรูปแบบต่าง ๆ ในระดับที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ พบว่า ทันทีกายหลังทำการทดสอบ สามารถตรวจพบฮีทชอกโปรตีน 60 ในปริมาณสูงในอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งสลับกับการละลายเท่านั้น แต่ไม่สามารถตรวจพบฮีทชอกโปรตีน 60 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์ในกลุ่มทดสอบอื่นๆ รวมทั้งกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 10 และจากการวิเคราะห์การแสดงออกของฮีทชอกโปรตีน 60 ที่อยู่ภายในเซลล์สร้างกระดูกที่ผ่านการทดสอบ พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณฮีทชอกโปรตีน 60 ภายในเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งสลับกับการละลายมากที่สุด ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับยาไอบูโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ หรือได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 หรือ 30 นาที ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณฮีทชอกโปรตีน 60 ภายในเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 10 และรูปที่ 11



รูปที่ 10 ภาพแสดงปริมาณของฮีทชอกโปรตีน 60 (HSP60) ที่หลั่งออกมาอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ (conditioned media) และที่อยู่ภายในเซลล์ (cell lysate) ของเซลล์สร้างกระดูก ด้วยเทคนิคเวสเทิร์น บลอต ที่เวลา 0 ชั่วโมง ภายหลังจากการได้รับความเครียดแบบต่างๆ โดยมี กลุ่มควบคุม, กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มที่ได้รับรังสียูวี, กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งสลับกับการละลาย, กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มที่ได้รับยาไอบูโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์, กลุ่มที่ 4 คือ กลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที, กลุ่มที่ 5 คือ กลุ่มที่

ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สำหรับเบต้า-แอคติน (beta-actin) ใช้เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในแต่ละกลุ่มมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 3 และการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง

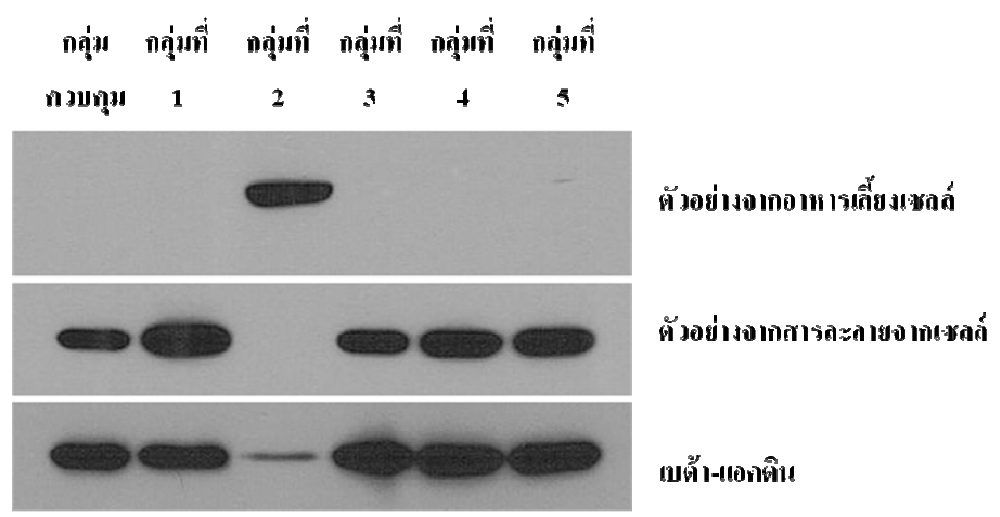


รูปที่ 11 กราฟแสดงปริมาณการแสดงออกของฮีทชอกโปรตีน 60 (HSP60) ที่อยู่ในเซลล์ (cell lysate) ของเซลล์สร้างกระดูก เทียบกับปริมาณเบต้า-แอคติน (beta-actin) ด้วยเทคนิคเวสต์เทิร์นบลอต ที่เวลา 0 ชั่วโมง ภายหลังจากการได้รับความเครียดแบบต่างๆ โดยมี กลุ่มควบคุม, กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มที่ได้รับรังสียูวี, กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งสลับกับการละลาย, กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มที่ได้รับยาไอบู โพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์, กลุ่มที่ 4 คือ กลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที, กลุ่มที่ 5 คือ กลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในแต่ละกลุ่มมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 3 และการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง

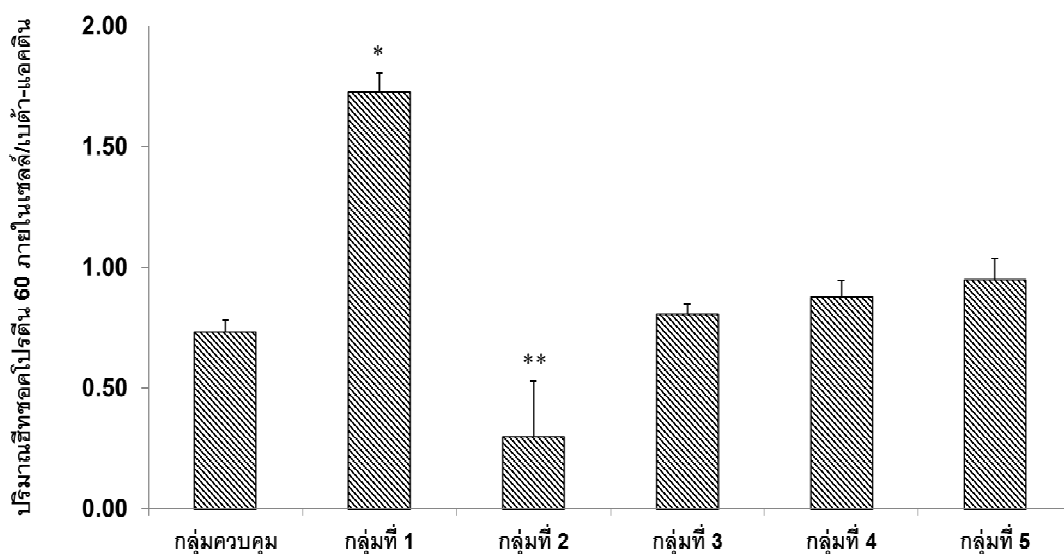
ภายหลังทำการทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณของฮีทชอกโปรตีน 60 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งสลับกับการละลายเพิ่มมากขึ้น แต่ยังไม่สามารถตรวจพบฮีทชอกโปรตีน 60 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์ในกลุ่มทดสอบอื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 12 และจากการวิเคราะห์ปริมาณของฮีทชอกโปรตีน 60 ภายในเซลล์ ไม่พบฮีทชอกโปรตีน 60 อยู่ในเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งสลับกับการละลาย ในขณะที่เซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มที่ได้รับรังสียูวี มีปริมาณของฮีทชอกโปรตีน 60 อยู่ในเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ ) อย่างไรก็ตามไม่พบการเพิ่มขึ้นของฮีทชอกโปรตีน 60 ใน

เซลล์สร้างกระดูกกลุ่มที่ได้รับยาไอบูโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ หรือได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 หรือ 30 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 12 และรูปที่ 13

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ยาไอบูโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ หรือความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 หรือ 30 นาที ไม่ทำให้เกิดการหลั่งฮีทชอคโปรตีน 60 หรือการเปลี่ยนแปลงของปริมาณฮีทชอคโปรตีน 60 ภายในเซลล์สร้างกระดูก จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอต ในขณะที่เซลล์สร้างกระดูกที่เกิดการตายแบบเนโครซิสทำให้เกิดการหลั่งของฮีทชอคโปรตีน 60 ออกมาภายนอกเซลล์ทันทีภายหลังการทดสอบ และเกิดการหลั่งของโปรตีนออกมาภายนอกเกือบทั้งหมดภายในเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 12 ภาพแสดงปริมาณของฮีทชอคโปรตีน 60 (HSP60) ที่หลั่งออกมาอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ (conditioned media) และที่อยู่ภายในเซลล์ (cell lysate) ของเซลล์สร้างกระดูก ด้วยเทคนิคเวสเทิร์น บลอตที่เวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังจากการได้รับความเครียดแบบต่างๆ โดยมี กลุ่มควบคุม, กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มที่ได้รับรังสียูวี, กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งสลับกับการละลาย, กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มที่ได้รับยาไอบูโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์, กลุ่มที่ 4 คือ กลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที, กลุ่มที่ 5 คือ กลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สำหรับเบต้า-แอคติน (beta-actin) ใช้เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในแต่ละกลุ่มมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 3 และการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง

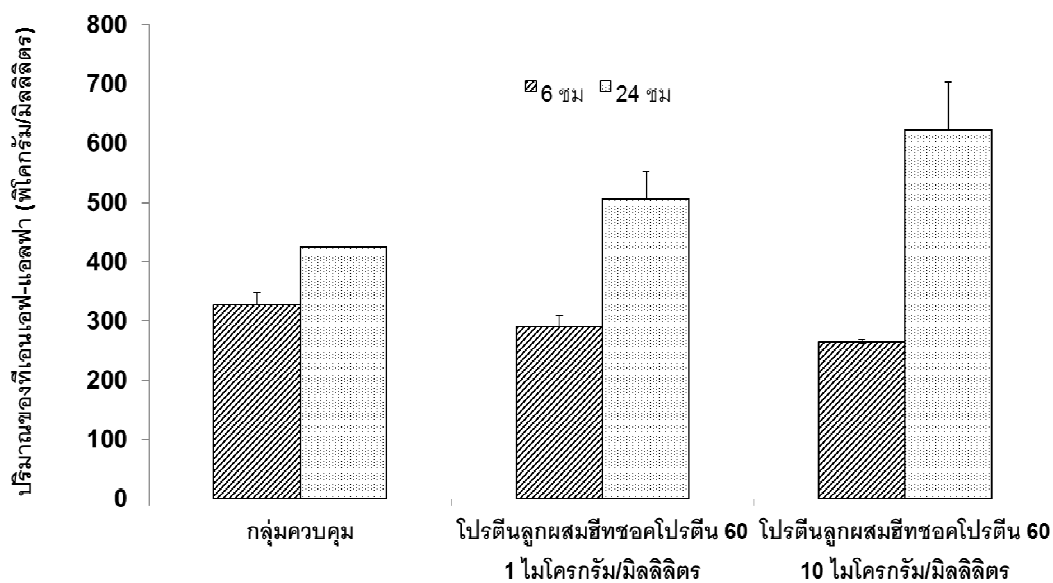


รูปที่ 13 กราฟแสดงปริมาณการแสดงออกของฮีทช็อคโปรตีน 60 (HSP60) ที่อยู่ในเซลล์ (cell lysate) ของเซลล์สร้างกระดูก เปรียบเทียบกับปริมาณเบต้า-แอคติน (beta-actin) ด้วยเทคนิค เวสต์เทิร์นบลอตที่เวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังจากการได้รับความเครียดแบบต่างๆ โดยมี กลุ่มควบคุม, กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มที่ได้รับรังสียูวี, กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งสลับกับการละลาย, กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มที่ได้รับยาไอบูโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์, กลุ่มที่ 4 คือ กลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที, กลุ่มที่ 5 คือ กลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ( $p < 0.05$ ; \* เปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น, \*\* เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีและ 30 นาที) จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในแต่ละกลุ่มมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 3 และการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง

### ผลของโปรตีนลูกผสมอีทชอคโปรตีน 60 ต่อการสร้างทีเอนเอฟ-แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจ

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าอีทชอคโปรตีน 60 สามารถกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการทดสอบเซลล์แมคโครฟาจด้วยโปรตีนลูกผสมอีทชอคโปรตีน 60 และทำการวิเคราะห์ปริมาณของทีเอนเอฟ-แอลฟาที่เซลล์แมคโครฟาจสร้างและหลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิคอีไลซา ซึ่งจากการทดสอบพบว่า โปรตีนลูกผสมอีทชอคโปรตีน 60 ไม่มีผลต่อการสร้างทีเอนเอฟ-แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจภายหลังการกระตุ้นเป็นเวลา 6 ชั่วโมง แต่สามารถกระตุ้นการสร้างทีเอนเอฟ-แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมง โดยผลการกระตุ้นจะเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีนลูกผสมอีทชอคโปรตีน 60 ที่ใช้ในการทดสอบที่ความเข้มข้น 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามปริมาณทีเอนเอฟ-แอลฟาที่เพิ่มขึ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 14

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า อีทชอคโปรตีน 60 ที่อยู่ภายนอกเซลล์ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นให้เซลล์แมคโครฟาจสร้างทีเอนเอฟ-แอลฟา ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบในปริมาณที่เพิ่มขึ้นได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมง โดยผลการกระตุ้นจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของอีทชอคโปรตีน 60 ที่อยู่ภายนอกเซลล์



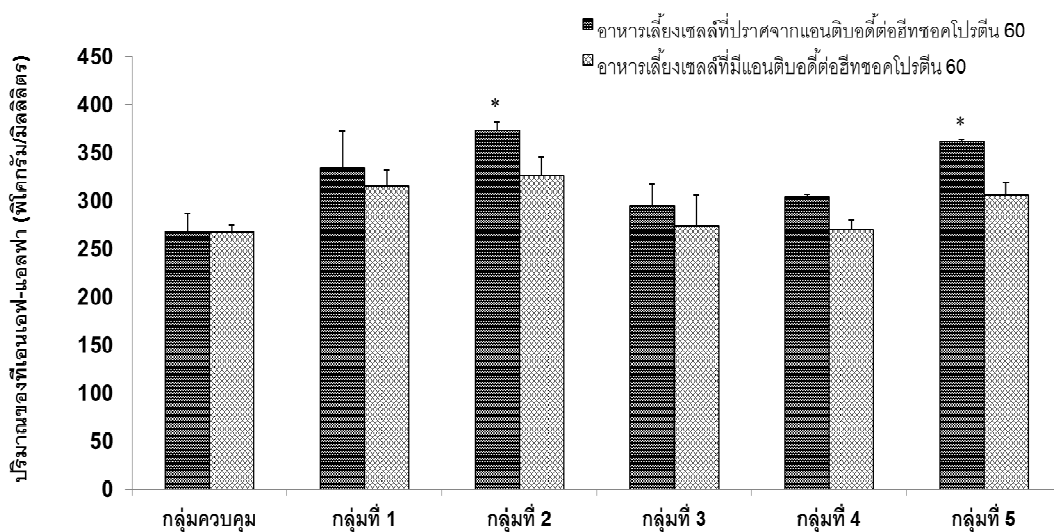
รูปที่ 14 กราฟแสดงปริมาณการสร้างทีเอนเอฟ-แอลฟา (TNF- $\alpha$ ) จากเซลล์แมคโครฟาจ ด้วยเทคนิคอิลิซา ภายหลังจากทำการทดสอบด้วยโปรตีนลูกผสมฮีทชอคโปรตีน 60 (rHSP60) ในปริมาณ 1 หรือ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ( $\mu$ g/ml) เป็นเวลา 6 หรือ 24 ชั่วโมง จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในแต่ละกลุ่มมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 3 และการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง

## ผลของอาหารเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกภายหลังจากรับความเครียดในระดับที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ต่อการสร้างทีเอนเอฟ-แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจ

ภายหลังจากการกระตุ้นให้เซลล์สร้างกระดูกได้รับความเครียดในรูปแบบต่าง ๆ ในระดับที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ นำเซลล์สร้างกระดูกไปเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำเอาอาหารเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกไปทดสอบกับเซลล์แมคโครฟาจ โดยแบ่งกลุ่มการทดสอบออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์จากเซลล์สร้างกระดูกเพียงอย่างเดียว และกลุ่มที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกร่วมกับแอนติบอดีต่ออีทซอกโปรตีน 60 จากนั้นจึงวิเคราะห์ปริมาณของทีเอนเอฟ-แอลฟาที่เซลล์แมคโครฟาจสร้างและหลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิคอีไลซา

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณทีเอนเอฟ-แอลฟาเมื่อทำการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกที่ได้รับความเครียดในระดับที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ พบว่า อาหารเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกทุกกลุ่มสามารถกระตุ้นการสร้างทีเอนเอฟ-แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจได้ในปริมาณที่แตกต่างกันไปเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีสามารถกระตุ้นการสร้างทีเอนเอฟ-แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกที่ไม่ได้รับความเครียด นอกจากนี้ยังพบว่า การเพิ่มขึ้นของทีเอนเอฟ-แอลฟาที่สร้างจากเซลล์แมคโครฟาจในกลุ่มที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที มีปริมาณใกล้เคียงกับเซลล์แมคโครฟาจในกลุ่มที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกที่เกิดการตายแบบเนโครซิสจากการผ่านการแช่แข็งสลับกับการละลาย ในขณะที่อาหารเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที และยาไอบูโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ สามารถกระตุ้นการสร้างทีเอนเอฟ-แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจได้ในปริมาณเล็กน้อย นอกจากนี้จากการเติมแอนติบอดีต่ออีทซอกโปรตีน 60 ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อศึกษาความเกี่ยวข้องของอีทซอกโปรตีน 60 กับการกระตุ้นการสร้างทีเอนเอฟ-แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจในสภาวะที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูก พบว่า แอนติบอดีต่ออีทซอกโปรตีน 60 ทำให้เกิดการลดลงของปริมาณทีเอนเอฟ-แอลฟาที่หลั่งออกมาจากเซลล์แมคโครฟาจในทุกกลุ่มการทดสอบ ดังแสดงในรูปที่ 15





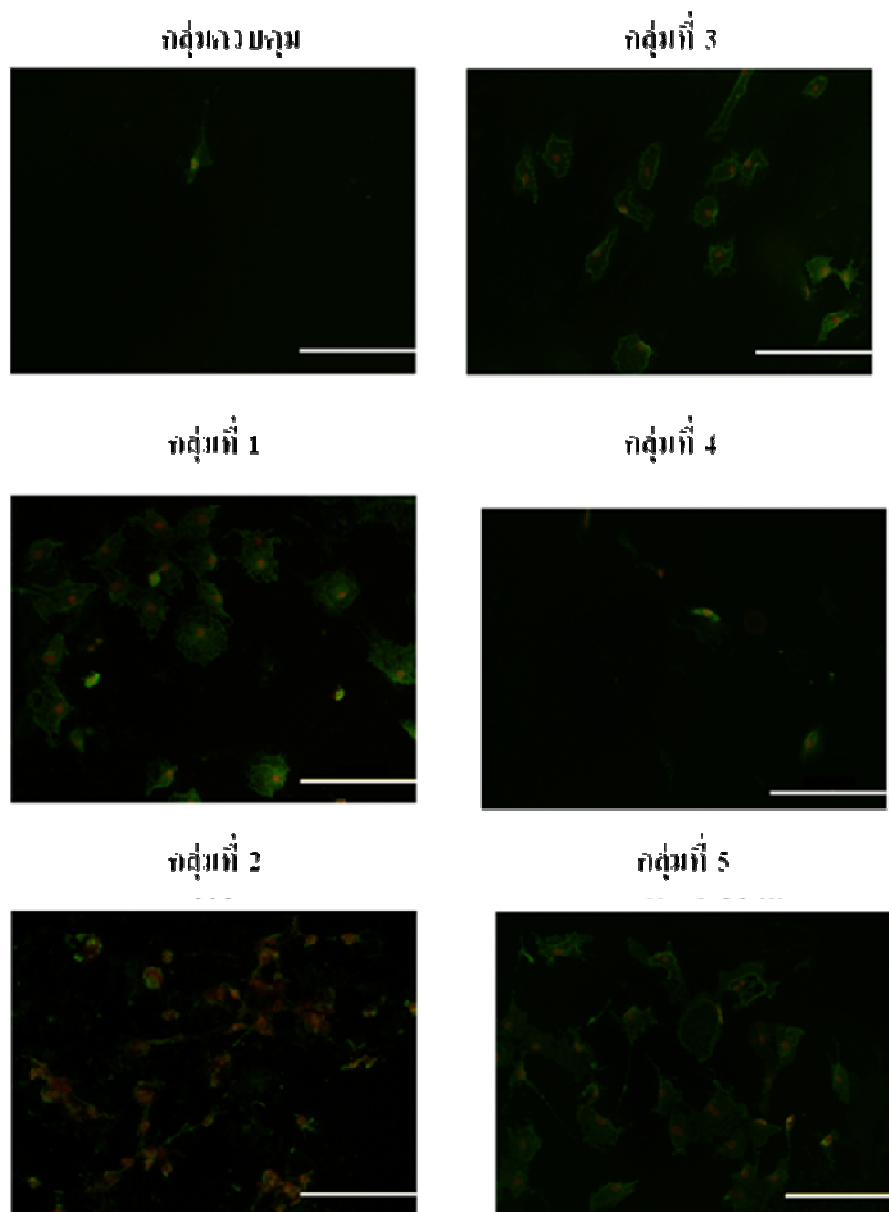
รูปที่ 15 กราฟแสดงปริมาณการสร้างทีเอ็นเอฟ-แอลฟา (TNF-alpha production) จากเซลล์แมคโครฟาจ ด้วยเทคนิคอีไลซ่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังจากกระตุ้นด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (conditioned media) จากเซลล์สร้างกระดูกที่ได้รับความเครียดจากรูปแบบต่างๆ และเติมแอนติบอดีต่ออีทซอคโปรตีน 60 โดยที่มี กลุ่มควบคุม, กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มที่ได้รับรังสียูวี, กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งสลับกับการละลาย, กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มที่ได้รับยาไอบูโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์, กลุ่มที่ 4 คือ กลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที, กลุ่มที่ 5 คือ กลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ( $p < 0.05$ ; \* เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม) จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในแต่ละกลุ่มมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 3 และการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง)

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า อาหารเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกที่ผ่านการได้รับยาไอบูโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ หรือความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ไม่มีผลกระตุ้นการสร้างทีเอ็นเอฟ-แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจ ในขณะที่อาหารเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที สามารถกระตุ้นการสร้างทีเอ็นเอฟ-แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจได้ในระดับที่ใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกที่เกิดการตายแบบเนโครซิส นอกจากนี้อีทซอคโปรตีน 60 ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์น่าจะเป็นมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการกระตุ้นการสร้างทีเอ็นเอฟ-แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจ

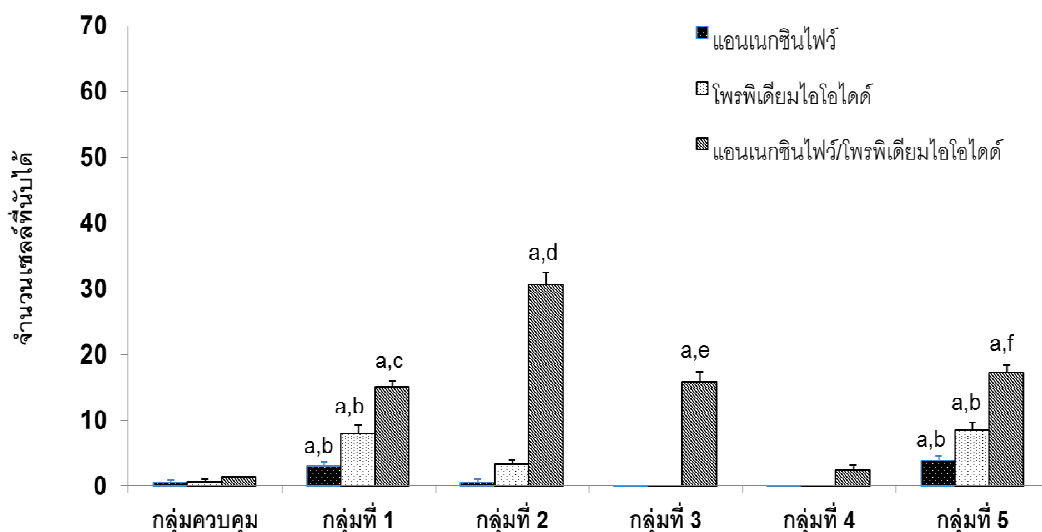
### ผลของความเครียดในระดับที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ต่อรูปแบบการตายของเซลล์สร้างกระดูก

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การตายของเซลล์แบบเนโครซิสและอะพอโทซิสทำให้เกิดการหลั่งของโมเลกุลที่แตกต่างกันออกมาจากเซลล์ชนิดต่าง ๆ ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการวิเคราะห์รูปแบบการตายของเซลล์สร้างกระดูกภายหลังการทดสอบด้วยความเครียดชนิดต่างๆในระดับที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ ด้วยการย้อมด้วยแอนเนกซินไฟว์/โพรพิเดียมไอโอไดด์ แล้วนำไปวิเคราะห์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอโทซิสจะเปล่งสารเรืองแสงสีเขียว และเซลล์ที่เกิดการตายแบบเนโครซิสจะเปล่งสารเรืองแสงสีแดง

จากการวิเคราะห์การตายของเซลล์ทันทีภายหลังจากการทดสอบเซลล์สร้างกระดูกด้วยความเครียดชนิดต่างๆในระดับที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ พบว่าเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มที่ได้รับยาไอบูโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์หรือได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จะเกิดการตายของเซลล์ทั้งแบบอะพอโทซิสและแบบเนโครซิสในปริมาณสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ ) โดยจำนวนเซลล์ที่เกิดการตายในลักษณะนี้มีปริมาณใกล้เคียงกับเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มที่ได้รับรังสียูวี นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณเซลล์ที่เกิดการตายแบบเนโครซิสอย่างเดียวในกลุ่มที่ได้รับยาไอบูโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์มีปริมาณที่น้อยกว่าเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในขณะที่เซลล์ในกลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที มีปริมาณเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอโทซิสและเนโครซิสในระดับที่น้อยและใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 16 และรูปที่ 17



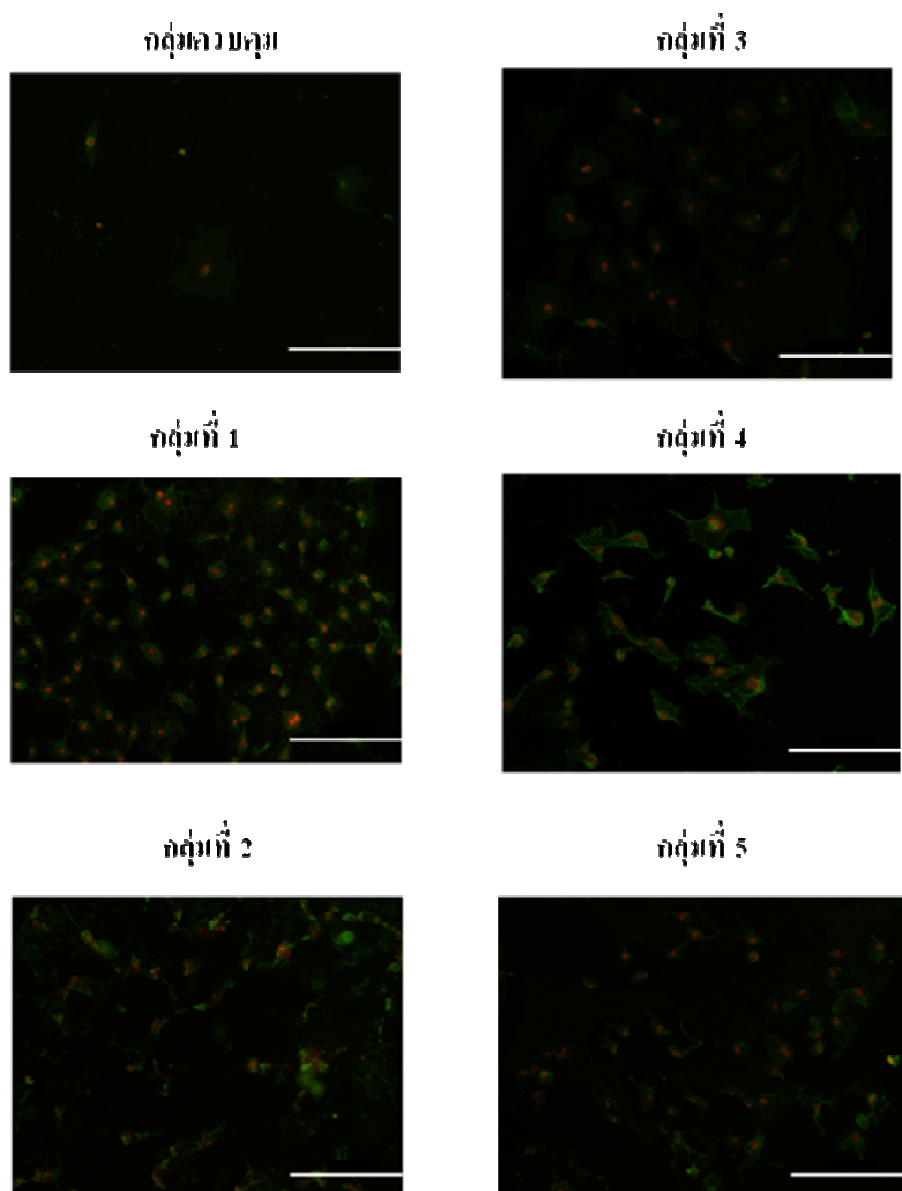
รูปที่ 16 ภาพแสดงเซลล์สร้างกระดูกที่เกิดการตายแบบอะพอโทซิสและ/หรือเนโครซิส ที่เวลา 0 ชั่วโมง ภายหลังจากการได้รับความเครียดแบบต่างๆ และซ่อมด้วยแอนเนกซินไฟว์ (สีเขียว)/โทรฟิเดียมไอโอไดด์ (สีแดง) โดยมี กลุ่มควบคุม, กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มที่ได้รับรังสียูวี, กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งสลับกับการละลาย, กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มที่ได้รับยาไอบูโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์, กลุ่มที่ 4 คือ กลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที, กลุ่มที่ 5 คือ กลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีโดยแถบมาตราส่วน (Scale bar) เท่ากับ 500 ไมโครเมตร ( $\mu\text{m}$ ) จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในแต่ละกลุ่มมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 3 และการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง



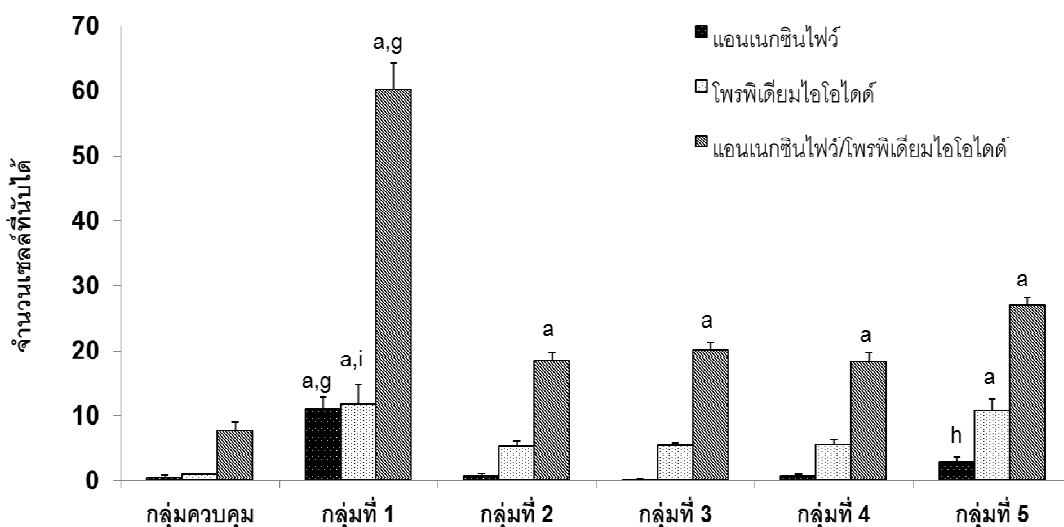
รูปที่ 17 กราฟแสดงจำนวนเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอโทซิสและ/หรือเนโครซิส ด้วยเทคนิคการย้อมแอนเนกซินไฟว์/โพรพิเดียมไอโอไดด์ ที่เวลา 0 ชั่วโมง ภายหลังจากการได้รับความเครียดแบบต่างๆ โดยมี กลุ่มควบคุม, กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มที่ได้รับรังสียูวี, กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งสลับกับการละลาย, กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มที่ได้รับยาไอบูโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์, กลุ่มที่ 4 คือ กลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที, กลุ่มที่ 5 คือ กลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ( $p < 0.05$ ; a เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม; b เปรียบเทียบกับกลุ่มผ่านการแช่แข็งสลับกับการละลาย, ไอบูโพรเฟน และความร้อนที่อุณหภูมิ 47°C เป็นเวลา 5 นาที; c เปรียบเทียบกับกลุ่มผ่านการแช่แข็งสลับกับการละลายและความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที; d เปรียบเทียบกับกลุ่มไอบูโพรเฟน, ความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และ 30 นาที; e เปรียบเทียบกับกลุ่มความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที; f เปรียบเทียบกับกลุ่มผ่านการแช่แข็งสลับกับการละลายและความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที) จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในแต่ละกลุ่มมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 3 และการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง)

ภายหลังจากการทดสอบเซลล์สร้างกระดูกด้วยความเครียดชนิดต่างๆ ในระดับที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ และวิเคราะห์การตายของเซลล์หลังจากการเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เกิดการตายของเซลล์สร้างกระดูกที่ได้รับความเครียดในเกือบทุกกลุ่มเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเซลล์ที่ตรวจพบทันทีภายหลังจากการทดสอบ โดยพบว่า เซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มที่ได้รับยาไฮโปโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ มีปริมาณเซลล์ที่เกิดการตายทั้งแบบอะพอพโทซิสและแบบเนโครซิสเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ส่วนเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เกิดการตายของเซลล์ทั้งสองรูปแบบเพิ่มขึ้นมากกว่า ในขณะที่เซลล์ในกลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที มีปริมาณเซลล์ที่เกิดการตายทั้งสองรูปแบบเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเซลล์ที่เกิดการตายทันทีภายหลังจากการทดสอบ โดยปริมาณเซลล์ที่เกิดการตายทั้งแบบอะพอพโทซิสและแบบเนโครซิสมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 24 ชั่วโมง ( $p < 0.05$ ) สำหรับเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มที่ได้รับรังสียูวี พบปริมาณการตายทั้งสองรูปแบบเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 18 และรูปที่ 19 อย่างไรก็ตามเซลล์ในกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งสลับกับการละลายมีปริมาณเซลล์ที่ตายลดลงจากที่ตรวจสอบได้ทันทีภายหลังจากการทดสอบ ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากมีการหลุดของเซลล์ที่ตายภายหลังเกิดการตาย โดยพบว่าลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ของเซลล์สร้างกระดูก เช่น รูปร่างของเซลล์ และลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเซลล์ปกติทันทีภายหลังจากการทดสอบและมีลักษณะที่ผิดปกติมากขึ้นที่ 24 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 18

จากการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่ายาไฮโปโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ หรือความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จะเกิดการตายของเซลล์สร้างกระดูกทั้งแบบอะพอพโทซิสและแบบเนโครซิสทันทีภายหลังจากการทดสอบและเพิ่มมากขึ้นภายในเวลา 24 ชั่วโมง แต่ยาไฮโปโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ทำให้เกิดการตายของเซลล์น้อยกว่าความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในขณะที่ความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์สร้างกระดูกทั้งสองรูปแบบได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 18 ภาพแสดงเซลล์สร้างกระดูกที่เกิดการตายแบบอะพอโทซิสและ/หรือเนโครซิส ที่เวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังจากการได้รับความเครียดแบบต่างๆ และย้อมด้วยแอนเนกซินไฟว์ (สีเขียว)/โพรพิเดียมไอโอไดด์ (สีแดง) โดยมี กลุ่มควบคุม, กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มที่ได้รับรังสียูวี, กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งสลับกับการละลาย, กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มที่ได้รับยาไอบูโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์, กลุ่มที่ 4 คือ กลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที, กลุ่มที่ 5 คือ กลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยแถบมาตราส่วน (Scale bar) เท่ากับ 500 ไมโครเมตร ( $\mu\text{m}$ ) จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในแต่ละกลุ่มมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 3 และการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง



รูปที่ 19 กราฟแสดงจำนวนเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสและ/หรือเนโครซิส ด้วยเทคนิคการย้อมแอนเนกซินไฟว์/โพรพิเดียมไอโอดีค ที่เวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังจากการได้รับความเครียดแบบต่างๆ โดยมี กลุ่มควบคุม, กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มที่ได้รับรังสียูวี, กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งสลับกับการละลาย, กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มที่ได้รับยาไอบูโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์, กลุ่มที่ 4 คือ กลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที, กลุ่มที่ 5 คือ กลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ( $p < 0.05$ ; a เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม; g เปรียบเทียบกับกลุ่มผ่านการแช่แข็งสลับกับการละลาย, ไอบูโพรเฟน, ความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และ 30 นาที, h เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับรังสียูวี; i เปรียบเทียบกับกลุ่มผ่านการแช่แข็งสลับกับการละลาย) จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในแต่ละกลุ่มมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 3 และการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง

## บทที่ 4

### บทวิจารณ์

สภาวะที่ก่อให้เกิดความเครียดต่อเซลล์สามารถทำให้เกิดการตอบสนองของเซลล์หรือทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้หลายลักษณะ<sup>(41)</sup> โดยในส่วนของเซลล์สร้างกระดูกได้มีรายงานถึงผลของความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานกว่า 1 นาที ต่อการทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์กระดูกของมนุษย์ ซึ่งนำไปสู่การเกิดการละลายของกระดูกและความล้มเหลวในการซ่อมแซมกระดูก<sup>(38)</sup> นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับผลของยาต้านการอักเสบในกลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ในการทำให้เกิดการตายของเซลล์สร้างกระดูก<sup>(54-58)</sup> อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่เข้าใจแน่ชัดถึงความเกี่ยวข้องของเซลล์ที่ได้รับความเครียดหรือเกิดการตายในกระบวนการนี้ โดยการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้พบว่า การกรอกระดูกด้วยวิธีการต่าง ๆ สามารถทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิในกระดูกได้แตกต่างกัน โดย Stelzle และคณะพบว่า การกรอกระดูกโดยใช้แรง 900-1,000 กรัม ทำให้เกิดความร้อนในช่วง 43.9 ถึง 48.6 องศาเซลเซียส ขึ้นกับวิธีการและหัวกรอที่ใช้<sup>(84)</sup> นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า การกรอกระดูกด้วยความเร็ว 30 ถึง 100 รอบต่อนาที ทำให้อุณหภูมิในกระดูกเพิ่มขึ้นได้ 3.69 ถึง 9.81 องศาเซลเซียส<sup>(85)</sup> ในการศึกษานี้ได้ทำการทดสอบเซลล์สร้างกระดูกด้วยความร้อนซึ่งอยู่ในช่วงใกล้เคียงกับความร้อนที่เกิดขึ้นจากการกรอกระดูกหรือยาไอบูโพรเฟนในปริมาณสูง ซึ่งพบว่าทันทีภายหลังจากการทดสอบยังไม่พบการตายของเซลล์สร้างกระดูก แต่เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงสามารถตรวจพบการตายของเซลล์สร้างกระดูกและการรั่วของเชื้อหุ้มเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในขณะที่ในกลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ไม่พบการรั่วของเชื้อหุ้มเซลล์ ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ความร้อนที่ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เกิดการตายของเซลล์สร้างกระดูกจากกะโหลกหนู ภายหลังจากทำการทดสอบ 12 ชั่วโมง<sup>(43)</sup> ในขณะนี้อีกการศึกษาหนึ่งรายงานว่า ความร้อนที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ถึง 30 นาที ทำให้เกิดการตายของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ภายหลังจากการทดสอบ 24 ชั่วโมง<sup>(44)</sup> ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียสทำให้เซลล์สร้างกระดูกเกิดการตายได้ อย่างไรก็ตามระยะเวลาที่เซลล์แต่ละชนิดสามารถทนต่อสภาวะความร้อนสูงได้อาจมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์และอาจเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของฮีทชอคโปรตีนภายในเซลล์แต่ละชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งฮีทชอคโปรตีน 70 ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการปกป้องเซลล์ (cytoprotection) ในสภาวะที่เซลล์ได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อม<sup>(40)</sup> นอกจากนี้ในการกรอกระดูกที่มีการใช้น้ำเกลือในการลดความร้อนที่เกิดขึ้น อาจช่วยทำให้ลดอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นและลดการตายของเซลล์ในกระดูกได้เช่นกัน



สำหรับผลของยาต้านการอักเสบในกลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ต่อเซลล์สร้างกระดูก จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าปริมาณยาไอบูโพรเฟนในกระแสเลือดในช่วง 11-30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากได้รับยาไอบูโพรเฟนสามารถลดความเจ็บปวดภายหลังการถอนฟันกรามซี่ที่ 3 ได้ในร้อยละ 50 ของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษา<sup>(86)</sup> ในการศึกษาพบว่ายาไอบูโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ (103.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ทำให้เกิดการตายของเซลล์สร้างกระดูกภายหลังทำการทดสอบ 24 ชั่วโมง แต่ปริมาณเซลล์ที่เกิดการรื้อของเยื่อหุ้มเซลล์มีปริมาณที่น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งผลการศึกษานี้คล้ายคลึงกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่ายาไอบูโพรเฟนในปริมาณสูง 1 ถึง 3 มิลลิโมลาร์ (0.21-0.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูกจากเซลล์มีเซนไคมอลในไขกระดูกของหนู<sup>(54)</sup> นอกจากนี้มีรายงานว่ายาต้านการอักเสบในกลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ในกลุ่มเดียวกับไอบูโพรเฟน เช่น อินโดเมธาซิน (indomethacin) หรือ ไดโคลฟีแนค (diclofenac) ที่ความเข้มข้น 10 ถึง 100 ไมโครโมลาร์ (2.06-20.61 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์แต่ไม่ทำให้เกิดการตายของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์<sup>(56)</sup> และจากการศึกษาโดย Garcia-Martinez และคณะ ในปี 2011 พบว่ายาไอบูโพรเฟนที่ความเข้มข้น 5 และ 25 ไมโครโมลาร์ (1.03-5.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูกจากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์<sup>(57)</sup> สำหรับการศึกษาถึงปริมาณของยาไอบูโพรเฟนในกระแสเลือดภายหลังจากการได้รับยาทางปาก พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับยาไอบูโพรเฟน 200 มิลลิกรัม จะมีปริมาณยาไอบูโพรเฟนในกระแสเลือดสูงสุดเฉลี่ย 9.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ภายใน 4 ชั่วโมง ในขณะที่การได้รับยาไอบูโพรเฟน 600 มิลลิกรัม จะมีปริมาณยาไอบูโพรเฟนในกระแสเลือดสูงสุดเฉลี่ย 24.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในช่วงที่มีประสิทธิภาพในการลดความเจ็บปวด<sup>(87)</sup> อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้เลือกใช้ความเข้มข้นของยาไอบูโพรเฟนที่มากกว่าการศึกษาที่ผ่านมา ดังนั้นเซลล์สร้างกระดูกที่ได้รับยาไอบูโพรเฟนในปริมาณที่สูงมากอาจเกิดการตายของเซลล์แบบเนโครซิสในปริมาณที่แตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของเซลล์ ในขณะที่ยาไอบูโพรเฟนในปริมาณที่ต่ำอาจมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูก อย่างไรก็ตามพบว่า การตายของเซลล์สร้างกระดูกเกิดขึ้นในปริมาณที่น้อยกว่าการได้รับความร้อนสูง จึงเป็นไปได้ว่าการได้รับยาไอบูโพรเฟนในปริมาณที่มากเกินไปอาจส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์สร้างกระดูกแต่น่าจะมีผลต่อกระบวนการต่างๆ ในกระดูกน้อยกว่าการได้รับความร้อนสูง

การเกิดความเครียดต่อเซลล์ทำให้เกิดการหลั่งของฮิซซอกโปรตีนออกมาภายนอกเซลล์หรือการแสดงออกของฮิซซอกโปรตีนได้ ซึ่ง Saito และคณะในปี 2005 ได้รายงานว่าฮิซซอกโปรตีนสามารถถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ในขณะที่เซลล์ได้รับความร้อนสูงหรือได้รับสารพิษที่เป็นอันตรายต่อเซลล์จนเกิดการรื้อของเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบการขนส่งฮิซซอกโปรตีนมาที่ผิวเซลล์ที่เกิดความเสียหายภายหลังจากการกระตุ้นให้เกิดรีแอคทีฟออกซิเจนแรดิคัลส์ (reactive

oxygen radicals) <sup>(23)</sup> ในการศึกษาครั้งนี้พบการหลั่งฮีทชอคโปรตีน 60 ออกมาจากเซลล์สร้างกระดูกที่เกิดการตายแบบเนโครซิสซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวกเท่านั้น แต่ไม่สามารถตรวจพบการหลั่งฮีทชอคโปรตีน 60 จากเซลล์หรือการกระตุ้นฮีทชอคโปรตีน 60 ภายในเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส หรือยาไอบูโพรเฟนในปริมาณสูง ซึ่งผลของความร้อนที่อุณหภูมิสูงต่อเซลล์สร้างกระดูกคล้ายคลึงกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งไม่พบฮีทชอคโปรตีน 60 ในอาหารเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้เทคนิคเวสเทิร์นบลอตในการวิเคราะห์ <sup>(44)</sup> อย่างไรก็ตามอาจเป็นไปได้ว่าความร้อนที่อุณหภูมิสูงหรือยาไอบูโพรเฟนในปริมาณสูงอาจทำให้เกิดการหลั่งของฮีทชอคโปรตีน 60 ในปริมาณที่ต่ำมากจนไม่สามารถตรวจพบได้หรืออาจมีการเคลื่อนย้ายฮีทชอคโปรตีน 60 มาอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์โดยไม่มีการปล่อยออกมาในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่ง Gupta และ Knowlton ในปี 2010 ได้รายงานว่าการเครียดจากภาวะขาดออกซิเจน (hypoxia) ทำให้ฮีทชอคโปรตีน 60 เคลื่อนย้ายจากไซโตซอล (cytosol) ไปยังเยื่อหุ้มเซลล์โดยไม่มีการหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ <sup>(22)</sup> นอกจากนี้บางการศึกษา รายงานการตรวจพบการหลั่งฮีทชอคโปรตีน 60 เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง <sup>(7, 14)</sup> ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อตรวจสอบการหลั่งฮีทชอคโปรตีนในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ภายหลังจากได้รับความเครียด หรืออาจต้องเลือกใช้เทคนิคอื่นที่มีความไวมากกว่าเทคนิคเวสเทิร์นบลอตในการวิเคราะห์ เช่น อีไลซ่า (ELISA) เป็นต้น

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าฮีทชอคโปรตีน 60 ที่ถูกหลั่งออกมามีบทบาทในการควบคุมการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน <sup>(28)</sup> โดยรายงานวิจัยที่ผ่านมาได้กล่าวถึงบทบาทของฮีทชอคโปรตีน 60 ที่ผิวเซลล์หรือที่หลั่งออกมาภายหลังเกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ <sup>(10)</sup> โดยมีคุณสมบัติเป็นสัญญาณอันตรายภายใน (endogenous signal) ที่สามารถกระตุ้นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้ ซึ่งในการศึกษานี้พบว่าฮีทชอคโปรตีน 60 ที่อยู่นอกเซลล์ในปริมาณ 1 ถึง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรสามารถกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจให้สร้างไซโตไคน์ที่เอนเอฟ-แอลฟาได้ โดยผลที่เกิดขึ้นแปรผันตามปริมาณฮีทชอคโปรตีน 60 ที่เพิ่มขึ้น และจากการทดสอบเซลล์แมคโครฟาจด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกที่ได้รับความเครียดมาก่อน พบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สามารถกระตุ้นการสร้างทีเอนเอฟ-แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจได้ แต่ไม่พบการกระตุ้นในกลุ่มที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกที่ได้รับความร้อนสูงเป็นเวลา 5 นาทีหรือยาไอบูโพรเฟนในปริมาณสูง และผลการกระตุ้นนี้อาจเกี่ยวข้องกับฮีทชอคโปรตีน 60 ที่อยู่ภายนอกเซลล์ โดยในการศึกษาก่อนหน้านี้พบผลโดยตรงของฮีทชอคโปรตีน 60 ที่ความเข้มข้น 3 ถึง 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรในการกระตุ้นการหลั่งทีเอนเอฟ-แอลฟาและอินเตอร์ลิวคินหลายชนิดจากเซลล์เดนไดรติก (dendritic cells) <sup>(80)</sup> ผลการศึกษานี้จึงสนับสนุนบทบาทของฮีทชอคโปรตีน 60 ต่อการกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์จากเซลล์ต่าง ๆ รวมทั้งแสดงให้เห็นว่าเซลล์สร้างกระดูกที่ได้รับความเครียดจากความร้อนที่อุณหภูมิสูงเป็นระยะเวลานานจน

ทำให้เกิดการตายของเซลล์สามารถปลดปล่อยโมเลกุลต่าง ๆ รวมทั้งฮีทชอคโปรตีน 60 ซึ่งอาจไปมีผลไปกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบให้สร้างไซโตไคน์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังอาจมีโมเลกุลอื่นๆ ที่ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างกระดูกที่เกิดการตาย อาทิเช่น เอชเอ็มจีบีวัน (HMGB1)<sup>(81)</sup>, เอทีพี (ATP), ยูริกแอซิด (uric acid), ดีเอ็นเอ (DNA), เอส100 (S100) และไฮยาลูโรแนน (Hyaluronan) เป็นต้น ที่พบว่าสามารถกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์จากเซลล์อื่น เช่น นิวโทรฟิล เซลล์เดนไดรติก ได้เช่นกัน<sup>(88, 89)</sup>

เซลล์ที่ได้รับความเครียดในรูปแบบแตกต่างกันส่งผลให้เกิดการตอบสนองหรือการตายของเซลล์ได้ลักษณะ เช่น การตายแบบอะพอพโทติก หรือการตายแบบเนโครซิส เป็นต้น ซึ่งการตายในแต่ละรูปแบบส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ รวมทั้งการหลั่งโมเลกุลต่าง ๆ ออกมาแตกต่างกัน<sup>(34, 81)</sup> ในการศึกษา<sup>(81)</sup> นี้ได้ทำการวิเคราะห์รูปแบบการตายของเซลล์สร้างกระดูกในสองลักษณะนี้ พบว่าความร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีหรือยาไอบูโพรเฟนในปริมาณสูง สามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์ทั้งแบบเนโครติกและอะพอพโทติกได้ทันทีภายหลังการทดสอบ โดยพบปริมาณการตายของเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับยาไอบูโพรเฟนน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับความร้อนสูงเป็นเวลา 30 นาที แต่เซลล์ที่ได้รับความร้อนสูงเป็นเวลา 5 นาที จะเกิดการตายของเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ซึ่งการวิจัยก่อนหน้านี้ได้รายงานว่าการตายแบบเนโครติกและอะพอพโทติกในระยะหลังสามารถหลั่งฮีทชอคโปรตีน 60 ออกมาภายนอกเซลล์ซึ่งอาจกระตุ้นการเกิดการอักเสบได้<sup>(82)</sup> นอกจากนี้ได้มีการรายงานผลของความร้อนที่อุณหภูมิสูง 48 องศาเซลเซียสในการกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์สร้างกระดูกจากกะโหลกหนูทั้งแบบอะพอพโทติกและเนโครติก<sup>(43)</sup> และมีรายงานการเกิดการตายแบบอะพอพโทติกมากกว่าแบบเนโครติกในเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ที่ได้รับยาในกลุ่มอินโดเมธาซินเป็นเวลา 17 ถึง 24 ชั่วโมง<sup>(56, 83)</sup> ดังนั้นผลการศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นว่าความร้อนที่อุณหภูมิสูงเป็นระยะเวลาสั้น ทำให้เกิดการตายของเซลล์สร้างกระดูกทั้งสองรูปแบบได้มากกว่าและรวดเร็วกว่าการได้รับยาไอบูโพรเฟนในปริมาณสูง ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการหลั่งโมเลกุลที่กระตุ้นกระบวนการอักเสบได้มากกว่า

## บทที่ 5

### บทสรุปและข้อเสนอแนะ

ความเครียดจากความร้อนสูงที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียสเป็นเวลานานหรือยาไอบูโพรเฟนในปริมาณสูงทำให้เกิดการตายของเซลล์สร้างกระดูก และทำให้เกิดการหลั่งโมเลกุลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกิดการรั่วได้ นอกจากนี้เซลล์สร้างกระดูกที่ได้รับความร้อนสูงเป็นเวลานาน 30 นาทียังสามารถหลั่งโมเลกุลที่ทำให้เซลล์แมคโครฟาจสร้างไซโตไคน์ที่เอนเอฟ-แอลฟาเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจรวมถึงฮีทชอคโปรตีน 60 ในขณะที่ความร้อนสูงเป็นเวลา 5 นาทีหรือยาไอบูโพรเฟนในปริมาณสูง ไม่มีผลกระตุ้นการสร้างที่เอนเอฟ-แอลฟาจากเซลล์แมคโครฟาจ ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าในสภาวะที่เซลล์สร้างกระดูกได้รับความร้อนสูงเป็นเวลานาน เช่น ในการทำศัลยกรรมกระดูก นอกจากจะทำให้เซลล์สร้างกระดูกเกิดการตายแล้วยังอาจกระตุ้นให้เซลล์แมคโครฟาจเพิ่มการหลั่งไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบออกมามากขึ้น และอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดการอักเสบหรือเกิดการทำลายกระดูกมากขึ้น ส่งผลให้การซ่อมแซมของกระดูกเกิดช้าลงหรือเกิดไม่สมบูรณ์ได้ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเกี่ยวกับโมเลกุลที่เกี่ยวข้อง เพื่อเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

1. Diller KR. Stress protein expression kinetics. *Annu Rev Biomed Eng* 2006; 8: 403-24.
2. Rylander MN, Feng Y, Bass J, Diller KR. Thermally Induced Injury and Heat-Shock Protein Expression in Cells and Tissues. *Ann Ny Acad Sci* 2006; 1066(1): 222-42.
3. Calderwood SK, Mambula SS, Gray PJ. Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. *Ann Ny Acad Sci* 2007; 1113(1): 28-39.
4. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein. *Science* 2002; 295(5561): 1852-8.
5. Arya R, Mallik M, Lakhota SC. Heat shock genes-integrating cell survival and death. *J Biosciences* 2007; 32(3): 595-610.
6. Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Bio Chem Bioph Res Co* 2001; 286(3): 433-42.
7. Saito K, Dai Y, Ohtsuka K. Enhanced expression of heat shock proteins in gradually dying cells and their release from necrotically dead cells. *Exp Cell Res* 2005; 310(1): 229-36.
8. Bendz H, Ruhland SC, Pandya MJ, Hainzl O, Riegelsberger S, Braüchle C, et al. Human heat shock protein 70 enhances tumor antigen presentation through complex formation and intracellular antigen delivery without innate immune signaling. *J Biol Chem* 2007; 282(43): 31688-702.
9. Jolesch A, Elmer K, Bendz H, Issels RD, Noessner E. Hsp70, a messenger from hyperthermia for the immune system. *Eur J Cell Biol* 2012; 91(1): 48-52.
10. Habich C, Burkart V. Heat shock protein 60: Regulatory role on innate immune cells. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64(6): 742-51.
11. Ulloa L, Messmer D. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: Friend and foe. *Cytokine Growth F R* 2006; 17(3): 189-201.
12. Hiemstra P. Defensins and cathelicidins in inflammatory lung disease: Beyond antimicrobial activity. *Biochem Soc T* 2006; 34(2): 276-8.
13. Quintana FJ, Cohen IR. Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation. *J Immunol* 2005; 175(5): 2777-82.
14. Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and

- activate the NF- $\kappa$ B pathway. *Int Immunol* 2000; 12(11): 1539-46.
15. Osterloh A, Geisinger F, Piédavent M, Fleischer B, Brattig N, Breloer M. Heat shock protein 60 (HSP60) stimulates neutrophil effector functions. *J Leukocyte Biol* 2009; 86(2): 423-34.
  16. Febbraio MA, Ott P, Nielsen HB, Steensberg A, Keller C, Krstrup P, et al. Exercise induces hepatosplanchnic release of heat shock protein 72 in humans. *J Physiol* 2004; 544(3): 957-62.
  17. Lancaster G, Møller K, Nielsen B, Secher NH, Febbraio MA, Nybo L. Exercise induces the release of heat shock protein 72 from the human brain in vivo. *Cell Stress Chaperon* 2004; 9(3): 276-280.
  18. Merendino AM, Bucchieri F, Campanella C, Marcianò V, Ribbene A, David S, et al. Hsp60 is actively secreted by human tumor cells. *Plos One* 2010; 5(2): e9247.
  19. Samali A, Holmberg CI, Sistonen L, Orrenius S. Thermotolerance and cell death are distinct cellular responses to stress: Dependence on heat shock proteins. *Febs J* 1999; 461(3): 306-10.
  20. Zedler S, Faist E. The impact of endogenous triggers on trauma-associated inflammation. *Curr Opin Crit Care* 2006; 12(6): 595-601.
  21. Goh YC, Yap CT, Huang BH, Cronshaw AD, Leung BP, Lai PB, et al. Heat-shock protein 60 translocates to the surface of apoptotic cells and differentiated megakaryocytes and stimulates phagocytosis. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68(9): 1581-92.
  22. Gupta S, Knowlton AA. HSP60 trafficking in adult cardiac myocytes: Role of the exosomal pathway. *Am J Physiol-Heart C* 2007; 292(6): H3052-6.
  23. Korbelik M, Sun J, Cecic I. Photodynamic therapy-induced cell surface expression and release of heat shock proteins: Relevance for tumor response. *Cancer Res* 2005; 65(3): 1018-26.
  24. Martin CA, Carsons SE, Kowalewski R, Bernstein D, Valentino M, Santiago-Schwarz F. Aberrant extracellular and dendritic cell (DC) surface expression of heat shock protein (hsp) 70 in the rheumatoid joint: Possible mechanisms of hsp/DC-mediated cross-priming. *J Immunol* 2003; 171(11): 5736-42.
  25. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: All we need to know about danger. *J Leukocyte Biol* 2007; 81(1): 1-5.
  26. Bethke K, Staib F, Distler M, Schmitt U, Jonuleit H, Enk AH, et al. Different efficiency of heat shock proteins (HSP) to activate human monocytes and dendritic cells: Superiority of HSP60. *J Immunol* 2002; 169(11): 6141-8.

27. Flohé SB, Brüggemann J, Lendemans S, Nikulina M, Meierhoff G, Flohé S, et al. Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype. *J Immunol*; 170(5): 2340-8.
28. Zanin-Zhorov A, Tal G, Shivtiel S, Cohen M, Lapidot T, Nussbaum G, et al. Heat shock protein 60 activates cytokine-associated negative regulator suppressor of cytokine signaling 3 in T cells: Effects on signaling, chemotaxis, and inflammation. *J Immunol* 2005; 175(1): 276-85.
29. Mortaz E, Redegeld FA, Nijkamp FP, Wong HR, Engels F. Acetylsalicylic acid-induced release of HSP70 from mast cells results in cell activation through TLR pathway. *Exp Hematol* 2006; 34(1): 8-18.
30. Quintana FJ, Cohen IR. The HSP60 immune system network. *Trends Immunol* 2011; 32(2): 89-95.
31. Pespeni M, Mackersie RC, Lee H, Morabito D, Hodnett M, Howard M, et al. Serum Levels of Hsp60 Correlate with the Development of Acute Lung Injury after Trauma. *J Surg Res* 2005; 126(1): 41-7.
32. Prakken BJ, Roord S, Ronaghy A, Wauben M, Albani S, van Eden W, editors. Heat shock protein 60 and adjuvant arthritis: A model for T cell regulation in human arthritis. *Springer Semin Immun* 2003; 25(1): 47-63.
33. Adler T, Akiyama H, Herder C, Kolb H, Burkart V. Heat shock protein 60 elicits abnormal response in macrophages of diabetes-prone non-obese diabetic mice. *Biochem Bioph Res Co* 2002; 294(3): 592-6.
34. Krysko DV, Agostinis P, Krysko O, Garg AD, Bachert C, Lambrecht BN, et al. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol* 2011; 32(4): 157-64.
35. Peter C, Wesselborg S, Herrmann M, Lauber K. Dangerous attraction: Phagocyte recruitment and danger signals of apoptotic and necrotic cells. *Apoptosis* 2010; 15(9): 1007-28.
36. Krysko DV, D'Herde K, Vandenabeele P. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis* 2006; 11(10): 1709-26.
37. Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* 2008; 44(3): 205-21.
38. Misch CE. Dental implant prosthetics: *Mosby*; 2004.

39. Adachi S, Kokura S, Okayama T, Ishikawa T, Takagi T, Handa O, et al. Effect of hyperthermia combined with gemcitabine on apoptotic cell death in cultured human pancreatic cancer cell lines. *Int J Hyperther* 2009; 25(3): 210-9.
40. Bettaieb A, Averill-Bates DA. Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 degrees C protects cells against heat shock-induced apoptosis. *J Cell Physiol* 2005; 205(1): 47-57.
41. Lepock JR. How do cells respond to their thermal environment? *Int J Hyperther* 2005; 21(8): 681-7.
42. Zhao Q-L, Fujiwara Y, Kondo T. Mechanism of cell death induction by nitroxide and hyperthermia. *Free Radical Bio Med* 2006; 40(7): 1131-43.
43. Li S, Chien S, Branemark P-I. Heat shock-induced necrosis and apoptosis in osteoblasts. *J Orthop Res* 1999; 17(6): 891-9.
44. Charoonpatrapong-Panyayong K, Chanchayanon B, Panyayong W. Heat stress induces both apoptosis and necrosis in normal human osteoblasts without heat shock protein-60 (HSP60) release. *Songklanakarin J Sci Technol* 2013; 35(2): 123-129.
45. Norgaard R, Kassem M, Rattan SI. Heat Shock-Induced Enhancement of Osteoblastic Differentiation of hTERT-Immortalized Mesenchymal Stem Cells. *Ann Ny Acad Sci* 2006; 1067(1): 443-7.
46. Trieb K, Blahovec H, Kubista B. Effects of hyperthermia on heat shock protein expression, alkaline phosphatase activity and proliferation in human osteosarcoma cells. *Cell Biochem Funct* 2007; 25(6): 669-72.
47. Maytin EV. Differential effects of heat shock and UVB light upon stress protein expression in epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 1992; 267(32): 23189-96.
48. Merwald H, Kokesch C, Klosner G, Matsui M, Trautinger F. Induction of the 72-kilodalton heat shock protein and protection from ultraviolet B-induced cell death in human keratinocytes by repetitive exposure to heat shock or 15-deoxy-delta (12, 14)-prostaglandin J2. *Cell Stress Chaperon* 2006; 11(1): 81-8.
49. Koester MC, Spindler KP. Pharmacologic agents in fracture healing. *Clin Sport Med* 2006; 25(1): 63-73.
50. Pountos I, Georgouli T, Blokhuis TJ, Pape HC, Giannoudis PV. Pharmacological agents and impairment of fracture healing: what is the evidence? *Injury* 2008; 39(4): 384-94.



51. Vuolteenaho K, Moilanen T, Moilanen E. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, Cyclooxygenase-2 and the Bone Healing Process. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 102(1): 10-4.
52. Simon AM, O'Connor JP. Dose and time-dependent effects of cyclooxygenase-2 inhibition on fracture-healing. *J Bone Joint Surg* 2007; 89(3): 500-11.
53. Xie C, Ming X, Wang Q, Schwarz EM, Guldberg RE, O'Keefe RJ, et al. COX-2 from the injury milieu is critical for the initiation of periosteal progenitor cell mediated bone healing. *Bone* 2008; 43(6): 1075-83.
54. Abukawa H, Phelps M, Jackson P, Smith RM, Vacanti JP, Kaban LB, et al. Effect of Ibuprofen on Osteoblast Differentiation of Porcine Bone Marrow-Derived Progenitor Cells. *J Oral Maxil Surg* 2009; 67(11): 2412-7.
55. Arpornmaeklong P, Akarawatcharangura B, Pripatnanont P. Factors influencing effects of specific COX-2 inhibitor NSAIDs on growth and differentiation of mouse osteoblasts on titanium surfaces. *Int J Oral Max Impl* 2008; 23(6): 1071-81.
56. Chang J-K, Li C-J, Liao H-J, Wang C-K, Wang G-J, Ho M-L. Anti-inflammatory drugs suppress proliferation and induce apoptosis through altering expressions of cell cycle regulators and proapoptotic factors in cultured human osteoblasts. *Toxicology* 2009; 258(2): 148-56.
57. Garcia-Martinez O, Díaz-Rodríguez L, Rodríguez-Pérez L, De Luna-Bertos E, Botella CR, Ruiz CC. Effect of acetaminophen, ibuprofen and methylprednisolone on different parameters of human osteoblast-like cells. *Arch Oral Biol* 2011; 56(4): 317-23.
58. Pountos I, Giannoudis PV, Jones E, English A, Churchman S, Field S, et al. NSAIDs inhibit in vitro MSC chondrogenesis but not osteogenesis: Implications for mechanism of bone formation inhibition in man. *J Cell Mol Med* 2011; 15(3): 525-34.
59. Endo K, Sairyō K, Komatsubara S, Sasa T, Egawa H, Ogawa T, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor delays fracture healing in rats. *Acta Orthop* 2005; 76(4): 470-2.
60. Krischak G, Augat P, Blakytyn R, Claes L, Kinzl L, Beck A. The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac reduces appearance of osteoblasts in bone defect healing in rats. *Arch Orthop Traum Su* 2007; 127(6): 453-8.
61. Dimmen S, Nordsletten L, Madsen JE. Parecoxib and indomethacin delay early fracture healing: A study in rats. *Clin Orthop Relat R* 2009; 467(8): 1992-9.
62. Spiro AS, Timo Beil F, Baranowsky A, Barvencik F, Schilling AF, Nguyen K, et al. BMP-7-

- induced ectopic bone formation and fracture healing is impaired by systemic NSAID application in C57BL/6-mice. *J Orthop Res* 2010; 28(6): 785-91.
63. Kidd LJ, Cowling NR, Wu AC, Kelly WL, Forwood MR. Selective and non-selective cyclooxygenase inhibitors delay stress fracture healing in the rat ulna. *J Orthop Res*; 31(2): 235-42.
  64. Geusens P, Emans PJ, de Jong JJ, van den Bergh J. NSAIDs and fracture healing. *Curr Opin Rheumatol* 2013; 25(4): 524-31.
  65. Van der Heide HJ, Hannink G, Buma P, Schreurs BW. No effect of ketoprofen and meloxicam on bone graft ingrowth: A bone chamber study in goats. *Acta Orthop* 2008; 79(4): 548-54.
  66. Hak DJ, Schulz KS, Khoie B, Hazelwood SJ. The effect of Cox-2 specific inhibition on direct fracture healing in the rabbit tibia. *J Orthop Sci* 2011; 16(1): 93-8.
  67. Utvag SE, Fuskevag OM, Shegarfi H, Reikeras O. Short-term treatment with COX-2 inhibitors does not impair fracture healing. *J Invest Surg* 2010; 23(5): 257-61.
  68. Dodwell ER, Latorre JG, Parisini E, Zwettler E, Chandra D, Mulpuri K, et al. NSAID exposure and risk of nonunion: A meta-analysis of case-control and cohort studies. *Calcified Tissue Int* 2010; 87(3): 193-202.
  69. Ishihara K, Yamagishi N, Hatayama T. Suppression of heat- and polyglutamine-induced cytotoxicity by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *EUR J BIOCHEM* 2004; 271(22): 4552-8.
  70. Wheeler DS, Wong HR. Heat shock response and acute lung injury. *Free Radical Bio Med* 2007; 42(1): 1-14.
  71. Hatakeyama D, Kozawa O, Niwa M, Matsuno H, Ito H, Kato K, et al. Upregulation by retinoic acid of transforming growth factor-beta-stimulated heat shock protein 27 induction in osteoblasts: Involvement of mitogen-activated protein kinases. *Bba-Mol Cell Res* 2002; 1589(1): 15-30.
  72. Tokuda H, Kozawa O, Niwa M, Matsuno H, Kato K, Uematsu T. Mechanism of prostaglandin E2-stimulated heat shock protein 27 induction in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *J Endocrinol* 2002; 172(2): 271-81.
  73. Tiffée J, Griffin J, Cooper L. Immunolocalization of stress proteins and extracellular matrix proteins in the rat tibia. *Tissue Cell* 2000; 32(2): 141-7.
  74. Kim YS, Koh J-M, Lee Y-S, Kim B-J, Lee SH, Lee K-U, et al. Increased circulating heat shock protein 60 induced by menopause, stimulates apoptosis of osteoblast-lineage cells via up-

- regulation of toll-like receptors. *Bone* 2009; 45(1): 68-76.
75. Koh J-M, Lee Y-S, Kim YS, Park S-H, Hun Lee S, Kim H-H, et al. Heat shock protein 60 causes osteoclastic bone resorption via toll-like receptor-2 in estrogen deficiency. *Bone* 2009; 45(4): 650-60.
  76. Gerstenfeld L, Einhorn T. Fracture healing: the biology of bone repair and regeneration. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 6<sup>th</sup> ed *Am Soc Bone Min*, Washington, DC, USA 2006: p. 42-8.
  77. Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Kohara H, Yoshimatsu M, Takano-Yamamoto T. Immunological reaction in TNF-alpha-mediated osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 181849.
  78. Hess K, Ushmorov A, Fiedler J, Brenner RE, Wirth T. TNFalpha promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by triggering the NF-kappaB signaling pathway. *Bone* 2009; 45(2): 367-76.
  79. Lacey D, Simmons P, Graves S, Hamilton J. Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17(6): 735-42.
  80. Flohe SB, Bruggemann J, Lendemans S, Nikulina M, Meierhoff G, Flohe S, et al. Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype. *J Immunol* 2003; 170(5): 2340-8.
  81. Yang J, Shah R, Robling AG, Templeton E, Yang H, Tracey KJ, et al. HMGB1 is a bone-active cytokine. *J Cell Physiol* 2008; 214(3): 730-9.
  82. Beere HM. The stress of dying: The role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci* 2004; 117(13): 2641-51.
  83. Chang J-K, Wang G-J, Tsai S-T, Ho M-L. Nonsteroidal anti-inflammatory drug effects on osteoblastic cell cycle, cytotoxicity, and cell death. *Connect Tissue Res* 2005; 46(4-5): 200-10.
  84. Stelzle F, Frenkel C, Riemann M, Knipfer C, Stockmann P, Nkenke E. The effect of load on heat production, thermal effects and expenditure of time during implant site preparation-an experimental ex vivo comparison between piezosurgery and conventional drilling. *Clin Oral Implan Res* ; 25(2): e140-e8.
  85. Sumer M, Keskiner I, Mercan U, Misir F, Cankaya S. Assessment of heat generation during

- implant insertion. *J Prosthet Dent* 2014.
86. Laska EM, Sunshine A, Marrero I, Olson N, Siegel C, McCormick N. The correlation between blood levels of ibuprofen and clinical analgesic response. *Clin Pharmacol Ther* 1986; 40(1): 1-7.
  87. Jamali F, Kunz-Dober CM. Pain-mediated altered absorption and metabolism of ibuprofen: an explanation for decreased serum enantiomer concentration after dental surgery. *Brit J Clin Pharmacol* 1999; 47(4): 391-6.
  88. Said-Sadier N, Ojcius DM. Alarmins, inflammasomes and immunity. *Biomed*; 35(6): 437.
  89. Pittman K, Kubes P. Damage-associated molecular patterns control neutrophil recruitment. *J Innate Immune*; 5(4): 315-23.

**ภาคผนวก**

## ภาคผนวก

### ก. การเพาะเลี้ยงเซลล์

#### 1. การเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูก

##### 1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ (Culture medium preparation)

#### อุปกรณ์

1. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
2. ที่กรอง (Filter) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

#### สารเคมี

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดมินิมัมเอสเซนเชียล แอลฟามีเดียม (Minimum Essential Medium Alpha Medium หรือ  $\alpha$ -MEM)
2. โซเดียมไบคาร์บอเนต ( $\text{NaHCO}_3$ )
3. แอล-กลูตามีน (L-glutamine )
4. ยาปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อรา (Antibiotics-Antimycotics)
5. ซีรั่มฟอสโตโบวีน (Fetal Bovine Serum หรือ FBS)

#### วิธีการ

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดมินิมัมเอสเซนเชียล แอลฟามีเดียม 1 ซอง ละลายในน้ำ 1 ลิตร
2. เติมโซเดียมไบคาร์บอเนตลงไป 2.2 กรัม และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.3
3. นำไปกรองผ่านที่กรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร
4. นำอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดมินิมัมเอสเซนเชียล แอลฟามีเดียมที่ผ่านการกรองปริมาตร 440 มิลลิลิตร มาผสมกับซีรั่มฟอสโตโบวีนปริมาตร 50 มิลลิลิตร, แอล-กลูตามีนปริมาตร 5 มิลลิลิตร และยาปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อรา 5 มิลลิลิตร
5. เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 1.2 การฟื้นสภาพของเซลล์สร้างกระดูก (Cell recovery)

### อุปกรณ์

1. ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร (75 cm<sup>2</sup> tissue culture flask)
2. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
3. ตู้ปลอดเชื้อระดับ 2
4. ตู้เลี้ยงเซลล์ (Incubator)

### สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดมินิมัมเอสเซนเชียล แอลฟาดีเอ็มที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.3

### วิธีการ

1. นำเซลล์สร้างกระดูกที่ถูกแช่เยือกแข็งอยู่ในถังเก็บเซลล์ออกมา 1 หลอด
2. นำหลอดเก็บเซลล์ไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสทันที รอจนกระทั่งอาหารเลี้ยงเซลล์ละลายจนหมด
3. ย้ายเซลล์สร้างกระดูกที่อยู่ในหลอดเก็บเซลล์ลงสู่ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร
4. เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 13 มิลลิลิตร ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ เขย่าเบาๆ เพื่อให้เซลล์สร้างกระดูกกระจายทั่วพื้นผิวภาชนะ
5. นำไปเพาะเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5

### การแยกเซลล์ออกจากขวดเพาะเลี้ยงและการหว่านเซลล์ (Subculture and Cell seeding)

### อุปกรณ์

1. สไลด์นับเซลล์เม็ดเลือด (Haemocytometer)
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบปรับอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)
3. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับแบบเฟสคอนทราสต์ (Phase contrast inverted microscope)
4. ตู้ปลอดเชื้อระดับ 2
5. ตู้เลี้ยงเซลล์ (Incubator)

## สารเคมี

1. ตะแกรงแยกเซลล์ (Cell strainer)
2. เอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ (Trypsin – EDTA)
3. อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดมินิมัมเอสเซนเชียล แอลฟาเอ็มดีเอ็มที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.3
4. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์

## วิธีการ

1. เลี้ยงเซลล์ให้มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 80 – 90 ของพื้นผิวขวดเลี้ยงเซลล์
2. เทอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร 1 ครั้ง
3. เติมเอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่ตู้เลี้ยงเซลล์นาน 3-5 นาที
4. เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 3 มิลลิลิตรลงในขวดเพาะเลี้ยง เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์
5. ตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบปรับอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
6. นับเซลล์ด้วยสไลด์นับเซลล์เม็ดเลือด

## 2. การเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ

### 2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ (Culture medium preparation)

#### อุปกรณ์

1. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
2. ที่กรอง (Filter) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

## สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดัลเบคโค โมดิฟายด์อีเกิลมีเดีย (Dulbecco's modified eagle medium หรือ DMEM)
2. ยาปฏิชีวนะและยาด้านเชื้อรา (Antibiotics-Antimycotics)
3. ซีรัมบอวันซ์ฟิทัล (Fetal Bovine Serum หรือ FBS)
4. โซเดียมไบคาร์บอเนต ( $\text{NaHCO}_3$ )



## วิธีการ

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดคัลเบคโคโมดิฟายด์อีเกิลมีเดียม 1 ซอง ละลายในน้ำ 1 ลิตร
2. เติมโซเดียมไบคาร์บอเนตลงไป 1.5 กรัม
3. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้อยู่ในช่วง 7.0-7.4
4. นำไปกรองผ่านที่กรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร
5. นำอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดคัลเบคโคโมดิฟายด์อีเกิลมีเดียม ที่ผ่านการกรองปริมาตร 445 มิลลิลิตร มาผสมกับฟัลทโบไวน์ซีรัมปริมาตร 50 มิลลิลิตร และยาปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อรา 5 มิลลิลิตร
6. เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 2.2 การฟื้นสภาพของเซลล์แมคโครฟาจ (Cell recovery)

### อุปกรณ์

1. จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 100 มิลลิเมตร (100 mm Tissue culture dish)
2. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
3. ตู้อบเชื้อระดับ 2
4. ตู้เลี้ยงเซลล์ (Incubator)

### สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดคัลเบคโคโมดิฟายด์อีเกิลมีเดียมที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้อยู่ในช่วง 7.0-7.4

## วิธีการ

1. นำเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกแช่เยือกแข็งอยู่ในถังเก็บเซลล์ออกมา 1 หลอด
2. นำหลอดเก็บเซลล์ไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสทันที รอจนกระทั่งอาหารเลี้ยงเซลล์ละลายจนหมด
3. ย้ายเซลล์แมคโครฟาจที่อยู่ในหลอดเก็บเซลล์ลงสู่จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 100 มิลลิเมตร
4. เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ เขย่าเบาๆ เพื่อให้เซลล์แมคโครฟาจกระจายทั่วพื้นผิวภาชนะ
5. นำไปเพาะเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5

## 2.3 การแยกเซลล์ออกจากงานเพาะเลี้ยงและการหว่านเซลล์ (Subculture and Cell seeding)

### อุปกรณ์

1. สไลด์นับเซลล์เม็ดเลือด (Haemocytometer)
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบปรับอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)
3. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับแบบเฟสคอนทราสต์ (Phase contrast inverted microscope)
4. ตู้ปลอดเชื้อระดับ 2
5. ตู้เลี้ยงเซลล์ (Incubator)
6. เครื่องมือขูดเซลล์ (Cell scraper)

### สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดคัลเบคโคโมดิฟายด์อีเกิลมีเดียที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้อยู่ในช่วง 7.0-7.4
2. สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ซาไลน์

### วิธีการ

1. เลี้ยงเซลล์ให้มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 80 – 90 ของพื้นผิวงานเพาะเลี้ยงเซลล์
2. เทอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ซาไลน์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร 1 ครั้ง
3. เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดคัลเบคโคโมดิฟายด์อีเกิลมีเดียปริมาตร 5 มิลลิลิตร
4. ใช้เครื่องมือขูดเซลล์ ขูดบริเวณพื้นผิวงานเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ทั่ว
5. ตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบปรับอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส, ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
6. นับเซลล์ด้วยสไลด์นับเซลล์เม็ดเลือด

## ข. วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์การหลั่งแลคเตทดีไฮโดรจีเนส (Lactate Dehydrogenase หรือ LDH) จากเซลล์ที่เกิดเนโครซิส

### อุปกรณ์

1. จานหลุมแบบ 96 หลุม
2. เครื่องอ่านจานหลุมแบบ 96 หลุม

### วิธีการ

1. นำอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์สร้างกระดูกที่ผ่านการทดสอบรูปแบบต่างๆ มาใส่ลงในจานหลุมแบบ 96 หลุม ตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม
2. เติมน้ำที่ไร้ฟอสเฟตลงไป 100 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม
3. ทำปฏิกิริยาในที่มืด (ห่อหุ้มด้วยฟอยล์) นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
4. เติมน้ำที่ไร้ฟอสเฟตปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม
5. เขย่าเบาๆ เพื่อให้สารผสมเข้ากันได้ดี
6. นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 และ 690 นาโนเมตรด้วยเครื่องอ่านจานหลุมแบบ 96 หลุม
7. คำนวณค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร – ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 690 นาโนเมตร
2. การวิเคราะห์การตายของเซลล์ด้วยเทคนิคการย้อมแอนเนกซินไฟฟว์โพรพิเดียมไอโอไดด์ (Annexin-V/Propidium iodide)

### อุปกรณ์

1. สไลด์
2. ปากกีสบ
3. กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

## วิธีการ

1. เพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกบนแผ่นกระจกปิดสไลด์ หลังจากนั้นนำไปทดสอบเซลล์ด้วยรูปแบบต่างๆ
  2. ล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ 1 ครั้ง
  3. หยดสารที่ใช้ทำปฏิกิริยาปริมาณ 50 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์
  4. คีบกระจกปิดสไลด์ที่ผ่านการล้างแล้ว นำมาคว่ำลงบนสารที่ใช้ทำปฏิกิริยาด้วยปากกิบ
  5. รอให้สารทำปฏิกิริยากับเซลล์ที่เกิดอะพอโทซิสและเนโครซิส เป็นเวลา 10 -15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
  6. นับจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสีแดงและสีเขียว บันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์
- 3. การวิเคราะห์ปริมาณฮีทชอคโปรตีน 60 (HSP60) ด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอต (Western blot)**

### 3.1 การเตรียมตัวอย่างจากสารละลายจากเซลล์ (cell lysate)

#### อุปกรณ์

1. เครื่องมือขูดเซลล์ (Cell scraper)
2. หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Microcentrifuge tube)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบปรับอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)
4. ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส

#### สารเคมี

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (Phosphate Buffer Saline หรือ PBS) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.4
2. สารละลายไลซิส (lysis buffer)

## วิธีการ

1. เพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกในถาดหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม หลังจากนั้นนำไปทดสอบเซลล์ด้วยรูปแบบต่างๆ
2. ล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ หลุมละ 2 มิลลิลิตร 1 ครั้ง
3. ใส่สารละลายไลซิส (lysis buffer) ปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงไปในแต่ละหลุม
4. ใช้เครื่องมือขูดเซลล์ ขูดลงบนพื้นผิวของถาดหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์จนทั่ว ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. ย้ายสารละลายลงสู่หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
6. แยกและเก็บสารละลายไว้ที่ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์โปรตีนต่อไป

### 3.2 การเตรียมตัวอย่างจากอาหารเลี้ยงเซลล์ (conditioned media)

#### อุปกรณ์

1. หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร
2. เครื่องทำแห้งด้วยความเย็น (Lyophilizer)
3. ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส

#### วิธีการ

1. เพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกในถาดหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม หลังจากนั้นนำไปทดสอบเซลล์ด้วยรูปแบบต่างๆ
2. เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละกลุ่มลงในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่ในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส
3. เมื่อตัวอย่างแข็งดีแล้ว นำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งด้วยความเย็น จนกระทั่งตัวอย่างแห้งสนิท
4. เก็บตัวอย่างที่แห้งสนิทแล้วที่ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์โปรตีนต่อไป

### 3.3 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิคเวสต์เทิร์นบลอต

#### อุปกรณ์

1. ชุดเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Mini gel electrophoresis system)
2. ชุดถ่ายโอนโปรตีนด้วยไฟฟ้า (Mini trans – blot electrophoretic transfer system)
3. फिल्मเอ็กซ์เรย์ (Clear blue X – ray film) เครื่องล้างฟิล์ม (Film processor)

#### สารเคมี

1. ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris –Hydrochloride)
2. ไดไธโอเทรียล (Dithiothreitol หรือ DTT )
3. อะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ (30% Acrylamide)
4. โบรโมฟีนอลบลู (Bromophenol blue)
5. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium Persulfate หรือ APS)

6. เมทานอล (Methanol)
7. มวลโมเลกุลโปรตีนมาตรฐาน (Kaleidoscope prestained standards)
8. ทวิน-20 (Tween 20)
9. ชุดตรวจปริมาณโปรตีนแบบบีซีเอ (BCA Protein assay kit)
10. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate หรือ SDS)
11. แอนติบอดีต่อฮีทชอกโปรตีน 60 จากหนู (Mouse HSP 60 antibody)
12. แอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินจีของหนูที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์ฮอราดิชเปอร์ออกซิเดส (Horseradish Peroxidase (HRP)-conjugated anti –mouse IgG)
13. แอนติบอดีต่อเบต้า-แอคติน (Mouse beta-actin antibody)
14. ซับสเตรทแบบเคมีลูมิเนสเซนส์ระดับพิโคกรัม (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate)
15. ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane)

### วิธีการ

1. นำตัวอย่างจากสารละลายจากเซลล์และตัวอย่างจากอาหารเลี้ยงเซลล์ มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
2. เตรียมเจลสำหรับวิเคราะห์โปรตีน ด้วยการใช้อะคริลาไมด์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 และร้อยละ 4 สำหรับเจลล่างและเจลบน ตามลำดับ
3. นำตัวอย่างโปรตีนในแต่ละกลุ่มไปวิเคราะห์ด้วยชุดเจลอิเล็กโตรโพลีซิสที่กำลังไฟฟ้า 30 มิลลิแอมป์ นาน 90 นาที
4. เคลื่อนย้ายโปรตีนที่ทำการวิเคราะห์สำเร็จแล้ว จากแผ่นเจลลงสู่ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนด้วยชุดถ่ายโอนโปรตีนด้วยไฟฟ้าที่กำลังไฟฟ้า 80 มิลลิแอมป์ นาน 12 ชั่วโมง
5. บล็อกไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนด้วยบล็อกกิ้งบัฟเฟอร์ ที่วางอยู่บนเครื่องเขย่านาน 1 ชั่วโมง
6. ตรวจสอบฮีทชอกโปรตีน 60 ที่อยู่บนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนด้วยแอนติบอดีต่อฮีทชอกโปรตีน 60 จากหนู ที่วางอยู่บนเครื่องเขย่านาน 1 ชั่วโมง
7. ล้างไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนด้วยทีบีเอส-ทีบัฟเฟอร์ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง
8. ล้างไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนด้วยทีบีเอส-ทีบัฟเฟอร์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่วางอยู่บนเครื่องเขย่าเป็นจำนวน 5 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

9. เติมแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินจีของหนูที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์สเตรดิซเปอร์ออกซิเดสที่วางอยู่บนเครื่องเขย่านาน 1 ชั่วโมง
10. ล้างในโตรเซลลูโลสเมมเบรนด้วยทีบีเอส-ทีบัฟเฟอร์ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง
11. ล้างในโตรเซลลูโลสเมมเบรนด้วยทีบีเอส-ทีบัฟเฟอร์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่วางอยู่บนเครื่องเขย่าเป็นจำนวน 6 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
12. เติมซับสเตรทแบบเคมีลูมินเนสเซนซ์ระดับพิโคกรัมลงบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน นาน 5 นาที
13. นำไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนมาตรวจหาสัญญาณด้วยการประกบกับฟิล์มเอกซเรย์ในห้องมืด นาน 2 – 3 นาที
14. ล้างฟิล์มเอกซเรย์ด้วยเครื่องล้างฟิล์ม

### 3.4 การวิเคราะห์ปริมาณความเข้มบนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์

#### อุปกรณ์

1. เครื่องวัดความเข้มของฟิล์ม (Densitometer)

#### วิธีการ

1. นำฟิล์มเอกซเรย์มาสแกนด้วย เครื่องวัดความเข้มของฟิล์ม
2. ใช้โปรแกรม Molecular analysis คำนวณหาค่าเฉลี่ยของความเข้มของฟิล์ม
4. การวิเคราะห์การสร้างทีเอ็นเอฟแอลฟา (TNF-alpha) ด้วยเทคนิคอีไลซา (ELISA)

#### อุปกรณ์

1. เครื่องดูด-จ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Microplate washer)
2. เครื่องอ่านจานหลุมแบบ 96 หลุม (Microplate reader)

#### สารเคมี

1. จานหลุมแบบ 96 หลุม
2. ชุดตรวจอีไลซาสำหรับทีเอ็นเอฟแอลฟาของหนู (Mouse TNF- $\alpha$  ELISA)
3. โปรตีนลูกผสมฮีทชอกโปรตีน 60 (Recombinant HSP 60 หรือ rHSP60)

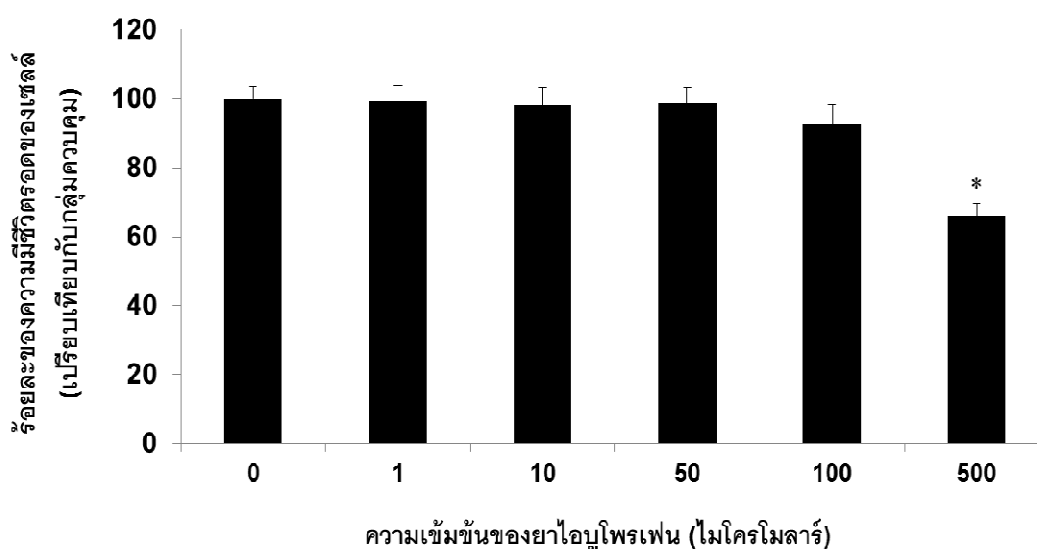
## วิธีการ

1. เคลือบจานหลุมแบบ 96 หลุมด้วยแอนติบอดีจับ (capture antibody) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง
2. ล้างจานหลุมแบบ 96 หลุม ด้วยบัฟเฟอร์ทั้งหมด 5 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที
3. เติมตัวอย่างที่ต้องการจะทดสอบและสารมาตรฐานของทีเอนเอฟ-แอลฟา ลงในจานหลุม ตั้งให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง
4. เติมแอนติบอดีตรวจหา (detection antibody) ลงในจานหลุมแต่ละหลุม ให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง
5. ล้างจานหลุมแบบ 96 หลุม ด้วยบัฟเฟอร์ทั้งหมด 5 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที
6. เติมเอนไซม์ฮอริสเตรสเปอร์ออกซิเดส จากนั้นให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที
7. ล้างจานหลุมแบบ 96 หลุม ด้วยบัฟเฟอร์ทั้งหมด 7 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
8. เติมสับสเตรทลงในจานหลุมแต่ละหลุม ให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที
9. เติมตัวหยุดปฏิกิริยา
10. นำจานหลุมไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และ 570 นาโนเมตร
11. ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร – ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร
12. คำนวณปริมาณทีเอนเอฟ-แอลฟา ที่ปล่อยออกมาด้วยสมการสมการเส้นตรง (linear regression) ที่ได้จากค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานของทีเอนเอฟ-แอลฟา



### ค. ปริมาณยาไอบูโพรเฟนที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์สร้างกระดูก

ทำการทดสอบเพื่อหาระดับความเข้มข้นของยาไอบูโพรเฟนที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์สร้างกระดูก โดยวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธีเอ็มทีที (MTT assay) โดยนำเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกที่มียาไอบูโพรเฟนที่ 1, 10, 50, 100 และ 500 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็มทีที เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิด RPMI จากนั้นใส่สารละลายเอ็มทีที แล้วนำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ 3 ชั่วโมง ก่อนละลายผลึกด้วยสารละลายอะซิติกไอโซโพรพานอล (Acidic Isopropanol) จากนั้นนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร จากการทดสอบพบว่าเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มที่ได้รับยาไอบูโพรเฟนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในรูปที่ 20



รูปที่ 20 กราฟแสดงปริมาณเซลล์สร้างกระดูกที่มีชีวิต (Cell viability) ภายหลังจากทดสอบด้วยยาไอบูโพรเฟนที่ 1-500 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ( $p < 0.05$ ; \* เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับยาไอบูโพรเฟน)จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในแต่ละกลุ่มมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 3 และการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายบารมี ชาญชญานนท์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5310820006

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2552

### ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

1. ทุนค่าธรรมเนียมการศึกษาหลักสูตรเฉพาะ หลักสูตรที่เรียนเน้นด้านการวิจัย ระดับปริญญาโท สาขาวิชาการวิจัยทางทันตแพทยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีการศึกษา 2553
2. ทุนผู้ช่วยสอน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีการศึกษา 2554
3. ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ของนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2554

### ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

1. ผู้ช่วยวิจัย ในโครงการวิจัยเรื่อง Expression and Release of Heat Shock Protein-60 (HSP60) From Human Osteoblasts (ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2550) ภาควิชาชีววิทยาช่องปากและระบบการบดเคี้ยว คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (พฤษภาคม พ.ศ.2552-เมษายน พ.ศ.2553)
2. ผู้ช่วยวิจัย ในโครงการวิจัยเรื่อง Effect Of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs On Gene Expression Of Heat Shock Proteins In Osteoblasts And The Role Of Heat Shock Proteins On Cytokine Production From Osteoblasts (ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2554) ภาควิชาชีววิทยาช่องปากและระบบการบดเคี้ยว คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (ตุลาคม พ.ศ.2553-มีนาคม พ.ศ.2556)

**การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน**

1. **Chanchayanon B**, Panyayong K (2013). Effects of stress on osteoblasts-induced TNF-alpha release from macrophages. *Full text in Proceedings of the 6<sup>th</sup> Silpakorn University International Conference on Academic Research and Creative Arts: Integration of Art and Science*. P126-P133.
2. Charoonpatrapong-Panyayong K, **Chanchayanon B**, Panyayong W (2013). Heat stress induces both apoptosis and necrosis in normal human osteoblasts without heat shock protein-60 (HSP60) release. *Songklanakarin J Sci Technol*. 35(2):123-129.
3. Panyayong K, **Chanchayanon B**, Panyayong W (2011). Expression and release of heat shock protein-60 from heat-treated osteoblasts. *Abstract book in the 89<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the International Association of Dental Research (IADR)* [Poster presentation]