

RESEARCH ARTICLE

Catabolism of Asian Elephant Cartilage Matrix Biomolecules in Explant Culture

Siriwan Tangyuenyong¹, Nawarat Viriyakhasem², Sirinda Aungsuchawan³, Siriporn Peansukmanee¹, Chatchote Thitaram¹, Prachya Kongtawelert², Siriwan Ongchai^{2*}

Abstract

Objective—To attempt to culture and study articular cartilage biomolecules in Asian elephant.

Materials and Methods—Elephant articular cartilages were dissected from knee joint. The explants were then incubated in culture medium containing antibiotics in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37°C for 3-28 days, under condition of 10 ng/ml IL-1 β -induced cartilage degradation, compare to left untreated as control. At the end of incubation, the conditioned media were collected to measure the quantity of hyaluronan (HA), sulfated glycosaminoglycan (s-GAG) and the matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity by competitive inhibition-based-ELISA, colorimetric dye binding assay and gelatin zymography respectively. The remaining of collagen and uronic acid content in cartilage tissue were investigated by colorimetric dye binding assays.

Results—IL-1 β treated group showed 74% higher HA release than control ($P<0.05$) but there was no statistical difference in s-GAG release. MMP-2 activity was found to be 71% lower in IL-1 β treated group than in control. The remaining of collagen and uronic acid in the explant tissues tended to be greater in the IL-1 β treated group when compared to the control. The explant tissue section stained with Hematoxylin-Eosin and Safranin-O showed no significant difference in chondrocyte number and matrix profile; however, cell size in IL-1 β treated group was likely to be bigger than that in the control.

Conclusion—The achievement on cartilage explants culture and monitoring the marker substance of articular cartilage degradation provides the academic significance for further investigation of osteoarthritis in elephants.

KKU Vet J. 2012;22(2):107-123.

<http://vmj.kku.ac.th/>

Keywords: Elephant; Explant culture; Articular cartilage degradation; Osteoarthritis; IL-1 β

¹Department of Companion Animal and Wildlife Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai, 50100

²Thailand Excellent Center for Tissue Engineering and Stem Cells, Department of Biochemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai, 50200

³Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai, 50200

*Corresponding author E-mail: siriwan.ongchai@gmail.com

แคแทบอลิซึมของสารชีวโมเลกุลจากกระดูกอ่อนช้างเอเชีย ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

ศิริวรรณ ตั้งยืนยง¹, นวรัตน์ วิริยะเขมม², ลีรินดา อังศุชวาล³, ศิริพร เพียรสุขมณี¹,
ฉัตรโชติ ทิตาราม¹, ปรัชญา คงทวีเลิศ², ศิริวรรณ องค์กรไชย^{2*}

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อทดลองเพาะเลี้ยงและศึกษาการสลายสารชีวโมเลกุลของเนื้อกระดูกอ่อนข้อต่อช้างเอเชีย

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ เก็บกระดูกอ่อนข้อต่อจากข้อเข่าของซากช้าง นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มียาปฏิชีวนะภายในตู้บ่มที่มีความชื้น และมี 5% CO₂ ณ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3-28 วัน ในภาวะมีการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมของกระดูกอ่อนด้วย IL-1 β 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่มี IL-1 β เมื่อครบกำหนดเก็บน้ำเลี้ยงไปตรวจวัดปริมาณไฮยาลูโรแนนและซัลเฟตกลัยโคซามิโนกลัยแคน การทำงานของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-2 (MMP-2) ด้วยวิธี Competitive inhibition-based-ELISA, Colorimetric dye binding assay และ Gelatin zymography ตามลำดับ ปริมาณคอลลาเจน และกรดยูโรนิกที่คงเหลืออยู่ในเนื้อกระดูกอ่อนถูกวิเคราะห์โดย Colorimetric dye binding assays

ผลการศึกษา กลุ่มที่ให้ IL-1 β มีการสลายไฮยาลูโรแนนสูงกว่ากลุ่มควบคุมร้อยละ 74 ($P < 0.05$) แต่ซัลเฟตกลัยโคซามิโนกลัยแคนไม่แตกต่าง และมีการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมร้อยละ 71 คอลลาเจนและกรดยูโรนิกที่คงเหลือในกระดูกอ่อนมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มควบคุมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเพาะเลี้ยงย้อมด้วย Hematoxylin-Eosin และ Safranin-O ไม่พบความแตกต่างของจำนวนเซลล์กระดูกอ่อนและลักษณะเมทริกซ์ แต่ขนาดเซลล์ในกลุ่ม IL-1 β ค่อนข้างใหญ่กว่ากลุ่มควบคุม

ข้อสรุป ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนและการติดตามตรวจวัดสารบ่งชี้การสลายกระดูกอ่อนข้อต่อครั้งนี้ มีคุณค่าทางวิชาการที่สำคัญต่อการศึกษากลุ่มกระดูกอ่อนข้อต่อช้างในอนาคต

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2555;22(2):107-123.

<http://vmj.kku.ac.th/>

คำสำคัญ: ช้าง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การเสื่อมกระดูกอ่อนข้อต่อ ข้อเสื่อม IL-1 β

¹ภาควิชาคลินิกสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ. เมือง จ. เชียงใหม่ 50100

²หน่วยวิจัยที่มีความเป็นเลิศทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อและเซลล์ต้นกำเนิดแห่งประเทศไทย

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ. เมือง จ. เชียงใหม่ 50200

³ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ. เมือง จ. เชียงใหม่ 50100

*ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ E-mail: siriwan.ongchai@gmail.com

บทนำ

โรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis, OA หรือ Degenerative Joint Disease, DJD) เป็นโรคข้อต่อที่มีความสำคัญ เนื่องจากมีอุบัติการณ์การเกิดของโรคสูงมากทั้งในมนุษย์และสัตว์ ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสุขภาพ เป็นสาเหตุให้มีผู้ป่วยหลายล้านคนทั่วโลก รวมถึงในสัตว์หลายชนิด เช่น สุนัข ม้า และช้าง ต้องประสบกับความเจ็บปวดบริเวณข้อต่อ ทำให้การเคลื่อนไหวในหลายส่วนของร่างกายและการดำรงชีพเป็นไปอย่างยากลำบาก ประสิทธิภาพในการทำงานและคุณภาพชีวิตต่ำลง อันส่งผลให้โอกาสการมีชีวิตอยู่สั้นลงกว่าที่ควรจะเป็น นอกจากนี้ ยังส่งผลเสียต่อสภาพเศรษฐกิจของเจ้าของสัตว์ รวมทั้งการสูญเสียงบประมาณจำนวนมหาศาลไปในการตรวจวินิจฉัยและการรักษาทั้งทางยาและการผ่าตัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช้าง ซึ่งเป็นสัตว์บกขนาดใหญ่ที่สุดในโลกและเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์อย่างยิ่ง สำหรับประเทศไทย ช้างถือเป็นสัตว์สัญลักษณ์ประจำชาติที่ทรงคุณค่าทั้งทางด้านจิตใจและความเป็นมาของชาติไทยตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ในช้างเลี้ยง (captive elephant) พบว่า โรคข้อเสื่อมเป็นโรกระบบโครงร่างและกล้ามเนื้อที่พบได้บ่อยมากที่สุดโรคหนึ่ง [1-9] และยังเป็นสาเหตุสำคัญของอาการขาเก (lameness) ด้วย [6] ช้างที่ถูกนำมาเลี้ยงมักถูกจำกัดพื้นที่รวมทั้งการเคลื่อนไหว โดยการล่ามโซ่ที่ขาและให้ยืนอยู่บนพื้นคอนกรีตแข็งในสภาพที่เย็น ชื้น และเปียกแฉะเกือบตลอดเวลา รวมไปถึงการถูกใช้งานโดยมนุษย์ อาทิ แสดงในสวนสัตว์ ละครสัตว์ ธุรกิจการท่องเที่ยว และอุตสาหกรรมป่าไม้ ประกอบกับการที่ช้างมีน้ำหนักตัวมาก จากหลายปัจจัยข้างต้นทำให้มีแรงกดจำนวนมากกระทำต่อข้อต่ออย่างต่อเนื่องซ้ำๆ เป็นระยะเวลานาน อันก่อให้เกิดการบาดเจ็บของข้อต่อและเนื้อเยื่อบริเวณใกล้เคียง ส่งผลให้ภายในข้อต่อมีกระบวนการอักเสบเกิดขึ้น โดยเซลล์เยื่อข้อต่อจะหลั่งสารสื่ออักเสบ ไซโตไคน์ เช่น อินเตอร์ลิวคิน และพรอสตาแกลนดิน เป็นต้น ซึ่งจะไปกระตุ้นเอนไซม์ต่างๆ หลั่งออกสู่น้ำไขข้อ อันเป็นผลให้กระดูกอ่อนข้อต่อ (articular cartilage) ที่หุ้มบริเวณผิวหน้าของข้อต่อนั้นถูกทำลายจนเกิดภาวะข้อเสื่อมในที่สุด [10]

โดยทั่วไปการตรวจวินิจฉัยโรคข้อต่อในช้างจะอาศัยการซักประวัติ การตรวจร่างกายทางกายภาพร่วมกับการถ่ายภาพทางรังสี สำหรับประเทศไทย การตรวจวินิจฉัยโรคข้อต่ออย่างมีประสิทธิภาพและการรักษาที่ประสบความสำเร็จสามารถทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากข้อจำกัดของอุปกรณ์ที่ใช้ประกอบกับความหนาของข้อต่อและขาข้างโตเต็มวัย ทำให้ภาพรังสีที่ได้อาจไม่ชัดเจนเพียงพอที่จะยืนยันการวินิจฉัยโรคได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับในต่างประเทศ ซึ่งนอกจากมีอุปกรณ์ในการถ่ายภาพทางรังสีที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า ยังมีการใช้เทคนิคอื่นในการวินิจฉัยโรกระบบโครงร่างและกล้ามเนื้อของช้างด้วย ได้แก่ computed tomography (CT) nuclear scintigraphy [11] และ mag-

netic resonance imaging (MRI) [9] สำหรับวิธีการรักษาในช้างมักจะใช้การรักษาทางกายภาพ เช่น การหยุดหรือพักการทำงาน การแช่หรือประคบเย็น [12] และการให้ยาเพื่อลดการอักเสบบรรเทาความเจ็บปวด เช่น ยาแก้อักเสบชนิดที่ไม่ใช่สารสเตียรอยด์ [13-14] ในบางกรณีอาจมีการใช้ยาในกลุ่มคอร์ติโคสเตียรอยด์หรือให้สารอื่น เช่น ไฮยาลูโรนิก แอซิด (hyaluronic acid; HA) โพลีซัลเฟตกลัยโคซามิโนกลัยแคน (polysulfated glycosaminoglycan; s-GAG) เพื่อเสริมความแข็งแรงของข้อต่อ รวมทั้งใช้การออกกำลังกายหลังจากไม่มีการอักเสบของข้อต่อแล้ว เช่น การว่ายน้ำ ร่วมในแผนการรักษาด้วย

ปัจจุบัน ประเทศในทวีปยุโรปและอเมริกา มีการศึกษาเกี่ยวกับเมตาบอลิซึมของกระดูกอ่อนหุ้มผิวข้อต่อทั้งในสัตว์และในหลอดทดลองอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนจากข้อต่อ (cartilage explant culture) นั้น ในต่างประเทศมีการศึกษามาเป็นเวลานานและได้พัฒนาอย่างต่อเนื่องจนมีรูปแบบวิธีการเพาะเลี้ยงที่เป็นมาตรฐาน สำหรับประเทศไทย หน่วยงานที่มีความเป็นเลิศทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อและเซลล์ต้นกำเนิดแห่งประเทศไทย (Thailand Excellent Center for Tissue Engineering and Stem Cells) ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เป็นหน่วยงานแรกที่ประสบความสำเร็จในการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนจากข้อต่อของสุกร [15-18] และม้า [19] รวมทั้ง แคมแพบอลิซึมของกระดูกอ่อนข้อต่อที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดข้อเสื่อมด้วยสารอินเตอเลอวกิน-1 เบต้า (interleukin-1 β) และฤทธิ์ของสมุนไพรชนิดต่างๆ เช่น ข่า [15-16] ไพล [18] งาดำ [16-17] และฟ้าทะลายโจร [19] ต่อการสร้างและเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อในสุกรและม้า

สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการศึกษาเกี่ยวกับแคมเพบอลิซึมกระดูกอ่อนข้อต่อในช้าง ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษามาก่อน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดลองเพาะเลี้ยงและศึกษากระบวนการสลายของสารชีวโมเลกุลของเนื้อกระดูกอ่อนข้อต่อในช้างเอเชีย โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (cartilage explant culture) ร่วมกับการใช้สารกระตุ้นเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนข้อต่อ และใช้การตรวจวิเคราะห์หาสารชีวโมเลกุลซึ่งเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน การทดลองครั้งนี้ แม้จะเป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของช้าง แต่ถือว่ามีคุณค่าทางวิชาการอย่างยิ่ง เพราะนอกจากจะเป็นการศึกษาต้นแบบครั้งแรกในประเทศไทยแล้ว แม้ในระดับโลก ก็ยังมีข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับแคมเพบอลิซึมของกระดูกอ่อนและภาวะข้อเสื่อมในช้างน้อยมาก

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

ตัวอย่างกระดูกอ่อนหุ้มผิวข้อในการศึกษานี้ ทำการเก็บจากข้อเข่า (femerotibial หรือ knee joint) ของช้างเอเชีย (*Elephas maximus*) เพศเมีย อายุ 29 ปี ไม่มีประวัติการเจ็บป่วยอื่นและโรค

ข้อมาก่อน มีอาชีพเป็นช่างโดยสารสำหรับพนักงานท่องเที่ยวชมป่า ซึ่งเสียชีวิตมาประมาณ 6-7 ชั่วโมง ด้วยสาเหตุที่คาดว่าล้มแล้วลุกไม่ขึ้นเนื่องจากติดเชื้อที่ลำตัว

วิธีการเก็บตัวอย่างและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนข้อต่อ

ก่อนการเก็บตัวอย่างทำการล้างทำความสะอาดภายนอกและเลาะชั้นผิวหนังออก แล้วจึงทำการเก็บตัวอย่างกระดูกอ่อนข้อต่อ โดยผ่าเปิดข้อต่อและทำการตัดเลาะกระดูกอ่อนข้อต่อบริเวณหน้าตัดที่ใช้น้ำหนักออกเป็นชิ้น (cartilage disc) ให้มีขนาด 3 x 3 มิลลิเมตรโดยประมาณ ทำการล้างชิ้นกระดูกอ่อนข้อต่อด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (serum-free-DMEM) ที่มียาเพนนิซิลิน 200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ สเตรปโตมัยซิน 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำไปเลี้ยงภายในตู้บ่มที่มีความชื้น และคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ณ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ทำการชั่งน้ำหนัก และนำชิ้นกระดูกอ่อนไปเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 1 คืน แล้วจึงเก็บน้ำเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนข้อต่อ (day 0) ไว้ จากนั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภายในตู้บ่มที่มีความชื้นและคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C ต่อไปเป็นเวลา 3-28 วัน ทั้งในสภาวะที่ไม่มีสารกระตุ้นให้เกิดการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (Untreated control) และสภาวะที่มีสารกระตุ้น (IL-1 β group) โดยการใช้ริคอมบิแนนท์อีวแมนอินเทอลิวคิน-1 เบต้า ปริมาณ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเก็บน้ำเลี้ยงและเนื้อเยื่อไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อวิเคราะห์สารบ่งชี้การเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งการตรวจทางจุลกายวิภาคศาสตร์ต่อไป

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง

ตรวจวิเคราะห์สารบ่งชี้การเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน โดยการวัดปริมาณสารชีวโมเลกุล ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ถูกสลายออกมาในน้ำเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น ไฮยาลูโรแนน (HA) ด้วยวิธี Competitive inhibition-based-ELISA ตามวิธีของ Pothacharoen et al. [15] และซัลเฟตกลัยโคซามิโนกลัยแคน (s-GAG) ด้วยวิธี Colorimetric dye binding assay ตามวิธีของ Farndale et al. [20] นอกจากนี้ ตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน กลุ่มเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส (MMP, Gelatinase activity) ด้วยวิธี Gelatin zymography ซึ่งคัดแปลงมาจากวิธีของ Ito et al. [21] และคำนวณหาความหนา (density) ของแถบเจลที่เกิดขึ้น และตรวจวัดปริมาณสารสำคัญที่คงเหลืออยู่ในชิ้นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน คือ กรดยูโรนิก ตามวิธีของ Pothacharoen et al. [15] และคอลลาเจน ด้วยวิธี Hydroxyproline assay ตามวิธีของ Hoemann et al. [22] พร้อมทดสอบความเป็นพิษของริคอมบิแนนท์อีวแมนอินเทอลิวคิน-1 เบต้า ต่อเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนด้วยวิธี Lactate dehydrogenase (LDH) assay ตามวิธีของ Chotjumlong et al. [23] รวมทั้งตรวจดูลักษณะโครงสร้างทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนด้วยวิธี Hematoxylin-Eosin staining และ safranin-O staining

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

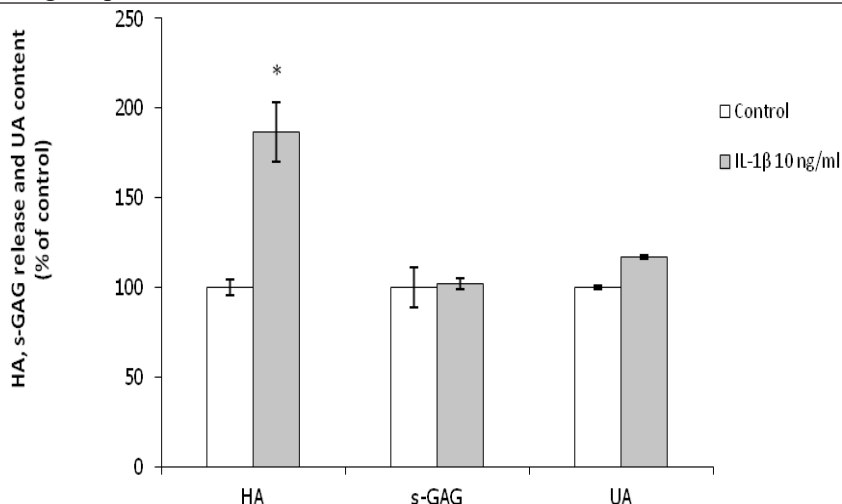
วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS[®] version 16 และเลือกระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p < 0.05$) หากค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของ HA s-GAG ปริมาณกรดยูโรนิก ปริมาณคอลลาเจน MMP และ LDH activity จากผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งสิ้น 3 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งทำการตรวจซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นเฉลี่ยดังกล่าว ระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ให้สารกระตุ้นการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อน ด้วยวิธี Student's t-test และ ANOVA

ผลการศึกษา

จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนข้างเป็นเวลา 3 วัน พบว่า ปริมาณ HA และ s-GAG ในน้ำเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของกลุ่มที่ให้ IL-1 β มีการสลายของ HA ออกมาสู่น้ำเลี้ยงเนื้อเยื่อมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยเพิ่มขึ้นถึง 1.8 เท่า (คิดเป็นร้อยละ 74.3) แต่ปริมาณการสลายของ s-GAG ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สำหรับผลการวัดปริมาณกรดยูโรนิกที่เหลืออยู่ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 β ไม่พบความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) แม้มีแนวโน้มสูงกว่า (Figure 1) และผลการศึกษางานของเอนไซม์ในกลุ่มเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส พบว่า กลุ่มที่ให้ IL-1 β มีการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ในระดับต่ำกว่ากลุ่มควบคุม โดยการทำงานที่ลดลงนั้นคิดเป็นร้อยละ 71.8 (Figure 2) ส่วนการทดสอบความเป็นพิษของสารรีคอมบิแนนท์อีวเมนอินเตอลิวคิน-1 เบต้า ต่อเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนนั้น ผลปรากฏว่า IL-1 β ที่ระดับความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณ Lactate dehydrogenase ปลดปล่อยออกสู่น้ำเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นปริมาณน้อย และไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่ต่ำกว่ามากเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้ hydrogen peroxide (10 mM) ซึ่งเป็นสารที่ใช้เป็น positive control (Figure 3) ในการติดตามตรวจวิเคราะห์ปริมาณการสลาย HA และ s-GAG เป็นระยะเวลา 28 วัน ผลปรากฏว่า ณ สัปดาห์ที่ 1 มีการสลายของ HA และ s-GAG ออกมาในน้ำเลี้ยงเนื้อเยื่อเพิ่มสูงขึ้นจากสัปดาห์ที่ 0 และการสลายยังเพิ่มสูงขึ้นต่อไปจนถึงสัปดาห์ที่ 2 ถึง 4 (Figure 4 & Figure 5) หลังจากนั้นอัตราการสลายลดลงและอยู่ในระดับคงที่ต่อไป (ไม่แสดงข้อมูล) สำหรับผลการวัดปริมาณกรดยูโรนิกและคอลลาเจนที่เหลืออยู่ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนแม้ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) แต่มีแนวโน้มของปริมาณกรดยูโรนิกและคอลลาเจนในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 β สูงกว่ากลุ่มควบคุม (Figure 6)

ผลการตรวจดูลักษณะโครงสร้างทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนด้วยการย้อมสี Hematoxylin-Eosin พบว่า กระดูกอ่อนหุ้มผิวข้อของข้างเป็นชนิด hyaline cartilage ลักษณะของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนสดที่ไม่ได้ผ่านการเพาะเลี้ยง (fresh cartilage) พบเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) จำนวนมากอยู่ในแอ่ง lacunae มีรูปร่างทรงกลม (round) หรือรี (ovoid) ในบาง lacunae อาจพบเซลล์

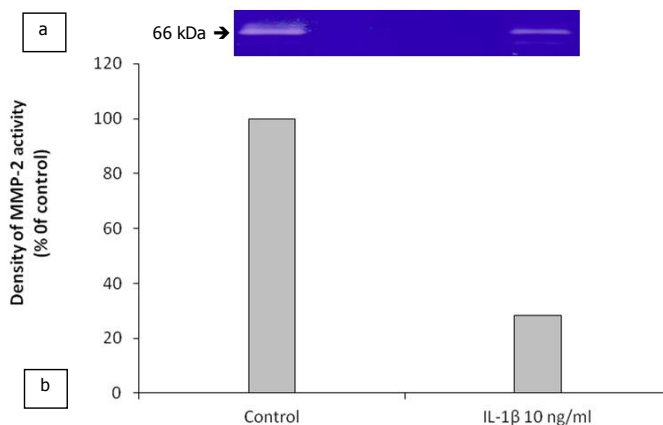
Figure 1. IL-1 β induced degradation of cartilage matrix biomolecules of the Asian elephant articular cartilage explants



Elephant articular cartilage explants were treated with IL-1 β at concentration 10 ng/ml or left untreated as control. After 3 days of incubation, the explants culture were harvested for analysis the release of cartilage matrix biomolecules into the culture media such as HA and s-GAG. The cartilage tissues were analyzed for uronic acid content. The results are expressed as a percentage relative to the control. *Denoted value that was significant different ($P < 0.05$) from the control.

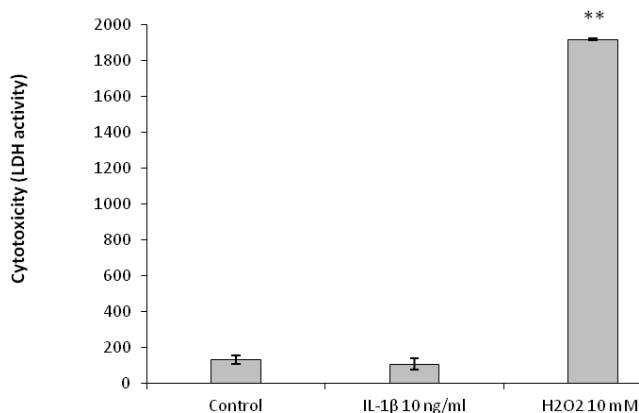
กระดูกอ่อนอยู่มากกว่าหนึ่งเซลล์ และพบอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (isogeneous groups) ลักษณะของ matrix จะเป็นเนื้อเดียว (homogenous) และพบลักษณะของ territorial matrix (capsular matrix) อยู่รอบๆ lacunae ซึ่งติดสี basophilic เข้มกว่า ใน interterritorial matrix (Figure 7a) สำหรับเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่เลี้ยงใน medium (normal culture explants) พบว่า จำนวนของเซลล์กระดูกอ่อนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนสดที่ไม่ได้ผ่านการเพาะเลี้ยง ส่วนของ nucleus มีขนาดเล็กลง ติดสี เข้ม และแทบจะไม่พบ territorial matrix เลย (Figure 7b) ส่วนของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่เลี้ยงใน medium ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย IL-1 β (IL-1 β induced culture) พบว่า จำนวนของเซลล์กระดูกอ่อน และลักษณะของ matrix ไม่แตกต่างจากกลุ่ม normal culture แต่ขนาดเซลล์ค่อนข้างใหญ่กว่ากลุ่ม normal culture เล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 7c นอกจากนี้ การย้อมด้วย Safranin-O ของกลุ่มเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนสดที่ไม่ได้ผ่านการเพาะเลี้ยง มีการติดสีเข้มกว่าใน culture explants ทั้งสองกลุ่ม และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะที่พบในกลุ่ม normal culture กับกลุ่ม IL-1 β induced culture ปรากฏว่าไม่มีความแตกต่างกัน ดังแสดงใน Figure 7d, 7c และ 7f ตามลำดับ

Figure 2. Zymographic analysis of MMP-2 activity from the culture medium of Asian elephant articular cartilage explants induced by IL-1 β (a) and optical density values of MMP-2 activity relative to the control group (b).



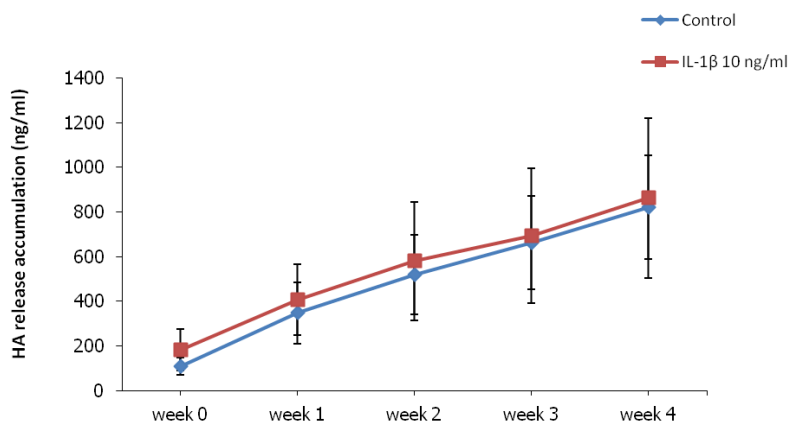
Elephant articular cartilage explants were treated with IL-1 β at concentration 10 ng/ml or left untreated as control. After 3 days of incubation, the culture media were analyzed for the gelatinolytic activity of MMP-2. Density of the clear bands which represented the gelatinase activity is expressed in the bar graph as relative to the control.

Figure 3. Cytotoxicity effect of IL-1 β on Asian elephant articular cartilage explants measuring by LDH assay



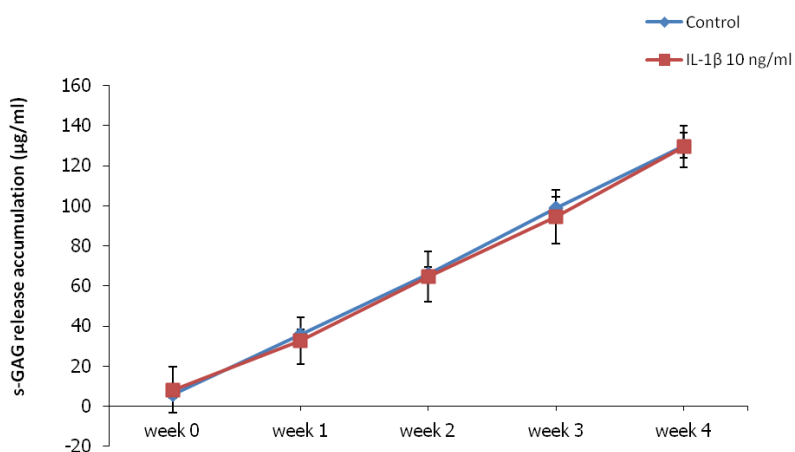
Elephant articular cartilage explants were treated with IL-1 β at concentration 10 ng/ml or left untreated as control. After 3 days of incubation, the culture media were analyzed for the release of LDH. The positive control treated with 10 mM of H₂O₂ showed significant difference from the control (** = $P < 0.01$).

Figure 4. Effect of IL-1 β on the release accumulation of HA to culture medium from Asian elephant articular cartilage explants



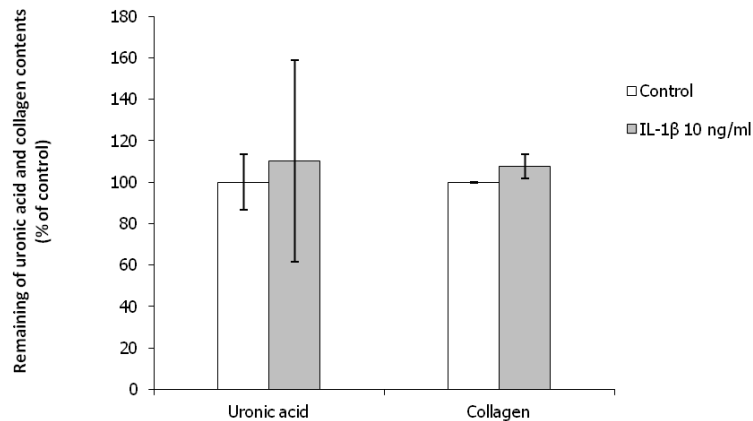
Elephant articular cartilage explants were cultured for 28 days under treatment with IL-1 β at concentration 10 ng/ml or left untreated as control. The culture media were changed at day 4, 7, 14, 21 and 28 to analyze for HA accumulative concentration.

Figure 5. Effect of IL-1 β on the release accumulation of s-GAG to culture medium from Asian elephant articular cartilage explants



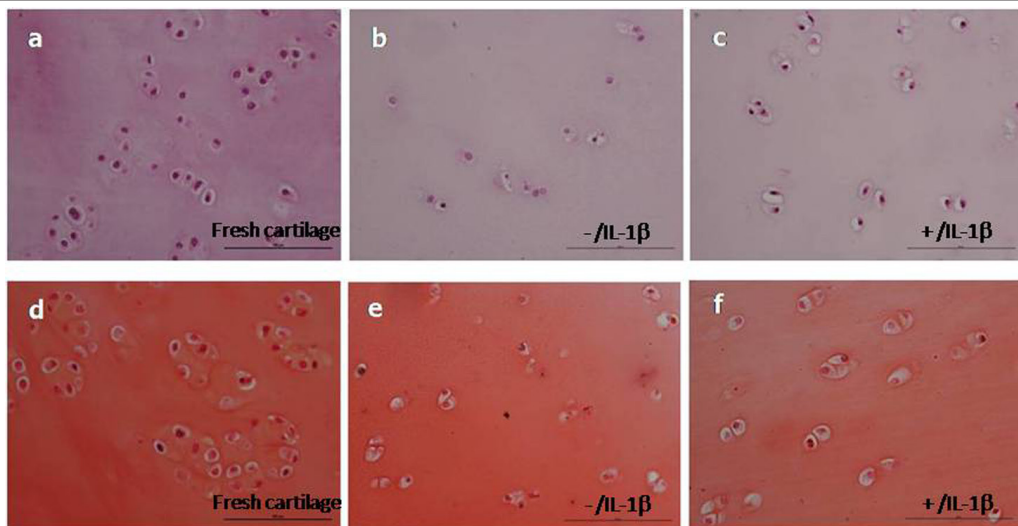
Elephant articular cartilage explants were cultured for 28 days under treatment with IL-1 β at concentration 10 ng/ml or left untreated as control. The culture media were changed at day 4, 7, 14, 21 and 28 to analyze for s-GAG accumulative concentration.

Figure 6. Effect of IL-1 β on the remaining of uronic acid and collagen contents in Asian elephant articular cartilage explants



Elephant articular cartilage explants were treated with IL-1 β at concentration 10 ng/ml or left untreated as control. The cartilage tissues were harvested at day 28 to analyze for uronic acid and collagen contents. The results are expressed as a percentage relative to the control. There was no significant difference between the IL-1 β treated and control ($P < 0.05$).

Figure 7. Histological staining of articular cartilage of the Asian elephant (*Elephas maximus*)



Fresh elephant articular cartilage tissues, the 28 days explants treated with IL-1 β treated (+/IL-1 β) and the untreated control (-/IL-1 β) were proceeded sections and stained with Hematoxylin Eosin (a-c) and Safranin-O, the staining used for the contents of acidic glycosaminoglycans (d-f). All sections were examined under a light microscope. Bar = 100 μ m.

วิจารณ์

โรคข้ออักเสบและข้อเสื่อมเป็นโรคเรื้อรังที่พบได้บ่อยทั้งในมนุษย์และสัตว์หลายชนิด รวมถึงช้างซึ่งเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอาศัยอยู่บนบกที่มีขนาดตัวใหญ่ที่สุดในโลก การมีพยาธิสภาพของโรคดังกล่าวภายในข้อต่อ มักนำมาซึ่งความเจ็บปวด ทุกข์ทรมาน ทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานลดต่ำลง และยังคงส่งผลต่อการดำเนินชีวิตในระยะยาวเป็นผลให้คุณภาพชีวิตของคนและสัตว์ต่ำลง อันมีสาเหตุมาจากกระบวนการสร้างและการสลายของกระดูกอ่อนภายในข้อต่อเสียภาวะสมดุลไป โดยเกิดการสลายมากกว่าการสร้าง ซึ่งกระบวนการสลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนดังกล่าวจะอาศัยการทำงานของสารสื่ออักเสบ (destructive inflammatory mediators) ไซโตไคน์และเอนไซม์ต่างๆ ในการทำลายกระดูกอ่อนที่หุ้มผิวบริเวณข้อต่อ เป็นผลให้สารชีวโมเลกุลซึ่งเป็นองค์ประกอบของเนื้อกระดูกอ่อน เช่น ซัลเฟตกลัยโคซามิโนไกลแคน ไฮยาลูโรแนน คอลลาเจน และกรดยูโรนิก สลายออกมาอยู่ในน้ำไขข้อและถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดต่อไป หลายสิบปีที่ผ่านมามีการศึกษาถึงไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนอย่างกว้างขวาง IL-1 β เป็น pro-inflammatory cytokine ที่สำคัญมากชนิดหนึ่ง ซึ่งสร้างจากเซลล์เยื่อข้อต่อและเซลล์กระดูกอ่อน โดยมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองต่อการติดเชื้อและการสร้างเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ [24] ทั้งยังเป็นตัวการสำคัญในกระบวนการสลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน โดย IL-1 β จะไปกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์ในกลุ่มเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส [25-26] ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างคอลลาเจน [27-28] และโปรตีโอไกลแคน [29-30] รวมทั้งลดการเพิ่มจำนวนเซลล์กระดูกอ่อนของมนุษย์ด้วย [31]

งานวิจัยครั้งนี้ เป็นการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการสลายของสารชีวโมเลกุลของเนื้อกระดูกอ่อนข้อต่อในช้างเอเชีย ซึ่งถือเป็นครั้งแรกในโลกและครั้งแรกสำหรับประเทศไทย โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ร่วมกับการใช้ IL-1 β เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนข้อต่อเสมือนเป็นการจำลองภาวะการอักเสบที่เกิดขึ้นภายในข้อต่อของโรคข้ออักเสบและข้อเสื่อม ซึ่งจากผลการทดสอบระดับความเป็นพิษพบว่า IL-1 β ที่ระดับความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน คณะผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้ IL-1 β ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว ซึ่งมีความปลอดภัยต่อเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนสำหรับการนำมาใช้ในการวัดปริมาณสารชีวโมเลกุลและวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ต่อไป

จากผลการศึกษาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนช้างเป็นเวลา 3 วัน พบว่า กลุ่มที่ให้ IL-1 β มีการสลายของ HA ออกมาสู่น้ำเลี้ยงเนื้อเยื่อมากกว่ากลุ่มควบคุมนั้น ให้ผลตรงกันกับหลายงานวิจัยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของสุกร [15-18] และม้า [19] ซึ่งพบว่า การกระตุ้นด้วย IL-1 β ทำให้มีร้อยละการสลายของ HA เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม เมื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลานาน 1 เดือนโดยประมาณ (28 วัน) เพื่อดูค่าสะสมการสลาย HA ซึ่งพบว่า ทั้งกลุ่มที่กระตุ้นด้วย IL-1 β และกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารกระตุ้นดังกล่าวไม่มีค่าแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้น

ของ IL-1 β ที่ใช้ในการทดลองนี้น่าจะมีปริมาณน้อย เพียงพอแก่กระตุ้นให้การสลาย HA สูงขึ้นได้ ในระยะเวลาสั้น ๆ เท่านั้น จึงไม่พบความแตกต่างของค่าสะสมการสลาย HA จากกลุ่มควบคุมในการเลี้ยงแบบระยะยาว ซึ่งผลนี้ยืนยันได้จากการวิเคราะห์ปริมาณ s-GAG ในน้ำเลี้ยงทั้งแบบ 3 วันและการดูค่าสะสมการสลาย s-GAG จากการเลี้ยงนาน 28 วัน รวมทั้งผลการวิเคราะห์ ปริมาณกรดยูโรนิคที่เหลื่ออยู่ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม IL-1 β และกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตาม การทดลองครั้งนี้ให้ผลสวนทางกับผลการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่า IL-1 β เพิ่มการสลายของ s-GAG และลดปริมาณกรดยูโรนิคที่คงเหลืออยู่ในชั้นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของสุกร [16-18] และม้า [19]

สำหรับผลการศึกษางานของเอนไซม์ในกลุ่มเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอสที่พบว่า การทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ในกลุ่มที่ให้ IL-1 β มีระดับต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งตรงข้ามกับผลการศึกษาในสุกร [16-18] และม้า [19] ที่พบว่า IL-1 β กระตุ้นให้เกิดการทำงานของ MMP-2 เพิ่มสูงขึ้น โดยในภาวะปกติ กระดูกอ่อนที่หุ้มบริเวณผิวหนังของข้อต่อจะมีการสลายและปล่อยสารชีวโมเลกุล ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนออกสู่น้ำไขข้ออยู่แล้วในปริมาณหนึ่ง โดยการทำงานของเอนไซม์กลุ่มเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส เมื่อเลี้ยงกระดูกอ่อนในภาวะที่มี IL-1 β ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ในกลุ่มเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส [25-26] เป็นผลทำให้เกิดการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนมากขึ้น จึงพบการสลายของซัลเฟตกลัยโคซามิโนกลัยแคน ไฮยาลูโรแนน คอลลาเจน และกรดยูโรนิคออกจากเนื้อกระดูกอ่อนสูงขึ้นคล้ายกับภาวะที่เกิดขึ้นในโรคข้อเสื่อม [32] เป็นที่น่าสนใจว่า ผลการศึกษานี้พบการทำงานของ MMP-2 ลดต่ำลงภายใต้ภาวะการถูกกระตุ้นด้วย IL-1 β ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาในสัตว์ชนิดอื่นข้างต้น อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองของเอนไซม์นี้กลับมีความสอดคล้องกับปริมาณของ s-GAG ในน้ำเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ไม่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม รวมทั้งปริมาณกรดยูโรนิคที่เหลื่อในเนื้อกระดูกอ่อนซึ่งควรเหลือน้อยลง แต่กลับพบว่ามีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นแม้ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมก็ตาม แสดงว่าน่าจะมีสาเหตุจากการที่ MMP-2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอสที่ทำให้เกิดการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน เมื่อมีการทำงานลดลง การสลาย s-GAG จากเนื้อกระดูกอ่อนจึงเกิดขึ้นได้น้อย และเป็นผลให้มีการคงเหลือของกรดยูโรนิคในเนื้อกระดูกอ่อนเพิ่มขึ้น เนื่องจาก s-GAG นั้นมีกรดยูโรนิคเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอยู่ในโมเลกุล [32] จากผลการสลายและคงเหลือของสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของช้าง รวมทั้งการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอสของการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งชี้ให้เห็นว่า IL-1 β มีผลเฉพาะในการสลายของ HA (ในการเลี้ยงแบบระยะสั้น) มากกว่าสารชีวโมเลกุลชนิดอื่น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า IL-1 β ไปมีผลต่อเอนไซม์ hyaluronidase ซึ่งสามารถเร่งการสลาย HA ในช่วงแรกๆ ของการเลี้ยง หรือในการเลี้ยงภายใต้ภาวะถูกกระตุ้นอ่อนๆ ด้วยปริมาณ IL-1 β น้อยๆ อาจส่งผลในทางตกลับ ทำให้เซลล์เกิดการส่งสัญญาณปกป้องตนเอง โดย

กคการสร้างเอนไซม์ที่สลายเนื้อกระดูกอ่อน เป็นผลให้อัตราการสลายเนื้อกระดูกอ่อนน้อยลง สอดคล้องกับการคงเหลือของกรดยูโรนิกที่มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่ IL-1 β ซึ่งก็มีอัตราการปลดปล่อยเอนไซม์ที่สลายเนื้อกระดูกอ่อน และมีการสลายเนื้อกระดูกอ่อนเป็นปกติอยู่แล้วในระดับหนึ่ง อย่างไรก็ตาม เนื่องจากตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้มาครั้งนี้มีปริมาณค่อนข้างน้อย ไม่สามารถทำการทดลองมากซ้ำได้ จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนยิ่งขึ้นต่อไป

ในส่วนของผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารชีวโมเลกุลในระยะยาวเป็นเวลา 28 วัน ที่พบว่า ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0 จนถึงสัปดาห์ที่ 4 การสลายของ HA และ s-GAG จากเนื้อเยื่อออกสู่น้ำเลี้ยงมีระดับเพิ่มสูงขึ้น และหลังจากนั้นอัตราการสลายลดลงจนอยู่ในระดับคงที่ต่อไป จะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงเพียงแค่ 1 สัปดาห์ ก็สามารถวัดและติดตามการสลายของสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้ โดยภายหลัง 28 วัน ยังคงมีการสลายอยู่แต่เป็นในระดับค่อนข้างคงที่ และจากผลที่พบว่า ปริมาณกรดยูโรนิกและคอลลาเจนที่เหลืออยู่ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 β สูงกว่ากลุ่มควบคุมนั้น ซึ่งให้เห็นถึงแนวโน้มของการรักษาค่าประกอบของเนื้อกระดูกอ่อนให้คงเหลืออยู่ในชิ้นเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้น ผลการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่า วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจวัดและติดตามการสลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนข้อต่อในช้างได้

สำหรับผลการเปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนระหว่างกลุ่มการเพาะเลี้ยงที่มีและไม่มี IL-1 β ด้วยการย้อมสี Safranin-O ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ดู glycosaminoglycans และการย้อมด้วย Hematoxylin-Eosin ไม่มีพบความแตกต่างกันทั้งจำนวน เซลล์กระดูกอ่อนและลักษณะของ matrix (สอดคล้องกับผล s-GAG และปริมาณกรดยูโรนิก) แต่พบว่า เซลล์ในกลุ่มที่ได้รับ IL-1 β มีขนาดค่อนข้างใหญ่กว่ากลุ่ม normal culture เล็กน้อย จากผลการทดลองเป็นที่น่าสนใจว่า แม้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่าชีวเคมีระหว่างกลุ่มที่มีและไม่มีสาร IL-1 β แต่ผลทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของชิ้นเนื้อกลับพบว่า ขนาดของเซลล์ที่อยู่ภายใต้ภาวะการถูกกระตุ้นด้วย IL-1 β ดูคล้ายจะโตกว่าในภาวะที่ไม่มีการกระตุ้นเล็กน้อย ซึ่งตรงกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ทำการทดลองในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของหนู ที่พบความเป็นไปได้ว่า เซลล์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นอาจเกิดจากการถูกกระตุ้นโดย IL-1 β ให้ทำงานมากขึ้นไปชั่วระยะเวลาหนึ่ง ก่อนที่เซลล์จะตายแบบอะพอพโทซิสไปในที่สุด (ข้อมูลยังไม่ได้ดีพิมพ์) ดังนั้น ระดับความเข้มข้นของ IL-1 β ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ จึงอาจไม่ใช่ความเข้มข้นที่มากพอและเหมาะสมสำหรับการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมสลายของเนื้อกระดูกอ่อนในช้าง ประกอบข้างเป็นสัตว์ใหญ่น้ำหนักตัวมากถึง 2,000–7,000 กิโลกรัม [33] ทำให้กระดูกอ่อนข้อต่อมีความหนาแน่นค่อนข้างมาก [34] สอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่า ความหนาของกระดูกอ่อนหุ้มผิวข้อจะสัมพันธ์กับน้ำหนักตัวของสัตว์ [35-36] นอกจากนี้ โครงสร้างภายในกระดูกอ่อนของช้างมีเมทริกซ์เป็นองค์ประกอบในปริมาณมาก เส้นใยคอลลาเจนหนา แต่มีโปรตีโอไกลัยแคนปริมาณ

น้อย ซึ่งทำให้ของกระดูกอ่อนข้อต่อข้างมีความเหนียว ยืดหยุ่นและแข็งแรงมาก สามารถรับและทนต่อแรงกด (compressive load) อันมหาศาลได้โดยไม่ก่อให้เกิดการผิดรูป [34] อาจทำให้การเข้าถึงของ IL-1 β ที่จะไปกระตุ้นให้เกิดกระบวนการสลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเกิดขึ้นได้น้อย ความเข้มข้นที่ใช้ครั้งนี้จึงเพียงทำให้เนื้อเยื่อเริ่มมีการสลาย ส่งผลในทางกลับให้เซลล์พยายามรักษาสมดุลโดยเพิ่มการทำงานขึ้น ขนาดเซลล์จึงโตขึ้นเล็กน้อย แต่ความเข้มข้นที่ใช้นั้นไม่สูงมากพอที่จะทำให้เกิดการสลายมากกว่าการสร้าง ทำให้พบปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนในน้ำเลี้ยงที่มี IL-1 β มีค่าไม่ต่างจากภาวะไม่มีสารกระตุ้น คณะผู้วิจัยเชื่อว่า หากเพิ่มความเข้มข้นของ IL-1 β ให้มากขึ้น ผลที่น่าจะสอดคล้องกับรายงานการทดลองที่ใช้เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของสัตว์ชนิดอื่น อย่างไรก็ตาม ความจำกัดของการได้ตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อข้าง ทำให้การทดลองนี้ไม่สามารถทดสอบในหลายความเข้มข้นได้ นอกจากนี้ IL-1 β ที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ เป็นชนิด recombinant human IL-1 β จึงอาจมีโครงสร้างต่างจากของข้าง ส่งผลทำให้ออกฤทธิ์ได้ไม่เต็มที่ จำเป็นต้องใช้ในปริมาณมากซึ่งต่างจากในสุกรและม้าที่อาจมีโครงสร้างของสารนี้ใกล้เคียงกับของมนุษย์มากกว่า จึงออกฤทธิ์ได้ดีแม้ใช้ในปริมาณเท่ากับที่ใช้ในข้าง

จากผลการศึกษาแคแทบอลิซึมของสารชีวโมเลกุลในเนื้อกระดูกอ่อนของข้างเอเซีย ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในครั้งนี้ ถือเป็นความสำเร็จครั้งแรกของประเทศไทยและครั้งแรกในโลก ที่สามารถสร้างต้นแบบของการศึกษาโรคข้ออักเสบและข้อเสื่อมในข้างได้ ซึ่งวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้พิสูจน์ได้ว่า สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการวัดและติดตามการสลายของสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบในเนื้อกระดูกอ่อนในข้างได้ดีเช่นเดียวกับในมนุษย์ [15] และสัตว์ชนิดอื่น เช่น สุกร [16-18] ม้า [19] และสุนัข [37] รวมทั้งสามารถใช้เป็นวิธีพื้นฐานในการวิจัยพัฒนาที่ใช้ในการรักษาโรคข้อของมนุษย์ สุนัข และม้า มาสู่การรักษาโรคข้อในข้างได้ ถึงแม้ว่าปริมาณตัวอย่างที่นำมาตรวจวิเคราะห์ในงานวิจัยครั้งนี้มีค่อนข้างจำกัด อันเนื่องมาจากข้างเลี้ยงในประเทศไทยมีจำนวนน้อย โอกาสที่ข้างจะเสียชีวิต การได้รับอนุญาตและการบริจาคจากเจ้าของจึงมีไม่มากนัก ประกอบกับความยากลำบากในขั้นตอนของการเก็บตัวอย่างซึ่งมักอยู่ในภูมิภาคและพื้นที่ที่เป็นป่าจึงต้องใช้เวลาในการเดินทาง รวมทั้งโครงสร้างของผิวหนังข้างที่เหนียวและมีความหนาถึง 2 นิ้ว ทำให้การผ่าเปิดเข้าสู่ข้อต่อเพื่อเก็บชิ้นเนื้อกระดูกอ่อนทำได้ค่อนข้างยาก ใช้เวลา และเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์จากอุปกรณ์และสิ่งแวดล้อมได้ง่าย ดังนั้น การได้มาซึ่งตัวอย่างชิ้นเนื้อกระดูกอ่อนข้อต่อของข้างแม้เพียงปริมาณน้อยแต่เต็มไปด้วยคุณค่าในแง่ของการอนุรักษ์ข้างไทยและการให้ข้อมูลอันเป็นประโยชน์ต่อวงการแพทย์ สัตวแพทย์ และเกษตรกรรม อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยสามารถแยกและเก็บเซลล์กระดูกอ่อนจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนข้อต่อของข้างในครั้งนี้ได้และกำลังทำการศึกษาเกี่ยวกับ cellular response ต่อตัวกระตุ้น IL-1 β และ Lipopolysaccharide (LPS) ในกระบวนการสลาย (catabolism) และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมของกระดูกอ่อน

ข้อต่อ (catabolic gene expression) เช่น MMP-1 MMP-3 และ MMP-13 จึงควรมีการศึกษาต่อไปในวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน โดยใช้ตัวกระตุ้นการเสื่อมของกระดูกอ่อนชนิดอื่น เช่น Tumor Necrosis Factors (TNFs) หรือ LPS เป็นต้น และทดสอบในหลายความเข้มข้น นอกจากนั้น ควรศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกในระดับยีน โดยเฉพาะการส่งสัญญาณระดับเซลล์ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ในกลุ่มเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส และความเป็นพิษในระดับเซลล์ของสารกระตุ้น เพื่อเพิ่มพูนความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับกระบวนการสร้างและการสลายของกระดูกอ่อนที่สามารถนำไปสู่การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยและการใช้ยารักษาโรคข้อเสื่อม รวมทั้งช่วยยกระดับคุณภาพชีวิตและยืดอายุของช้างเลี้ยงให้ยาวนานขึ้นได้ในอนาคต

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ ถือเป็นความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนและการติดตามการสลายกระดูกอ่อนข้อต่อของช้าง ซึ่งให้ข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญและมีคุณค่าทางวิชาการต่อวงการสัตวแพทย์เป็นอย่างมาก รวมทั้งเป็นวิธีพื้นฐานที่สามารถใช้ศึกษาต่อยอคในการวิจัยพัฒนายาที่ใช้ในการรักษาโรคข้อของมนุษย์ สุนัข และม้า มาสู่การรักษาโรคข้อเสื่อมในช้างได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากหน่วยวิจัยที่มีความเป็นเลิศทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อและเซลล์ต้นกำเนิดแห่งประเทศไทย ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ศูนย์การศึกษาและวิจัยช้างไทยฯ ขอขอบพระคุณ อ.น.สพ.ดร. วีรพงศ์ ตั้งจิตเจริญเป็นอย่างสูงในการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน และการสนับสนุนจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ให้สถานที่และอุปกรณ์ รวมทั้งเจ้าของช้างทุกท่านและช้างทุกตัวที่ทำให้การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. George PO. Some common surgical conditions encountered in elephants. In: Silas EG, Nair MK, Nirmalan G, editors. The Asian Elephant: Ecology, Biology, Diseases, Conservation and Management. *Proceedings of the National Symposium on the Asian Elephant organized by the Kerala Agricultural University at Trichur, India*; 1989 Jan 16–18; Kerala Agricultural University, Trichur, India. p. 168.
2. Houck, R. Veterinary care of performing elephants. In: Fowler ME, editor. *Zoo and Wild Animal Medicine, Current Therapy 3*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1993. p. 453–455.
3. Schmidt M. Elephants (Proboscidea). In: Fowler ME, editor. *Zoo and Wild Animal Medicine*, 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1986. p. 883–923.
4. Varghese K, Abraham M, Valsala KV, Rajan A. Osteoarthritis in an Indian elephant (*Elephas maximus indicus*). *Cheiron*.1990;19(4):185–186.
5. Forstenpointner G, Weissengruber G, Kubber-Heiss A, Hittmair K, Konar M. Morphological features of

- the stifle joint of the African elephant (*Loxodonta africana*, Blumenbach 1797). *J Morphol.* 2001;248:230.
6. Hittmair KM, Vielgrader HD. Radiographic diagnosis of lameness in African elephants (*Loxodonta africana*). *Vet Radiol Ultrasound.* 2000;41(6):511–515.
 7. Ruthe H. Fußleiden der Elefanten. Wissenschaftliche Z Humboldt-Universität Berlin, *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Reihe.* 2000;10:471–516.
 8. Salzert W. Elefanten. Ihre Pathologie und den Tierarzt interessierende physiologische Daten [dissertation]. Tierärztliche Hochschule Hannover; 1972.
 9. Weissengruber GE, Fuss FK, Egger GF, Stanek G, Hittmair KM, Forstenpointner G. The elephant knee joint: Morphological and biomechanical considerations. *J Anat* 2006;208:59–72.
 10. McIlwraith CW. Traumatic joint injuries and disease: Intraarticular fractures amenable to treatment and in which the horse can be returned to athletic activity. In: Stashak TS, Hendrickson DA, McIlwraith CW, Trotter GW, Baxter GM, editors. Lameness in the horse: An in – depth short course for the horseman. *Proceeding of Lameness in the horse: An in – depth short course for the horseman*; 1997 Nov 21-22; Equine Sciences of Colorado State University, Colorado. 1997. p. 39-42.
 11. Gage L. Antemortem Diagnostics, Section II: Radiology. In: Murray EE, Susan KM, editors. Biology, Medicine, and Surgery of Elephants. Iowa: Wiley-Blackwell; 2006. p. 192-197.
 12. Evans GH. Elephants and their diseases. Govt. Printing, Union of Burma. Rangoon. 1961. p. 194-197.
 13. Bechert U, Christensen JM, Finnegan M. Pharmacokinetics of orally administered ibuprofen in elephants. *Proc Amer Assoc Zoo Vet.* 2003:84–85.
 14. Hunter RP, Isaza R, Koch DE. Oral bioavailability and pharmacokinetic characteristics of ketoprofen enantiomers after oral and intravenous administration in Asian elephants (*Elephas maximus*). *Amer J Vet Res.* 2003;64(1):109–114.
 15. Pothacharoen P, Choocheep K, Pitak T, Pompimon W, Premanode B, Hardingham T, et al. Effect of *Alpinia galanga* extract on cartilage degradation and on gene expression in human chondrocyte and synovial fibroblast metabolism. *Cent Eur J Biol.* 2006;1(3):430-450.
 16. Phitak T. Molecular investigation of phytochemicals having effects on human chondrocyte metabolism [dissertation]. The Graduate school. Chiang Mai University; 2010.
 17. Phitak T, Pothacharoen P, Settakorn J, Poompimol W, Caterson B, Kongtawelert P. Chondroprotective and anti-inflammatory effects of sesamin. *Phytochemistry.* 2012;80:77-88.
 18. Chaiwongsa R, Ong-chai S, Tangyuenyong S, Kongtawelert P, Panthong A, Reutrakul V. Chondroprotective potential of bioactive compounds of *Zingiber cassumunar* Roxb. against cytokine-induced cartilage degradation in explant culture. *JMPR.* Accepted Feb 24, 2012.
 19. Ong-chai S, Chaiwongsa R, Viriyakhasem N, Pompimon W, Tangyuenyong S. Effect of Active Compounds from *Andrographis paniculata* (Nees) on Protection of Equine Articular Cartilage Degradation *In Vitro*. *KKU Vet J.* 2008;18(2):81-96
 20. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta.* 1986;883(2):173-177.
 21. Ito A, Nose T, Takahashi S, Mori Y. Cyclooxygenase inhibitors augment the production of pro-matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B) in rabbit articular chondrocytes. *FEBS Lett.* 1995;360(1):75-79.

22. Hoemann CD, Sun J, Chrzanowski V, Buschmann MD. A multivalent assay to detect glycosaminoglycan, protein, collagen, RNA, and DNA content in milligram samples of cartilage or hydrogel-based repair cartilage. *Anal Biochem.* 2002;300(1):1-10.
23. Chotjumlong P, Khongkhunthian S, Ongchai S, Reutrakul V, Krisanaprakornkit S. Human β -defensin-3 up-regulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis in human gingival fibroblasts. *J Periodont Res.* 2010;45:464-470.
24. Taub DD, Oppenheim JJ. Chemokines, inflammation and the immune system. *Ther Immunol.* 1994;1(4):229-246.
25. Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-jun N-terminal kinase, and nuclear factor B: Differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum.* 2000;43(4):801-811.
26. Richardson DW, Dodge GR. Effects of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α on expression of matrix-related genes by cultured equine articular chondrocytes. *Am J Vet Res.* 2000;61(6):624-630.
27. Tyler JA, Bird JLE, Giller T. Interleukin-1 inhibits the production of types II, IX, and XI procollagen mRNA in cartilage. *Ann. NY Acad Sci.* 1990;580(1):512-517.
28. Cook JL, Anderson CC, Kreeger JM, Tomlinson JL. Effects of human recombinant interleukin-1 beta on canine articular chondrocytes in three-dimensional culture. *Am J Vet Res.* 2000;61(7):766-770.
29. Takafuji VA, McIlwraith CW, Howard RD. Effects of equine recombinant interleukin-1alpha and interleukin-1beta on proteoglycan metabolism and prostaglandin E2 synthesis in equine articular cartilage explants. *Am J Vet Res.* 2002;63(4):551-558.
30. Gregg AJ, Fortier LA, Mohammed HO, Mayr KG, Miller BJ, Haupt JL. Assessment of the catabolic effects of interleukin-1 β on proteoglycan metabolism in equine cartilage cocultured with synoviocytes. *Am J Vet Res.* 2006;67(6):957-962.
31. Frazer A, Bunning RA, Russe RG. Effects of transforming growth factor beta and interleukin -1 beta on [3H] thymidine incorporation by human articular chondrocytes in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1226(2):193-200.
32. Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* 1992; 6:861-870.
33. Somgerd C. Elephant. In: Langka G, Somgerd C, Thitaram C, Sutthipat T, Boonyasart B, Pongsopawijit P, editors. *Manual of elephant health care.* Elephant and Wildlife Clinic, Department of Companion Animal and Wildlife Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, ChiangMai University. ChiangMai. 2545. p 7.
34. Egger GF, Witter K, Weissengruber G, Forstenpointner G. Articular Cartilage in the Knee Joint of the African Elephant, *Loxodonta africana*, Blumenbach 1797. *J Morphol.* 2008;269:118-127.
35. Kaab MJ, Gwynn IA, Notzli HP. Collagen fibre arrangement in the tibial plateau articular cartilage of man and other mammalian species. *J Anat.* 1998;193:23-34.
36. Stockwell RA. The interrelationship of cell density and cartilage thickness in mammalian articular cartilage. *J Anat.* 1971;109:411-421.
37. Macrory L, Vaughan-Thomas A, Clegg PD, Innes JF. An exploration of the ability of tepoxalin to ameliorate the degradation of articular cartilage in a canine *in vitro* model. *BMC Vet Res.* 2009;5:25.