

บทบาทของ advanced glycation end products และภาวะเครียดออกซิเดชันในโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Role of advanced glycation end products and oxidative stress in lumbar degenerative
disease



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

Department of Biochemistry

FACULTY OF MEDICINE

Chulalongkorn University

Academic Year 2021

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	บทบาทของ advanced glycation end products และ
	ภาวะเครียดออกซิเดชันในโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม
โดย	น.ส.มนัสนันท์ จิตรจำนงค์
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉันทชาย สิทธิพันธุ์)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	
.....	ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธัญญา ทองตัน)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.กอมธัม สิริกุล)	

CHULALONGKORN UNIVERSITY

มนัสนันท์ จิตรจำนงค์ : บทบาทของ advanced glycation end products และภาวะเครียดออกซิเดชันในโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม. (Role of advanced glycation end products and oxidative stress in lumbar degenerative disease) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ศ. นพ.สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก

โรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมเป็นโรคที่เกิดจากการเสื่อมสภาพของหมอนรองกระดูกสันหลัง พบได้บ่อยในผู้สูงอายุ ปัจจัยหนึ่งที่เป็นสาเหตุร่วมทำให้เกิดการเสื่อมคือภาวะเครียดออกซิเดชัน การสะสมของสารอนุมูลอิสระ และ advanced glycation end products (AGEs) ซึ่งอาจมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดและการดำเนินโรค วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาบทบาทของ AGEs, receptor for AGEs (RAGE) ตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชัน สารต้านอนุมูลอิสระ และความยาวเทโลเมียร์ในเลือดของผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม การศึกษานี้แบ่งกลุ่มตัวอย่างเป็นสองกลุ่ม กลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม กลุ่มละ 75 ราย ซึ่งใช้ภาพถ่ายคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic Resonance Imaging, MRI) เพื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมตามระดับความรุนแรงของโรค โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครทั้งสองกลุ่มเพื่อตรวจวัดระดับ AGEs, RAGE, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), protein carbonyl, malondialdehyde (MDA), nitrite ในพลาสมา การแสดงออกของยีน inducible nitric oxide synthase (iNOS) ในเลือด ระดับ total antioxidant capacity (TAC), ferric reducing antioxidant power (FRAP) ในพลาสมา ค่า catalase activity ค่า superoxide dismutase (SOD) activity ค่า glutathione peroxidase (GPx) activity และความยาวเทโลเมียร์ในเลือด จากการศึกษาพบว่าระดับ AGEs, RAGE, 8-OHdG, protein carbonyl, MDA, nitrite ในพลาสมา การแสดงออกของยีน iNOS ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P = 0.001$, $P = 0.01$, $P = 0.02$, $P < 0.001$, $P < 0.001$ ตามลำดับ) และค่า GPx activity ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.04$) สำหรับระดับ TAC, FRAP ค่า catalase activity ค่า SOD activity และความยาวเทโลเมียร์ในเลือดพบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมและกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าระดับ protein carbonyl และ nitrite ในพลาสมามีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรคที่เพิ่มขึ้นจากภาพถ่ายคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า การศึกษานี้สรุปได้ว่าระดับ protein carbonyl และ nitrite ในพลาสมาอาจนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวชี้วัดในการพยากรณ์ระดับความรุนแรงของโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมได้

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2564

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความช่วยเหลือที่ดียิ่งจากหลายฝ่าย ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ ทรราชเวก อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ ที่เสียสละเวลาอันมีค่าในการให้คำปรึกษาและช่วยเหลือทุกขั้นตอนของการทำวิทยานิพนธ์ ตั้งแต่กระบวนการเก็บรวบรวมข้อมูล การทดลอง การทำรูปเล่ม รวมทั้งให้คำแนะนำและคำสั่งสอนอย่าง ดียิ่งเสมอมา

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง พรพรรณ เฉลิมกิจพานิชย์ ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่าง และข้อมูลในการศึกษาครั้งนี้ รวมทั้งให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการเก็บตัวอย่างเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ธัญญา ทองตัน ประธานกรรมการวิทยานิพนธ์ และรอง ศาสตราจารย์ ดร. ภก. กอบจัม สติกรกุล กรรมการวิทยานิพนธ์ ที่เสียสละเวลาในการดำเนินการสอบ วิทยานิพนธ์และให้คำแนะนำในการแก้ไขจุดที่บกพร่อง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่มอบความรู้ ให้แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิม ฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุนอุดหนุนการศึกษา คณะแพทยศาสตร์ และทุนสนับสนุนการวิจัย

ขอขอบคุณพี่น้อง พี่โม พี่ข้าวตู น้องพลอย สมาชิกในห้องปฏิบัติการ 718 รวมถึงเพื่อน ๆ ทุกคน พี่แก่ง อาย นัท จูเนียร์ ปิงปอง แดง จิน พี่กล้า มุก ก๊อด พี่ไหม ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ กำลังใจ และการช่วยเหลือทุกอย่างเป็นอย่างดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดามารดาและสมาชิกในครอบครัวทุกคนสำหรับกำลังใจ แแรงผลักดัน และคำแนะนำที่ดีเสมอมา

มนัสนันท์ จิตรจำนงค์

สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationale)	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives).....	3
1.3 คำถามของการวิจัย (Research questions)	3
1.4 สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis).....	3
1.5 กรอบแนวคิดการวิจัย (Conceptual framework)	4
1.6 คำสำคัญ (Keywords).....	4
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected or Anticipated Benefit Gain).....	4
1.8 ระเบียบวิธีการวิจัย (Research methodology).....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 โรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (Lumbar degenerative disease).....	6
2.1.1 หมอนรองกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (Lumbar disc degeneration).....	6
2.1.2 โพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ (Lumbar spinal stenosis).....	7

2.1.3 ปล้องกระดูกสันหลังส่วนเอวเคลื่อน (Lumbar spondylolisthesis).....	8
2.2 Advance glycation end products (AGEs).....	9
2.3 ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress).....	10
2.4 สารอนุมูลอิสระ (Oxidants).....	11
2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants).....	12
2.5.1 สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ (Enzymatic antioxidants).....	12
2.5.2 สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ (Non-enzymatic antioxidants)	13
2.6 การหดสั้นลงของเทโลเมียร์ (Telomere shortening).....	14
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	15
3.2 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	17
3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	18
3.4 วิธีการวิจัย/วิธีดำเนินการวิจัย	19
3.4.1 กระบวนการเก็บข้อมูลพื้นฐาน.....	19
3.4.2 กระบวนการเก็บตัวอย่าง	20
3.4.3 การสกัดและวัดความเข้มข้นของ DNA	20
3.4.4 การสกัดและวัดความเข้มข้นของ RNA.....	20
3.4.5 การศึกษาตรวจวัดระดับ Advanced glycation end products (AGEs).....	20
3.4.6 การศึกษาตรวจวัดระดับ Receptor for AGEs (RAGE).....	22
3.4.7 การศึกษาตรวจวัดระดับ 8-OHdG.....	23
3.4.8 การศึกษาตรวจวัดระดับ Protein carbonyl.....	25
3.4.9 การศึกษาตรวจวัดระดับ Malondialdehyde (MDA)	27
3.4.10 การศึกษาตรวจวัดระดับ Nitrite.....	29
3.4.11 การศึกษาการแสดงออกของยีน iNOS.....	30
3.4.12 การศึกษาตรวจวัดระดับ Total antioxidant capacity (TAC).....	32

3.4.13 การศึกษาตรวจวัดระดับ Ferric reducing antioxidant power (FRAP).....	33
3.4.14 การศึกษาตรวจวัด Catalase activity	34
3.4.15 การศึกษาตรวจวัด Superoxide dismutase (SOD) activity	36
3.4.16 การศึกษาตรวจวัด Glutathione peroxidase (GPx) activity.....	38
3.4.17 การศึกษาประเมินคะแนน Oxidative status.....	40
3.4.18 การศึกษาความยาวเทโลเมียร์ (Relative telomere length).....	40
3.5 ขนาดตัวอย่างและการคำนวณ	42
3.6 การรวบรวมข้อมูล (Data collection).....	43
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้วิเคราะห์ (Data analysis and statistics).....	43
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	44
4.1 กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา.....	44
4.2 การศึกษาตรวจวัดระดับ Advanced glycation end products (AGEs)	46
4.3 การศึกษาตรวจวัดระดับ Receptor for AGEs (RAGE)	48
4.4 การศึกษาตรวจวัดระดับ 8-OHdG ในเลือด.....	50
4.5 การศึกษาตรวจวัดระดับพลาสมา Protein carbonyl.....	52
4.6 การศึกษาตรวจวัดระดับพลาสมา Malondialdehyde (MDA).....	54
4.7 การศึกษาตรวจวัดระดับพลาสมา Nitrite.....	56
4.8 การศึกษาการแสดงออกของยีน iNOS ในเลือด	58
4.9 การศึกษาตรวจวัดระดับ Total antioxidant capacity (TAC) ในเลือด.....	60
4.10 การศึกษาตรวจวัดระดับ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ในเลือด.....	61
4.11 การศึกษาตรวจวัดค่า Catalase activity ในเลือด.....	63
4.12 การศึกษาตรวจวัดค่า Superoxide dismutase (SOD) activity ในเลือด.....	64
4.13 การศึกษาตรวจวัดค่า Glutathione peroxidase (GPx) activity ในเลือด	66
4.14 การศึกษาประเมินคะแนน Oxidative status	67

4.15 การศึกษาความยาวเทโลเมียร์ (Relative telomere length; RTL) ในเลือด	69
4.16 ความสัมพันธ์ระหว่างสารชีวเคมีที่ศึกษาในเลือดกับระดับความรุนแรงของโรค	71
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	75
ภาคผนวก.....	84
บรรณานุกรม.....	89
ประวัติผู้เขียน.....	91



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 การเตรียมสารเคมีเพื่อใช้ในการตรวจวัด Protein carbonyl.....	27
ตารางที่ 2 สารเคมีสำหรับใช้ในการสังเคราะห์ cDNA	30
ตารางที่ 3 สภาวะสำหรับการสังเคราะห์ cDNA	30
ตารางที่ 4 ลำดับเบสของ primer สำหรับการตรวจวัดการแสดงออกของยีน iNOS	31
ตารางที่ 5 สารเคมีสำหรับการทำ real time qPCR	31
ตารางที่ 6 สภาวะสำหรับการทำ real time qPCR.....	31
ตารางที่ 7 การเตรียมสารเคมีเพื่อใช้ในการตรวจวัด TAC	33
ตารางที่ 8 สารเคมีสำหรับทำ Developer Mix.....	35
ตารางที่ 9 สารเคมีสำหรับทำ reaction mix	39
ตารางที่ 10 ลำดับเบสของ primer สำหรับการตรวจวัดความยาวเทโลเมียร์.....	41
ตารางที่ 11 สารเคมีสำหรับการทำ real time qPCR	41
ตารางที่ 12 สภาวะสำหรับการทำ real time qPCR	41
ตารางที่ 13 ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่าง.....	45

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 หมอนรองกระดูกสันหลังเสื่อม.....	7
รูปที่ 2 โพรงกระดูกสันหลังตีบแคบ.....	8
รูปที่ 3 ปล้องกระดูกสันหลังส่วนเอวเคลื่อน.....	9
รูปที่ 4 การเกิด Advanced glycation end products (AGEs).....	10
รูปที่ 5 การทำงานของ catalase.....	12
รูปที่ 6 การทำงานของ superoxide dismutase (SOD).....	13
รูปที่ 7 การทำงานของ Glutathione peroxidase (GPx).....	13
รูปที่ 8 ระดับความรุนแรงของโรคจากการถูกกดทับของเส้นประสาทบริเวณกระดูกสันหลังส่วนเอว ด้วยการตรวจวิเคราะห์ภาพถ่ายคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า MRI.....	19
รูปที่ 9 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน AGEs.....	21
รูปที่ 10 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน RAGE.....	22
รูปที่ 11 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน 8-OHdG.....	24
รูปที่ 12 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA).....	25
รูปที่ 13 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน Malondialdehyde (MDA).....	28
รูปที่ 14 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน Nitrite.....	29
รูปที่ 15 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน vitamin C.....	32
รูปที่ 16 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน FeSO ₄	33
รูปที่ 17 การทำงานของ catalase.....	34
รูปที่ 18 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน H ₂ O ₂	35
รูปที่ 19 การทำงานของ Superoxide dismutase (SOD).....	37
รูปที่ 20 การทำงานของ Glutathione peroxidase (GPx).....	38

รูปที่ 21 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน.....	38
รูปที่ 22 การศึกษาตรวจวัดระดับพลาสมา Advanced glycation end products (AGEs).....	47
รูปที่ 23 การศึกษาตรวจวัดระดับพลาสมา RAGE (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน.....	49
รูปที่ 24 การศึกษาตรวจวัดระดับ 8-OHdG ในเลือด (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน.....	51
รูปที่ 25 การศึกษาตรวจวัดระดับ protein carbonyl (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน.....	53
รูปที่ 26 การศึกษาตรวจวัดระดับพลาสมา MDA (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน.....	55
รูปที่ 27 การศึกษาตรวจวัดระดับพลาสมา Nitrite (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน.....	57
รูปที่ 28 การศึกษาการแสดงออกของยีน iNOS ในเซลล์เม็ดเลือดขาว (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน.....	59
รูปที่ 29 การศึกษาตรวจวัด Total antioxidant capacity (TAC) ในเลือด (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน.....	61
รูปที่ 30 การศึกษาตรวจวัด Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ในเลือด (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน.....	62

- รูปที่ 31 การศึกษาตรวจวัดค่า Catalase activity ในเลือด (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน 64
- รูปที่ 32 การศึกษาตรวจวัดค่า superoxide dismutase (SOD) activity ในเลือด (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน..... 65
- รูปที่ 33 การศึกษาตรวจวัด glutathione peroxidase (GPx) activity ในเลือด (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน..... 67
- รูปที่ 34 การศึกษาประเมินคะแนน oxidative status (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน..... 69
- รูปที่ 35 การศึกษาค่า RTL ในเลือด (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน 70
- รูปที่ 36 ความสัมพันธ์ระหว่าง (A) AGEs, (B) RAGE, (C) 8-OHdG, (D) Protein carbonyl, (E) MDA, (F) Nitrite, (G) Oxidative status scores, (H) ODI scores กับความรุนแรงของโรค..... 73
- รูปที่ 37 ความสัมพันธ์ระหว่าง (A) Total antioxidant capacity, (B) FRAP, (C) catalase activity, (D) SOD activity, (E) GPx activity, (F) Relative telomere length, (G) Relative iNOS gene expression กับความรุนแรงของโรค..... 74

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationale)

โรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (lumbar degenerative disease) เป็นโรคที่พบได้บ่อยในผู้สูงอายุ และเป็นสาเหตุของอาการปวดหลังระดับเอวและสะโพก (low back pain) ปวดและชาไปตามรากประสาทที่ถูกกดทับ ทำให้เคลื่อนไหวได้จำกัดและคุณภาพชีวิตลดลง (1) โรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมักเกิดจากการเสื่อมของหมอนรองกระดูกสันหลังโดยวินิจฉัยจากการดูภาพถ่ายคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า MRI จะพบว่าความสูงของหมอนรองกระดูกสันหลังลดลง และมีการลดลงของจำนวนเซลล์ที่อยู่ในหมอนรองกระดูกสันหลัง รวมถึงปัจจัยอื่น ๆ เช่น การยกของหนัก เป็นต้น ปัจจัยที่เป็นสาเหตุร่วมทำให้เกิดการเสื่อมและอาการปวดหลังคือ การเสื่อมของเนื้อเยื่อภายในหมอนรองกระดูกสันหลัง ได้แก่ nucleus pulposus และ annulus fibrosus การเกิด DNA methylation การชราของเซลล์ (cellular senescence) ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เอนไซม์ที่ใช้ในการสลายโปรตีนภายในสารเนื้อพื้นนอกเซลล์ (matrix metalloproteinases in extracellular matrix) การสะสมของสารอนุมูลอิสระ (free radical) รวมทั้ง advance glycation end products (AGEs) ซึ่งอาจมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดและการดำเนินโรค (2)

AGEs เกิดจากปฏิกิริยาไกลเคชันที่ไม่อาศัยตัวเร่งปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนหรือไขมันกับน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ทำให้เกิดสารที่ไม่เสถียรคือ Schiff base ซึ่งสามารถเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ได้เป็น amadori compound ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่เสถียรซึ่งสามารถจัดเรียงตัวใหม่จนได้เป็น AGEs มีการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่าการเพิ่มขึ้นของ AGEs เร่งกระบวนการเสื่อมของหมอนรองกระดูกสันหลังโดยกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ (3) โดย AGEs สามารถจับกับตัวรับ receptor for advanced glycation end products (RAGE) แล้วกระตุ้นให้เกิดการสร้าง reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระขึ้นได้ (4) การศึกษาก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่าการจับกันของ AGE-RAGE กระตุ้น nuclear factor kappa B (NF- κ B) ซึ่งเป็นตัวควบคุมการถอดรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบของยีนหลากหลายยีน (5)

ภาวะเครียดออกซิเดชันเกิดจากความไม่สมดุลกันระหว่างสารอนุมูลอิสระที่มากเกินไปและสารต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) ที่น้อยเกินไป โดยสารอนุมูลอิสระที่มากเกินไป ได้แก่ reactive nitrogen species (RNS) เช่น nitric oxide (NO $^{\bullet}$) nitric dioxide (NO $_2^{\bullet}$) และ reactive oxygen species (ROS) เช่น superoxide anion (O $_2^{\bullet-}$), hydroxyl radical (OH $^{\bullet}$) hydrogen peroxide

(H₂O₂) ซึ่งสามารถทำลายโปรตีน ไขมัน กรดนิวคลีอิก และคาร์โบไฮเดรตได้ (6) ตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชัน ได้แก่ protein carbonyl (7) 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) (8) malondialdehyde (MDA) (9) inducible nitric oxide synthase (iNOS) (10) สำหรับสารต้านอนุมูลอิสระจะแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่เป็น enzymatic antioxidants เช่น catalase และ superoxide dismutase อีกกลุ่มคือ nonenzymatic antioxidants เช่น วิตามินอีและวิตามินซี (11) การศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าเนื้อเยื่อ ligamentum flavum ที่หนาตัวมีความสัมพันธ์กับตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชันที่มากขึ้นและความยาวเทโลเมียร์ที่สั้นลงเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อ ligamentum flavum ที่ไม่หนาตัวในผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ (lumbar spinal stenosis) (12) การศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า ภาวะเครียดออกซิเดชันเร่งการแก่ชราของเซลล์ (cellular senescence) ในหมอนรองกระดูกสันหลัง ซึ่งนำไปสู่การเสื่อมของหมอนรองกระดูกสันหลัง (13)

เทโลเมียร์เป็นส่วนปลายของโครโมโซมที่ประกอบไปด้วยลำดับเบสที่ซ้ำกันของ TTAGGG โดยเทโลเมียร์จะทำงานร่วมกับกลุ่มก้อนโปรตีนที่ชื่อว่า shelterin ในการปกป้องปลายโครโมโซมจากการที่ DNA ถูกทำลาย อย่างไรก็ตามการหดสั้นลงของเทโลเมียร์จะเกิดขึ้นในทุก ๆ การจำลองตัวเองของ DNA (DNA replication) เนื่องจาก DNA polymerase ไม่สามารถจำลอง DNA ในส่วนที่ primers วางอยู่ในสายของ DNA ต้นแบบ ซึ่งจะนำไปสู่การแก่ชราของเซลล์ (cellular senescence) และการตายของเซลล์ (apoptosis) (14) การศึกษาก่อนหน้านี้ชี้ให้เห็นว่าการหดสั้นลงของเทโลเมียร์มีความสัมพันธ์กับอายุที่เพิ่มมากขึ้นและความเสื่อมของหมอนรองกระดูกสันหลังที่มากขึ้น (15)

จากการศึกษาที่ผ่านมาซึ่งไม่มีการศึกษา AGEs และภาวะเครียดออกซิเดชันในโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม จึงเป็นเหตุให้คณะผู้วิจัยมีความสนใจศึกษาบทบาทของ AGEs และตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress biomarkers) ความยาวเทโลเมียร์ (relative telomere length) รวมทั้งปริมาณสารทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคในผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

วัตถุประสงค์(หลัก) เพื่อศึกษาบทบาทของ AGEs ระดับ AGEs, RAGE ตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชัน ระดับสารต้านอนุมูลอิสระ และความยาวเทโลเมียร์ในเลือดของผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

วัตถุประสงค์(รอง) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ AGEs, RAGE ตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชัน ระดับสารต้านอนุมูลอิสระ ความยาวเทโลเมียร์ และความรุนแรงของโรคจากภาพถ่ายคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic Resonance Imaging, MRI)

1.3 คำถามของการวิจัย (Research questions)

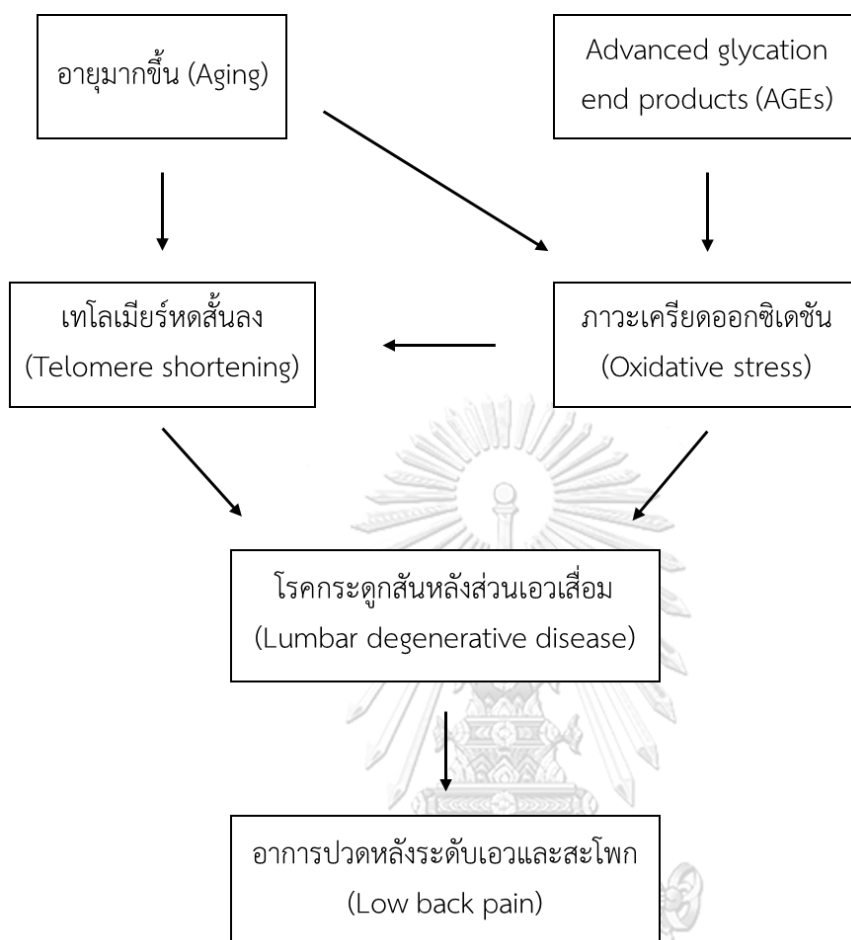
คำถาม(หลัก) ระดับ AGEs, RAGE ตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชัน ระดับสารต้านอนุมูลอิสระ และความยาวเทโลเมียร์ในกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมแตกต่างกันกับในกลุ่มควบคุมหรือไม่ และกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงมากจะมีระดับสารดังกล่าวแตกต่างจากกลุ่มที่มีความรุนแรงน้อยหรือไม่

คำถาม(รอง) ระดับ AGEs, RAGE ตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชัน ระดับสารต้านอนุมูลอิสระ ความยาวเทโลเมียร์ และความรุนแรงของโรคจากภาพถ่ายคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า MRI มีความสัมพันธ์กันหรือไม่

1.4 สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis)

ผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคมัก ส่งผลทำให้ระดับ AGEs และภาวะเครียดออกซิเดชันเพิ่มขึ้น สารต้านอนุมูลอิสระ และความยาวเทโลเมียร์ลดลง โดยระดับสารชีวเคมีเหล่านี้จะมีความสัมพันธ์กันซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้ในการประเมินติดตามการรักษาและทำนายความรุนแรงโรค

1.5 กรอบแนวคิดการวิจัย (Conceptual framework)



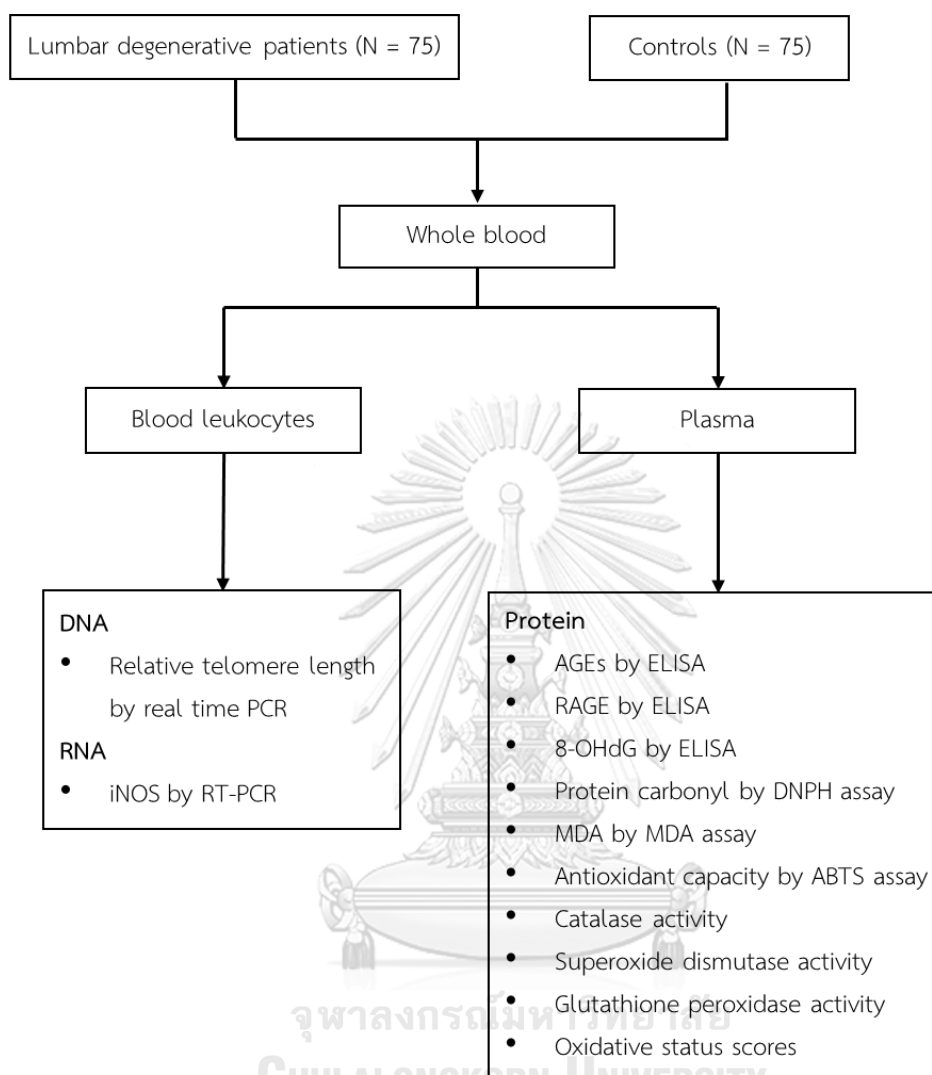
1.6 คำสำคัญ (Keywords)

Advanced glycation end products, oxidative stress, antioxidants, disc degeneration

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected or Anticipated Benefit Gain)

1. ทราบถึงผลของ AGEs, RAGE ภาวะเครียดออกซิเดชัน ระดับสารต้านอนุมูลอิสระ และความยาวเทโลเมียร์ในเลือดของผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม
2. ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่าง AGEs, RAGE ภาวะเครียดออกซิเดชัน ระดับสารต้านอนุมูลอิสระ และความยาวเทโลเมียร์ในเลือดของผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม
3. ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงของโรคกับระดับสารชีวเคมีที่ศึกษา
4. มีความเข้าใจและทราบถึงความสัมพันธ์ของสารชีวเคมีที่ตรวจวัดและกลไกของการเกิดโรค

1.8 ระเบียบวิธีการวิจัย (Research methodology)



AGEs: Advanced glycation end products

ABTS: 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

DNPH: 2,4-dinitrophenylhydrazine

MDA: Malondialdehyde

iNOS: inducible nitric oxide synthase

PCR: Polymerase chain reaction

RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

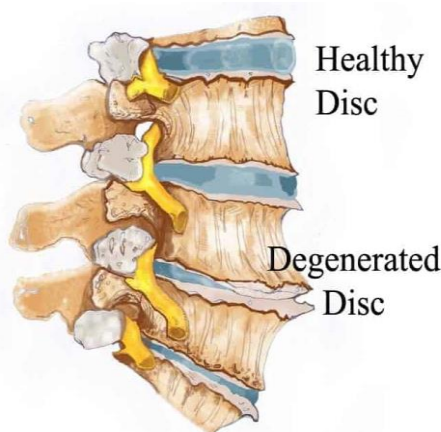
2.1 โรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (Lumbar degenerative disease)

โรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมเป็นโรคที่พบได้บ่อยในผู้สูงอายุ โดยมีผลต่อกระดูกสันหลังและหมอนรองกระดูกสันหลังในบริเวณหลังส่วนล่าง มีหลายปัจจัยซึ่งเป็นตัวเร่งความเสื่อม เช่น อายุเพิ่มขึ้น ดัชนีมวลกาย (body mass index, BMI) เพศ (16) โดยกระบวนการเสื่อมจะเริ่มจากการเกิดความไม่สมดุลกันของการสร้าง (anabolic activity) และการสลาย (catabolic activity) ในสารเนื้อพื้นนอกเซลล์ (extracellular matrix) เช่น การลดลงของคอลลาเจนและ glycosaminoglycans ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการอุ้มน้ำ และการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ที่สลายโปรตีน (matrix metalloproteinases) รวมไปถึงการสะสมสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (proinflammatory factors) เช่น nitric oxide, leukotrienes และ lactic acid (17) ส่งผลให้เซลล์ในหมอนรองกระดูกสันหลังถูกทำลายและลดลง รวมถึงความสามารถในการอุ้มน้ำที่ลดลง ทำให้ความสูงของหมอนรองกระดูกสันหลังลดลงจนเกิดการเสื่อมในที่สุด ซึ่งสามารถแบ่งแยกระดับความเสื่อมได้จาก Pfirrmann classification (18) ทำให้การรองรับน้ำหนักของร่างกายลดลง นำไปสู่อาการปวดหลังระดับเอวและสะโพก รวมถึงรากประสาทที่ถูกกดทับทำให้ปวดและชาบริเวณขา และปัญหาอื่น ๆ ตามมาคือ การอ่อนแรงของกล้ามเนื้อขาและการจำกัดการเคลื่อนไหว (19) โรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมประกอบด้วย หมอนรองกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (lumbar disc degeneration) โพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ (lumbar spinal stenosis) และกระดูกสันหลังส่วนเอวเคลื่อน (lumbar spondylolisthesis)

2.1.1 หมอนรองกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (Lumbar disc degeneration)

เมื่ออายุมากขึ้นหมอนรองกระดูกสันหลังส่วนเอวจะเสื่อม (รูปที่ 1) เนื่องจากการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 2 ลดลงและสารจำพวก proteoglycan ลดลงทำให้คุณสมบัติในการอุ้มน้ำและรับแรงกระแทกบริเวณ nucleus pulposus ลดลง รวมทั้งมีการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ที่เร่งการสลายโปรตีน เช่น matrix metalloproteinase (MMP) ที่จะไปสลายคอลลาเจนชนิดที่ 2 และ proteoglycan ใน nucleus pulposus (20) และยังมีปัจจัยเสี่ยงอื่น ๆ ได้แก่ น้ำหนักตัวที่มากเกินไป (21) การสูบบุหรี่ การยกของหนัก (22) เพศ และพันธุกรรม (23) อาการทางคลินิกคือ ปวดบริเวณหลังส่วนล่าง ปวดร้าวลงขา กล้ามเนื้ออ่อนแรง และเคลื่อนไหวลำบาก (24) สามารถแบ่งระดับความรุนแรงของโรคได้จาก

Pfirrmann classification ซึ่งแบ่งออกเป็น 5 ระดับ ได้แก่ ระดับที่ 1 – 5 โดยระดับที่ 1 มีความรุนแรงของโรคน้อยที่สุด และระดับที่ 5 มีความรุนแรงของโรคมากที่สุด ใช้เกณฑ์ในการแบ่งระดับความรุนแรงจากความสูงและรูปร่างของหมอนรองกระดูกสันหลัง รวมถึงการแยกตัวระหว่าง nucleus pulposus และ annulus fibrosus ด้วยการถ่ายภาพถ่ายคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า MRI (18) การศึกษาก่อนหน้าพบว่า tumour necrosis factor alpha (TNF- α) และ interleukin 1 (IL-1) เกี่ยวข้องกับกระบวนการสลาย (catabolic process) เซลล์ในหมอนรองกระดูกสันหลัง (25)



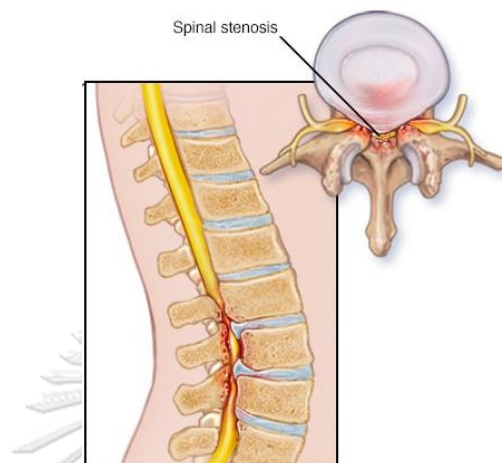
รูปที่ 1 หมอนรองกระดูกสันหลังเสื่อม

(รูปจาก: <https://muscleandjoint.ca/cervical-degenerative-disc-disease-cervical-ddd/lumbar-degenerative-disc-disease/>)

2.1.2 โพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ (Lumbar spinal stenosis)

โพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบมีสาเหตุมาจาก 2 สาเหตุใหญ่ ๆ คือ โพรงกระดูกสันหลังตีบแคบแต่กำเนิด (congenital/developmental spinal stenosis) และโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบภายหลัง (acquired spinal stenosis) ซึ่งมักจะพบเมื่ออายุมากขึ้น โดยสาเหตุที่พบบ่อยที่สุดของโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบภายหลังคือ โพรงกระดูกสันหลังตีบแคบจากกระดูกสันหลังเสื่อม (degenerative lumbar spinal stenosis) นำมาสู่การอักเสบและเกิดความไม่มั่นคงของกระดูกสันหลัง ร่างกายจึงพยายามทำให้กระดูกสันหลังมั่นคงขึ้นโดยการสร้างกระดูกงอก (osteophytes) และการหนาตัวของเนื้อเยื่อ ligamentum flavum จนกดเบียดให้โพรงกระดูกสันหลังแคบลง รวมทั้งกดทับเส้นประสาท (รูปที่ 2) ทำให้เกิดอาการปวดหลังส่วนล่าง ปวดร้าวลงขา การอ่อนแรงของกล้ามเนื้อ หรืออาการชาบริเวณขา (26) สามารถแบ่งระดับความรุนแรงของโรคได้เป็น 4 ระดับ ได้แก่ ระดับที่ 0 – 3 โดยระดับที่ 0 ไม่มีความรุนแรงของโรค ระดับที่ 1 มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย

(mild) ระดับที่ 2 มีความรุนแรงของโรคปานกลาง (moderate) และระดับที่ 3 มีความรุนแรงของโรคมากที่สุด (severe) ใช้เกณฑ์ในการแบ่งระดับความรุนแรงจากการถูกกดทับของเส้นประสาทบริเวณกระดูกสันหลังส่วนเอว ด้วยการตรวจวิเคราะห์ภาพถ่ายคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า MRI (27)



รูปที่ 2 โพรงกระดูกสันหลังตีบแคบ

(รูปจาก: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/spinal-stenosis/symptoms-causes/syc-20352961>)

2.1.3 ปล้องกระดูกสันหลังส่วนเอวเคลื่อน (Lumbar spondylolisthesis)

กระดูกสันหลังส่วนเอวเคลื่อนเกิดจากการเสื่อมของหมอนรองกระดูกสันหลังและข้อต่อ facet ส่วนเอวนำมาซึ่งความไม่มั่นคงของกระดูกสันหลังส่วนเอว ทำให้ปล้องกระดูกสันหลังขึ้นบนเคลื่อนที่ไปข้างหน้าต่อปล้องกระดูกสันหลังชั้นล่าง มักจะเกิดกับปล้องกระดูกระดับ L4-L5 (รูปที่ 3) และส่วนใหญ่จะเกิดในผู้สูงอายุที่อายุมากกว่า 50 ปีขึ้นไป อาการทางคลินิก ได้แก่ ปวดหลังส่วนล่าง ปวดร้าวลงขา กล้ามเนื้ออ่อนแรง หรือมีอาการชา (28) สามารถแบ่งระดับความรุนแรงของโรคได้จาก Meyerding classification ซึ่งแบ่งออกเป็น 5 ระดับ ได้แก่ ระดับที่ 1 – 5 ใช้เกณฑ์ในการแบ่งระดับความรุนแรงจากการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของปล้องกระดูกสันหลังชั้นบนต่อชั้นล่าง ด้วยการดูภาพถ่ายคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (MRI) โดยระดับที่ 1 มีการเคลื่อนที่ร้อยละ 0 – 25 ระดับที่ 2 มีการเคลื่อนที่ร้อยละ 25 – 50 ระดับที่ 3 มีการเคลื่อนที่ร้อยละ 50 – 75 ระดับที่ 4 มีการเคลื่อนที่ร้อยละ 75 – 100 ระดับที่ 5 มีการเคลื่อนที่มากกว่าร้อยละ 100 (29)

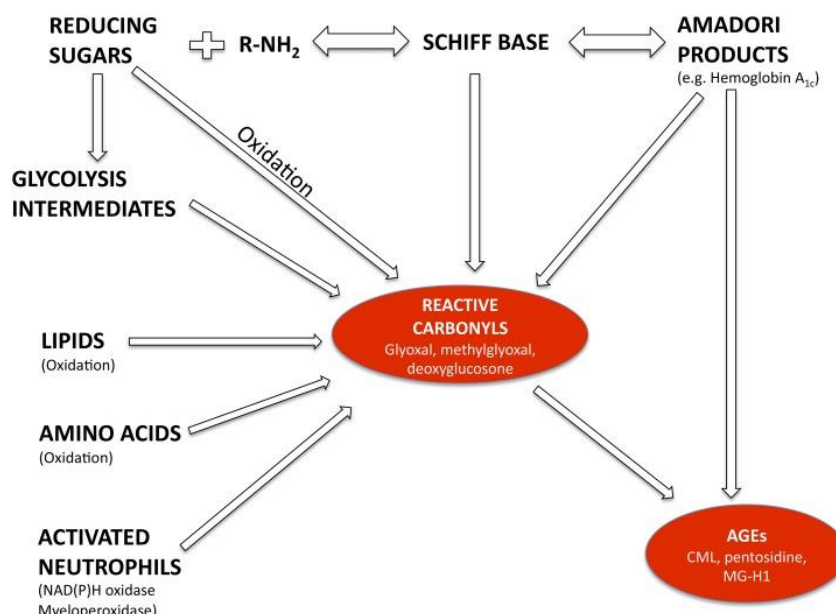


รูปที่ 3 ปล้องกระดูกสันหลังส่วนเอวเคลื่อน

(รูปจาก: <http://www.axis-hospital-croatia.com/all-conditions-list/spondylolisthesis/>)

2.2 Advance glycation end products (AGEs)

AGEs เกิดจากภาวะเครียดออกซิเดชันกระตุ้นให้เกิดน้ำตาล reducing sugar ที่มีหมู่แอลดีไฮด์ (aldehyde) หรือหมู่คีโตน (ketone) ที่เป็นอิสระอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาล ทำให้ถูกออกซิไดซ์ได้ง่าย จะไปจับกับโปรตีนหรือไขมันแล้วเกิดปฏิกิริยาไกลเคชันแบบไม่อาศัยตัวเร่งปฏิกิริยาและปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของพันธะเคมีภายในโมเลกุลของโปรตีนหรือไขมัน ซึ่งขั้นแรกจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น schiff bases และ amadori compound (รูปที่ 4) หลังจากนั้นมีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลใหม่จะทำให้ได้ AGEs การศึกษาก่อนหน้านี้ชี้ให้เห็นว่า AGEs อาจกระตุ้นให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้ เช่น โรคข้อเข่าเสื่อม โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง หรือโรคเกี่ยวกับระบบหัวใจและหลอดเลือด เนื่องจาก AGEs สามารถเปลี่ยนคุณสมบัติของโปรตีนในสารเนื้อพื้นนอกเซลล์ (extracellular matrix) เช่น คอลลาเจน (collagen) ทำให้หน้าที่ของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจนเกิดการเสียหายและการตายของเซลล์ นำไปสู่ความเสื่อมของกระดูกอ่อนและเอ็นได้ (30-33) นอกจากนี้ยังพบว่า AGEs เกี่ยวข้องกับกระบวนการเสื่อมสภาพของกระดูกอ่อน ส่งผลให้เกิดการชราของเซลล์และเกิด crosslinking ของโปรตีนในสารเนื้อพื้นนอกเซลล์ เช่น คอลลาเจนและลามินิน (34) โดย AGEs สามารถจับกับตัวรับ RAGE ที่เป็นสมาชิกของ immunoglobulin superfamily จะไปรบกวนการทำงานของเซลล์ โดยการแสดงออกของ RAGE จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการสะสมของ AGEs มากขึ้น (35) RAGE พบได้ในเซลล์บุผนังหลอดเลือด เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ เซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยเบาหวาน (36) การจับกันของ AGEs และตัวรับ RAGE กระตุ้นการทำงานของ NAD(P)H oxidase ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยน NADPH ให้เป็น NADP^+ โดยมีออกซิเจนมารับอิเล็กตรอนแล้วเปลี่ยนเป็น O_2^- ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระ (37)



รูปที่ 4 การเกิด Advanced glycation end products (AGEs)

(รูปจาก: Uribarri J, del Castillo MD, de la Maza MP, et al. Dietary advanced glycation end products and their role in health and disease. *Adv Nutr.* 2015;6(4):461-473. Published 2015 Jul 15.)

2.3 ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress)

ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นภาวะความไม่สมดุลกันของสารอนุมูลอิสระที่มากเกินไปและสารต้านอนุมูลอิสระที่น้อยเกินไป สารต้านอนุมูลอิสระ เช่น catalase ที่เป็นเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน H₂O₂ ให้กลายเป็นน้ำและออกซิเจน, superoxide dismutase ที่เป็นเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน O₂⁻ เป็น H₂O₂, glutathione peroxidase (GPx) ที่เป็นเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน H₂O₂ ให้กลายเป็นน้ำ ควบคู่ไปกับปฏิกิริยาการเปลี่ยน GSH ทำให้ได้ GSSG การที่สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้น้อยเกินไปจะทำให้กลไกการปกป้องเซลล์จากสารอนุมูลอิสระลดน้อยลง รวมทั้งสารอนุมูลอิสระที่มากเกินไป ได้แก่ reactive nitrogen species (RNS) เช่น nitric oxide (NO[•]) nitric dioxide (NO₂[•]) และ nitrite สามารถการกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) ทำให้เกิดสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาได้ เช่น reactive aldehyde-malondialdehyde และ 4-hydroxynonenal (38) การศึกษาก่อนหน้าที่แสดงให้เห็นว่าระดับ nitrite ในตัวอย่าง serum ของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม (osteoarthritis) และผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) มีค่าสูงกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี (39) และ reactive oxygen species (ROS) ประกอบไปด้วย superoxide anion (O₂⁻), hydroxyl radical (OH[•]) และ hydrogen

peroxide (H_2O_2) โดย ROS สามารถทำปฏิกิริยากับ RNS เกิดเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์รุนแรงคือ peroxynitrite species (ONOO^-) การศึกษาก่อนหน้าระบุไว้ว่าภาวะเครียดออกซิเดชันเป็นตัวเร่งที่สำคัญในกระบวนการเสื่อมของฮอร์โมนรองกระดูกสันหลัง โดยกระตุ้นการสร้างสารที่ทำให้เกิดการอักเสบ และเกิดการเสียหายของ DNA ส่งผลให้เกิดการชราและการตายของเซลล์ในฮอร์โมนรองกระดูกสันหลัง (40)

2.4 สารอนุมูลอิสระ (Oxidants)

สารอนุมูลอิสระ ได้แก่ reactive nitrogen species (RNS) เช่น nitric oxide (NO^*) nitric dioxide (NO_2^*) nitrite และ nitrate สำหรับ reactive oxygen species (ROS) ประกอบไปด้วย superoxide anion (O_2^-), hydroxyl radical (OH^*) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) อนุมูลอิสระเหล่านี้มีความสามารถในการรับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลที่ไปทำปฏิกิริยาด้วย ทำให้เกิดปฏิกิริยาถูกใช้ใน การเกิดสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ (41) ROS มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์ เช่น NF- κ B, mitogen-activated protein kinase (MAPK) เป็นต้น นำมาซึ่งกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น การเพิ่มจำนวนของเซลล์ การอยู่รอดของเซลล์ และการอักเสบ (42) นอกจากนี้ยังพบว่าในฮอร์โมนรองกระดูกสันหลังที่เกิดการเสื่อมจะเกิดความไม่สมดุลในการสร้างและกำจัด ROS จึงกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันที่จะทำให้เซลล์ใน ฮอร์โมนรองกระดูกสันหลังลดลง และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในสารเนื้อพื้น (matrix) จน ทำให้เกิดการเสียหายของคุณสมบัติของโปรตีนในฮอร์โมนรองกระดูกสันหลัง (43) ตัวชี้วัดภาวะเครียด ออกซิเดชัน ได้แก่ protein carbonyl ที่สามารถถูกสร้างได้โดยตรงจาก ROS และยังสามารถสร้างได้จาก ส่วนที่เป็นอนุมูลอิสระบนโปรตีน หรือเกิดจากโปรตีนทำปฏิกิริยากับหมู่อัลดีไฮด์ที่ไวต่อการ เกิดปฏิกิริยาซึ่งถูกสลายมาจากกรดไขมันหลายตำแหน่ง หรือโปรตีนทำปฏิกิริยากับน้ำตาลรีดิวซ์ (7) การศึกษาก่อนหน้าได้มีการใช้ระดับ protein carbonyl เป็นตัวชี้วัดในการบ่งชี้ถึงภาวะการเกิด โปรตีนออกซิเดชัน (protein oxidation) ในตัวอย่างพลาสมาและน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้ออักเสบ (44) 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง hydroxyl radical (OH^*) กับเบสบน DNA โดยเฉพาะเบส guanine (8) malondialdehyde (MDA) เกิดจากปฏิกิริยา ออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) ซึ่งนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงภาวะเครียดออกซิเดชัน (9) inducible nitric oxide synthase (iNOS) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสร้าง peroxynitrite species (ONOO^-) ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์รุนแรง เนื่องจาก iNOS ที่มากเกินไปจะเร่งให้เกิดการสร้าง nitric oxide ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ O_2^- ได้เป็น ONOO^- (10)

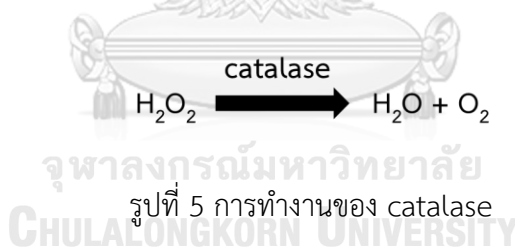
2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระคือสารที่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ก่อให้เกิดสารอนุมูลอิสระซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ได้ โดยสารต้านอนุมูลอิสระประกอบไปด้วย สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ และสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์

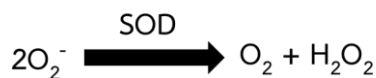
2.5.1 สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ (Enzymatic antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ประกอบไปด้วย

Catalase คือเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำและออกซิเจน (รูปที่ 5) จึงสามารถพบ catalase ได้ในเซลล์ที่ต้องการออกซิเจน การทำงานของ catalase ต้องอาศัยธาตุโลหะ เช่น เหล็ก (iron) หรือ แมงกานีส (manganese) เอนไซม์ชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงเนื่องจากใน 1 วินาทีสามารถลดจำนวนของ H_2O_2 ได้มากถึงหนึ่งล้านโมเลกุล จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการศึกษาที่มี catalase ไม่เพียงพอ มีความสัมพันธ์ทางอ้อมกับกลุ่มโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาท (Neurodegenerative disorders) (45) และมีการศึกษาก่อนหน้าที่ได้ศึกษาในกลุ่มของเซลล์ nucleus pulposus ที่ได้มาจากกระดูกสันหลังของหนูพบว่า กลุ่มเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันมีระดับของ catalase ที่น้อยกว่ากลุ่มเซลล์ควบคุม (46)



Superoxide dismutase (SOD) คือเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน O_2^- ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์รุนแรงให้กลายเป็น H_2O_2 ที่มีฤทธิ์รุนแรงน้อยลงและออกซิเจน (รูปที่ 6) การทำงานของ SOD ต้องอาศัยธาตุโลหะ เช่น เหล็ก (iron) สังกะสี (zinc) ทองแดง (copper) ปกติแล้ว SOD สามารถพบได้ในพืช เช่น บร็อคโคลี่ และกะหล่ำ โดย SOD เป็นเอนไซม์ที่มีความสัมพันธ์กับอายุ เมื่ออายุมากขึ้นพบว่า ระดับของ SOD น้อยลง ในขณะที่ reactive oxygen species (ROS) เพิ่มขึ้น การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการเสริม SOD มีส่วนช่วยในการเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน ลดอัตราการเกิดโรค และชะลอการเกิดกระบวนการแก่ของเซลล์ได้ (45)



รูปที่ 6 การทำงานของ superoxide dismutase (SOD)

Glutathione peroxidase (GPx) คือเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำควบคู่กับการเปลี่ยน reduced glutathione (GSH) ให้กลายเป็น oxidized glutathione (GSSG) (รูปที่ 7) การทำงานของ GPx ต้องอาศัยธาตุซีลีเนียม (selenium) มีการค้นพบว่า GPx มีอย่างน้อย 8 ชนิดในร่างกายของคน นั่นคือ GPx-1 ถึง GPx-8 โดยแต่ละชนิดพบได้ในโครโมโซมที่จำเพาะ เช่น GPx-1 พบได้มากในเซลล์ และเป็นชนิดที่พบได้มากที่สุดในร่างกาย ในขณะที่ GPx-2 พบได้มากในระบบทางเดินอาหาร มีการศึกษาก่อนหน้าพบว่าผู้ป่วยที่มีการทำงานของ GPx (GPx activity) ต่ำจะมีความสามารถในการทำงานของระบบต้านอนุมูลอิสระที่บกพร่อง มีผลทำให้ภาวะเครียดออกซิเดชันมีความสามารถในการทำลายเซลล์มากขึ้น (45)



รูปที่ 7 การทำงานของ Glutathione peroxidase (GPx)

2.5.2 สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ (Non-enzymatic antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ประกอบไปด้วย

วิตามินอี (vitamin E) เป็นวิตามินที่สามารถละลายได้ในไขมันจึงทำให้สามารถมีปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์และจับกับ reactive oxygen species (ROS) ได้ วิตามินอีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบได้ในพืช มีการศึกษาก่อนหน้าพบว่า การเสริมวิตามินอีช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดกลุ่มโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาท (Neurodegenerative disorders) ได้ (47)

วิตามินซี (vitamin C) หรือกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) สารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายได้ในน้ำ มีความเกี่ยวข้องในการสร้างเส้นใยคอลลาเจน และช่วยในการดูดซึมของธาตุเหล็ก จากการศึกษา ก่อนหน้าพบว่าวิตามินซีมีบทบาทในการต่อต้านการเกิดกลุ่มโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาทเนื่องจากมีความสามารถในการลดความรุนแรงของ O_2^- (superoxide radical) (47)

2.6 การหดสั้นลงของเทโลเมียร์ (Telomere shortening)

เทโลเมียร์ประกอบไปด้วยลำดับเบสที่ซ้ำกันของ TTAGGG พบได้บริเวณปลายโครโมโซม ช่วยในการรักษาปลายโครโมโซมจากความเสียหายของ DNA เทโลเมียร์จะทำงานร่วมกับกลุ่มก้อนโปรตีน shelterin และเพื่อรักษาความยาวเทโลเมียร์ telomerase จะช่วยในการเติมเบสโดยเฉพาะอย่างยิ่งเบส guanine ไปยังปลายโครโมโซม (48) การศึกษาก่อนหน้าได้แสดงให้เห็นว่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติเทโลเมียร์ในเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocytes) ในโรคข้อเสื่อมหดสั้นลง (49) อีกทั้งยังมีการศึกษาที่พบว่าตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชันที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับการหดสั้นของเทโลเมียร์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวในผู้สูงอายุ (50)

จากการศึกษาที่ผ่านมา มีการตรวจวัด RAGE, activated NF- κ B และ oxidative stress ในหมอนรองกระดูกสันหลังในประชากรทุกวัยตั้งแต่ทารกถึงวัยผู้สูงอายุ พบว่าไม่มีการแสดงออกของ RAGE, activated NF- κ B และ oxidative stress ในหมอนรองกระดูกสันหลังในทารก แต่ในหมอนรองกระดูกสันหลังของผู้สูงอายุมีการแสดงออกของ RAGE และ activated NF- κ B เพิ่มขึ้นและสัมพันธ์กันกับภาวะ oxidative stress ที่สูงมากขึ้นตามอายุ และสรุปว่าภาวะ oxidative stress อาจทำให้เกิดการกระตุ้น RAGE และ NF- κ B ได้ (51) นอกจากนี้มีการศึกษาวิจัยถึง telomere length และ telomerase activity รวมถึงอายุซึ่งเกี่ยวข้องกับความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ nucleus pulposus chondrocytes (52) แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงบทบาทของ AGEs ภาวะเครียดออกซิเดชัน และสารต้านอนุมูลอิสระมีส่วนสัมพันธ์กันกับความยาวเทโลเมียร์และระดับความรุนแรงในโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ประชากร (Population)

อาสาสมัครอายุตั้งแต่ 20 ปีขึ้นไป เป็นกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาคือ ผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีอาการปวดหลัง และ/หรืออาการปวดร้าวลงขา ที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีและยินยอมเข้าร่วมงานวิจัย

วิธีการเข้าถึงอาสาสมัคร (approach to participant): เมื่อผ่านการรับรองทางจริยธรรมวิจัย จากคณะกรรมการจริยธรรมวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแล้ว

สำหรับอาสาสมัครกลุ่มตัวอย่าง ได้ดำเนินการขอความยินยอมจากอาสาสมัคร โดยผู้วิจัยได้อธิบายข้อมูลให้กับอาสาสมัครและให้เอกสารข้อมูลและแบบขอความยินยอมแก่อาสาสมัครที่คลินิกระงับปวด เพื่อนำกลับไปพิจารณาก่อนตัดสินใจ

สำหรับอาสาสมัครกลุ่มควบคุม ได้ทำการติดต่อขอสมัครอาสาสมัคร จากนั้นดำเนินการขอความยินยอมจากอาสาสมัคร โดยผู้วิจัยได้อธิบายข้อมูลให้กับอาสาสมัครและให้เอกสารข้อมูลและแบบขอความยินยอมแก่อาสาสมัคร เพื่อนำกลับไปพิจารณาก่อนตัดสินใจ

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครกลุ่มตัวอย่างเข้าร่วมโครงการวิจัย (inclusion criteria)

1. อายุตั้งแต่ 20 ปีขึ้นไป
2. มีอาการปวดหลัง และ/หรืออาการปวดร้าวลงขา เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 3 เดือนเป็นต้นไป และได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคกระดูกสันหลังเสื่อม ซึ่งยืนยันการวินิจฉัยโดยภาพถ่ายคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (MRI)
3. มีประวัติได้รับการรักษาด้วยวิธีประคับประคอง (เช่น การรับประทานยาบรรเทาปวดนอนพัก การทำกายภาพบำบัด) แล้วอาการปวดไม่ดีขึ้น คือ ยังมีอาการปวดที่รบกวนการทำงาน การใช้ชีวิตประจำวัน การนอนหลับ หรือให้คะแนนความปวด (โดยใช้ visual analog scale; VAS 0-10) มากกว่าหรือเท่ากับ 4

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครกลุ่มตัวอย่างออกจากโครงการวิจัย (exclusion criteria)

1. เคยได้รับการผ่าตัดกระดูกสันหลังมาก่อน
2. เป็นผู้ป่วยโรคเบาหวาน
3. มีประวัติกระดูกสันหลังหักหรือยุบจากอุบัติเหตุ หรือจากการแพร่กระจายของโรคมะเร็ง
4. มีประวัติขาอ่อนแรง หรือประวัติสูญเสียการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติในการควบคุมระบบการขับถ่าย
5. ประวัติเป็นโรคเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันหรือมีภาวะการอักเสบเรื้อรัง (systemic inflammatory disease) เช่น rheumatoid arthritis, inflammatory arthritis, ankylosing spondylitis, autoimmune diseases
6. มีการใช้ยาสเตียรอยด์แบบรับประทานต่อเนื่อง หรือประวัติใช้ยาในช่วง 3 เดือนที่ผ่านมา
7. มีประวัติได้รับการฉีดยาสเตียรอยด์เข้าช่องเหนือไขสันหลังในช่วง 3 เดือนที่ผ่านมา
8. มีการรับประทานวิตามินหรืออาหารเสริมที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ
9. มีโรคติดเชื้อและติดต่อกันได้ง่าย (เช่น COVID-19)

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครกลุ่มควบคุมเข้าร่วมโครงการวิจัย (inclusion criteria)

1. อายุตั้งแต่ 20 ปีขึ้นไป โดยมีอายุและเพศที่ใกล้เคียงกันกับกลุ่มผู้ป่วย
2. ไม่มีอาการเจ็บปวดอย่างฉับพลันรุนแรงใน 24 ชั่วโมงที่ผ่านมา และไม่มีอาการเจ็บปวดเรื้อรังที่ต่อเนื่องเป็นเวลา 3 เดือน
3. ไม่มีอาการบาดเจ็บหรือการปวดภายใน 14 วันที่ผ่านมา
4. ไม่มีดื่มสุราและไม่สูบบุหรี่

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครกลุ่มควบคุมออกจากโครงการวิจัย (exclusion criteria)

1. มีการรับประทานวิตามินหรืออาหารเสริมที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ
2. เป็นโรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง โรคไขมันในเลือดผิดปกติ โรคไตเรื้อรังทำงานผิดปกติ
3. เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับตับ ถุงน้ำดี หรือตับอ่อน เช่น ตับอักเสบ ตับแข็ง นิ่วในถุงน้ำดี ถุงน้ำดีอักเสบ ตับอ่อนอักเสบ
4. เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับไตหรือกระเพาะปัสสาวะ เช่น ไตวายเรื้อรัง กระเพาะปัสสาวะอักเสบ นิ่วในไต
5. เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับหัวใจ เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจตีบหรือตัน หัวใจเต้นผิดจังหวะ กล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน

6. เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท เช่น โรคปลอกประสาทอักเสบ โรคพาร์กินสัน โรคเส้นประสาทสันหลังอักเสบ โรคเส้นเลือดในสมองตีบ
7. เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับกระดูกและกล้ามเนื้อ เช่น rheumatoid arthritis โรคกระดูกพรุน
8. มีภาวะผิดปกติทางจิตใจ เช่น ภาวะซึมเศร้า อาการวิตกกังวล พฤติกรรมการรับประทานอาหารที่ผิดปกติ
9. มีโรคติดเชื้อและติดต่อผู้อื่นได้ง่าย (เช่น COVID-19)

กระบวนการขอความยินยอม (informed consent process)

ผู้ทำวิจัยอธิบายข้อมูลเกี่ยวกับการวิจัย ได้แก่ วัตถุประสงค์ วิธีการที่ปฏิบัติต่ออาสาสมัคร ประโยชน์และความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น ฯลฯ ตอบข้อสงสัยจนผู้ป่วยที่รับเชิญให้เข้าร่วมการวิจัยเข้าใจ และให้เวลานานเพียงพอที่อาสาสมัครได้ตัดสินใจโดยอิสระ ก่อนลงนามให้ความยินยอมเข้าร่วมในการวิจัย และย้ำกับอาสาสมัครว่า การตัดสินใจในครั้งนี้ไม่ได้เป็นการบังคับแต่อย่างใด

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. Automatic adjustable micropipette (Eppendorf, Germany)
2. Centrifuge, refrigerated centrifuge (Eppendorf, USA)
3. Freezer -80°C (Thermo Scientific, Ohio, USA)
4. Incubator (Mettler, Schwabach, Germany)
5. Microplate reader (Thermo Scientific, Ohio, USA)
6. Multi - block heater (Techne DRI Block, USA)
7. Multi – channel pipettor (Biohit, Finland)
8. NanoDrop® ND-100 Spectrophotometer (Scientific, USA)
9. Orbital plate shaker (Bioer, Zhejiang, China)
10. Pipette controller (Eppendorf, Germany)
11. Pipette rack (Autopack, USA)
12. Refrigerator (Sanyo, Japan)
13. StepOnePlus™ Real-time PCR system (Applied Biosystems, USA)
14. Vortex mixer (Scientific Industry, USA)
15. Water bath: Memmert WB45 (Mettler, Schwabach, German)
16. Water purification equipment (Water pro Ps, Labconco, USA)

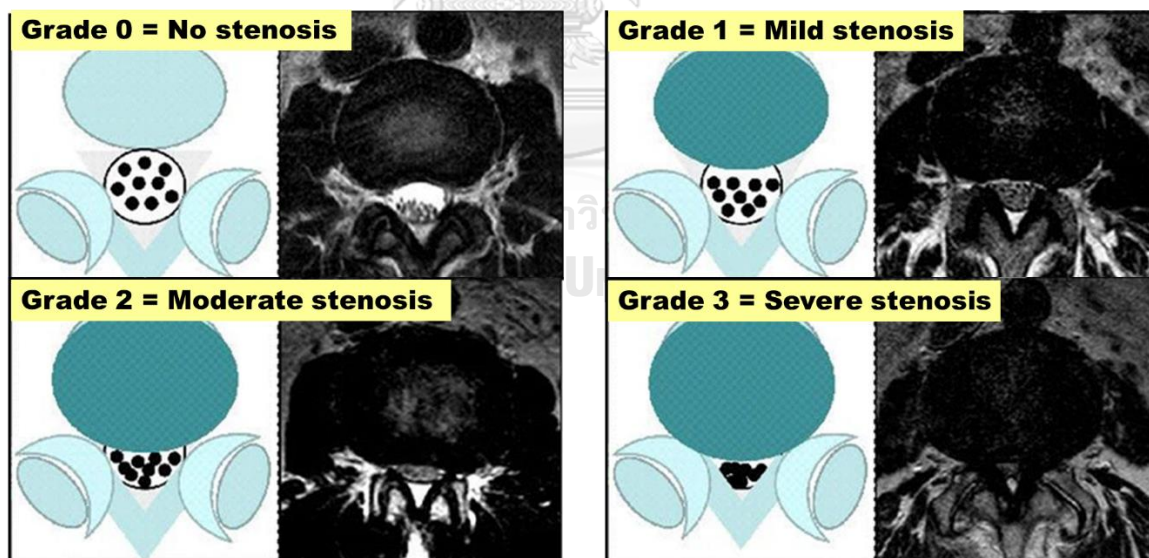
3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)
2. 2,2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) reagent (Merck Millipore, Massachusetts, USA)
3. 2,4,6-tripyridyl-S-triazine (TPTZ) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)
4. 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH) (TCI America, Tokyo, Japan)
5. 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)
6. 2-thiobarbituric acid (TBA) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)
7. 8-OHdG ELISA kit (ab285254, Abcam, Cambridge, UK)
8. AGEs ELISA kit (ab238539, Abcam, Cambridge, UK)
9. Catalase activity kit (ab83464, Abcam, Cambridge, UK)
10. cDNA synthesis kit (Biotechrabbit, Berlin, Germany)
11. Ethanol (Merck, Germany)
12. Ethyl acetate (Fisher Scientific, UK)
13. GF-1 nucleic acids extraction kit (Vivantis, Buckinghamshire, Malaysia)
14. GF-1 total RNA extraction kit (Vivantis, Buckinghamshire, Malaysia)
15. GPx activity kit (ab102530, Abcam, Cambridge, UK)
16. Green PCR master mix direct - load, 2x (Biotechrabbit, Berlin, Germany)
17. Griess reaction (Promega, Madison, USA)
18. Guanidine hydrochloride (GdmCl) (ACROS, Germany)
19. Hydrochloric acid (HCl) (Merck Millipore, Massachusetts, USA)
20. Iron (III) chloride (FeCl₃) (ChemSupply, Australia)
21. Iron sulfate (FeSO₄) (KemAus, Australia)
22. Malondialdehyde tetrabutylammonium salt (Merck Millipore, Massachusetts, USA)
23. Pierce™ BCA protein assay kit (Thermo Scientific, Ohio, USA)
24. RAGE ELISA kit (ab190807, Abcam, Cambridge, UK)
25. SOD activity kit (ab65354, Abcam, Cambridge, UK)
26. Sodium acetate trihydrate (KemAus, Australia)
27. Trichloroacetic acid (MP, Biomedicals, France)

3.4 วิธีการวิจัย/วิธีดำเนินการวิจัย

3.4.1 กระบวนการเก็บข้อมูลพื้นฐาน

อาสาสมัครที่ยินดีเข้าร่วมการวิจัยทุกคนได้รับคำอธิบายเกี่ยวกับรายละเอียดของโครงการ มีการกรอกข้อมูลรายละเอียดการยินยอมเข้าร่วมงานวิจัยและข้อมูลพื้นฐาน สำหรับกลุ่มผู้ป่วยเก็บข้อมูลโดยการสัมภาษณ์จากแบบสอบถามประเมินระดับความเจ็บปวด visual analog scale (VAS scale) และ Oswestry Disability Index (ODI) ซึ่งเป็นแบบสอบถามที่เป็นที่ยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลายในการเก็บข้อมูลเกี่ยวกับคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม ผู้ป่วยทุกรายได้รับการถ่ายภาพคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า MRI เพื่อช่วยยืนยันในการวินิจฉัยและประเมินความรุนแรงของโรคจากภาพถ่ายคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า MRI สามารถแบ่งระดับความรุนแรงของโรคได้เป็น 4 ระดับ ได้แก่ ระดับที่ 0 – 3 โดยระดับที่ 0 ไม่มีความรุนแรงของโรค ระดับที่ 1 มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) ระดับที่ 2 มีความรุนแรงของโรคปานกลาง (moderate) และระดับที่ 3 มีความรุนแรงของโรคมากที่สุด (severe) ใช้เกณฑ์ในการแบ่งระดับความรุนแรงจากการถูกกดทับของเส้นประสาทบริเวณกระดูกสันหลังส่วนเอว ด้วยการตรวจวิเคราะห์ภาพถ่ายคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า MRI ดังรูปที่ 8 (27)



รูปที่ 8 ระดับความรุนแรงของโรคจากการถูกกดทับของเส้นประสาทบริเวณกระดูกสันหลังส่วนเอว ด้วยการตรวจวิเคราะห์ภาพถ่ายคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า MRI

3.4.2 กระบวนการเก็บตัวอย่าง

ในการวิจัยนี้อาสาสมัครกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่ยังไม่ได้เข้ารับการรักษาโดยวิธีผ่าตัดและอาสาสมัครกลุ่มควบคุมได้รับการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อตรวจวัดระดับ AGEs, RAGE, ตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชัน, ระดับสารต้านอนุมูลอิสระ และความยาวเทโลเมียร์ในเลือดของผู้ป่วย โดยเก็บเลือดใส่หลอด ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) แล้วนำมาปั่นเหวี่ยง 100 x g ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้เกิดการตกตะกอน แล้วเก็บตัวอย่างโดยแยกชั้นส่วนใสซึ่งเป็นพลาสมาทับชั้นกลางคือ buffy coat ที่มีเม็ดเลือดขาวออกจากกัน จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำมาทำการทดลองต่อไป

3.4.3 การสกัดและวัดความเข้มข้นของ DNA

นำตัวอย่างชั้นกลางจากเลือดที่ปั่นเหวี่ยงแล้ว (buffy coat) มาสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด GF-1 nucleic acids extraction kit (Vivantis, Buckinghamshire, Malaysia) และนำ DNA ที่ได้มาตรวจวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำมาทำการทดลองต่อไป

3.4.4 การสกัดและวัดความเข้มข้นของ RNA

นำตัวอย่างชั้นกลางจากเลือดที่ปั่นเหวี่ยงแล้ว (buffy coat) มาสกัด RNA โดยใช้ชุดสกัด GF-1 total RNA extraction kit (Vivantis, Buckinghamshire, Malaysia) นำ RNA ที่ได้ไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำมาทำการทดลองต่อไป

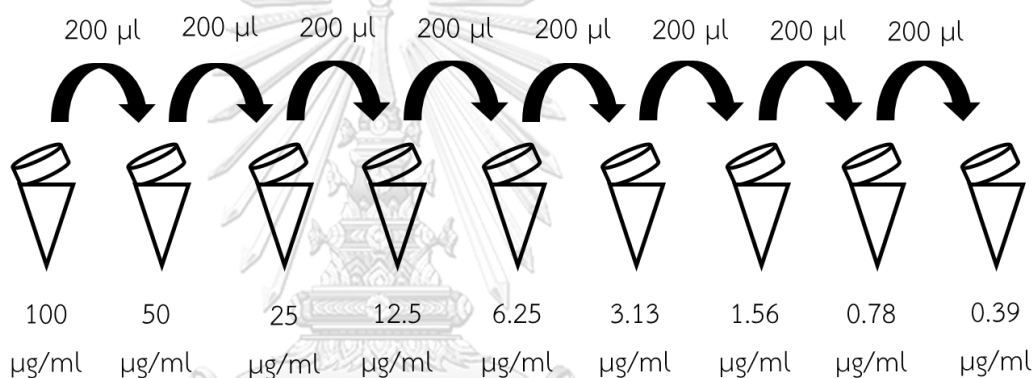
3.4.5 การศึกษาตรวจวัดระดับ Advanced glycation end products (AGEs)

นำพลาสมาที่ได้จากตัวอย่างเลือดมาตรวจวัดระดับ AGEs โดยใช้เทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

1. เตรียมสารละลายสำหรับกระบวนการ coat plate
 - 1.1 เตรียมสารละลาย 1X conjugate diluent โดยการละลาย 100x conjugate diluent ปริมาตร 50 μ l ใน 1X PBS ปริมาตร 4,950 μ l
 - 1.2 เตรียมสารละลาย 10 μ g/ml AGE conjugate โดยการละลาย 1.0 mg/ml AGE conjugate ปริมาตร 50 μ l ใน 1X PBS ปริมาตร 4,950 μ l

1.3 ผสมสารละลายในข้อ 1.1 และ 1.2 เข้าด้วยกัน แล้วหยอดลง protein binding strip well plate หลุมละ 100 μl จากนั้นปิดฝาแล้วนำไปบ่มในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4°C เป็นเวลาข้ามคืน

2. เทสารละลายที่บ่มไว้ข้ามคืนทิ้ง แล้วล้างด้วย 1X PBS 2 รอบ จากนั้นให้คว่ำใส่กระดาษซับแห้งเพื่อช่วยซับสารละลายออกจาก plate ให้หมด
3. หยอดสาร assay diluent ปริมาตร 200 μl แล้วบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง
4. เตรียม 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AGEs โดยละลาย 1 mg/ml AGE-BSA ปริมาตร 40 μl ใน assay diluent ปริมาตร 360 μl
5. นำสารละลายในข้อ 4 มาเตรียมสารละลายมาตรฐาน AGEs ที่ผ่านการทำ serial dilution ด้วย assay diluent ดังรูปที่ 9



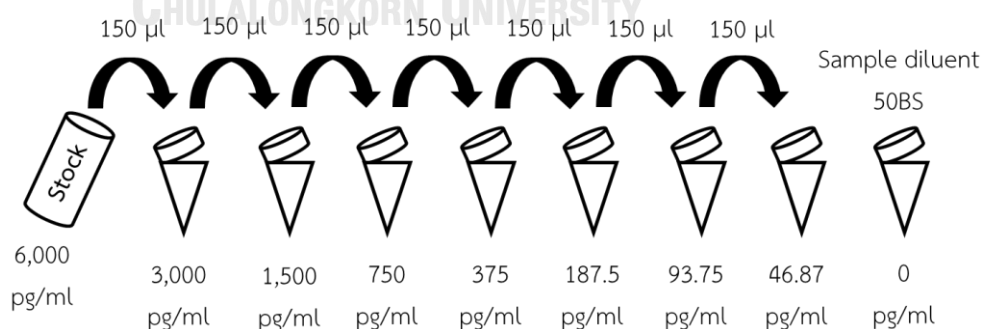
รูปที่ 9 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน AGEs

6. หยอดสารละลายมาตรฐาน AGEs ที่ผ่านการทำ serial dilution และสารตัวอย่างใส่ใน coated plate หลุมละ 50 μl จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 25°C บน orbital plate shaker เป็นเวลา 10 นาที
7. เตรียมสารละลาย anti-AGE antibody เจือจางให้เป็น 1:1000 โดยการละลาย 1000X anti-AGE antibody ปริมาตร 10 μl ใน assay diluent ปริมาตร 9,990 μl ผสมด้วยเครื่อง vortex แล้วหยอดใส่ plate หลุมละ 50 μl แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25°C บน orbital plate shaker เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
8. เทของเหลวใน plate ออก แล้วล้าง 3 ครั้งด้วย 1X wash buffer (เตรียมได้โดยการผสม 10X wash buffer ปริมาตร 30 ml ในน้ำกลั่น 270 ml) จากนั้นให้คว่ำใส่กระดาษซับแห้งเพื่อช่วยซับสารละลายออกจาก plate ให้หมด

9. เตรียมสารละลาย secondary antibody-HRP conjugate เจือจางให้เป็น 1:1000 โดยการละลาย 1000X secondary antibody-HRP conjugate ปริมาตร 10 μl ใน assay diluent ปริมาตร 9,990 μl ผสมด้วยเครื่อง vortex แล้วหยอดใส่ plate หลุมละ 100 μl แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25°C บน orbital plate shaker เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
10. เทของเหลวใน plate ออก แล้วล้าง 3 ครั้งด้วย 1X wash buffer จากนั้นให้คว่ำใส่กระดาษซับแห้งเพื่อช่วยซับสารละลายออกจาก plate ให้หมด
11. หยอด substrate solution หลุมละ 100 μl แล้วบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25°C บน orbital plate shaker เป็นเวลา 2 – 20 นาที โดยให้สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี จนกระทั่งเปลี่ยนเป็นสีฟ้า หากสีเปลี่ยนไวต้องหยอด stop solution ไว
12. หยอด stop solution หลุมละ 100 μl
13. วัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader
14. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานมาสร้างกราฟและสมการมาตรฐาน
15. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของ AGEs จากสมการมาตรฐาน

3.4.6 การศึกษาตัวรับระดับ Receptor for AGEs (RAGE)

1. เตรียม 6,000 pg/ml RAGE โดยเติม sample diluent 50BS ปริมาตร 200 μl ใส่หลอดสารมาตรฐาน สำหรับเป็น stock solution
2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน RAGE ที่ผ่านการทำ serial dilution ด้วย sample diluent 50BS ดังรูปที่ 10

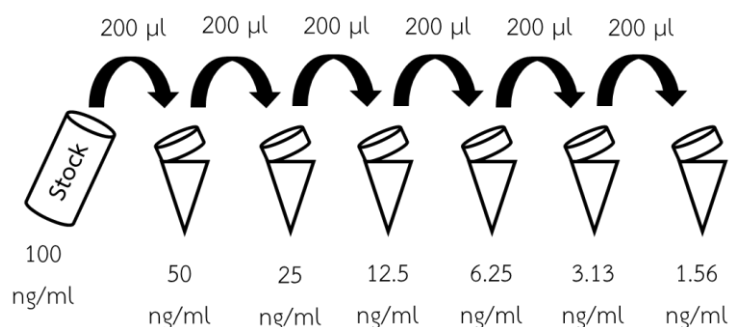


รูปที่ 10 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน RAGE

3. เตรียมสารละลาย antibody cocktail โดยผสม 10X capture ปริมาตร 1,000 μl กับ 10X detector ปริมาตร 1,000 μl ใน antibody diluent 5BI ปริมาตร 8,000 μl ผสมด้วยเครื่อง vortex
4. หยอดสารละลายมาตรฐาน RAGE ที่ผ่านการทำ serial dilution และสารตัวอย่างใส่ใน coated plate หลุมละ 50 μl
5. หยอดสารละลาย antibody cocktail ที่ผสมไว้ในข้อ 3 ลงใน plate หลุมละ 50 μl ปิดฝาแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25°C บน orbital plate shaker (ตั้งความเร็วที่ 400 rpm) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
6. เทของเหลวใน plate ออก แล้วล้าง 3 ครั้งด้วย 1X wash buffer (เตรียมได้โดยการผสม 10X wash buffer ปริมาตร 30 ml ในน้ำกลั่น 270 ml) จากนั้นให้คว่ำใส่กระดาษซับแห้งเพื่อช่วยซับสารละลายออกจาก plate ให้หมด
7. หยอด TMB development solution หลุมละ 100 μl แล้วบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25°C บน orbital plate shaker เป็นเวลา 5 – 20 นาที โดยให้สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีจนกระทั่งเปลี่ยนเป็นสีฟ้า หากสีเปลี่ยนไวต้องหยอด stop solution ไว
8. หยอด stop solution หลุมละ 100 μl
9. วัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader
10. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานมาสร้างกราฟและสมการมาตรฐาน
11. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของ RAGE จากสมการมาตรฐาน

3.4.7 การศึกษาตรวจวัดระดับ 8-OHdG

1. ล้าง 2 ครั้งด้วย 1X wash buffer (เตรียมได้โดยการผสม 25X wash buffer ปริมาตร 30 ml ในน้ำกลั่น 720 ml) จากนั้นให้คว่ำใส่กระดาษซับแห้งเพื่อช่วยซับสารละลายออกจาก plate ให้หมด
2. เตรียม 100 ng/ml 8-OHdG โดยเติม standard dilution buffer ปริมาตร 1,000 μl ใส่หลอดสารมาตรฐาน สำหรับเป็น stock solution
3. เตรียมสารละลายมาตรฐาน 8-OHdG ที่ผ่านการทำ serial dilution ด้วย standard dilution buffer ดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน 8-OHdG

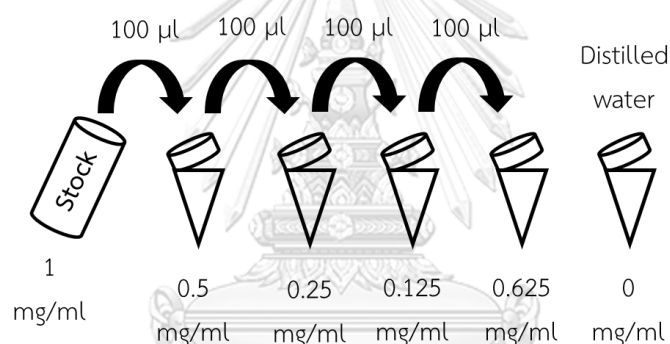
4. หยอดสารละลายมาตรฐาน 8-OHdG ที่ผ่านการทำ serial dilution และสารตัวอย่างใส่ใน coated plate หลุมละ 50 µl
5. เตรียมสารละลาย biotin-detection antibody เจือจางให้เป็น 1:100 โดยการละลาย biotin-detection antibody ปริมาตร 100 µl ใน antibody dilution buffer ปริมาตร 9,900 µl ผสมด้วยเครื่อง vortex แล้วหยอดใส่ plate หลุมละ 50 µl ปิดฝาแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 45 นาที
6. เทของเหลวใน plate ออก แล้วล้าง 3 ครั้งด้วย 1X wash buffer จากนั้นให้คว่ำใส่กระดาษซับแห้งเพื่อช่วยซับสารละลายออกจาก plate ให้หมด
7. เตรียมสารละลาย HRP-Streptavidin conjugate (SABC) เจือจางให้เป็น 1:100 โดยการละลาย SABC ปริมาตร 200 µl ใน SABC dilution buffer ปริมาตร 19,800 µl ผสมด้วยเครื่อง vortex แล้วหยอดใส่ plate หลุมละ 100 µl ปิดฝาแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที
8. เทของเหลวใน plate ออก แล้วล้าง 5 ครั้งด้วย 1X wash buffer จากนั้นให้คว่ำใส่กระดาษซับแห้งเพื่อช่วยซับสารละลายออกจาก plate ให้หมด
9. หยอด TMB substrate หลุมละ 90 µl แล้วบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 – 30 นาที โดยให้สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีจนกระทั่งเปลี่ยนเป็นสีฟ้า หากสีเปลี่ยนไว ต้องหยอด stop solution ไว้
12. หยอด stop solution หลุมละ 50 µl
13. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ภายใน 20 นาที
14. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานมาสร้างกราฟและสมการมาตรฐาน
15. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของ 8-OHdG จากสมการมาตรฐาน

3.4.8 การศึกษาตรวจวัดระดับ Protein carbonyl

วัดความเข้มข้นโปรตีน

นำพลาสมาที่ได้จากตัวอย่างเลือดมาวัดความเข้มข้นโปรตีนด้วยชุด Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Ohio, USA) โดยอาศัยปฏิกิริยา reduction ของ Cu^{2+} เป็น Cu^+ โดยโปรตีน ทำให้ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อน biconchonic acid: Cu^+ ที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 562 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader

1. เตรียมสารตัวอย่างโดยการเจือจางกับน้ำกลั่น 1:300
2. เตรียม 1 mg/ml Bovine serum albumin (BSA) โดยละลาย 2 mg/ml BSA ปริมาตร 100 μl ในน้ำกลั่น 100 μl สำหรับเป็น stock solution
3. เตรียมสารละลายมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) ที่ผ่านการทำ serial dilution ด้วย standard dilution buffer ดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA)

4. หยอดสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ผ่านการทำ serial dilution และสารตัวอย่างใส่ใน 96-well plate หลุมละ 25 μl
5. เตรียม working reagent โดยการนำ reagent A 196 μl ผสมกับ reagent B 4 μl รวมเป็น 200 μl ต่อ 1 หลุม (คำนวณปริมาตรรวมที่ต้องผสมโดยการนำไปคูณกับจำนวนสารมาตรฐานและตัวอย่างทั้งหมดที่จะทำการทดสอบ) แล้วหยอดหลุมละ 200 μl ปิดฝา plate ด้วยฟรอยด์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader
7. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานมาสร้างกราฟและสมการมาตรฐาน
8. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนจากสมการมาตรฐาน

วัดระดับ Protein carbonyl

1. เตรียมสารเคมีดังตารางที่ 1
2. เตรียม blank โดยการหยอด 2N HCl ปริมาตร 250 μ l ใส่ microtube 1 หลอด
3. เตรียม test โดยการหยอด DNPH ปริมาตร 250 μ l ใส่ microtube 3 หลอด
4. เตรียมสารตัวอย่างโดยการเจือจางกับน้ำกลั่น 1:30 แล้วหยอดใส่ microtube ทั้ง 4 หลอด จากนั้นผสมด้วยเครื่อง vortex แล้วนำไปปั่นในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. เติม 20% TCA ปริมาตร 300 μ l ผสมด้วยเครื่อง vortex แล้วนำไปปั่นบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที
6. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 x g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที
7. เทของเหลวใน microtube ทั้ง แล้วตากตะกอนให้แห้งโดยการเปิดฝาหลอดคว่ำไว้บนกระดาษซับแห้งเป็นเวลา 10 นาที
8. ล้างตะกอนด้วยการเติม ethanol : ethyl acetate ปริมาตร 625 μ l แล้วนำไป vortex จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 x g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที
9. เทของเหลวใน microtube ทั้ง แล้วตากตะกอนให้แห้งโดยการเปิดฝาหลอดคว่ำไว้บนกระดาษซับแห้งเป็นเวลา 10 นาที
10. ละลายตะกอนด้วยการเติม GdmCl ปริมาตร 300 μ l แล้วนำไปปั่นใน heat box ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที
11. ดูดสารละลายในข้อ 10 ใส่ 96-well plate ปริมาตร 200 μ l แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 375 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader
12. นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาระดับ protein carbonyl ด้วยสมการ

$$\text{Protein carbonyl (nmol/mg protein)} = \frac{\text{Absorbance}_{375} \times 45.45 (\text{nmol/ml})}{\text{Total protein concentration (mg/ml)}}$$

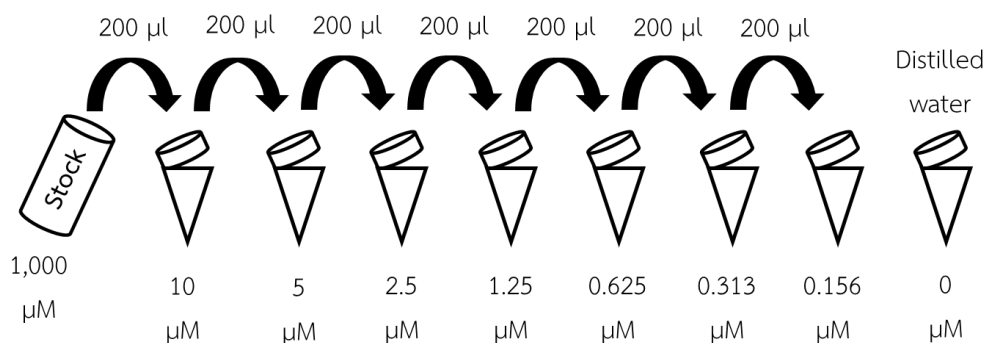
ตารางที่ 1 การเตรียมสารเคมีเพื่อใช้ในการตรวจวัด Protein carbonyl

สารเคมี	ปริมาณ/ปริมาณ
2 N HCl HCl น้ำกลั่น	82.117 ml ปรับปริมาตรให้เป็น 500 ml
10 mM 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH) DNPH 2 N HCl	0.4955 g 250 ml
20% Trichloroacetic acid (TCA) TCA น้ำกลั่น	20 g ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml
1:1 of Ethanol and Ethyl acetate Ethanol Ethyl acetate	100 ml 100 ml
Guanidine hydrochloride (GdmCl) GdmCl Potassium phosphate (KH ₂ PO ₄) น้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 2.5 จากนั้นใส่น้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 500 ml	286.6 g 34.023 g 300 ml

3.4.9 การศึกษาตรวจวัดระดับ Malondialdehyde (MDA)

นำพลาสมาที่ได้จากตัวอย่างเลือดมาตรวจวัดระดับ MDA โดย MDA assay

1. เติมสารตัวอย่างลงใน microtube ปริมาตร 200 μ l
2. เตรียม 1,000 μ M MDA โดยละลาย Malondialdehyde tetrabutylammonium salt 3.13 g ในน้ำกลั่น 10 ml สำหรับเป็น stock solution
3. เตรียมสารละลายมาตรฐาน Malondialdehyde (MDA) ที่ผ่านการทำ serial dilution ด้วยน้ำกลั่น ดังรูปที่ 13



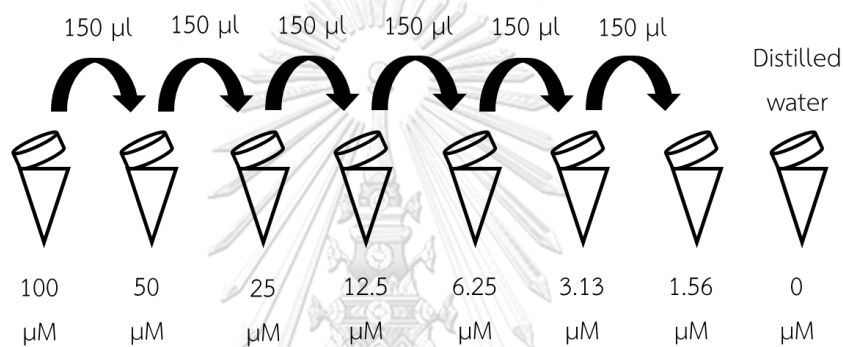
รูปที่ 13 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน Malondialdehyde (MDA)

4. เติมสารละลายมาตรฐานที่ผ่านการทำ serial dilution ลงใน microtube ปริมาตร 200 µl
5. เตรียมสารละลาย 3.3 mM 2,6-di-tert-butyl-4-methoxyphenol (BHT) โดยการละลาย BHT 7.27 mg ใน 10% ethanol ปริมาตร 10 ml
6. เตรียมสารละลาย 15% Trichloroacetic acid (TCA) โดยการละลาย TCA 15 g ในน้ำกลั่น 100 ml จากนั้นเติมใส่ microtube ละ 400 µl แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 8,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 3 นาที
7. ดูดของเหลวใสส่วน supernatant ใน microtube ปริมาตร 400 µl ใส่ microtube ใหม่
8. เตรียมสารละลาย 0.67% thiobarbituric acid (TBA) โดยการละลาย TBA 67 g ในน้ำกลั่น 100 ml จากนั้นเติมใส่ microtube ละ 400 µl แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่อง dry bath
9. ปลอ่ยให้สารละลายเย็นตัวลงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
10. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader
11. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานมาสร้างกราฟและสมการมาตรฐาน
12. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของ MDA จากสมการมาตรฐาน

3.4.10 การศึกษาตรวจวัดระดับ Nitrite

นำพลาสมาที่ได้จากตัวเลือดมาตรวจวัดระดับ Nitrite ด้วย Griess reaction โดยอาศัยการที่ sulfanilamide สามารถจับกับ nitrite ในสารตัวอย่าง จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ N-1-naphthylenediamine dihydrochloride (NED)

1. นำสารละลาย sulfanilamide และ NED มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนเริ่มทำการทดลอง 30 นาที
2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน 100 μM Nitrite โดยละลาย 0.1 M Nitrite standard ปริมาตร 1 μl ในน้ำกลั่น 999 μl แล้วนำมาทำ serial dilution ด้วยน้ำกลั่นดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน Nitrite

3. หยอดสารตัวอย่างสารละลายมาตรฐานที่ผ่านการทำ serial dilution ลงใน 96-well plate ปริมาตร 50 μl
4. หยอดสารละลาย sulfanilamide ลงใน 96-well plate หลุมละ 50 μl แล้วบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
5. หยอดสารละลาย NED ลงใน 96-well plate หลุมละ 50 μl แล้วบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จนกระทั่งสารละลายเริ่มเปลี่ยนเป็นสีม่วง
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ภายใน 30 นาที
7. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานมาสร้างกราฟและสมการมาตรฐาน
8. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาคำนวณหาความเข้มข้นของ Nitrite จากสมการมาตรฐาน

3.4.11 การศึกษาการแสดงออกของยีน iNOS

นำ RNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือดมาทำการศึกษาการแสดงออกของยีน inducible nitric oxide synthase (iNOS) ด้วยเทคนิค reverse transcription-quantitative real time polymerase chain reaction (RT-qPCR) (53)

1. ผสมสารดังตารางที่ 2 ลงใน 0.2 ml microtube จากนั้นผสมและปั่นเหวี่ยงให้สารตกลงมาอยู่ที่ก้นหลอดให้หมด

ตารางที่ 2 สารเคมีสำหรับการสังเคราะห์ cDNA

สารเคมี	ปริมาณ (ต่อ 1 ตัวอย่าง)
dNTP Mix (10mM each)	2 μ l
RNase inhibitor, 40 U/ μ l	0.5 μ l
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ (10 μ M)	0.5 μ l
5x Reverse Transcriptase Buffer	4 μ l
RevertUP™ II Reverse Transcriptase	1 μ l
RNA template	0.1 – 1 μ g total RNA
PCR grade water	variable
Total volume	20 μl

2. นำ 0.2 ml microtube ไปใส่ในเครื่อง 96-well thermal cycler ตั้งค่าสภาวะสำหรับการสังเคราะห์ cDNA ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สภาวะสำหรับการสังเคราะห์ cDNA

สภาวะ	อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Primer incubation	55	60	1
Inactivate enzyme	99	5	1

3. นำ cDNA ที่ได้มาตรวจวัดการแสดงออกของยีน iNOS ด้วย real time qPCR ซึ่งใช้ primers สำหรับยีน iNOS และ β -actin ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ลำดับเบสของ primer สำหรับการตรวจวัดการแสดงออกของยีน iNOS

Primer	ลำดับเบส
iNOS (Forward)	5'-TGGATGCAACCCCATTGTC-3'
iNOS (Reverse)	5'-CCCGCTGCCCCAGTTT-3'
β -actin (Forward)	5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3'
β -actin (Reverse)	5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3'

4. ผสมสารดังตารางที่ 5 ลงใน 0.1 ml microtube จากนั้นผสมและปั่นเหวี่ยงให้สารตกลงมาอยู่ที่ก้นหลอดให้หมด

ตารางที่ 5 สารเคมีสำหรับการทำ real time qPCR

สารเคมี	ปริมาตร (ต่อ 1 ตัวอย่าง)
SYBR master mix (2x)	12.5 μ l
Forward primer (10 μ M)	1.75 μ l
Reverse primer (10 μ M)	1.75 μ l
cDNA template	9 μ l
Total volume	25 μl

5. นำ 0.1 ml microtube ไปใส่ในเครื่อง real time qPCR ตั้งค่าสถานะสำหรับการทำ real time qPCR ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 สถานะสำหรับการทำ real time qPCR

สถานะ	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	ระยะเวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Holding stage	95	10.00	1
Denature	95	0.15	40
Annealing	60	1.00	40

6. นำค่า Ct ที่ได้มาคำนวณดังสมการ

$$\Delta Ct(LDD) = Ct(iNOS) - Ct(\beta\text{-actin})$$

$$\Delta Ct(Controls) = Ct(iNOS) - Ct(\beta\text{-actin})$$

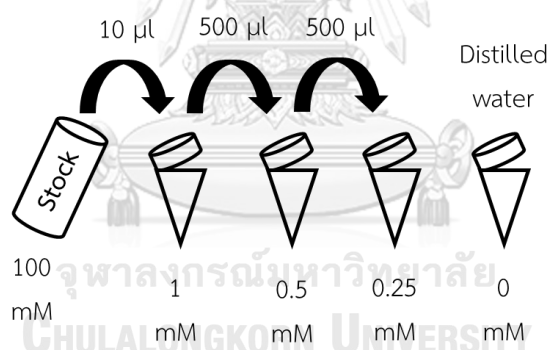
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{LDD} - \Delta Ct_{Controls}$$

$$\text{Relative iNOS gene expression} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

3.4.12 การศึกษาตรวจวัดระดับ Total antioxidant capacity (TAC)

นำพลาสมาที่ได้จากตัวอย่างเลือดมาทำการศึกษา total antioxidant capacity โดย 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS assay

1. เตรียมสารเคมีดังตารางที่ 7
2. เตรียมสาร $ABTS^{+}$ โดยการผสม 5 mM 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) และ 2 mM 2,2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ $68^{\circ}C$ เป็นเวลา 40 นาที สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากใสไม่มีสีกลายเป็นสีน้ำเงินเขียว
3. นำ 1X PBS ผสมกับสารละลาย $ABTS^{+}$ โดยให้ทำการผสมจนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ให้ได้ 0.650 ± 0.02
4. เตรียม 100 mM vitamin C โดยละลาย vitamin C 0.881 g ในน้ำกลั่น 50 ml สำหรับเป็น stock solution
5. เตรียมสารละลายมาตรฐาน vitamin C ที่ผ่านการทำ serial dilution ด้วยน้ำกลั่น ดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน vitamin C

10. หยอดสารละลายมาตรฐาน vitamin C ที่ผ่านการทำ serial dilution และสารตัวอย่างใสใน 96-well plate หลุมละ 5 μ l
11. หยอดสาร $ABTS^{+}$ ลงใน 96-well plate หลุมละ 295 μ l แล้วนำไปป่มที่อุณหภูมิ $37^{\circ}C$ ในที่มืด เป็นเวลา 10 นาที
12. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader
13. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานมาสร้างกราฟและสมการมาตรฐาน
14. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาคำนวณหาค่า TAC จากสมการดังต่อไปนี้

$$\%AA = \left(\frac{OD_{\text{blank}} - OD_{\text{sample}}}{OD_{\text{blank}}} \right) \times 100$$

$$\text{Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) (mM)} = \frac{\%AA-c}{m}$$

; c และ m เป็นค่าที่ได้จากสมการกราฟมาตรฐาน

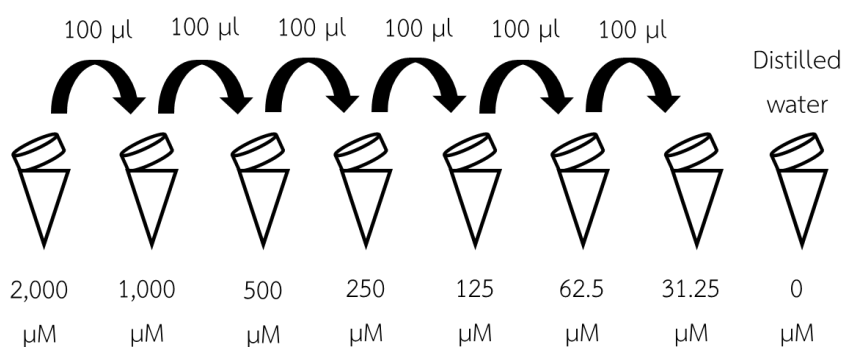
$$\text{TAC (mg/l)} = \text{VCEAC (mM)} \times 176.12 \text{ (มวลโมเลกุลของ vitamin C)}$$

ตารางที่ 7 การเตรียมสารเคมีเพื่อใช้ในการตรวจวัด TAC

สารเคมี	ปริมาตร/ปริมาณ
Phosphate buffered saline (1X PBS)	
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.204 g
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
น้ำกลั่น	1,000 ml
ปรับ pH ให้ได้ 7.4	
5 mM ABTS	
ABTS	0.1372 g
PBS	50 ml
2 mM AAPH	
AAPH	0.0271 g
PBS	50 ml

3.4.13 การศึกษาตรวจวัดระดับ Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

- เตรียม 2,000 μM FeSO₄ โดยละลาย FeSO₄ 2.78 mg ในน้ำกลั่น 5 ml
- เตรียมสารละลายมาตรฐาน FeSO₄ ที่ผ่านการทำ serial dilution ด้วยน้ำกลั่น ดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน FeSO₄

3. หยอดสารละลายมาตรฐาน FeSO_4 ที่ผ่านการทำ serial dilution และสารตัวอย่างใส่ใน 96-well plate หลุมละ 10 μl
4. เตรียม FRAP working reagent
 - 4.1 เตรียม 0.3 M sodium acetate buffer, pH 3.6
ละลาย sodium acetate trihydrate 0.15 g ใน acetic acid ปริมาตร 800 μl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 ml
 - 4.2 เตรียม 10 mM 2,4,6-tripyridyl-S-triazine (TPTZ)
ละลาย TPTZ 12.492 mg ใน 40 mM HCl ปริมาตร 4 ml
 - 4.3 เตรียม 20 mM FeCl_3
ละลาย FeCl_3 12.9768 mg ในน้ำกลั่นปริมาตร 4 ml
 - 4.4 ผสมสารละลายในข้อ 4.1 – 4.3 เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ
5. หยอด FRAP working reagent ลงใน 96-well plate หลุมละ 190 μl แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader
7. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานมาสร้างกราฟและสมการมาตรฐาน
8. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาคำนวณหาค่า FRAP จากสมการมาตรฐาน

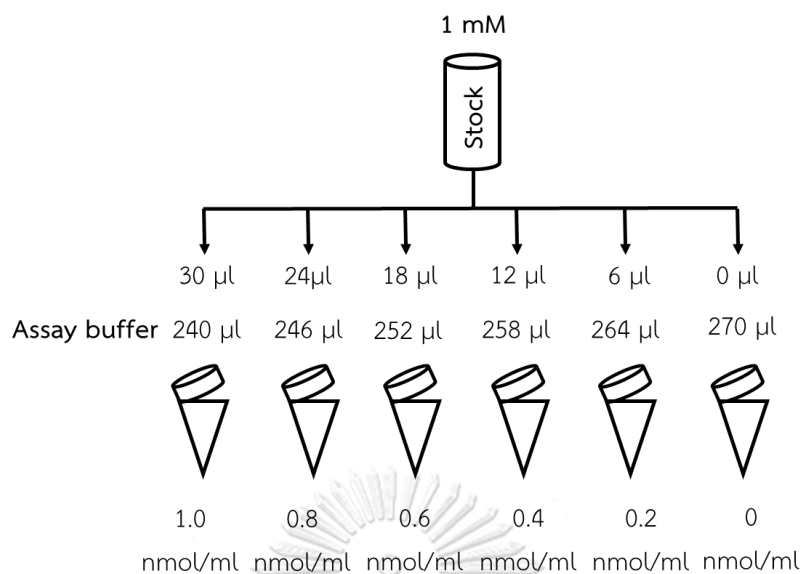
3.4.14 การศึกษาตรวจวัด Catalase activity

นำพลาสมาที่ได้จากตัวอย่างเลือดมาทำการศึกษา catalase activity โดยการวัดการสลายตัวของ H_2O_2 อาศัยหลักการที่ catalase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยน H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำและออกซิเจน (รูปที่ 17) ซึ่ง H_2O_2 จะสามารถจับกับ probe แล้วเกิดเป็นสารที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 570 นาโนเมตร



รูปที่ 17 การทำงานของ catalase

1. เตรียม 20 mM H_2O_2 โดยเจือจาง 0.88 M H_2O_2 ปริมาตร 5 μl ในน้ำกลั่น 215 μl
2. เตรียม 1 mM H_2O_2 โดยเจือจาง 20 mM H_2O_2 ปริมาตร 50 μl ในน้ำกลั่น 950 μl สำหรับเป็น stock solution
3. เตรียมสารละลายมาตรฐาน H_2O_2 ที่ผ่านการทำ serial dilution ด้วย assay buffer ดังรูปที่



รูปที่ 18 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน H_2O_2

4. หยอดสารละลายมาตรฐาน H_2O_2 ที่ผ่านการทำ serial dilution ปริมาตร 90 µl ใส่ 96-well plate
5. หยอดสารตัวอย่างสำหรับทำเป็น sample ปริมาตร 78 µl ใส่ 96-well plate
6. หยอดสารตัวอย่างสำหรับทำเป็น sample high control (HC) ปริมาตร 78 µl ใส่ 96-well plate
7. เติม stop solution ปริมาตร 10 µl ใส่สารละลายมาตรฐานและ HC จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 5 นาที
8. หยอด 1 mM H_2O_2 ที่เตรียมไว้ในข้อ 2 ปริมาตร 12 µl ใส่ sample และ HC จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 30 นาที
9. หยอด stop solution ใส่ sample
10. เตรียมสารละลาย Developer Mix ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 สารเคมีสำหรับทำ Developer Mix

สารเคมี	ปริมาตร (ต่อ 1 ตัวอย่าง)
Assay buffer	46 µl
OxiRed probe	2 µl
HRP solution	2 µl

11. หยอด Developer Mix ปริมาตร 50 μl ใส่สารละลายมาตรฐาน sample และ HC จากนั้นบ่มที่ 25°C ในที่มืด เป็นเวลา 10 นาที
12. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader
13. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานมาสร้างกราฟและสมการมาตรฐาน
14. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาคำนวณหาค่า catalase activity จากสมการดังนี้

$$\Delta\text{OD} = A_{\text{HC}} - A_{\text{sample}}$$

โดยที่

A_{HC} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ HC

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ sample

แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณของ H_2O_2 จากสมการมาตรฐาน แล้วนำค่านั้นมาคำนวณต่อตั้งสมการต่อไปนี้

$$\text{Catalase activity (nmol/min/ml หรือ mU/ml)} = \left(\frac{B}{30 \times V} \right) * D$$

โดยที่

B คือ ปริมาณ H_2O_2 ที่ได้จากสมการมาตรฐาน

30 คือ ระยะเวลาที่ catalase ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาในการทดลองนี้

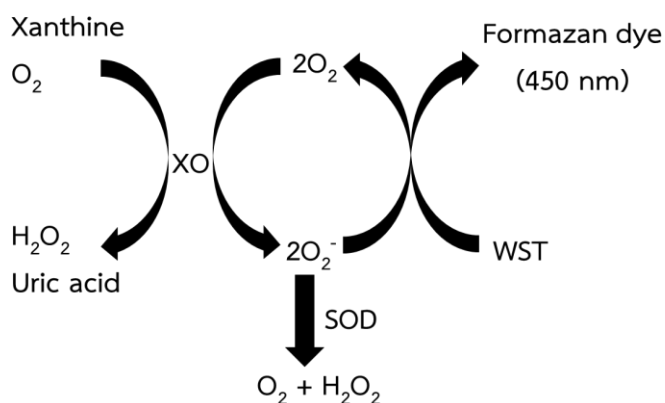
V คือ ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใส่ใน 96-well plate

D คือ ค่า dilution factor

1 หน่วยของ catalase activity คือปริมาณ catalase ทั้งหมดที่สลาย H_2O_2 1 μmol ต่อ 1 นาที ที่ pH 4.5 ที่อุณหภูมิ 25 °C

3.4.15 การศึกษาตรวจวัด Superoxide dismutase (SOD) activity

พลาสมาที่ได้จากตัวอย่างเลือดมาทำการศึกษา SOD activity โดยการวัดการสลายตัวของ O_2^- ที่สร้างขึ้นจาก xanthine oxidase (XO) อาศัยหลักการที่ SOD เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยน O_2^- ให้กลายเป็น H_2O_2 และออกซิเจน โดยจะใช้ water-soluble tetrazolium salts (WST) ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาควกับ O_2^- ได้ formazan (รูปที่ 19) ที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 450 นาโนเมตร



รูปที่ 19 การทำงานของ Superoxide dismutase (SOD)

1. หยอดน้ำกลั่นปริมาตร 20 μ l สำหรับเป็น blank 1 และ 3
2. หยอดสารตัวอย่างปริมาตร 20 μ l สำหรับเป็น blank 2 และ sample
3. เตรียม WST working solution โดยผสม WST solution ปริมาตร 1 ml กับ SOD assay buffer ปริมาตร 19 ml
4. เติม WST working solution ปริมาตร 200 μ l ในข้อ 3 ลงใน blank 1, 2, 3 และ sample
5. เติม dilution buffer ปริมาตร 20 μ l ลงใน blank 2 และ blank 3
6. เตรียม enzyme working solution โดยผสม enzyme solution ปริมาตร 15 μ l กับ dilution buffer ปริมาตร 2.5 ml
7. เติม enzyme working solution ในข้อ 6 ลงใน blank 1 และ sample
8. บ่มสารที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที
9. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader
10. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่า SOD activity ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{SOD activity (inhibition rate \%)} = \frac{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}})}{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})} \times 100$$

โดยที่

A_{blank1} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank 1

A_{blank2} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank 2

A_{blank3} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank 3

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ sample

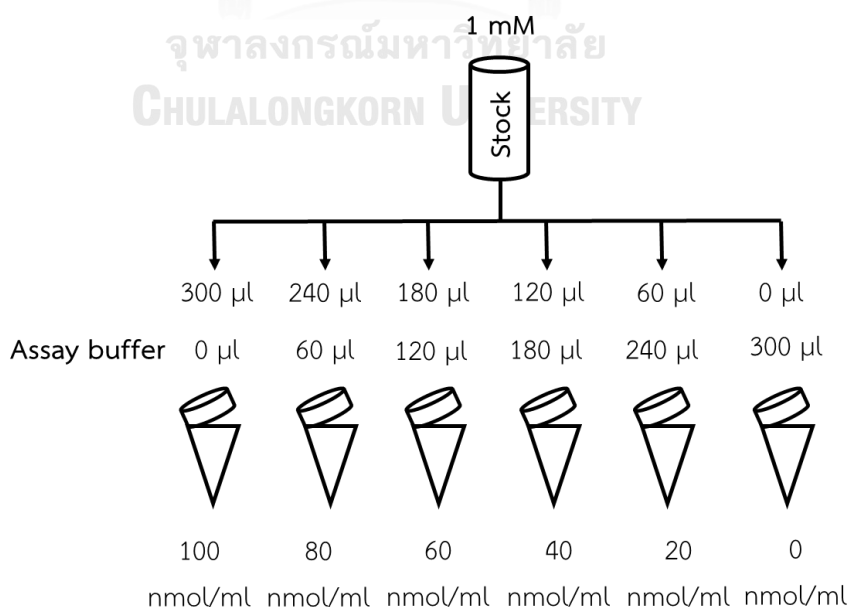
3.4.16 การศึกษาตรวจวัด Glutathione peroxidase (GPx) activity

นำพลาสมาที่ได้จากตัวอย่างเลือดมาทำการศึกษา glutathione peroxidase activity โดยอาศัยหลักการ glutathione peroxidase (GPx) ออกซิไดซ์ GSH ทำให้ได้ GSSG ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในปฏิกิริยาในการรีดิวซ์ cumene hydroperoxide จากนั้น glutathione reductase (GR) รีดิวซ์ GSSG ทำให้ได้สาร GSH และในปฏิกิริยาเดียวกันนี้ใช้ NADPH (รูปที่ 20) จึงใช้ NADPH ที่สามารถวัดการดูดกลืนแสงได้ที่ 340 นาโนเมตร เป็นตัวมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟและสมการสำหรับคำนวณหาค่า NADPH ในตัวอย่างพลาสมา ดังนั้นการลดลงของ NADPH เป็นสัดส่วนโดยตรงและบ่งชี้ถึง GPx activity



รูปที่ 20 การทำงานของ Glutathione peroxidase (GPx)

1. เตรียม 1 mM NADPH โดยเจือจาง 40 mM NADPH 25 μ l ในน้ำกลั่น 975 μ l
2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน NADPH ที่ผ่านการทำ serial dilution ด้วย assay buffer ดังรูปที่ 21



รูปที่ 21 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน

3. หยอดสารละลายมาตรฐานปริมาตร 100 μl ลงใน 96-well plate
4. หยอดสารตัวอย่างปริมาตร 50 μl ลงใน 96-well plate
5. หยอด assay buffer ปริมาตร 50 μl สำหรับทำเป็น reagent control
6. เตรียมสารละลาย reaction mix ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 สารเคมีสำหรับทำ reaction mix

สารเคมี	ปริมาตร (ต่อ 1 ตัวอย่าง)
Assay buffer	33 μl
40 mM NADPH solution	3 μl
Glutathione reductase solution	2 μl
Glutathione (GSH) solution	2 μl

7. เติมสารละลาย reaction mix ในข้อ 6 ลงในสารตัวอย่างและ reagent control หลุมละ 40 μl แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นให้นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร หากวัดได้ค่าน้อยกว่า 1.0 ให้ใส่ 40 mM NADPH เพิ่ม
8. เติมสาร cumene hydroperoxide ปริมาตร 10 μl ใส่สารตัวอย่างและ reagent control แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตรทันที (A1)
9. บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 25°C ในที่มืด เป็นเวลา 5 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตรทันที (A2)
10. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณหา GPx activity ดังสมการต่อไปนี้

$$\Delta A = (A1_{\text{sample}} - A2_{\text{sample}}) - (A1_{\text{Reagent control}} - A2_{\text{Reagent control}})$$

นำ ΔA มาคำนวณต่อในสมการมาตรฐานดังนี้

$$B = \frac{\Delta A - \text{intercept}}{\text{slope}}$$

นำค่า B มาคำนวณหาค่า GPx activity ดังนี้

$$\text{GPx activity (nmol/min/ml หรือ mU/ml)} = \left(\frac{B}{5 \cdot V} \right) \cdot D$$

โดยที่

B คือ ปริมาณ NADPH ที่ได้จากการคำนวณจากสมการมาตรฐาน

5 คือ ระยะเวลาที่ GPx ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาในการทดลองนี้

V คือ ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใส่ใน 96-well plate

D คือ ค่า dilution factor

3.4.17 การศึกษาประเมินคะแนน Oxidative status

นำค่าที่ได้จากการตรวจวัด antioxidant score (Antiox-S) มาคำนวณ oxidative status scores โดยอาศัย antioxidant parameters ในพลาสมา (TAC, FRAP, GPx activity) และ score related to oxidative damage (Proxy-S) โดยอาศัย oxidative stress parameters ในพลาสมา (protein carbonyl, 8-OHdG, MDA, nitrite) รวมถึงนำค่าที่ได้มาหาค่าดัชนี Antiox-S:Proxy-S (54)

อันดับแรก นำค่า antioxidant parameters มาวิเคราะห์การกระจายตัวของข้อมูล (j) โดย Kolmogorov-Smirnov test หากมี parameters ไหนกระจายตัวไม่ปกติให้นำมาทำเป็นค่า logarithm (log j) เมื่อทดสอบการกระจายตัวแล้ว parameters จะถูกทำให้เป็นมาตรฐานสำหรับแต่ละตัวอย่าง (i)

ใช้สูตรในการหา ดังนี้

$$Z_{ij} = (X_{ij} - M_j) / \text{STDV}_j$$

โดยที่ Z_{ij} = parameter ที่ถูกทำให้เป็นมาตรฐาน

X_{ij} = ค่าข้อมูลดิบที่กระจายตัวปกติที่ถูกนำมาทำเป็นค่า logarithm (log j)

M_j = ค่าเฉลี่ยของข้อมูลทั้งหมด

STDV_j = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูล

จากนั้นนำค่า Z_{ij} ของทุก parameters สำหรับ antioxidant มาบวกกันจะได้ค่า Antiox-S และค่า Z_{ij} ของทุก parameters สำหรับ oxidative stress มาบวกกันจะได้ค่า Proxy-S

3.4.18 การศึกษาความยาวเทโลเมียร์ (Relative telomere length)

นำ DNA ที่สกัดได้จากเลือดมาทำการศึกษาความยาวเทโลเมียร์ของเซลล์เม็ดเลือดด้วยเทคนิค real time qPCR (55)

1. เจือจาง DNA template ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1.5 ng/ μ l
2. เจือจาง Primers สำหรับยีนเทโลเมียร์และ 36B4 ดังตารางที่ 10 ให้มีความเข้มข้น 10 mM

3.5 ขนาดตัวอย่างและการคำนวณ

คำนวณกลุ่มตัวอย่างโดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$N = \frac{2(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \sigma^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2} + 30\%$$

โดยที่ $\alpha = 0.05, Z_{\alpha/2} = 1.96$

$$\beta = 0.20, Z_{\beta} = 0.84$$

\bar{X} = ค่าเฉลี่ยจากการศึกษาที่ผ่านมา (ระดับ MDA) (56)

โดยที่ \bar{X} จากการศึกษาก่อนหน้าคือ $\bar{X}_1 = 3.21, \bar{X}_2 = 5.13$

$$\sigma^2 = \text{ความแปรปรวนรวม} = \frac{SD_1^2 + SD_2^2}{2}$$

โดยที่ SD จากการศึกษานำร่อง (protein carbonyl)

$$SD_1 = 0.98, SD_2 = 5$$

จะได้ว่า $\sigma^2 = \frac{0.98^2 + 5^2}{2} = \frac{0.9604 + 25}{2} = 12.9802$

ดังนั้น $N = \frac{2(1.96 + 0.84)^2 12.9802}{(3.21 - 5.13)^2} + 30\% = 72$

สรุป ขนาดตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ทั้งหมด = 150 คน (แบ่งเป็นกลุ่มตัวอย่าง 75 คน และกลุ่มควบคุม 75 คน)

3.6 การรวบรวมข้อมูล (Data collection)

ผลการศึกษาหลัก (Primary outcome) คือ ระดับ AGEs, RAGE ตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชัน ระดับสารต้านอนุมูลอิสระ และความยาวเทโลเมียร์ ในเลือดจากการตรวจวัดทางห้องปฏิบัติการ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมและกลุ่มควบคุม และเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

ผลการศึกษารอง (Secondary outcome) คือ ความสัมพันธ์ระหว่างสารชีวเคมีดังกล่าวและความรุนแรงของโรคจากภาพถ่ายคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic Resonance Imaging, MRI)

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้วิเคราะห์ (Data analysis and statistics)

ผู้วิจัยนำข้อมูลที่เก็บรวบรวมมาวิเคราะห์ตามระเบียบวิธีการทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 22.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับ AGEs RAGE ตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชัน ระดับสารต้านอนุมูลอิสระ และความยาวเทโลเมียร์ ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม และระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงแตกต่างกัน หาความสัมพันธ์ระหว่างสารชีวเคมีที่ศึกษาและความรุนแรงของโรคจากภาพถ่ายคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า รวมถึงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย เช่น อายุ เพศ ดัชนีมวลกาย ค่าที่ได้จากการเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล แสดงในรูปค่าเฉลี่ย(mean) \pm ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย(standard error of mean, SEM) (การกระจายตัวของข้อมูลปกติ) หรือค่ามัธยฐาน(ควอไทล์ที่ 1 - ควอไทล์ที่ 3) (การกระจายตัวของข้อมูลไม่ปกติ) โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ Chi-square test, unpaired *t*-test (การกระจายตัวของข้อมูลปกติ) หรือ Mann-Whitney *U* test (การกระจายตัวของข้อมูลไม่ปกติ), Pearson correlation (การกระจายตัวของข้อมูลปกติ) หรือ Spearman correlation (การกระจายตัวของข้อมูลไม่ปกติ) โดยใช้ค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ *P*-value < 0.05

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษานี้มีกลุ่มประชากร 2 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุมซึ่งเป็นคนปกติที่มีสุขภาพดี (controls) 75 ราย และกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (LDD) 75 ราย

ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างได้แสดงและเปรียบเทียบไว้ในตารางที่ 13

กลุ่มควบคุม สัดส่วนเพศชายคิดเป็น ร้อยละ 28 และเพศหญิงคิดเป็น ร้อยละ 72 หรืออัตราส่วนระหว่างเพศชายต่อเพศหญิงเท่ากับ $1/2.57$ กลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม สัดส่วนเพศชายคิดเป็น ร้อยละ 37.33 และเพศหญิงคิดเป็น ร้อยละ 62.67 หรืออัตราส่วนระหว่างเพศชายต่อเพศหญิงเท่ากับ $1/1.68$ เมื่อเปรียบเทียบเพศระหว่างสองกลุ่ม พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ สำหรับอายุเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมเท่ากับ 58.07 ± 0.93 ปี อายุเฉลี่ยของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมเท่ากับ 58.53 ± 1.73 ปี เมื่อเปรียบเทียบอายุระหว่างสองกลุ่ม พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ สำหรับดัชนีมวลกาย (BMI) เฉลี่ยของกลุ่มควบคุมเท่ากับ 24.32 ± 0.43 kg/m^2 ดัชนีมวลกายเฉลี่ยของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมเท่ากับ 25.67 ± 0.52 kg/m^2 เมื่อเปรียบเทียบดัชนีมวลกายระหว่างสองกลุ่ม พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

กลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีคะแนนความเจ็บปวด (visual analog scale, VAS) เฉลี่ยเท่ากับ 6.04 ± 0.21 คะแนน สำหรับการประเมินอาการปวดหลังต่อการดำเนินชีวิตประจำวันจากแบบสอบถาม (Oswestry disability index, ODI) เฉลี่ยเท่ากับ ร้อยละ 43.29 ± 1.87 ระยะเวลาที่ผู้ป่วยมีอาการปวดหลัง (duration of pain) เฉลี่ยเท่ากับ 16.17 ± 2.60 เดือน

สำหรับกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม สามารถแบ่งออกตามระดับความรุนแรงของโรคได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มผู้ป่วยมีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) จำนวน 35 ราย กลุ่มผู้ป่วยมีความรุนแรงของโรคปานกลาง (moderate) จำนวน 27 ราย กลุ่มผู้ป่วยมีความรุนแรงของโรครุนแรง (severe) จำนวน 7 ราย

ตารางที่ 13 ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่าง

Characteristics	Controls (N = 75)	LDD (N = 75)	P-values
Gender			0.223 ^a
Male, n (%)	21 (28.00)	28 (37.33)	
Female, n (%)	54 (72.00)	47 (62.67)	
Age (years)			0.81 ^b
Mean \pm SEM	58.07 \pm 0.93	58.53 \pm 1.73	
BMI (kg/m ²)			0.05 ^b
Mean \pm SEM	24.32 \pm 0.43	25.67 \pm 0.52	
Visual analog scale (VAS)			
Mean \pm SEM	-	6.04 \pm 0.21	
Oswestry disability index (ODI)			
Mean \pm SEM	-	43.29 \pm 1.87	
Duration of pain (months)			
Mean \pm SEM	-	16.17 \pm 2.60	
Lumbar spinal stenosis*			
Mild, n (%)	-	35 (50.72)	
Moderate, n (%)	-	27 (39.13)	
Severe, n (%)	-	7 (10.15)	

^a Chi-square test

^b Unpaired student *t*-test

*เนื่องจากข้อมูลในส่วนองระดับความรุนแรงของโรคในกลุ่ม LDD ขาดหายไปจำนวน 6 คน จึงทำให้เมื่อแบ่งข้อมูลตามระดับความรุนแรงของโรคแล้วได้ข้อมูลเพียง 69 คน

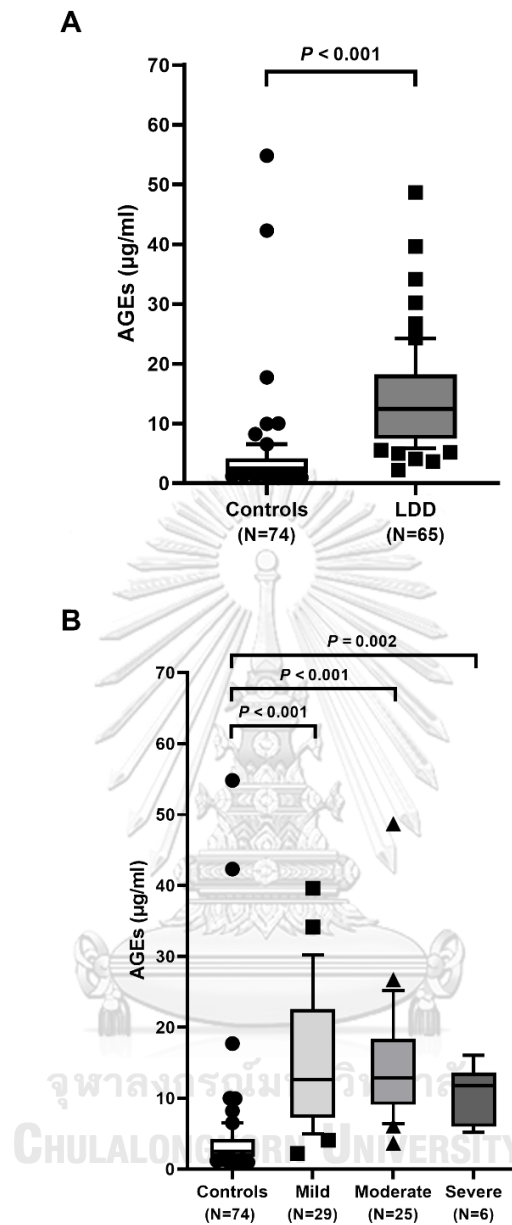
4.2 การศึกษาตรวจวัดระดับ Advanced glycation end products (AGEs)

4.2.1 การศึกษาตรวจวัดระดับ AGEs ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

ผลการศึกษาตรวจวัดระดับ AGEs ในพลาสมาพบว่า ระดับ AGEs ในพลาสมาของกลุ่มควบคุมจำนวน 74 รายมีค่าเท่ากับ 2.49 (1.73 – 4.22) $\mu\text{g/ml}$ ระดับ AGEs ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมจำนวน 65 รายมีค่าเท่ากับ 12.49 (7.48 – 18.22) $\mu\text{g/ml}$ พบว่าระดับ AGEs ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) (รูปที่ 22A)

4.2.2 การศึกษาตรวจวัดระดับ AGEs ในกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

ผลการศึกษาตรวจวัดระดับ AGEs ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกันพบว่า ระดับ AGEs ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) จำนวน 29 รายมีค่าเท่ากับ 12.63 (7.24 – 22.61) $\mu\text{g/ml}$ ระดับ AGEs ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรครุนแรงปานกลาง (moderate) จำนวน 25 รายมีค่าเท่ากับ 12.93 (9.11 – 18.39) $\mu\text{g/ml}$ ระดับ AGEs ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรครุนแรงที่สุด (severe) จำนวน 6 รายมีค่าเท่ากับ 12.93 (7.54 – 21.78) $\mu\text{g/ml}$ เมื่อเปรียบเทียบระดับ AGEs ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน พบว่าระดับ AGEs ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรครุนแรงปานกลาง (moderate) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรครุนแรงที่สุด (severe) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.002$) เมื่อเปรียบเทียบระดับ AGEs ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของระดับ AGEs ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน (รูปที่ 22B)



รูปที่ 22 การศึกษาตรวจวัดระดับพลาสมา Advanced glycation end products (AGEs) (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

*เนื่องจากตัดข้อมูลอาสาสมัครที่เป็นเบาหวานออกจึงทำให้จำนวนคนในกลุ่ม controls เหลือ 74 คน และกลุ่ม LDD เหลือ 65 คน

**เนื่องจากข้อมูลในส่วนองระดับความรุนแรงของโรคในกลุ่ม LDD ขาดหายไปจำนวน 5 คน จึงทำให้เมื่อแบ่งข้อมูลตามระดับความรุนแรงของโรคแล้วได้ข้อมูลเพียง 60 คน

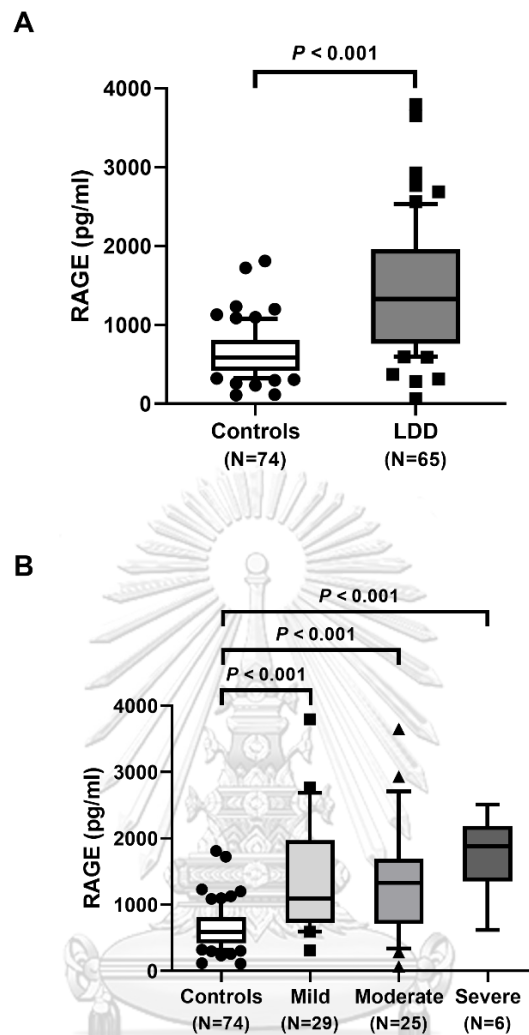
4.3 การศึกษาตรวจวัดระดับ Receptor for AGEs (RAGE)

4.3.1 การศึกษาตรวจวัดระดับ RAGE ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

ผลการศึกษาตรวจวัดระดับ RAGE ในพลาสมาพบว่า ระดับ RAGE ในพลาสมาของกลุ่มควบคุมจำนวน 74 รายมีค่าเท่ากับ 589.76 (418.74 – 813.15) pg/ml ระดับ RAGE ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมจำนวน 65 รายมีค่าเท่ากับ 1,328.30 (760.30 – 1,957.80) pg/ml พบว่าระดับ RAGE ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) (รูปที่ 23A)

4.3.2 การศึกษาตรวจวัดระดับ RAGE ในกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

ผลการศึกษาตรวจวัดระดับ RAGE ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกันพบว่า ระดับ RAGE ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) จำนวน 29 รายมีค่าเท่ากับ 1,096.30 (728.80 – 1,976.30) pg/ml ระดับ RAGE ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคนปานกลาง (moderate) จำนวน 25 รายมีค่าเท่ากับ 1,328.30 (709.30 – 1,690.30) pg/ml ระดับ RAGE ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมมากที่สุด (severe) จำนวน 6 รายมีค่าเท่ากับ 1,882.80 (1,351.05 – 2,189.05) pg/ml เมื่อเปรียบเทียบระดับ RAGE ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน พบว่าระดับ RAGE ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคนปานกลาง (moderate) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมมากที่สุด (severe) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบระดับ RAGE ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของระดับ RAGE ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน (รูปที่ 23B)



รูปที่ 23 การศึกษาตรวจวัดระดับพลาสมา RAGE (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

*เนื่องจากตัดข้อมูลอาสาสมัครที่เป็นเบาหวานออกจึงทำให้จำนวนคนในกลุ่ม controls เหลือ 74 คน และกลุ่ม LDD เหลือ 65 คน

**เนื่องจากข้อมูลในส่วนองระดับความรุนแรงของโรคในกลุ่ม LDD ขาดหายไปจำนวน 5 คน จึงทำให้เมื่อแบ่งข้อมูลตามระดับความรุนแรงของโรคแล้วได้ข้อมูลเพียง 60 คน

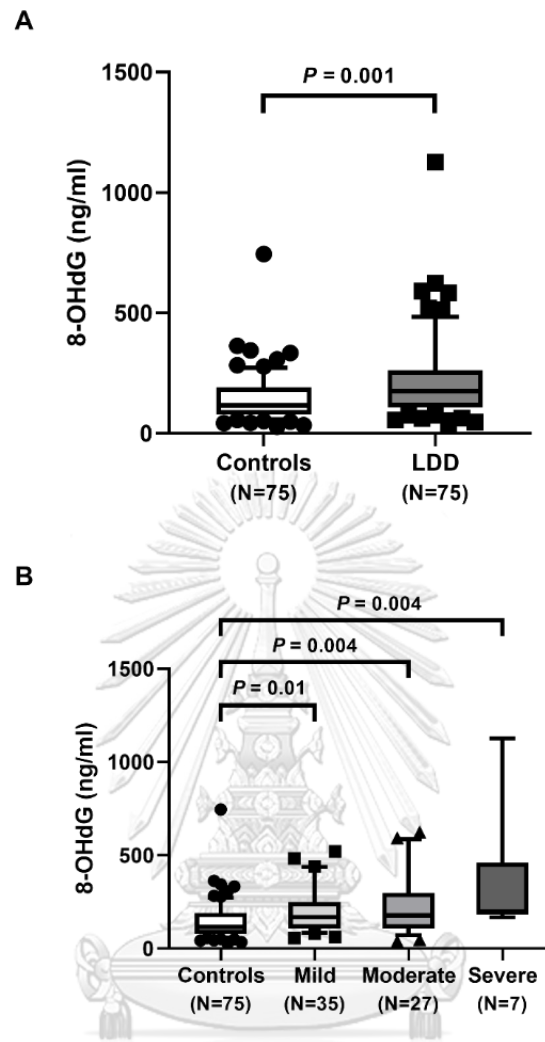
4.4 การศึกษาตรวจวัดระดับ 8-OHdG ในเลือด

4.4.1 การศึกษาตรวจวัดระดับ 8-OHdG ในเลือดของกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

ผลการศึกษาตรวจวัดระดับ 8-OHdG ในเลือดพบว่า ระดับ 8-OHdG ในกลุ่มควบคุมจำนวน 75 รายมีค่าเท่ากับ 116.17 (77.82 – 190.93) ng/ml ระดับ 8-OHdG ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมจำนวน 75 รายมีค่าเท่ากับ 175.55 (108.32 – 262.08) ng/ml พบว่าระดับ 8-OHdG ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.001$) (รูปที่ 24A)

4.4.2 การศึกษาตรวจวัดระดับ 8-OHdG ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

ผลการศึกษาตรวจวัดระดับ 8-OHdG ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกันพบว่า ระดับ 8-OHdG ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) จำนวน 35 รายมีค่าเท่ากับ 169.87 (108.32 – 249.89) ng/ml ระดับ 8-OHdG ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคนานกลาง (moderate) จำนวน 27 รายมีค่าเท่ากับ 178.49 (108.32 – 297.84) ng/ml ระดับ 8-OHdG ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรครุนแรงที่สุด (severe) จำนวน 7 รายมีค่าเท่ากับ 201.06 (183.02 – 461.10) ng/ml เมื่อเปรียบเทียบระดับ 8-OHdG ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน พบว่าระดับ 8-OHdG ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคนานกลาง (moderate) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรครุนแรงที่สุด (severe) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบระดับ 8-OHdG ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของระดับ 8-OHdG ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน (รูปที่ 24B)



รูปที่ 24 การศึกษาตรวจวัดระดับ 8-OHdG ในเลือด (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

*เนื่องจากข้อมูลในส่วนองระดับความรุนแรงของโรคในกลุ่ม LDD ขาดหายไปจำนวน 6 คน จึงทำให้เมื่อแบ่งข้อมูลตามระดับความรุนแรงของโรคแล้วได้ข้อมูลเพียง 69 คน

4.5 การศึกษาตรวจวัดระดับพลาสมา Protein carbonyl

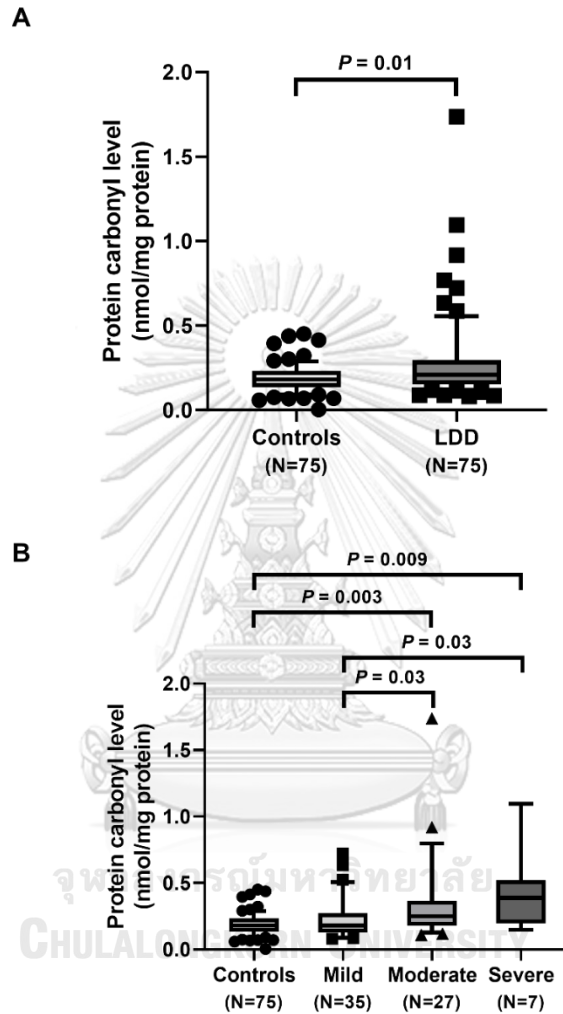
4.5.1 การศึกษาตรวจวัดระดับ protein carbonyl ในพลาสมาของกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

ผลการศึกษาตรวจวัดระดับ protein carbonyl ในพลาสมาพบว่า ระดับ protein carbonyl ในพลาสมาของกลุ่มควบคุมจำนวน 75 รายมีค่าเท่ากับ 0.18 (0.14 – 0.23) nmol/mg protein ระดับ protein carbonyl ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมจำนวน 75 รายมีค่าเท่ากับ 0.21 (0.15 – 0.30) nmol/mg protein พบว่าระดับ protein carbonyl ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.01$) (รูปที่ 25A)

4.5.2 การศึกษาตรวจวัดระดับ protein carbonyl ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

ผลการศึกษาตรวจวัดระดับ protein carbonyl ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกันพบว่า ระดับ protein carbonyl ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) จำนวน 35 รายมีค่าเท่ากับ 0.18 (0.13 – 0.27) nmol/mg protein ระดับ protein carbonyl ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคปานกลาง (moderate) จำนวน 27 รายมีค่าเท่ากับ 0.25 (0.18 – 0.37) nmol/mg protein ระดับ protein carbonyl ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมากที่สุด (severe) จำนวน 7 รายมีค่าเท่ากับ 0.39 (0.20 – 0.52) nmol/mg protein เมื่อเปรียบเทียบระดับ protein carbonyl ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน พบว่าระดับ protein carbonyl ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคปานกลาง (moderate) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.003$) กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมากที่สุด (severe) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.009$) เมื่อเปรียบเทียบระดับ protein carbonyl ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน พบว่าระดับ protein carbonyl ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคปานกลาง (moderate) มีค่าสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.03$) และระดับ protein carbonyl ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมากที่สุด (severe) มีค่าสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild)

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.03$) แต่ไม่พบความแตกต่างกันระหว่างระดับ protein carbonyl ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคปานกลาง (moderate) กับกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมามากที่สุด (severe) (รูปที่ 25B)



รูปที่ 25 การศึกษาตรวจวัดระดับ protein carbonyl (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

*เนื่องจากข้อมูลในส่วนองระดับความรุนแรงของโรคในกลุ่ม LDD ขาดหายไปจำนวน 6 คน จึงทำให้เมื่อแบ่งข้อมูลตามระดับความรุนแรงของโรคแล้วได้ข้อมูลเพียง 69 คน

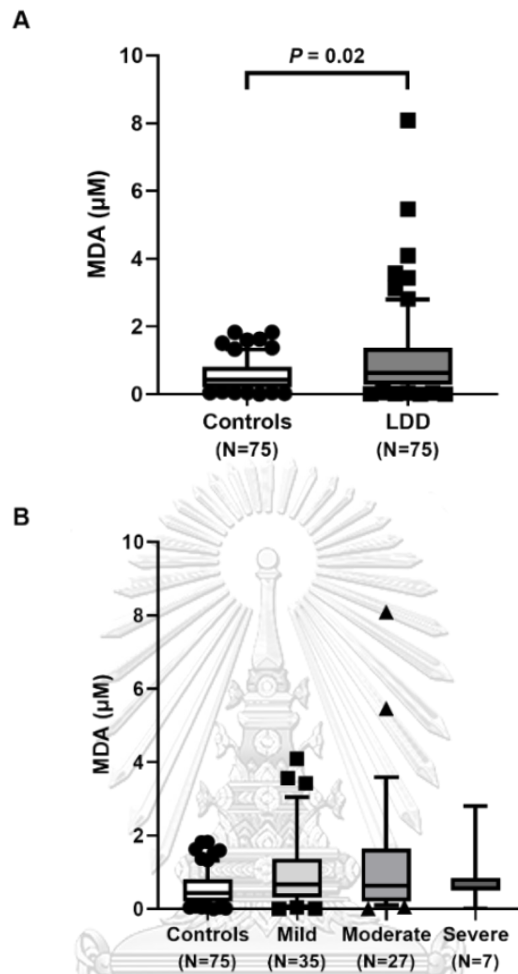
4.6 การศึกษาตรวจวัดระดับพลาสมา Malondialdehyde (MDA)

4.6.1 การศึกษาตรวจวัดระดับ MDA ในพลาสมาของกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

ผลการศึกษาตรวจวัดระดับ MDA ในพลาสมาพบว่า ระดับ MDA ในกลุ่มควบคุมจำนวน 75 รายมีค่าเท่ากับ 0.43 (0.21 – 0.81) μM ระดับ MDA ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมจำนวน 75 รายมีค่าเท่ากับ 0.63 (0.28 – 1.37) μM พบว่าระดับ MDA ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.02$) (รูปที่ 26A)

4.6.2 การศึกษาตรวจวัดระดับ MDA ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

ผลการศึกษาตรวจวัดระดับ MDA ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกันพบว่า ระดับ MDA ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) จำนวน 35 รายมีค่าเท่ากับ 0.67 (0.31 – 1.36) μM ระดับ MDA ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคปานกลาง (moderate) จำนวน 27 รายมีค่าเท่ากับ 0.63 (0.20 – 1.65) μM ระดับ MDA ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมากที่สุด (severe) จำนวน 7 รายมีค่าเท่ากับ 0.56 (0.51 – 0.85) μM เมื่อเปรียบเทียบระดับ MDA พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของระดับ MDA ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน (รูปที่ 26B)



รูปที่ 26 การศึกษาตรวจวัดระดับพลาสมา MDA (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

*เนื่องจากข้อมูลในส่วนองระดับความรุนแรงของโรคในกลุ่ม LDD ขาดหายไปจำนวน 6 คน จึงทำให้เมื่อแบ่งข้อมูลตามระดับความรุนแรงของโรคแล้วได้ข้อมูลเพียง 69 คน

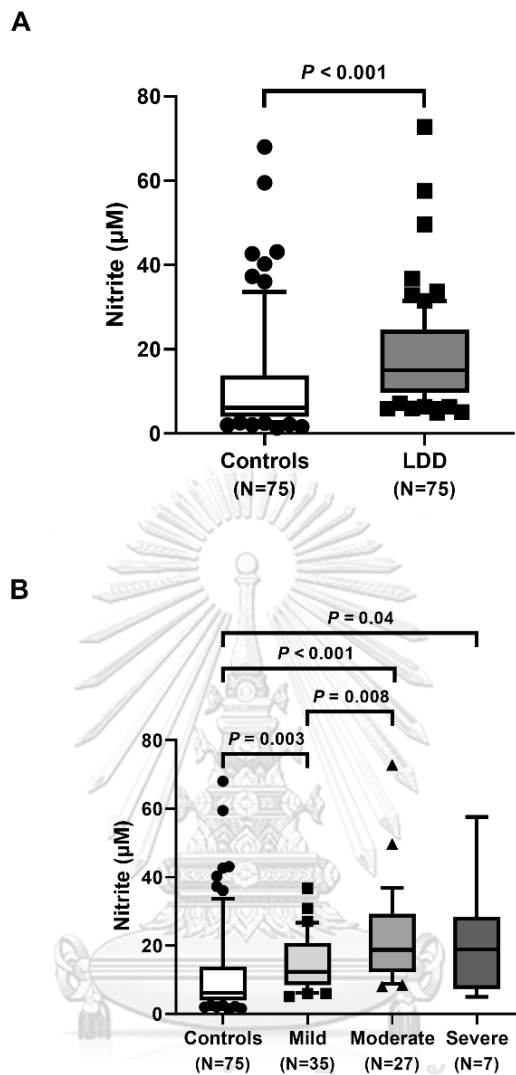
4.7 การศึกษาตรวจวัดระดับพลาสมา Nitrite

4.7.1 การศึกษาตรวจวัดระดับพลาสมา nitrite ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

ผลการศึกษาตรวจวัดระดับ nitrite ในพลาสมาพบว่าระดับ nitrite ในพลาสมาของกลุ่มควบคุมจำนวน 75 รายมีค่าเท่ากับ 6.14 (3.98 – 13.80) μM ระดับ nitrite ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมจำนวน 75 รายมีค่าเท่ากับ 15.03 (9.73 – 24.69) μM พบว่าระดับ nitrite ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) (รูปที่ 27A)

4.7.2 การศึกษาตรวจวัดระดับพลาสมา nitrite ในกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

ผลการศึกษาตรวจวัดระดับ nitrite ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกันพบว่า ระดับ nitrite ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) จำนวน 35 รายมีค่าเท่ากับ 12.35 (8.43 – 20.76) μM ระดับ nitrite ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคนปานกลาง (moderate) จำนวน 27 รายมีค่าเท่ากับ 18.74 (12.21 – 29.28) μM ระดับ nitrite ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมมากที่สุด (severe) จำนวน 7 รายมีค่าเท่ากับ 18.82 (7.32 – 28.45) เมื่อเปรียบเทียบระดับ nitrite ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน พบว่าระดับ nitrite ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.003$) กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคนปานกลาง (moderate) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมมากที่สุด (severe) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.04$) เมื่อเปรียบเทียบระดับ nitrite ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน พบว่าระดับ nitrite ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคนปานกลาง (moderate) มีค่าสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.008$) แต่ไม่พบความแตกต่างกันของระดับ nitrite ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) กับกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมมากที่สุด (severe) และกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคนปานกลาง (moderate) กับกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมมากที่สุด (severe) (รูปที่ 27B)



รูปที่ 27 การศึกษาตรวจวัดระดับพลาสมา Nitrite (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

*เนื่องจากข้อมูลในส่วนของระดับความรุนแรงของโรคในกลุ่ม LDD ขาดหายไปจำนวน 6 คน จึงทำให้เมื่อแบ่งข้อมูลตามระดับความรุนแรงของโรคแล้วได้ข้อมูลเพียง 69 คน

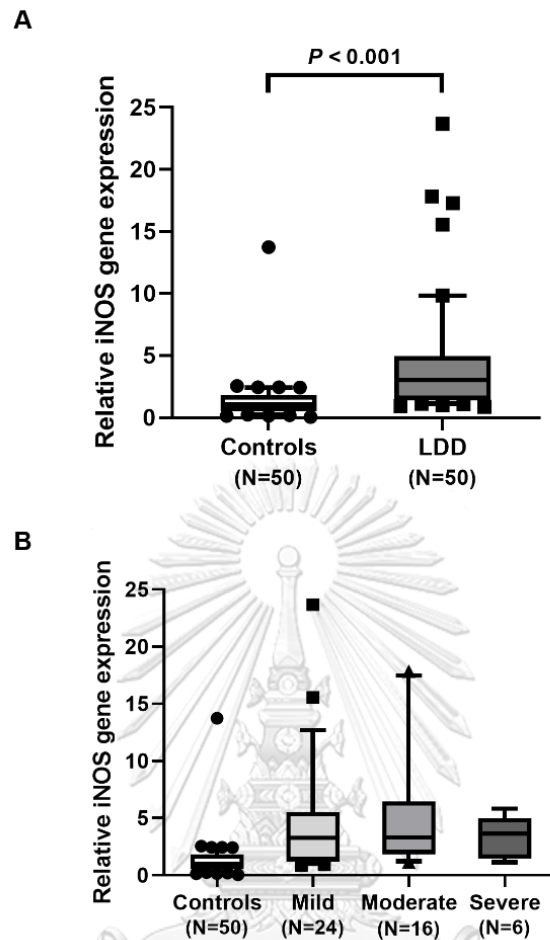
4.8 การศึกษาการแสดงออกของยีน iNOS ในเลือด

4.8.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน iNOS ในเลือดของกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน iNOS ของเซลล์เม็ดเลือดขาวในกลุ่มควบคุมจำนวน 50 รายมีการแสดงออกของยีน iNOS เท่ากับ 1.04 (0.50 – 1.81) และกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมจำนวน 50 รายมีการแสดงออกของยีน iNOS เท่ากับ 3.03 (1.39 – 4.97) พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีการแสดงออกของยีน iNOS ในเลือดมากกว่ากลุ่มควบคุม 2.91 เท่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) (รูปที่ 28A)

4.8.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน iNOS ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน iNOS ของเซลล์เม็ดเลือดขาวในกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน โดยแบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) จำนวน 24 ราย พบว่าการแสดงออกของยีน iNOS เท่ากับ 3.27 (1.23 – 5.51) กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคปานกลาง (moderate) จำนวน 16 รายมีการแสดงออกของยีน iNOS เท่ากับ 3.31 (1.84 – 6.47) และกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมากที่สุด (severe) จำนวน 6 รายมีการแสดงออกของยีน iNOS เท่ากับ 3.67 (1.47 – 4.97) พบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคปานกลาง (moderate) มีการแสดงออกของยีน iNOS ในเลือดมากกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) 1.01 เท่า และกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมากที่สุด (severe) มีการแสดงออกของยีน iNOS ในเลือดน้อยกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) 1.05 เท่าแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 28B)



รูปที่ 28 การศึกษาการแสดงออกของยีน iNOS ในเซลล์เม็ดเลือดขาว (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

*เนื่องจากตัวอย่างเลือดบางส่วนในทั้ง 2 กลุ่มไม่สามารถตรวจวัดค่า iNOS gene expression ได้ จึงทำให้จำนวนคนในกลุ่ม controls เหลือ 50 คน และกลุ่ม LDD เหลือ 50 คน

**เนื่องจากข้อมูลในส่วนของระดับความรุนแรงของโรคในกลุ่ม LDD ขาดหายไปจำนวน 4 คน จึงทำให้เมื่อแบ่งข้อมูลตามระดับความรุนแรงของโรคแล้วได้ข้อมูลเพียง 46 คน

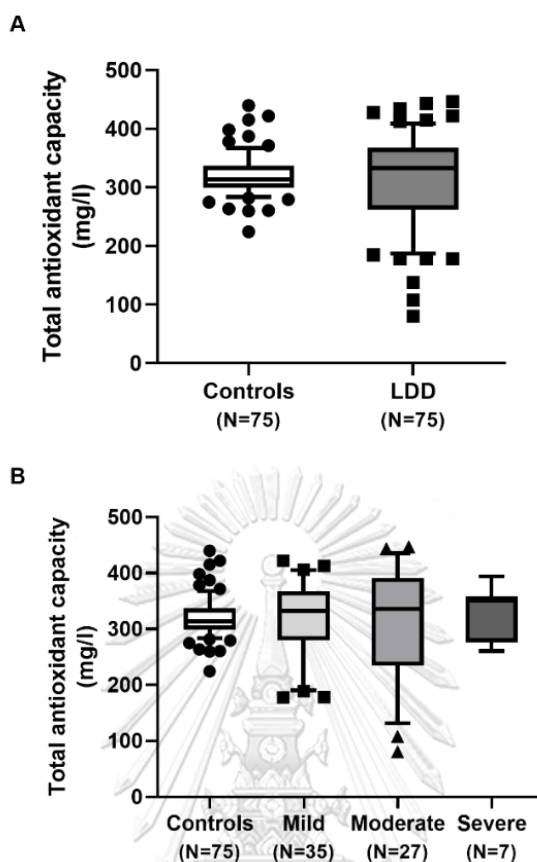
4.9 การศึกษาตรวจวัดระดับ Total antioxidant capacity (TAC) ในเลือด

4.9.1 การศึกษาตรวจวัดระดับ TAC ในพลาสมาของกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

ผลการศึกษาตรวจวัดระดับ TAC ในพลาสมาพบว่า ระดับ TAC ในพลาสมาของกลุ่มควบคุมจำนวน 75 รายมีค่าเท่ากับ 313.64 (298.90 – 336.91) mg/l ระดับ TAC ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมจำนวน 75 รายมีค่าเท่ากับ 332.30 (261.72 – 367.20) mg/l พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของระดับ TAC ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (รูปที่ 29A)

4.9.2 การศึกษาตรวจวัดระดับ TAC ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

ผลการศึกษาตรวจวัดระดับ TAC ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกันพบว่า ระดับ TAC ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) จำนวน 35 รายมีค่าเท่ากับ 332.30 (279.84 – 367.20) mg/l ระดับ TAC ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคปานกลาง (moderate) จำนวน 27 รายมีค่าเท่ากับ 335.94 (234.27 – 391.52) mg/l ระดับ TAC ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมากที่สุด (severe) จำนวน 7 รายมีค่าเท่ากับ 350.72 (276.04 – 358.36) mg/l เมื่อเปรียบเทียบระดับ TAC พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของระดับ TAC ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน (รูปที่ 29B)



รูปที่ 29 การศึกษาตรวจวัด Total antioxidant capacity (TAC) ในเลือด (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

*เนื่องจากข้อมูลในส่วนองระดับความรุนแรงของโรคในกลุ่ม LDD ขาดหายไปจำนวน 6 คน จึงทำให้เมื่อแบ่งข้อมูลตามระดับความรุนแรงของโรคแล้วได้ข้อมูลเพียง 69 คน

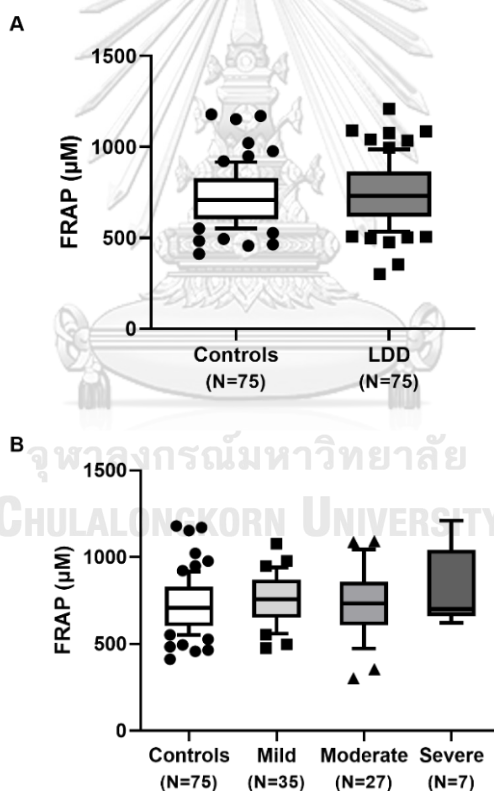
4.10 การศึกษาตรวจวัดระดับ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ในเลือด

4.10.1 การศึกษาตรวจวัดระดับ FRAP ในพลาสมาของกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

ผลการศึกษาตรวจวัดระดับ FRAP ในพลาสมาพบว่า ระดับ FRAP ในพลาสมาของกลุ่มควบคุมจำนวน 75 รายมีค่าเท่ากับ 708.57 (601.43 – 829.57) μM ระดับ FRAP ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมจำนวน 75 รายมีค่าเท่ากับ 730.43 (615.07 – 866.00) μM พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของระดับ FRAP ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (รูปที่ 30A)

4.10.2 การศึกษาตรวจวัดระดับ FRAP ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

ผลการศึกษาตรวจวัดระดับ FRAP ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกันพบว่า ระดับ FRAP ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) จำนวน 35 รายมีค่าเท่ากับ 756.43 (650.57 – 870.29) μM ระดับ FRAP ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคปานกลาง (moderate) จำนวน 27 รายมีค่าเท่ากับ 733.07 (606.43 – 858.71) μM ระดับ FRAP ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมากที่สุด (severe) จำนวน 7 รายมีค่าเท่ากับ 700.00 (659.29 – 1,041.43) μM เมื่อเปรียบเทียบระดับ FRAP ในพลาสมา พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของระดับ FRAP ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน (รูปที่ 30B)



รูปที่ 30 การศึกษาตรวจวัด Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ในเลือด (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

*เนื่องจากข้อมูลในส่วนองระดับความรุนแรงของโรคในกลุ่ม LDD ขาดหายไปจำนวน 6 คน จึงทำให้เมื่อแบ่งข้อมูลตามระดับความรุนแรงของโรคแล้วได้ข้อมูลเพียง 69 คน

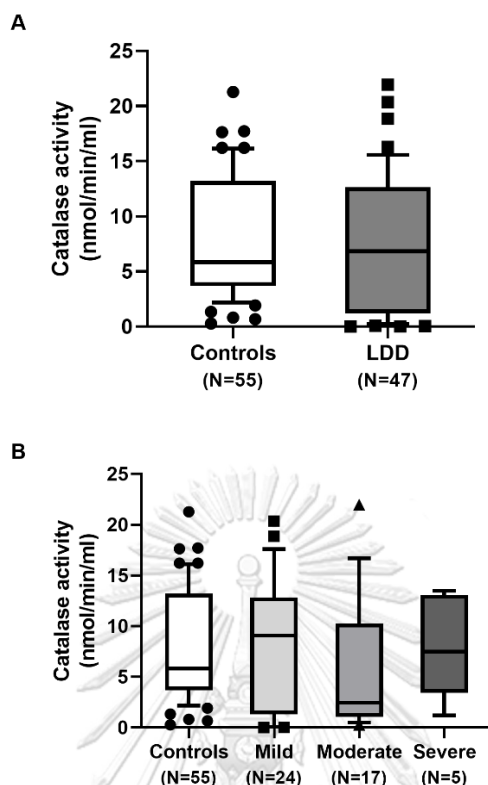
4.11 การศึกษาตรวจวัดค่า Catalase activity ในเลือด

4.11.1 การศึกษาตรวจวัดค่า catalase activity ในเลือดของกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

ผลการศึกษาตรวจวัดค่า catalase activity ในเลือดพบว่า กลุ่มควบคุมจำนวน 55 รายมีค่า catalase activity เท่ากับ 5.83 (3.67 – 13.23) nmol/min/ml กลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมจำนวน 47 รายมีค่า catalase activity เท่ากับ 6.83 (1.23 – 12.64) nmol/min/ml พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของค่า catalase activity ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (รูปที่ 31A)

4.11.2 การศึกษาตรวจวัด catalase activity ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

ผลการศึกษาตรวจวัด catalase activity ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกันพบว่า กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) จำนวน 24 รายมีค่า catalase activity เท่ากับ 9.07 (1.32 – 12.83) nmol/min/ml กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคปานกลาง (moderate) จำนวน 17 รายมีค่า catalase activity เท่ากับ 2.44 (1.05 – 10.23) nmol/min/ml กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมากที่สุด (severe) จำนวน 5 รายมีค่า catalase activity เท่ากับ 7.49 (3.43 – 13.10) nmol/min/ml เมื่อเปรียบเทียบ catalase activity พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของค่า catalase activity ในเลือดระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน (รูปที่ 31B)



รูปที่ 31 การศึกษาตรวจวัดค่า Catalase activity ในเลือด (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

*เนื่องจากตัวอย่างเลือดบางส่วนในทั้ง 2 กลุ่มไม่สามารถตรวจวัดค่า catalase activity ได้ จึงทำให้จำนวนคนในกลุ่ม controls เหลือ 55 คน และกลุ่ม LDD เหลือ 47 คน

**เนื่องจากข้อมูลในส่วนองระดับความรุนแรงของโรคในกลุ่ม LDD ขาดหายไปจำนวน 1 คน จึงทำให้เมื่อแบ่งข้อมูลตามระดับความรุนแรงของโรคแล้วได้ข้อมูลเพียง 46 คน

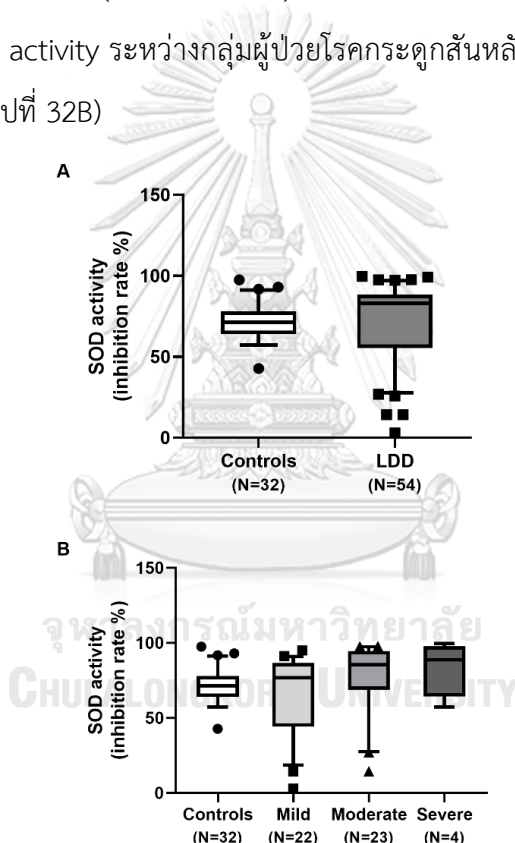
4.12 การศึกษาตรวจวัดค่า Superoxide dismutase (SOD) activity ในเลือด

4.12.1 การศึกษาตรวจวัดค่า SOD activity ในเลือดของกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

ผลการศึกษาตรวจวัด SOD activity ในเลือดพบว่า กลุ่มควบคุมจำนวน 32 รายมีค่า SOD activity เท่ากับร้อยละ 71.26 (64.11 – 78.05) กลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมจำนวน 54 รายมีค่า SOD activity เท่ากับร้อยละ 83.08 (55.43 – 88.54) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของค่า SOD activity ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (รูปที่ 32A)

4.12.2 การศึกษาตรวจวัดค่า SOD activity ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

ผลการศึกษาดูตรวจวัดค่า SOD activity ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกันพบว่า กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) จำนวน 22 รายมีค่า SOD activity เท่ากับร้อยละ 76.98 (44.13 – 86.65) กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคปานกลาง (moderate) จำนวน 23 รายมีค่า SOD activity เท่ากับร้อยละ 85.58 (68.74 – 94.65) กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมามากที่สุด (severe) จำนวน 4 รายมีค่า SOD activity เท่ากับร้อยละ 88.82 (64.29 – 97.72) เมื่อเปรียบเทียบค่า SOD activity พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของ SOD activity ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน (รูปที่ 32B)



รูปที่ 32 การศึกษาตรวจวัดค่า superoxide dismutase (SOD) activity ในเลือด (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

*เนื่องจากตัวอย่างเลือดบางส่วนในทั้ง 2 กลุ่มไม่สามารถตรวจวัดค่า SOD activity ได้ จึงทำให้จำนวนคนในกลุ่ม controls เหลือ 32 คน และกลุ่ม LDD เหลือ 54 คน

**เนื่องจากข้อมูลในส่วนองระดับความรุนแรงของโรคในกลุ่ม LDD ขาดหายไปจำนวน 5 คน จึงทำให้เมื่อแบ่งข้อมูลตามระดับความรุนแรงของโรคแล้วได้ข้อมูลเพียง 49 คน

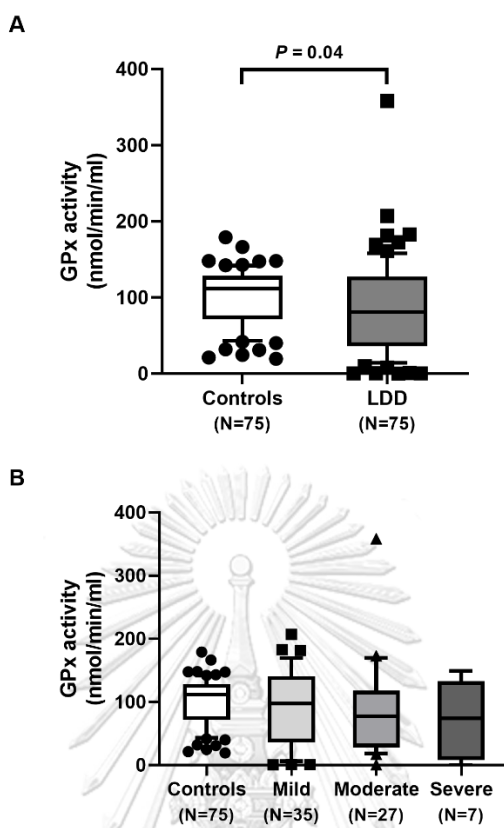
4.13 การศึกษาตรวจวัดค่า Glutathione peroxidase (GPx) activity ในเลือด

4.13.1 การศึกษาตรวจวัด GPx activity ในเลือดกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

ผลการศึกษาตรวจวัด GPx activity ในเลือดพบว่า กลุ่มควบคุมจำนวน 75 รายมีค่า GPx activity เท่ากับ 111.92 (71.68 – 128.32) nmol/min/ml กลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมจำนวน 75 รายมีค่า GPx activity เท่ากับ 80.81 (36.25 – 127.55) nmol/min/ml พบว่าค่า GPx activity ในกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.04$) (รูปที่ 33A)

4.13.2 การศึกษาตรวจวัดค่า GPx activity ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

ผลการศึกษาตรวจวัดค่า GPx activity ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกันพบว่า กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคล็กน้อย (mild) จำนวน 35 รายมีค่า GPx activity เท่ากับ 97.44 (36.25 – 140.96) nmol/min/ml กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคปานกลาง (moderate) จำนวน 27 รายมีค่า GPx activity เท่ากับ 77.51 (28.03 – 117.89) nmol/min/ml กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมากที่สุด (severe) จำนวน 7 รายมีค่า GPx activity เท่ากับ 74.16 (8.03 – 132.88) nmol/min/ml เมื่อเปรียบเทียบค่า GPx activity พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของค่า GPx activity ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน (รูปที่ 33B)



รูปที่ 33 การศึกษาตรวจวัด glutathione peroxidase (GPx) activity ในเลือด (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

*เนื่องจากข้อมูลในส่วนของระดับความรุนแรงของโรคในกลุ่ม LDD ขาดหายไปจำนวน 6 คน จึงทำให้เมื่อแบ่งข้อมูลตามระดับความรุนแรงของโรคแล้วได้ข้อมูลเพียง 69 คน

4.14 การศึกษาประเมินคะแนน Oxidative status

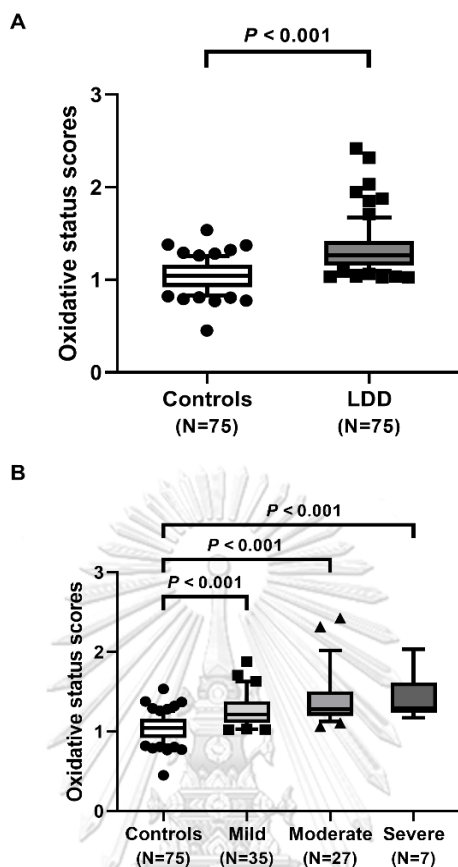
ผลการศึกษาประเมินคะแนน oxidative status แสดงในรูปแบบของค่าดัชนี Antiox-S:Proxy-S ซึ่งสามารถคำนวณได้ดังนี้ นำค่า antioxidant score (Antiox-S) มาคำนวณ oxidative status scores โดยอาศัย antioxidant parameters ในพลาสมา (TAC, FRAP, GPx activity) และ score related to oxidative damage (Proxy-S) โดยอาศัย oxidative stress parameters ในพลาสมา (protein carbonyl, 8-OHdG, MDA, nitrite)

4.14.1 การศึกษาประเมินคะแนน oxidative status ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

ผลการศึกษาประเมินคะแนน oxidative status พบว่ากลุ่มควบคุมจำนวน 75 ราย พบว่าคะแนน oxidative status เท่ากับ 1.04 (0.92 – 1.16) กลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมจำนวน 75 รายมีคะแนน oxidative status เท่ากับ 1.26 (1.15 – 1.42) พบว่าคะแนน oxidative status ในกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื้อมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) (รูปที่ 34A)

4.14.2 การศึกษาประเมินคะแนน oxidative status ในกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

ผลการศึกษาประเมินคะแนน oxidative status ในกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกันพบว่า กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) จำนวน 35 รายมีคะแนน oxidative status เท่ากับ 1.22 (1.11 – 1.38) กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคปานกลาง (moderate) จำนวน 27 รายมีคะแนน oxidative status เท่ากับ 1.28 (1.20 – 1.51) กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมากที่สุด (severe) จำนวน 7 รายมีคะแนน oxidative status เท่ากับ 1.29 (1.24 – 1.62) เมื่อเปรียบเทียบคะแนน oxidative status พบว่าคะแนน oxidative status ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคระดับเล็กน้อย ปานกลาง และมากที่สุด ไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 34B)



รูปที่ 34 การศึกษาประเมินคะแนน oxidative status (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

*เนื่องจากข้อมูลในส่วนองระดับความรุนแรงของโรคในกลุ่ม LDD ขาดหายไปจำนวน 6 คน จึงทำให้เมื่อแบ่งข้อมูลตามระดับความรุนแรงของโรคแล้วได้ข้อมูลเพียง 69 คน

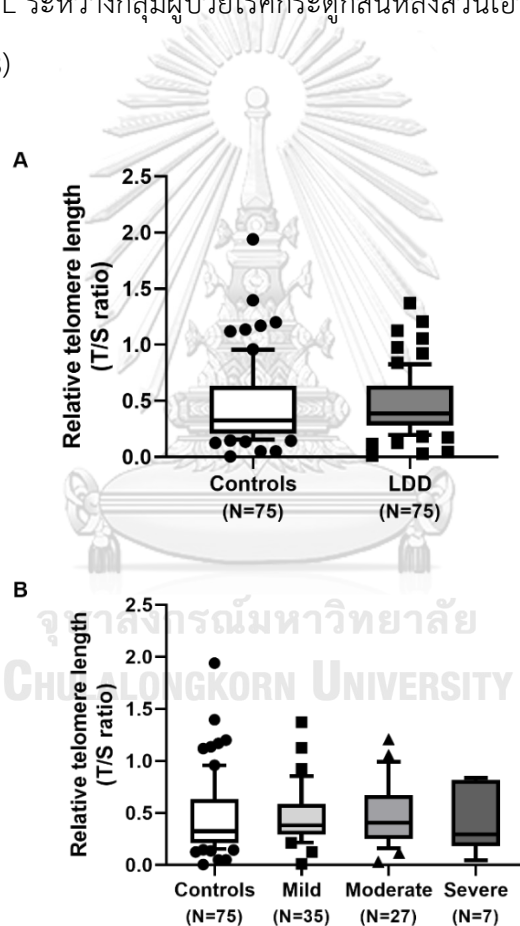
4.15 การศึกษาความยาวเทโลเมียร์ (Relative telomere length; RTL) ในเลือด

4.15.1 การศึกษาค่า RTL ในเลือดของกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

ผลการศึกษา RTL ของเซลล์เม็ดเลือดขาวพบว่า กลุ่มควบคุมจำนวน 75 ราย พบว่าค่า RTL เท่ากับ 0.33 (0.21 – 0.63) กลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมจำนวน 75 รายมีค่า RTL เท่ากับ 0.39 (0.29 – 0.64) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันของความยาวเทโลเมียร์ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (รูปที่ 35A)

4.15.2 การศึกษาค่า RTL ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

ผลการศึกษาค่า RTL ในกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกันพบว่า กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) จำนวน 35 รายมีค่า RTL เท่ากับ 0.38 (0.29 – 0.59) กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคปานกลาง (moderate) จำนวน 27 รายมีค่า RTL เท่ากับ 0.41 (0.25 – 0.67) กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมากที่สุด (severe) จำนวน 7 รายมีค่า RTL เท่ากับ 0.29 (0.18 – 0.82) เมื่อเปรียบเทียบค่า RTL พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของค่า RTL ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน (รูปที่ 35B)



รูปที่ 35 การศึกษาค่า RTL ในเลือด (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (B) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

*เนื่องจากข้อมูลในส่วนองระดับความรุนแรงของโรคในกลุ่ม LDD ขาดหายไปจำนวน 6 คน จึงทำให้เมื่อแบ่งข้อมูลตามระดับความรุนแรงของโรคแล้วได้ข้อมูลเพียง 69 คน

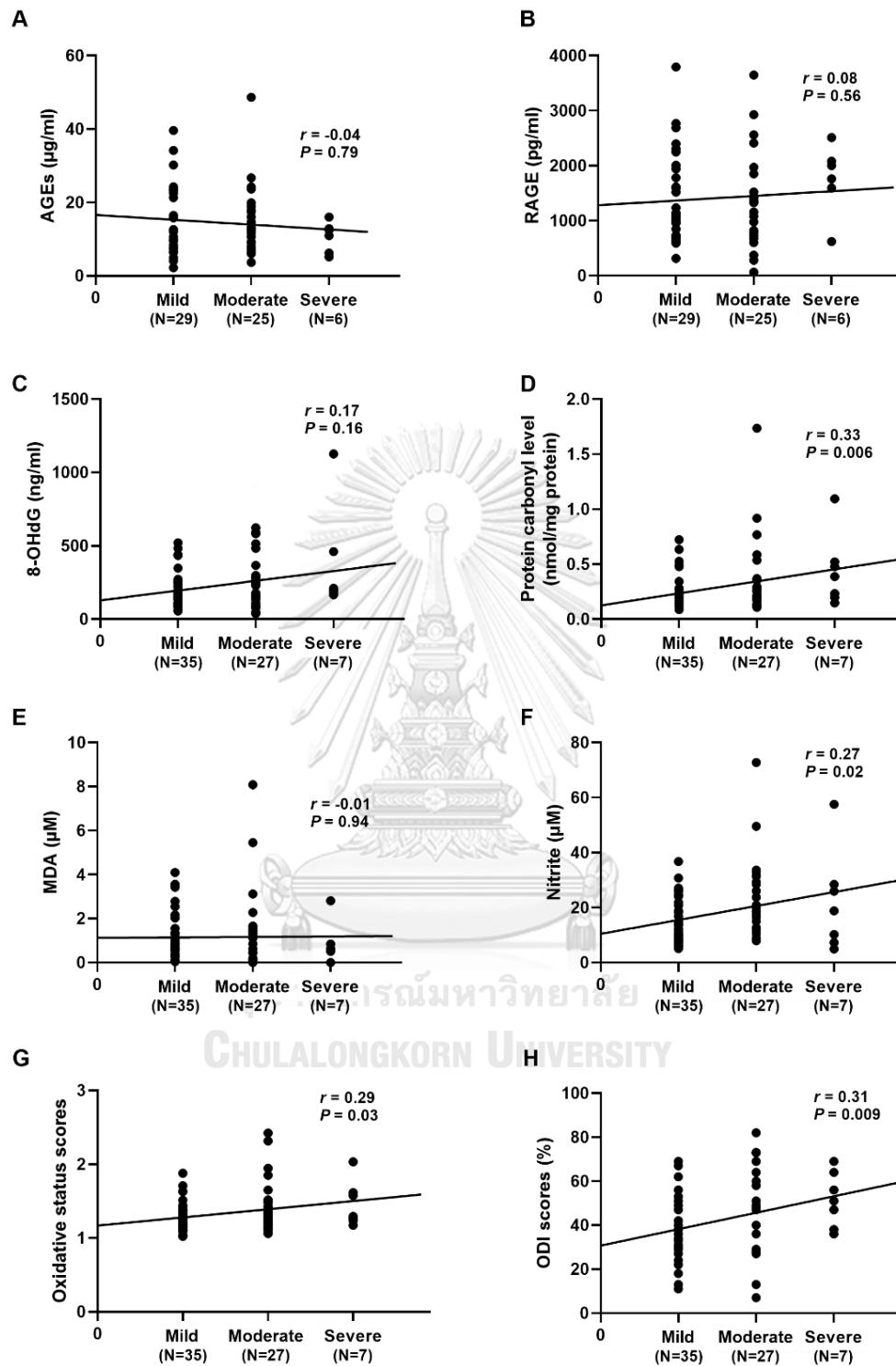
4.16 ความสัมพันธ์ระหว่างสารชีวเคมีที่ศึกษาในเลือดกับระดับความรุนแรงของโรค

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสารชีวเคมีที่ศึกษาในเลือดกับระดับความรุนแรงของโรค กระดูกล้างส่วนเอวเสื่อมโดยอาศัยเกณฑ์จากภาพถ่ายคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า MRI โดยการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (spearman's correlation coefficient หรือ r) เพื่อศึกษาระดับความสัมพันธ์ สามารถแปลผลได้ดังนี้ หากค่า r อยู่ระหว่าง 0.8 – 1 แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมาก หากค่า r อยู่ระหว่าง 0.5 – 0.8 แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันปานกลาง หากค่า r อยู่ระหว่าง 0.2 – 0.5 แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันเล็กน้อย และหากค่า r น้อยกว่า 0.2 แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์กันพบว่า ระดับ AGEs ในเลือดไม่มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรค (รูปที่ 36A) ระดับ RAGE ในเลือดไม่มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรค (รูปที่ 36B) ระดับ 8-OHdG ในเลือดไม่มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรค (รูปที่ 36C) ระดับ protein carbonyl ในเลือดมีความสัมพันธ์เล็กน้อยในเชิงบวกกับระดับความรุนแรงของโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.33, P = 0.006$) (รูปที่ 36D) ระดับ MDA ในเลือดไม่มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรค (รูปที่ 36E) ระดับ nitrite ในเลือดมีความสัมพันธ์เล็กน้อยในเชิงบวกกับระดับความรุนแรงของโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.27, P = 0.02$) (รูปที่ 36F) คะแนน oxidative status มีความสัมพันธ์เล็กน้อยในเชิงบวกกับระดับความรุนแรงของโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.29, P = 0.03$) (รูปที่ 36G) ค่าการประเมินอาการปวดหลัง ODI มีความสัมพันธ์เล็กน้อยในเชิงบวกกับระดับความรุนแรงของโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.31, P = 0.009$) (รูปที่ 36H) ระดับ TAC ในเลือดไม่มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรค (รูปที่ 37A) ระดับ FRAP ในเลือดไม่มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรค (รูปที่ 37B) ค่า catalase activity ในเลือดไม่มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรค (รูปที่ 37C) ค่า SOD activity ในเลือดมีความสัมพันธ์เล็กน้อยในเชิงบวกกับระดับความรุนแรงของโรคแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.25, P = 0.08$) (รูปที่ 37D) ค่า GPx activity ในเลือดไม่มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรค (รูปที่ 37E) ค่า RTL ในเลือดไม่มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรค (รูปที่ 37F) การแสดงออกของยีน iNOS ในเลือดไม่มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรค (รูปที่ 37G)

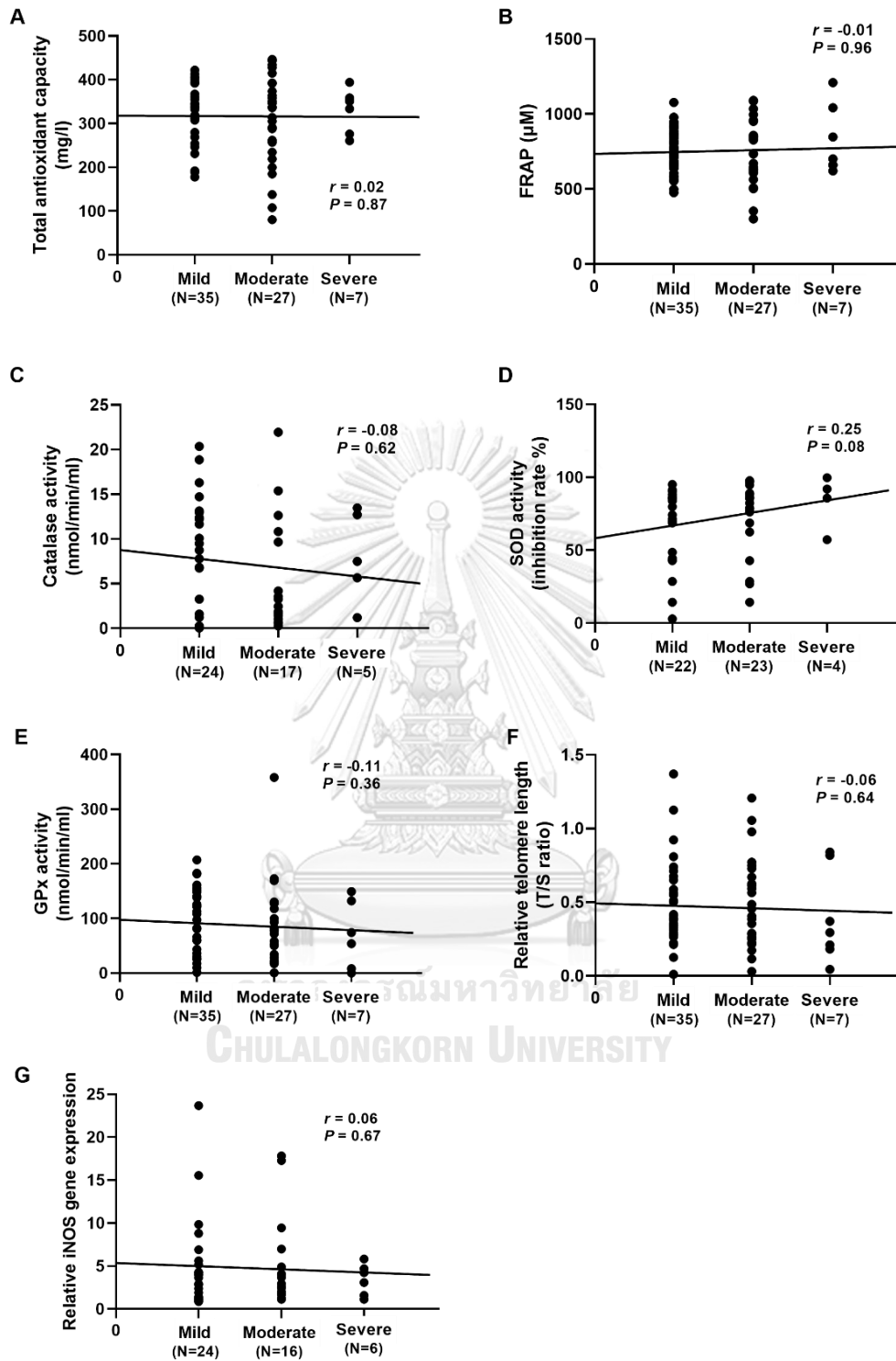
เมื่อนำระดับ protein carbonyl ในเลือด ระดับ nitrite ในเลือด คะแนน oxidative status และค่าการประเมินอาการปวดหลัง ODI ที่พบความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มาทำการศึกษาความสัมพันธ์ด้วยสถิติแบบ logistic regression โดยการควบคุมตัวแปรกวนคือ เพศ อายุ และดัชนีมวลกาย พบว่าระดับ protein carbonyl ในเลือดไม่มี

ความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรค (β coefficient (95% CI) = 16.79 (0.901 ถึง 312.74), $P = 0.06$) ระดับ nitrite ในเลือดมีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (β coefficient (95% CI) = 1.08 (1.01 ถึง 1.14), $P = 0.02$) คะแนน oxidative status มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (β coefficient (95% CI) = 9.62 (1.11 ถึง 83.28), $P = 0.04$) ค่าการประเมินอาการปวดหลัง ODI มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (β coefficient (95% CI) = 1.04 (1.01 ถึง 1.08), $P = 0.02$)





รูปที่ 36 ความสัมพันธ์ระหว่าง (A) AGEs, (B) RAGE, (C) 8-OHdG, (D) Protein carbonyl, (E) MDA, (F) Nitrite, (G) Oxidative status scores, (H) ODI scores กับความรุนแรงของโรค



รูปที่ 37 ความสัมพันธ์ระหว่าง (A) Total antioxidant capacity, (B) FRAP, (C) catalase activity, (D) SOD activity, (E) GPx activity, (F) Relative telomere length, (G) Relative iNOS gene expression กับความรุนแรงของโรค

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

โรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมเป็นโรคที่พบได้มากในผู้สูงอายุ เกิดจากความเสื่อมสภาพของหมอนรองกระดูกสันหลังส่วนเอวเมื่ออายุมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการอักเสบและความไม่มั่นคงของกระดูกสันหลังตามมา จนอาจทำให้เกิดการเคลื่อนของปล้องกระดูกขึ้นบนต่อชั้นล่างที่อยู่ติดกัน เรียกว่า ปล้องกระดูกสันหลังส่วนเอวเคลื่อน อีกทั้งความเสื่อมของหมอนรองกระดูกสันหลังอาจส่งผลให้เกิดการงอกของกระดูก (osteophyte) และการหนาตัวของเนื้อเยื่อ ligamentum flavum จนเกิดโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ ทำให้เกิดอาการปวดบริเวณหลังส่วนล่าง ปวดร้าวลงขา กล้ามเนื้ออ่อนแรง ทำให้เคลื่อนไหวลำบากจนไม่สามารถดำเนินชีวิตประจำวันได้ตามปกติ โดยปัจจัยที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคคือภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) (56) และ advanced glycation end products (AGEs) (30, 31) คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม และคนปกติที่มีสุขภาพดี เพื่อศึกษาบทบาทของ AGEs, RAGE ตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชัน ระดับสารต้านอนุมูลอิสระ และความยาวเทโลเมียร์ในเลือดของผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

การศึกษานี้แบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุมซึ่งเป็นคนปกติที่มีสุขภาพดี (controls) และกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (LDD) ซึ่งเป็นผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีอาการปวดหลัง และ/หรืออาการปวดร้าวลงขา พบว่าอัตราส่วนระหว่างเพศชายต่อเพศหญิงไม่ได้แตกต่างกัน สำหรับอายุเฉลี่ยจากการเปรียบเทียบทางสถิติพบว่าอายุของทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน สำหรับดัชนีมวลกายของทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน อีกทั้งได้ทำการแบ่งกลุ่มผู้ป่วยตามระดับความรุนแรงของโรคได้ดังนี้ กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคลดน้อย (mild) จำนวน 35 ราย กลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคปานกลาง (moderate) จำนวน 27 ราย และกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมามากที่สุด (severe) จำนวน 7 ราย

จากการศึกษาระดับพลาสมา AGEs พบว่าระดับ AGEs ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยออกตามระดับความรุนแรงของโรค พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของระดับ AGEs ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน จากการศึกษาดังกล่าวได้พบว่าค่า AGEs ที่

สูงขึ้นกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับของ NOD-, LRR- and pyrin domain containing protein 3 (NLRP3) inflammasome, pro interleukin 1 beta (pro-IL-1 β), cleaved-caspase-1, และ IL-1 β ซึ่งนำไปสู่การกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ อีกทั้ง AGEs และ IL-1 β ที่สูงขึ้นส่งผลให้การแสดงออกของ matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) และ matrix metalloproteinase 13 (MMP-13) เพิ่มขึ้น และ collagen type II alpha-1 (COL2A1) ลดลง แสดงถึงการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการสลายโปรตีน (catabolic activity) และการลดลงของคอลลาเจน (anabolic activity) ในหมอนรองกระดูกสันหลังนำไปสู่การเกิดหมอนรองกระดูกสันหลังเสื่อม ในทางกลับกัน อาจกล่าวได้ว่าการเกิดการเสื่อมของหมอนรองกระดูกสันหลังทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน จนเกิดการเพิ่มขึ้นของปฏิกิริยาไกลเคชัน (glycation reaction) ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ AGEs (57) จึงทำให้พบค่า AGEs สูงในกลุ่ม LDD มากกว่ากลุ่ม controls

จากการศึกษาระดับพลาสมา RAGE พบว่าระดับ RAGE ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยออกตามระดับความรุนแรงของโรค พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของระดับ RAGE ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน จากการศึกษาอาจอธิบายได้ว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคหมอนรองกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีการสะสมของ AGEs ส่งผลกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ RAGE เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นเหตุทำให้เกิดความเสียหายของเซลล์จากการที่มีการสร้าง ROS หรือสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบมากเกินไป การจับกันของ AGEs และ RAGE กระตุ้น JNK/p38 PPAR- α และ NF- κ B ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการอักเสบและการตอบสนองต่อภาวะเครียดออกซิเดชัน ในโรคข้อเสื่อม สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าระดับ RAGE มีค่าปกติในภาวะปกติ แต่มีค่าสูงขึ้นเมื่อมีภาวะของโรคต่าง ๆ เช่น โรคหมอนรองกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม โรคเบาหวาน โรคไตวายเรื้อรัง โรคพาร์กินสัน หรือโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (58) เป็นไปในทางเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ชี้ให้เห็นว่า AGEs มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ MMP-2 และ RAGE ที่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าการสะสมของ AGEs ที่มากขึ้นกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มขึ้นของตัวรับ RAGE และเอนไซม์ที่ใช้ในการสลายโปรตีนในหมอนรองกระดูกสันหลังซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหมอนรองกระดูกสันหลังเสื่อม (59) จึงทำให้พบค่า RAGE สูงในกลุ่ม LDD มากกว่ากลุ่ม controls

ในส่วนของตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชันมีดังนี้ จากการศึกษาระดับพลาสมา 8-OHdG พบว่าระดับ 8-OHdG ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยออกตามระดับความรุนแรงของโรค พบว่าไม่มี

ความแตกต่างกันของระดับ 8-OHdG ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าชี้ให้เห็นว่าเนื้อเยื่อ ligamentum flavum ที่หนาตัวมีความสัมพันธ์กับระดับ 8-OHdG ที่มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อ ligamentum flavum ที่ไม่หนาตัวในผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ (12) ระดับ 8-OHdG ที่สูงขึ้นแสดงถึงภาวะเครียดออกซิเดชันที่เพิ่มขึ้นและมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคหมอนรองกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม โรคเมเร็ง โรคที่สัมพันธ์กับอายุที่เพิ่มขึ้น โรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และโรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมของระบบประสาท (60) จากการศึกษานี้อาจกล่าวได้ว่า 8-OHdG ทำให้เกิดการเสียหายของ DNA ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม หรือการเกิดโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันซึ่งสามารถทำให้เกิดการเสียหายของ DNA จนทำให้ระดับของ 8-OHdG สูงขึ้น ดังนั้นในการศึกษานี้จึงพบว่าระดับ 8-OHdG ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่เป็นคนปกติมีสุขภาพดี

จากการศึกษาระดับพลาสมา protein carbonyl พบว่าระดับ protein carbonyl ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยออกตามระดับความรุนแรงของโรค พบว่าระดับ protein carbonyl ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคปานกลาง (moderate) มีค่าสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และระดับ protein carbonyl ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมากที่สุด (severe) มีค่าสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความแตกต่างกันระหว่างระดับ protein carbonyl ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคปานกลาง (moderate) กับกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมากที่สุด (severe) สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่าระดับซีรัม protein carbonyl มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับจำนวนเกล็ดเลือดในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมรูมาตอยด์ (61) จากการศึกษานี้อาจกล่าวได้ว่าการเพิ่มขึ้นของระดับ protein carbonyl บ่งชี้ถึงการสะสมของโปรตีนที่แตกหัก ทำให้หน้าที่ของโปรตีนในหมอนรองกระดูกสันหลัง เช่น คอลลาเจนเปลี่ยนไป ส่งผลให้หมอนรองกระดูกสันหลังสูญเสียความสามารถในการอุ้มน้ำ สูญเสียความยืดหยุ่น (elasticity) และมีความแข็งตัว (stiffness) เพิ่มขึ้น นำไปสู่การเสื่อมของหมอนรองกระดูกสันหลัง (62) จึงทำให้พบว่าระดับ protein carbonyl มีค่าสูงในกลุ่ม LDD มากกว่ากลุ่ม controls อาจใช้ protein carbonyl เป็นตัวชี้วัดในการเกิดความเสื่อมของหมอนรองกระดูกสันหลังได้

จากการศึกษาระดับพลาสมา MDA พบว่าระดับ MDA ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยออกตามระดับความรุนแรงของโรค พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของระดับ MDA ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ชี้ให้เห็นว่าระดับ MDA ในพลาสมาของผู้ป่วยโรคหมอนรองกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีค่าสูงกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี (56) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเป็นพลาสมาเหมือนกัน และศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยโรคหมอนรองกระดูกสันหลังเสื่อมเทียบกับกลุ่มควบคุมเหมือนกัน จึงทำให้ได้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน จากการศึกษานี้อาจระบุได้ว่าการเกิด lipid peroxidation ทำให้ระดับของ MDA สูงขึ้น มีผลให้หน้าที่ของออกแกเนลล์ต่าง ๆ เปลี่ยนไป มีความสัมพันธ์กับการตายของเซลล์ส่งผลให้เกิดโรคต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อมตามมาได้ (63) ในการศึกษาจึงพบว่าระดับพลาสมา MDA ซึ่งเป็นตัวชี้วัดการเกิด lipid peroxidation ในกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่เป็นคนปกติมีสุขภาพดี

จากการศึกษาระดับพลาสมา nitrite พบว่าระดับ nitrite ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยออกตามระดับความรุนแรงของโรค พบว่าระดับ nitrite ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคปานกลาง (moderate) มีค่าสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความแตกต่างกันของระดับ nitrite ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) กับกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมากที่สุด (severe) และกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคปานกลาง (moderate) กับกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมากที่สุด (severe) จากการศึกษานี้อาจอธิบายได้ว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีการอักเสบมากกว่ากลุ่มคนปกติ ส่งผลให้ค่า nitrite สูงกว่าคนปกติ เนื่องจาก nitric oxide ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดการทำลายกระดูกอ่อนและเมทริกซ์ในโรคข้ออักเสบ (64) โดย nitric oxide สลายตัวได้ nitrite เนื่องจาก nitric oxide เป็นสารที่สลายตัวไวในสารตัวอย่าง การศึกษานี้จึงทำการตรวจวัดระดับ nitrite ที่เป็นสารที่เสถียรและไม่สลายตัว อีกทั้งยังสามารถบ่งชี้ถึงระดับ nitric oxide ได้โดยตรง เป็นไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ชี้ให้เห็นว่าระดับ nitrite และ nitrate ในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบมีค่าสูงกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี (65)

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน iNOS พบว่าการแสดงออกของยีน iNOS ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยออกตามระดับความรุนแรงของโรค พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของการแสดงออกของยีน iNOS ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการแสดงออกของ iNOS ใน mononuclear cell ในเนื้อเยื่อที่ได้จากผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ (66) NF-kB กระตุ้นให้การแสดงออกของ iNOS เพิ่มขึ้นส่งผลกระตุ้นให้เกิดการอักเสบในหมอนรองกระดูกสันหลังได้ (67) จึงทำให้การศึกษานี้พบว่ากลุ่ม LDD มีการแสดงออกของยีน iNOS และระดับพลาสมา nitrite ที่บ่งชี้ถึง nitric oxide มากกว่ากลุ่ม controls เนื่องจาก iNOS ที่มากเกินไปจะเร่งให้เกิดการสร้าง nitric oxide ได้ จึงพบผลจากทั้งสองการศึกษาที่ไปในทางเดียวกัน (10)

ในส่วนของตัวชี้วัดความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระทั้งสองวิธีคือ TAC และ FRAP ดังนี้ จากการศึกษาระดับพลาสมา TAC พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของระดับพลาสมา TAC ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยออกตามระดับความรุนแรงของโรค พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของระดับพลาสมา TAC ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน และจากการศึกษาระดับพลาสมา FRAP พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของระดับพลาสมา FRAP ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยออกตามระดับความรุนแรงของโรค พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของระดับพลาสมา FRAP ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน ไม่สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ทำการตรวจวัด heme oxygenase-1 (HO-1) ซึ่งเป็นตัวชี้วัดสารต้านการอักเสบตัวหนึ่งในชั้นเนื้อของผู้ป่วยโรคหมอนรองกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมพบว่าระดับ HO-1 ในชั้นเนื้อของผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมามากที่สุด (severe) มีค่าสูงกว่าผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคเล็กน้อย (mild) (68) เนื่องจากตัวชี้วัดที่ทำการตรวจวัดต่างกัน อีกทั้งการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ทำการศึกษาในชั้นเนื้อในจุดที่เกิดโรคหมอนรองกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม ต่างกับการศึกษานี้ที่ทำการศึกษาในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย จึงอาจทำให้ไม่เห็นความแตกต่างของทั้งสองกลุ่ม

จากการศึกษาค่า catalase activity ในเลือดพบว่าไม่มีความแตกต่างกันของค่า catalase activity ในเลือดระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยออกตามระดับความรุนแรงของโรค พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของค่า catalase activity ใน

เลือดระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน ไม่สอดคล้องกับการศึกษาในปี พ.ศ. 2562 Şeyho Cem Yücetaş และคณะ ที่ได้ทำการศึกษาการ แสดงออกของ catalase ในเนื้อเยื่อ ligamentum flavum ที่หนาตัวจากผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสัน หลังส่วนเอวตีบแคบ เทียบกับเนื้อเยื่อ ligamentum flavum ที่ไม่หนาตัวจากผู้ป่วยโรคหมอนรอง กระดูกเคลื่อนทับเส้นประสาท (lumbar disc herniation) พบว่าการแสดงออกของ catalase ใน เนื้อเยื่อ ligamentum flavum ที่หนาตัวจากผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบน้อยกว่า เมื่อเทียบกับการแสดงออกของ catalase ในเนื้อเยื่อ ligamentum flavum ที่ไม่หนาตัวจากผู้ป่วย โรคหมอนรองกระดูกเคลื่อนทับเส้นประสาท (69) เนื่องจากตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาแตกต่างกัน การศึกษาก่อนหน้าเป็นการศึกษาในชิ้นเนื้อจากผู้ป่วย ในขณะที่การศึกษานี้เป็นการศึกษาในตัวอย่าง พลาสมาของมนุษย์ รวมถึงวิธีการศึกษาในการศึกษาก่อนหน้าเป็นการศึกษาการแสดงผลของ catalase ด้วยวิธี immunohistological analysis ในขณะที่การศึกษานี้ใช้วิธี biological assay โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า catalase activity ซึ่งตัวอย่างเลือดที่ ทำการศึกษาในการศึกษานี้มีบางตัวอย่างที่เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) จึงอาจมีผล รบกวนค่าการดูดกลืนแสงทำให้ไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ในตัวอย่างทั้งหมดที่ทำการศึกษา เมื่อนำมาเปรียบเทียบทางสถิติจึงไม่พบความแตกต่างในทั้งสองกลุ่ม

จากการศึกษาค่า SOD activity ในเลือดพบว่าไม่มีความแตกต่างกันของค่า SOD activity ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยออกตามระดับ ความรุนแรงของโรค พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของค่า SOD activity ในเลือดระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรค กระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน ไม่สอดคล้องกับการศึกษาในปี พ.ศ. 2557 Hou G. และคณะ ที่ได้ทำการทดลองในสัตว์ทดลองคือหนู โดยแบ่งออกเป็นสามกลุ่มคือ กลุ่ม เด็ก กลุ่มผู้ใหญ่ และกลุ่มสูงอายุ (70) พบว่าค่า SOD activity ในตัวอย่างซีรัมและชิ้นเนื้อหมอนรอง กระดูกสันหลังมีค่าลดลงในกลุ่มอายุที่มากขึ้น แตกต่างจากการศึกษานี้ที่พบว่าค่า SOD activity ไม่ ต่างกัน เนื่องจากการศึกษานี้ทำการศึกษาในตัวอย่างเลือดของมนุษย์ โดยกลุ่มที่ทำการศึกษามีอายุที่ เท่า ๆ กัน อีกทั้งยังบางตัวอย่างเลือดเกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง จึงอาจมีผลรบกวนค่าการดูดกลืน แสงทำให้ไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ในตัวอย่างทั้งหมดที่ทำการศึกษา เมื่อนำมาเปรียบเทียบ ทางสถิติจึงอาจทำให้ไม่พบความแตกต่างของค่า SOD activity

จากการศึกษาค่า GPx activity ในเลือดพบว่าค่า GPx activity ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรค กระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยออก

ตามระดับความรุนแรงของโรค พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของค่า GPx activity ในเลือดระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน จากการศึกษาอาจอธิบายได้ว่า GPx activity สามารถลดภาวะเครียดออกซิเดชัน ส่งผลให้เกิดการแก่ชราและการตายของเซลล์ nucleus pulposus น้อยลง (40) จึงทำให้ค่า GPx activity ในกลุ่ม LDD น้อยกว่ากลุ่ม controls สอดคล้องกันกับการศึกษาก่อนหน้าที่ชี้ให้เห็นว่าระดับ glutathione ซึ่งเป็นตัวชี้วัดสารต้านอนุมูลอิสระตัวหนึ่ง ในตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยโรคหมอนรองกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีค่าน้อยกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี (56) ผลการศึกษานี้และผลการศึกษาก่อนหน้ามีความสอดคล้องกัน เนื่องจากทำการศึกษาในตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมเหมือนกัน

จากการศึกษาค่า RTL ในเซลล์เม็ดเลือดขาวพบว่าไม่มีความแตกต่างกันของค่า RTL ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยออกตามระดับความรุนแรงของโรค พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของค่า RTL ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่ได้ทำการศึกษาความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์ nucleus pulposus จากผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัด จากการศึกษาไม่พบความแตกต่างของความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์ nucleus pulposus จากผู้ป่วยที่มีระดับความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน จากการศึกษาอาจอธิบายได้ว่ามีปัจจัยอื่น ๆ ที่ส่งผลต่อค่า RTL ในเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น อายุที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่า RTL ลดลง ในทางกลับกันค่า telomerase activity และการออกกำลังกายที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่า RTL สูงขึ้น ซึ่งการศึกษานี้ไม่ได้ทำการตรวจวัดค่า telomerase activity ไม่ได้เก็บข้อมูลในส่วนของการออกกำลังกายของอาสาสมัคร และอายุของอาสาสมัครทั้งสองกลุ่มมีค่าใกล้เคียงกัน จึงอาจทำให้ไม่พบความแตกต่างของค่า RTL (52) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้าที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ในเชิงลบระหว่างระดับความเสื่อมของเนื้อเยื่อหมอนรองกระดูกสันหลังกับความยาวเทโลเมียร์ เนื้อเยื่อที่มีระดับความเสื่อมของหมอนรองกระดูกสันหลังมากกว่าจะมีการหดสั้นของเทโลเมียร์มากกว่า (15) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการศึกษาก่อนหน้าใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อจากหมอนรองกระดูกสันหลังซึ่งเป็นจุดที่เกิดโรค แต่การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างเลือดซึ่งอาจมีปัจจัยอื่นรบกวนทำให้ค่า RTL ไม่แตกต่างกันในสองกลุ่ม อีกทั้งเมื่อแบ่งตามระดับความรุนแรงของโรคแล้วพบว่าผู้ป่วยที่มีระดับความรุนแรงของโรคแตกต่างกันมีสัดส่วนที่ไม่เท่ากัน จึงอาจส่งผลต่อการคำนวณค่าทางสถิติ และไม่สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่รายงานว่าเนื้อเยื่อ ligamentum flavum ที่หน้าตัวมีความสัมพันธ์กับค่า RTL ที่สั้นลงเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อ ligamentum flavum ที่หน้าตัวในผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ (Lumbar spinal stenosis) (12) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ

ตัวอย่างในการศึกษานี้และการศึกษาก่อนหน้าไม่เหมือนกัน การศึกษาก่อนหน้าเป็นการตรวจวัดค่า RTL จากเนื้อเยื่ออาจสะท้อนถึงกลไกการเกิดโรคได้มากกว่าการศึกษานี้ที่เป็นการตรวจวัดค่า RTL จากเลือด

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสารชีวเคมีที่ศึกษาในเลือดกับระดับความรุนแรงของโรคที่แตกต่างกัน พบว่าระดับ protein carbonyl ในเลือด ระดับ nitrite ในเลือด คะแนน oxidative status มีความสัมพันธ์เล็กน้อยในเชิงบวกกับระดับความรุนแรงของโรค อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจเป็นตัวชี้วัดที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการทำนายระดับความรุนแรงของโรคได้ และค่าการประเมินอาการปวดหลัง ODI มีความสัมพันธ์เล็กน้อยในเชิงบวกกับระดับความรุนแรงของโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเป็นตัวชี้วัดที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการทำนายระดับความรุนแรงของโรคที่ไม่ต้องใช้งบประมาณเยอะ เนื่องจากค่าประเมินอาการปวดหลัง ODI เป็นค่าที่ได้จากการสอบถามผู้ป่วยตามแบบสอบถามเพื่อประเมินอาการปวดหลังต่อการดำเนินชีวิตประจำวัน ค่า SOD activity ในเลือดมีความสัมพันธ์เล็กน้อยในเชิงบวกกับระดับความรุนแรงของโรคแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนระดับ AGEs ในเลือด ระดับ RAGE ในเลือด ระดับ 8-OHdG ในเลือด ระดับ MDA ในเลือด ระดับ TAC ในเลือด ระดับ FRAP ในเลือด ค่า catalase activity ในเลือด และค่า GPx activity ในเลือดไม่พบความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรคโดยอาศัยเกณฑ์จากภาพถ่ายคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า

การศึกษานี้ยังมีข้อจำกัดที่ควรคำนึงถึงคือ การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบ cross-sectional study และเมื่อแบ่งกลุ่มย่อยตามระดับความรุนแรงของโรคในกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมแล้วพบว่ามีความถี่ของผู้ป่วยในแต่ละกลุ่มที่น้อยและไม่เท่ากันจึงอาจส่งผลกระทบต่อผลการคำนวณทางสถิติ ดังนั้นจึงควรศึกษาแบบ prospective cohort study หรือ clinical trials study โดยให้มีจำนวนผู้ป่วยในแต่ละกลุ่มของระดับความรุนแรงของโรคที่มีจำนวนมากพอและมีจำนวนเท่า ๆ กัน โดยอาจแบ่งให้มีจำนวนกลุ่มละ 30 คน ข้อจำกัดข้อถัดมาคือ การศึกษานี้ไม่ได้เก็บรวบรวมข้อมูลในด้านของวิถีการดำเนินชีวิตประจำวันของแต่ละบุคคล เช่น พฤติกรรมการรับประทานอาหาร (71) และการออกกำลังกาย (72) และโรคร่วมที่ส่งผลกระทบต่อตัวชี้วัดที่ตรวจวัดในการศึกษานี้ อีกทั้งการศึกษานี้เป็นการตรวจวัดตัวชี้วัดในตัวอย่างเลือด ซึ่งไหลเวียนทั่วร่างกาย อาจมีโรคอื่น ๆ ที่ส่งผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงของสารที่อยู่ในเลือดได้ เช่น โรคหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน รวมถึงปัจจัยอื่น ๆ เช่น การดื่มแอลกอฮอล์ การสูบบุหรี่ (73) เป็นต้น ดังนั้นการศึกษานในอนาคตควรศึกษาในเนื้อเยื่อหรือเซลล์ โดยการนำเนื้อเยื่อจากหมอนรองกระดูกสันหลังของผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วน

เอวเสื่อมาทำการศึกษาโดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนแรกนำเนื้อเยื่อมาทำการศึกษาตรวจวัดระดับ AGEs ระดับ RAGE ระดับตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชัน เช่น ระดับ protein carbonyl ระดับ MDA และระดับ nitrite ตรวจวัดระดับสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น ค่า catalase activity ในเลือด ค่า SOD activity ในเลือด และค่า GPx activity ในเลือด และค่า RTL สำหรับส่วนที่สองนำเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงเซลล์แล้วทำการแบ่งกลุ่มออกเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ทำการกระตุ้นเพื่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันจากนั้นทำการศึกษาตรวจวัดระดับ AGEs ระดับ RAGE ระดับตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชัน เช่น ระดับ protein carbonyl ระดับ MDA และระดับ nitrite ตรวจวัดระดับสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น ค่า catalase activity ค่า SOD activity ค่า GPx activity และค่า RTL เพื่ออธิบายถึงบทบาทของ AGEs RAGE ภาวะเครียดออกซิเดชัน สารต้านอนุมูลอิสระ และความยาวเทโลเมียร์ต่อกลไกการเกิดโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อ ข้อจำกัดสุดท้ายคือ การตรวจวัดที่ใช้ในการศึกษานี้ อาจเป็นการตรวจวัดที่ไม่สามารถบอกภาวะในร่างกายได้ เช่น FRAP assay เป็นการตรวจวัดที่ต้องใช้ค่า pH ต่ำกว่า 7.4 ซึ่งเป็นภาวะที่มีความเป็นกรดมากกว่าในร่างกายมนุษย์ อาจทำให้ค่าที่ตรวจวัดไม่สะท้อนถึงภาวะจริงในร่างกาย อีกทั้งการศึกษานี้ไม่มีการตรวจวัดระดับสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ จึงควรการตรวจวัดระดับสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการอื่นเพิ่มเติม เช่น ระดับวิตามินซี ระดับวิตามินอี เป็นต้น สำหรับการศึกษากการแสดงออกของยีนในเลือดในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจวัดยีน iNOS เพียงตัวเดียว การศึกษาในอนาคตจึงอาจต้องศึกษาการแสดงออกของยีนอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น NADPH oxidase (NOX) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน NADPH ให้เป็น NADP^+ ควบคู่ไปกับปฏิกิริยาการเปลี่ยน O_2 ให้เป็น O_2^- ซึ่งเป็น reactive oxygen species ทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (74)

กล่าวโดยสรุป การศึกษาบทบาทของ advanced glycation end products และภาวะเครียดออกซิเดชันในโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อ พบว่าระดับพลาสมา AGEs, ระดับพลาสมา RAGE, ระดับพลาสมา 8-OHdG, ระดับพลาสมา protein carbonyl, ระดับพลาสมา MDA, และระดับพลาสมา nitrite การแสดงออกของยีน iNOS ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมีค่าสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ค่า GPx activity ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมีค่าต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อีกทั้งยังพบว่าระดับพลาสมา protein carbonyl และระดับพลาสมา nitrite มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรคที่เพิ่มขึ้น จากภาพถ่ายคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า จากผลการทดลองพบว่าระดับพลาสมา protein carbonyl และระดับพลาสมา nitrite อาจเป็นตัวชี้วัดหนึ่งที่ใช้ในการบอกระดับความรุนแรงของโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อได้



แบบสอบถามข้อมูลผู้ป่วย

อันดับที่ _____

วันที่ ____ / ____ / ____

Data record form

Research title: Predictive factors for outcome of lumbar epidural steroid injection in low back pain: a prospective analytic study

1. Age _____ years old
2. Gender male female
3. BMI _____ (BW _____ kg, Height _____ cm)
4. Diagnosis: HNP L2-3 L3-4 L4-5 L5-S1 left/right side
5. Pain character: LBP/buttock pain LBP with sciatic pain leg pain/sciatica pain
6. Pain score (visual analog scale; VAS 0-10) average _____, maximum _____
7. Duration of pain _____ months
 acute (\leq 1 month) subacute (1-3 months) chronic (\geq 3 months)
8. Neurogenic claudication no yes, _____ meters
9. SLRT (positive between 30-70°) no yes
10. Weakness no yes
11. MRI findings: bulging protrusion extrusion sequestration
12. MRI: nerve root compression no yes
13. MRI: foraminal stenosis no yes
14. MRI: central canal stenosis mild moderate severe
15. MRI: spondylolisthesis no yes
16. Oswestry Disability Index (ODI) (100%) _____

แบบสอบถามเพื่อประเมินอาการปวดหลังต่อการดำเนินชีวิตประจำวัน (ODI)

อันดับที่ _____

วันที่ ____ / ____ / ____

แบบสอบถามเพื่อประเมินอาการปวดหลังต่อการดำเนินชีวิตประจำวัน (ฉบับภาษาไทย)

กรุณาตอบแบบสอบถามทุกข้อโดยทำเครื่องหมาย ✓ ลงใน เพียงช่องเดียวที่สามารถอธิบายอาการได้ใกล้เคียงกับอาการของท่านมากที่สุด

1. ความรุนแรงของอาการปวด

- อาการปวดของฉันพอทนได้โดยไม่ต้องใช้ยา (0)
- อาการปวดของฉันแย่มาก แต่ฉันก็จัดการได้โดยไม่ต้องใช้ยา (1)
- ยาแก้ปวดช่วยลดอาการปวดได้ทั้งหมด (2)
- ยาแก้ปวดช่วยลดอาการปวดได้บางส่วน (ประมาณครึ่งหนึ่ง) (3)
- ยาแก้ปวดช่วยลดอาการปวดได้เล็กน้อย (4)
- ยาแก้ปวดไม่ช่วยลดอาการปวดและฉันไม่ได้ใช้ยาแก้ปวดนั้น (5)

2. การดูแลตัวเองในชีวิตประจำวัน (อาบน้ำ, แต่งตัว เป็นต้น)

- ฉันสามารถอาบน้ำ, แต่งตัว ได้เหมือนปกติ โดยไม่ทำให้อาการปวดมากขึ้น (0)
- ฉันสามารถอาบน้ำ, แต่งตัว ได้เหมือนปกติ แต่ทำให้มีอาการปวดเกิดขึ้น (1)
- ฉันสามารถอาบน้ำ, แต่งตัว ได้ แต่ต้องเป็นไปอย่างช้า ๆ และระมัดระวัง เพราะทำให้มีอาการปวด (2)
- ฉันสามารถอาบน้ำ, แต่งตัว ได้ แต่ต้องมีผู้ช่วยเหลือบ้างบางส่วน (3)
- ฉันสามารถอาบน้ำ, แต่งตัว ได้ แต่ต้องมีผู้ช่วยเหลือเกือบทั้งหมด (4)
- ฉันไม่สามารถอาบน้ำ, แต่งตัว ได้เอง และต้องอยู่แต่บนเตียง (5)

3. การยกของ

- ฉันสามารถยกของหนักได้โดยไม่มีอาการปวดมากขึ้น (0)
- ฉันสามารถยกของหนักได้ แต่ทำให้เกิดอาการปวดมากขึ้น (1)
- ฉันไม่สามารถยกของหนักจากพื้นได้ แต่ถ้าของหนักอยู่สูงระดับโต๊ะฉันจะสามารถยกของหนักนั้นได้ (2)
- ฉันไม่สามารถยกของหนักจากพื้นได้ แต่ถ้าของหนักอยู่สูงระดับโต๊ะ ฉันจะสามารถยกของได้แต่น้ำหนักของต้องไม่มากนัก (3)
- ฉันสามารถยกได้แต่ของน้ำหนักเบา ๆ (4)
- ฉันไม่สามารถยกของได้เลย (5)

4. การเดิน

- ฉันสามารถเดินได้ระยะทางเหมือนปกติโดยไม่มีอาการปวด (0)
- อาการปวดทำให้ฉันสามารถเดินได้ระยะทางไม่เกิน 1.6 กิโลเมตร (ประมาณ 5 ป้ายรถเมล์) (1)
- อาการปวดทำให้ฉันสามารถเดินได้ระยะทางไม่เกิน 800 เมตร (ประมาณ 2 ป้ายรถเมล์) (2)
- อาการปวดทำให้ฉันสามารถเดินได้ระยะทางไม่เกิน 400 เมตร (ประมาณ 1 ป้ายรถเมล์) (3)
- ฉันสามารถเดินได้แต่ต้องใช้เครื่องช่วยเดิน เช่น ไม้เท้า, ไม้ค้ำพุง (4)
- ฉันต้องอยู่แต่บนเตียง แต่ต้องคลานเวลาจะไปห้องน้ำ (5)

5. การนั่ง

- ฉันสามารถนั่งได้นานเหมือนปกติโดยไม่มีอาการปวด (0)
- ฉันสามารถนั่งได้นานเหมือนปกติโดยไม่มีอาการปวด เฉพาะเก้าอี้ที่ฉันนั่งเป็นประจำและสบายเท่านั้น (1)
- อาการปวดทำให้ฉันสามารถนั่งได้ไม่เกิน 1 ชั่วโมง (2)
- อาการปวดทำให้ฉันสามารถนั่งได้ไม่เกิน 30 นาที (3)
- อาการปวดทำให้ฉันสามารถนั่งได้ไม่เกิน 10 นาที (4)
- อาการปวดทำให้ฉันไม่สามารถนั่งได้เลย (5)

Sanjaroensuttikul N. J Med Assoc Thai 2007;90(7):1417-22. With approval of <https://eprovide.mapi-trust.org>

อันดับที่ _____

วันที่ ____ / ____ / ____

6. การยืน

- ฉันสามารถยืนได้นานเหมือนปกติ โดยไม่มีอาการปวดมากขึ้น (0)
- ฉันสามารถยืนได้นานเหมือนปกติ แต่จะทำให้ฉันปวดมากขึ้น (1)
- อาการปวดทำให้ฉันสามารถยืนได้ไม่เกิน 1 ชั่วโมง (2)
- อาการปวดทำให้ฉันสามารถยืนได้ไม่เกิน 30 นาที (3)
- อาการปวดทำให้ฉันสามารถยืนได้ไม่เกิน 10 นาที (4)
- อาการปวดทำให้ฉันไม่สามารถยืนได้เลย (5)

7. การนอน

- ฉันสามารถหลับได้เหมือนปกติ โดยไม่มีอาการปวด (0)
- ฉันสามารถหลับได้เหมือนปกติแต่ต้องใช้ยา (1)
- ถึงแม้จะใช้ยาแล้วก็ตามฉันสามารถหลับได้น้อยกว่า 6 ชั่วโมง (2)
- ถึงแม้จะใช้ยาแล้วก็ตามฉันสามารถหลับได้น้อยกว่า 4 ชั่วโมง (3)
- ถึงแม้จะใช้ยาแล้วก็ตามฉันสามารถหลับได้น้อยกว่า 2 ชั่วโมง (4)
- อาการปวดทำให้ฉันไม่สามารถหลับได้เลย (5)

8. การมีเพศสัมพันธ์

- ฉันสามารถมีเพศสัมพันธ์ได้เหมือนปกติ โดยไม่มีอาการปวดมากขึ้น (0)
- ฉันสามารถมีเพศสัมพันธ์ได้เหมือนปกติ แต่จะทำให้ฉันปวดมากขึ้น (1)
- ฉันสามารถมีเพศสัมพันธ์ได้เกือบเหมือนปกติ แต่มีอาการปวดมาก (2)
- ฉันมีเพศสัมพันธ์ได้น้อยมากเพราะอาการปวด (3)
- ฉันปวดมากจนแทบจะไม่สามารถมีเพศสัมพันธ์ได้ (4)
- ฉันปวดมากจนไม่สามารถมีเพศสัมพันธ์ได้เลย (5)

9. การเข้าสังคม เช่น การไปตลาด ดูหนัง ไปห้างสรรพสินค้า

- ฉันสามารถเข้าสังคมได้เหมือนปกติ โดยไม่มีอาการปวดมากขึ้น (0)
- ฉันสามารถเข้าสังคมได้เหมือนปกติ โดยมีอาการปวดมากขึ้น (1)
- อาการปวดไม่ได้มีผลต่อการเข้าสังคมของฉันมากนัก ยกเว้นมีกิจกรรมที่ต้องเคลื่อนไหวมาก เช่น การเล่นกีฬา (2)
- อาการปวดทำให้ฉันไม่สามารถเข้าสังคมนอกบ้านได้บ่อย ๆ (3)
- อาการปวดทำให้ฉันไม่สามารถเข้าสังคมนอกบ้านได้ แต่สามารถมีการเข้าสังคมที่จัดในบ้านได้ (4)
- อาการปวดทำให้ฉันไม่สามารถเข้าสังคมได้เลย (5)

10. การเดินทาง

- ฉันสามารถเดินทางไปที่ต่าง ๆ ได้ โดยไม่มีอาการปวดมากขึ้น (0)
- ฉันสามารถเดินทางไปที่ต่าง ๆ ได้ แต่มีอาการปวดมากขึ้น (1)
- อาการปวดของฉันแย่มาก แต่ฉันก็สามารถจัดการได้ และเดินทางได้มากกว่า 1 ชั่วโมง (2)
- อาการปวดทำให้ฉันสามารถเดินทางไปที่ต่าง ๆ ได้น้อยกว่า 1 ชั่วโมง (3)
- อาการปวดทำให้ฉันสามารถเดินทางไปที่ไกล ๆ ได้ที่ใช้เวลาน้อยกว่า 30 นาที (4)
- ฉันไม่สามารถเดินทางไปที่ต่าง ๆ ได้ ยกเว้นไปพบแพทย์ หรือ ไปโรงพยาบาล (5)

คะแนนรวม (เต็ม 50) = _____ หรือ หากไม่ทำบางข้อ คะแนนรวม (เต็ม _____) = _____
คิดเป็น ร้อยละ _____ (%)

Sanjaroensuttikul N. J Med Assoc Thai 2007;90(7):1417-22. With approval of <https://eprovide.mapi-trust.org>

อันดับที่ _____ วันที่ _____ / _____ / _____

0% to 20%: minimal disability:	The patient can cope with most living activities. Usually no treatment is indicated apart from advice on lifting sitting and exercise.
21%-40%: moderate disability:	The patient experiences more pain and difficulty with sitting, lifting and standing. Travel and social life are more difficult and they may be disabled from work. Personal care, sexual activity and sleeping are not grossly affected and the patient can usually be managed by conservative means.
41%-60%: severe disability:	Pain remains the main problem in this group but activities of daily living are affected. These patients require a detailed investigation.
61%-80%: crippled:	Back pain impinges on all aspects of the patient's life. Positive intervention is required.
81%-100%:	These patients are either bed-bound or exaggerating their symptoms.

บรรณานุกรม



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	Manassanan Jitjumnong
วัน เดือน ปี เกิด	27 January 1998
สถานที่เกิด	Chonburi
วุฒิการศึกษา	2013 – 2015., High school: Chonradsadornumrung school 2016 – 2019., Bachelor's degree: Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University 2020 – present., Master's degree: Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University
ผลงานตีพิมพ์	Jitjumnong, M.; Chalermkitpanit, P.; Suantawee, T.; Dechsupa, S.; Va-jarintaragoon, L.; Honsawek, S. Telomere Shortening and Increased Oxidative Stress in Lumbar Disc Degeneration. Int. J. Mol. Sci. 2022 Manassanan Jitjumnong, Sittisak Honsawek., Role of oxidative stress in lumbar degenerative disease. การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ครั้งที่ 4 Graduate School Conference 2022 iHappiness: ความสุขและคุณภาพชีวิตที่ดีอย่างยั่งยืนในยุคสังคมดิจิทัล 31 Aug 2022

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY