

การศึกษาความสัมพันธ์ของไซโตไคน์และความรุนแรงของโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม



นางสาวจริยา พูลภักดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



5 1 7 4 7 5 8 8 3 0

RELATIONSHIP OF CYTOKINE WITH SEVERITY IN DEGENERATIVE LUMBAR DISEASE



Ms.Jariya Poonphakdee

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

530432

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษาความสัมพันธ์ของไซโตไคน์และความรุนแรงของ
โรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

โดย

นางสาวจรรยา พูลภักดี

สาขาวิชา

ชีวเคมีทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หารราชเวก

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

นายแพทย์ชูเกียรติ เฉลิมพันธ์พิพัฒน์

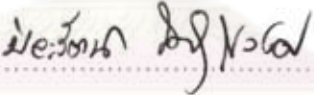
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ดร. สัญชัย พยุงภร

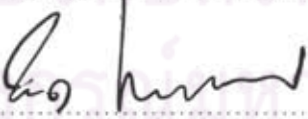
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์อดิศร ภัทรากุลย์)


คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หารราชเวก)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(นายแพทย์ชูเกียรติ เฉลิมพันธ์พิพัฒน์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร. สัจชัย พยุงภร)


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. กอบธัม สติรกุล)

จรรยา พูลภักดิ์: การศึกษาความสัมพันธ์ของไซโตไคน์และความรุนแรงของโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม. (Relationship of Cytokine with Severity in Degenerative Lumbar Disease) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.นพ. สิทธิศักดิ์ ธรรมชาติ, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม นพ.ชูเกียรติ เฉลิมพันธ์พิพัฒน์ และ ดร. สัญชัย พงษ์ภร, 103 หน้า.

โรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมเป็นโรคที่เกิดจากการเสื่อมอย่างเรื้อรังของกระดูกสันหลังส่วนเอว สาเหตุส่วนหนึ่งเกิดจากการหนาตัวของ ligamentum flavum ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblastic cells) ที่สามารถแบ่งตัวได้โดยการควบคุมของยีน basic fibroblast growth factor (bFGF) ดังนั้นการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์และเปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของยีนและโปรตีน bFGF ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่มีการหนาตัวในผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมในระดับกระดูกสันหลังที่เกิดพยาธิสภาพและ ligamentum flavum ที่ปกติในระดับกระดูกสันหลังที่ไม่เกิดพยาธิสภาพ จำนวน 19 ราย โดยวิเคราะห์การแสดงออกของยีน bFGF ด้วยวิธี real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (real time RT-PCR) และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน bFGF ด้วยวิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) และนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับอายุ นอกจากนี้ยังทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของยีนระหว่างเพศชายและหญิง จากผลการศึกษาพบว่ากลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดพยาธิสภาพมีการแสดงออกของยีน และมีปริมาณโปรตีน bFGF มากกว่าชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดพยาธิสภาพอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) แต่ไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของยีน bFGF ระหว่างเพศชายและหญิง ($P > 0.05$) นอกจากนี้พบว่าการแสดงออกของยีนและโปรตีน bFGF ในกลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดพยาธิสภาพมีความสัมพันธ์กับอายุผู้ป่วยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.46$ และ 0.63 ตามลำดับ, $P < 0.05$) ในขณะที่ในกลุ่มชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดพยาธิสภาพ พบว่าการแสดงออกของยีนมีความสัมพันธ์กับอายุเล็กน้อย แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.35$, $P > 0.05$) ในขณะที่การแสดงออกของโปรตีนไม่มีความสัมพันธ์กับอายุและไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.07$, $P > 0.05$) จากผลการศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่ายีน bFGF อาจจะมี ความสัมพันธ์กับกระบวนการเสื่อมของ ligamentum flavum ในโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....
สาขาวิชา.....ชีวเคมีทางการแพทย์.....
ปีการศึกษา.....2553.....

ลายมือชื่อนิสิต.....จรรยา พูลภักดิ์.....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5174758830: MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS : DEGENERATIVE LUMBAR DISEASE/ bFGF/ LIGAMENTUM

FLAVUM/REAL TIME RT-PCR

JARIYA POONPHAKDEE: RELATIONSHIP OF CYTOKINE WITH SEVERITY IN DEGENERATIVE LUMBAR DISEASE. THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF.

SITTISAK HONSAWEK, MD. Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: CHOOKIET

CHALERMPANPIPAT, MD. AND SUNCHAI PHAYUNGORN, Ph.D, 103 PP.

Degenerative lumbar disease is a chronic degenerative lumbar disorder resulting from thickening and hypertrophic ligamentum flavum. Fibroblastic cells which present in the ligamentum flavum are stimulated by basic fibroblast growth factor gene (*bFGF*) expression. The objective of this research was to study relationship of *bFGF* gene and protein expression in ligamentum flavum tissues from pathogenic and non-pathogenic lesions of patients with degenerative lumbar disease. A total of nineteen patients with degenerative lumbar disease were enrolled in this study. The *bFGF* gene expression were analysed quantitatively using real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (real time RT-PCR). The expression of *bFGF* protein were determined using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Furthermore, the expression of *bFGF* was compared in gender and was analysed in association with aging. The results showed that *bFGF* gene and protein expression of pathogenic tissues were significantly higher than those of non-pathogenic tissues ($P < 0.01$). The *bFGF* gene and protein expression of pathogenic tissues showed no significant difference between male and female ($P > 0.05$). For pathogenic tissue group, the *bFGF* gene and protein expression showed a relatively strong correlation with age ($r = 0.46$ and $r = 0.63$ respectively, $P < 0.05$) while non pathogenic tissue group showed a weak correlation for gene expression ($r = 0.35$, $P > 0.05$) and no correlation for protein expression with age ($r = 0.07$, $P > 0.05$). Our study displayed that increased *bFGF* expression might be associated with the chronic degenerative process of ligamentum flavum in lumbar diseases.

Department : Biochemistry

Student's Signature *Jariya Poonphakdee*

Field of Study : Medical Biochemistry

Advisor's Signature *Sittisak Honsaewek*

Academic Year : 2010

Co-Advisor's Signature *Chookiet Chalermpanpipat*

Co-Advisor's Signature *Sunchai Payungporn*

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สามารถเสร็จลุล่วงไปได้อย่างสมบูรณ์ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหลายฝ่าย

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สิทธิศักดิ์ ھرรษาเวก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ นายแพทย์ชูเกียรติ เฉลิมพันธ์พิพัฒน์ และดร. สัญชัย พยุงภร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ช่วยเหลือในทุกขั้นตอนของการทำวิทยานิพนธ์ ทั้งให้คำแนะนำ ให้คำสั่งสอน ตั้งแต่การรวบรวมข้อมูล การทดลอง การทำรูปเล่ม และการนำเสนอ

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์ ที่ยินดีเป็นประธานสอบ

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ท่านอื่นๆ ทั้งในและนอกภาควิชาชีวเคมีที่ช่วยประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆ เพื่อเตรียมความพร้อมในการทำวิทยานิพนธ์อย่างมีคุณภาพ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือต่างๆ เช่น การออกจดหมาย การจัดงาน การเตรียมสถานที่ การเบิกใช้สิ่งของต่างๆ เป็นต้น

ขอขอบพระคุณ ทูน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ช่วยสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการทำวิจัย และการไปนำเสนอผลงาน

ขอกราบขอบพระคุณสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่สนับสนุนในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท และคอยเป็นกำลังใจให้

ท้ายสุดนี้ขอบคุณเพื่อนร่วมรุ่นทุกคนในระดับปริญญาโท และเพื่อนในห้องทดลองผู้ที่คอยให้คำแนะนำกำลังใจเสมอมา

สารบัญ

| | |
|---|----|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | จ |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ฉ |
| สารบัญ..... | ช |
| สารบัญตาราง..... | ญ |
| สารบัญภาพ..... | ฎ |
| สารบัญคำย่อ..... | ฏ |
| บทที่ 1 บทนำ..... | 1 |
| - ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... | 1 |
| - วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... | 2 |
| - ขอบเขตของการวิจัย..... | 3 |
| - ข้อตกลงเบื้องต้น..... | 3 |
| - คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย..... | 4 |
| - ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 4 |
| - วิธีดำเนินการวิจัย..... | 5 |
| - ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย..... | 5 |
| บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 7 |
| - แนวคิดและทฤษฎี..... | 7 |
| - กายวิภาคของกระดูกสันหลังบริเวณเอว..... | 7 |
| - กระดูกสันหลังเอว..... | 8 |
| - ช่องไขสันหลัง..... | 9 |
| - โรคกระดูกสันหลังเอวเสื่อม..... | 10 |
| - Ligamentum flavum..... | 13 |
| - การแสดงออกของยีนที่พบใน ligamentum flavum..... | 18 |
| - ความสัมพันธ์ระหว่างความเสื่อมของในโรค degenerative lumbar disease ligamentum flavum และอายุ..... | 19 |
| - ความสัมพันธ์ระหว่างเพศและความเสื่อมของ ligamentum flavum ในโรค | |

| | |
|--|----|
| degenerative lumbar disease..... | 23 |
| - Basic fibroblast growth factor (bFGF) | 23 |
| - Basic fibroblast growth factor และ การเกิดการหนาตัว..... | 23 |
| - Basic fibroblast growth factorและการเสื่อมของกระดูกและข้อ..... | 24 |
| - Basic fibroblast growth factor และ ligamentum flavum..... | 25 |
| - Real time-RT PCR..... | 25 |
| - การตรวจสอบการเพิ่มจำนวน DNA ด้วย SYBR Green..... | 26 |
| - การหาปริมาณสัมบูรณ์ (absolute quantitation)..... | 28 |
| - การหาปริมาณเชิงเปรียบเทียบ (relative quantitation)..... | 29 |
| - ELISA..... | 29 |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... | 31 |
| - ประชากร..... | 31 |
| - เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย..... | 32 |
| - วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย..... | 33 |
| - สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย..... | 33 |
| - การเก็บรวบรวมข้อมูล..... | 35 |
| - การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ..... | 35 |
| - การวิเคราะห์ข้อมูล..... | 46 |
| บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... | 47 |
| - ผลการวิเคราะห์..... | 47 |
| บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... | 66 |
| - สรุปผลการวิจัย..... | 66 |
| - อภิปรายผลการวิจัย..... | 67 |
| - ข้อเสนอแนะ..... | 72 |
| รายการอ้างอิง..... | 73 |
| ภาคผนวก..... | 78 |
| ภาคผนวก ก..... | 79 |
| ภาคผนวก ข..... | 87 |
| ภาคผนวก ค..... | 88 |

| | |
|---------------------------------|-----|
| ภาคผนวก ง..... | 93 |
| ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... | 103 |



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|--|------|
| 1 | แสดง Primers ที่ใช้ในการทำ real time RT- PCR..... | 37 |
| 2 | แสดงชนิดและปริมาณสารเคมีที่ใช้ทำ real time RT- PCR | 38 |
| 3 | แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ real time RT-PCR..... | 39 |
| 4 | การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA (ในช่วงความเข้มข้น 5 - 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)..... | 43 |
| 5 | การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA (ในช่วงความเข้มข้น 20 - 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)..... | 44 |
| 6 | ค่ามัธยฐานของความเข้มของแถบ DNA ยีน <i>bFGF: GAPDH</i> ใน ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและกลุ่มชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค..... | 51 |
| 7 | ค่ามัธยฐานของปริมาณสัมบูรณ์ของยีน <i>bFGF:GAPDH</i> ใน ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและกลุ่มชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค..... | 54 |
| 8 | ค่ามัธยฐานของปริมาณโปรตีน bFGF ใน ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและกลุ่มชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค..... | 55 |
| 9 | ค่ามัธยฐานของความเข้มของแถบ DNA ยีน <i>bFGF: GAPDH</i> ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคระหว่างเพศหญิงและชาย..... | 61 |
| 10 | ค่ามัธยฐานของปริมาณโปรตีน bFGF ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum จากตำแหน่งที่เกิดรอยโรคของเพศหญิงและชาย..... | 63 |
| 11 | ค่ามัธยฐานของปริมาณโปรตีน bFGF ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum จากตำแหน่งที่เกิดรอยโรคของเพศหญิงและชาย..... | 65 |

สารบัญภาพ

| รูปที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 1 | แสดงลักษณะกระดูกสันหลังของคน..... | 7 |
| 2 | แสดงส่วนประกอบกระดูกสันหลังบริเวณเอว..... | 8 |
| 3 | แสดงรูปร่างของช่องไขสันหลังแบบ ovoid shape..... | 9 |
| 4 | แสดงรูปร่างของช่องไขสันหลังแบบ round shape..... | 10 |
| 5 | แสดงรูปร่างของช่องไขสันหลังแบบ trefoil shape..... | 10 |
| 6 | ลักษณะของช่องไขสันหลังบริเวณเอวปกติและมีการตีบแคบ..... | 11 |
| 7 | แสดงลักษณะการตีบแคบของช่องไขสันหลังแบบ central canal stenosis, lateral spinal canal stenosis และ foraminal stenosis..... | 13 |
| 8 | ลักษณะของ ligamentum flavum ของคน..... | 13 |
| 9 | กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง mRNA (elastin และ collagen type 1) กับความหนาของ ligamentum flavum..... | 14 |
| 10 | รูปเปรียบเทียบลักษณะการจัดเรียงตัวของอีลาสตินไฟเบอร์ในชั้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เสื่อมและปกติ..... | 15 |
| 11 | รูปเปรียบเทียบปริมาณพังผืดในชั้นเนื้อ ligamentum flavum ที่มีความหนาต่างกัน ในผู้ป่วยโรค degenerative lumbar spinal stenosis..... | 16 |
| 12 | รูปเปรียบเทียบปริมาณอีลาสตินไฟเบอร์ในชั้นเนื้อ ligamentum flavum ที่มีความหนาต่างกัน ในผู้ป่วยโรค degenerative lumbar spinal stenosis..... | 16 |
| 13 | ลักษณะรอยโรคที่พบใน ligamentum flavum ที่เสื่อม..... | 17 |
| 14 | กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง mRNA (elastin และ collagen type1) กับอายุ.... | 20 |
| 15 | กราฟเปรียบเทียบอายุเฉลี่ยในผู้ป่วยโรค degenerative lumbar disease ระหว่างกลุ่มที่มีการเกิดหินปูน (calcification) และไม่มีการเกิดของหินปูนใน ligamentum flavum..... | 21 |
| 16 | กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนาของ ligamentum flavum กับอายุของผู้ป่วยโรค lumbar spinal stenosis..... | 22 |
| 17 | ลักษณะ bFGF ที่พบใน ligamentum flavum ที่เกิดการหนาตัว..... | 25 |
| 18 | การตรวจวัด PCR product โดย SYBR Green I..... | 27 |
| 19 | กราฟการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค real-time PCR..... | 28 |

| | | |
|----|---|----|
| 20 | แสดงการสร้างกราฟมาตรฐาน จากค่า Ct จาก DNA มาตรฐานที่ถูกเจือจาง..... | 29 |
| 21 | หลักการของเทคนิค ELISA สำหรับการตรวจหาแอนติเจนที่สนใจ..... | 30 |
| 22 | แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐาน สำหรับวัดปริมาณโปรตีน bFGF โดยเทคนิค ELISA..... | |
| | ภาพถ่ายแถบ DNA ของยีน <i>bFGF</i> และ <i>GAPDH</i> ของผู้ป่วยแต่ละราย..... | 45 |
| 23 | กราฟแท่งแสดงการเปรียบเทียบอัตราส่วนความเข้มของแถบ DNA ของยีน | 48 |
| 24 | <i>bFGF:GAPDH</i> ระหว่างชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคในผู้ป่วยรายเดียวกัน ของแต่ละคน..... | |
| | กราฟแท่งเปรียบเทียบอัตราการแสดงออกของยีน <i>bFGF</i> ระหว่างชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรค | 48 |
| 25 | และไม่เกิดรอยโรคในผู้ป่วยแต่ละคน..... | |
| | กราฟแท่งแสดงการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน <i>bFGF</i> จากชิ้นเนื้อ ligamentum | 49 |
| 26 | flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคในผู้ป่วยรายเดียวกันแต่ละคน..... | |
| | แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบอัตราส่วนความเข้มของแถบ DNA | 50 |
| 27 | ของยีน <i>bFGF:GAPDH</i> ระหว่างกลุ่มชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและ | |
| | ไม่เกิดรอยโรค..... | |
| | แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบปริมาณสัมบูรณ์ของ DNA ของยีน | 52 |
| 28 | <i>bFGF</i> ระหว่างกลุ่มชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอย | |
| | โรค..... | |
| | แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน <i>bFGF</i> ระหว่างกลุ่ม | 53 |
| 29 | ชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค..... | |
| | กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของ | 55 |
| 30 | แถบ DNA ของยีน <i>bFGF:GAPDH</i> ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและอายุผู้ป่วย..... | |
| | กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของ | 57 |
| 31 | แถบ DNA ของยีน <i>bFGF:GAPDH</i> ในชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรคและอายุผู้ป่วย..... | |
| | กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการ | 57 |
| 32 | แสดงออกของยีน <i>bFGF</i> ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum กับอายุผู้ป่วย..... | |
| | กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน | 58 |
| 33 | <i>bFGF</i> ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคกับอายุผู้ป่วย..... | |
| | กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน | 59 |

| | | |
|----|---|----|
| 34 | bFGF ในชั้นเนื้อ ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรคกับอายุผู้ป่วย..... | |
| | แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบความเข้มของแถบ DNA ยีน <i>bFGF</i> ใน | 60 |
| 35 | เนื้อที่เกิดรอยโรคระหว่างเพศหญิงและชาย..... | |
| | แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบอัตราการแสดงออกของยีน <i>bFGF</i> ใน | 62 |
| 36 | ชั้นเนื้อที่เกิดรอยโรคระหว่างเพศชายและหญิง..... | |
| | แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน <i>bFGF</i> ในชั้นเนื้อที่เกิด | 64 |
| 37 | รอยโรคระหว่างเพศชายและหญิง..... | |
| | แสดงสมมุติฐานการเกิดการหนาตัวของ ligamentum flavum..... | 65 |
| 38 | แสดงสมมุติฐานกลไกการเสื่อมของ ligamentum flavum ของผู้ป่วยโรคกระดูกสัน | 69 |
| 39 | หลังส่วนเอวเสื่อม..... | |
| | | 70 |

สารบัญย่อ

| | |
|------------------|---|
| bp | Base pair |
| bFGF | Basic fibroblast growth factor |
| cDNA | Complementary deoxy ribonucleic acid |
| ELISA | Enzyme linked immunosorbent assay |
| GAPDH | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| MRI | Magnetic resonance imaging |
| MMPs | Matrix metalloproteinase |
| mRNA | Messenger ribonucleic acid |
| nt | Nucleotides |
| OD | Optical density |
| Ct | Threshold cycle |
| TGF- β | Transforming growth factor-beta |
| TIMPs | Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase |
| Real time RT-PCR | Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคกระดูกสันหลังเอวเสื่อม (degenerative lumbar disease) เป็นภาวะทางกระดูกสันหลังที่พบบ่อยได้ภาวะหนึ่ง⁽¹⁾ และจัดว่าเป็นภาวะที่ผู้ป่วยเข้ารับการผ่าตัดมากที่สุดภาวะหนึ่งในผู้สูงอายุ⁽²⁾ เนื่องจากกระดูกสันหลังบริเวณเอวเป็นตำแหน่งที่มีการรับน้ำหนักมากที่สุดและมีการเคลื่อนไหวได้ในหลายทิศทางจึงทำให้เสื่อมสภาพได้ง่าย โดยอาจเกิดการเสื่อมได้ทั้งกระดูกสันหลังและเนื้อเยื่อหรือข้อต่อบริเวณโดยรอบกระดูกสันหลังที่มีพยาธิสภาพเกิดขึ้น ภาวะโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบบริเวณเอว (lumbar spinal stenosis) จัดเป็นโรคที่เกิดจากความเสื่อมของกระดูกสันหลังที่พบได้บ่อยมากในประเทศไทย และจัดเป็นโรคที่มีการผ่าตัดเป็นอันดับแรกในการผ่าตัดของผู้สูงอายุอีกด้วย⁽³⁾ ในสหรัฐอเมริกาพบว่ามีค่าใช้จ่ายในการรักษาโรคนี้ถึง 33-55 พันล้านเหรียญต่อปี⁽⁴⁾ มีรายงานว่าในประชากร 100,000 คน จะมีโอกาสพบผู้ป่วยที่เกิดโรคนี้ประมาณ 5 ราย⁽⁵⁾ อุบัติการณ์การเกิดโรคนี้สูงกว่าการเกิดภาวะโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบบริเวณคอ (cervical spinal stenosis) ถึง 4 เท่า⁽⁶⁾ โรคนี้พบได้บ่อยในกลุ่มประชากรที่มีอายุมากกว่า 65 ปีขึ้นไป โดยที่พบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง 2 เท่า⁽⁶⁾ ซึ่งสาเหตุของโรคนี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกระดูกสันหลัง เช่น ligamentum flavum มีการหนาตัวมากขึ้น หมอนรองกระดูกสันหลังแตกและกดทับเส้นประสาท (disc herniation) โรคกระดูกสันหลังเคลื่อน (spondylolisthesis) หรือมีภาวะเหล่านี้หลายๆอย่างร่วมกัน⁽⁷⁻⁸⁾ ซึ่งจากสาเหตุข้างต้นเป็นผลให้เกิดการลดลงของเส้นผ่านศูนย์กลางช่องไขสันหลัง (spinal canal) โดยมีผลทำให้ไปกดรากประสาท ทำให้ผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้เกิดความทุกข์ทรมานจากอาการ neurogenic claudication^(5-6,7,9) คือ อาการอ่อนแรงหรืออาการปวดขาเวลาเดินจนทำให้ผู้ป่วยต้องหยุดเดินเป็นพักๆ ซึ่งทำให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยลดลงและไม่สามารถทำกิจวัตรประจำวันได้อย่างปกติ แม้ว่าอุบัติการณ์และความชุกของโรคโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบบริเวณเอวจะยังไม่เป็นที่ทราบที่แน่ชัด แต่พบว่าภาวะนี้เป็นภาวะที่พบได้บ่อยที่สุดและเป็นสาเหตุทำให้ผู้ที่มีอายุมากกว่า 65 ปีต้องเข้ารับการผ่าตัดแก้ไขอาการผิดปกติมากที่สุดอีกด้วย⁽¹⁰⁾

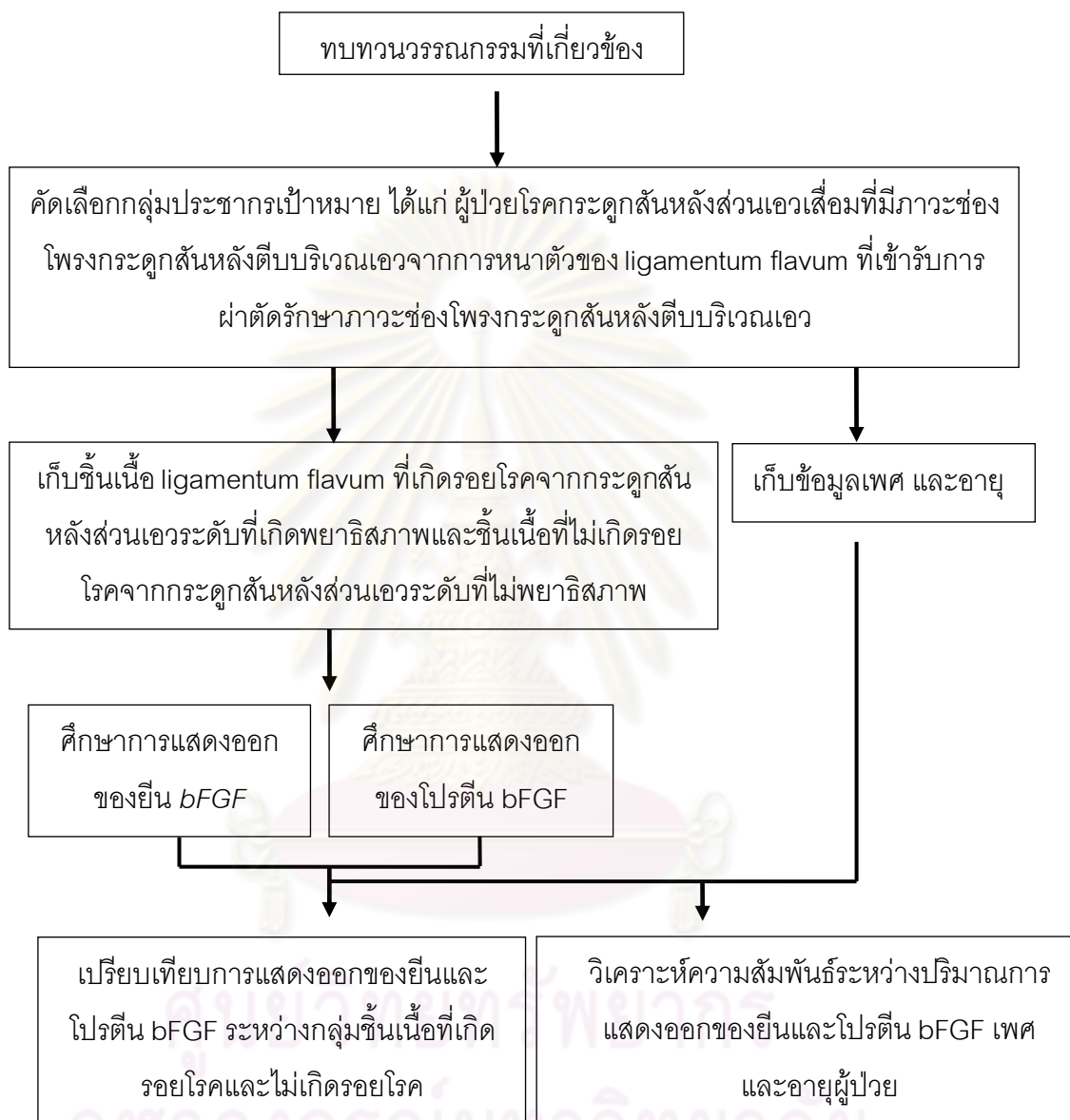
การวินิจฉัยโรคกระดูกสันหลังเอวเสื่อมนี้ในปัจจุบันมักจะใช้วิธีการประเมินจากอาการทางคลินิก ร่วมกับการซักประวัติผู้ป่วยเป็นหลัก และใช้การตรวจทางรังสี เช่น CT scan หรือ MRI ช่วยยืนยันผลการวินิจฉัย^(8,9) เนื่องจากในปัจจุบันเรายังไม่ทราบว่าสาเหตุของการเกิดการเสื่อมของกระดูกสันหลังว่าเกิดจากการแสดงออกของยีนชนิดใดบ้าง ซึ่งในช่วงเวลาหลายปีที่ผ่านมา

การศึกษาพบว่ามีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดความเสื่อมของกระดูกสันหลัง ซึ่งสามารถนำมาเป็นเหตุผลที่ใช้อธิบายอาการที่เกิดทางคลินิก เช่น มีรายงานเกี่ยวกับการแสดงออกของ transforming growth factor-beta (TGF- β) ใน ligamentum flavum ที่เกิดการหนาตัวในผู้ป่วยที่มีภาวะโพรงกระดูกสันหลัง ligamentum flavum ที่เกิดการหนาตีบแคบ⁽¹¹⁻¹³⁾ แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มการแสดงออก TGF- β ก็ยังไม่สามารถอธิบายการเกิดการหนาตัวของ ligamentum flavum ได้อย่างชัดเจน คาดว่าน่าจะมีปัจจัยอื่น เช่น growth factors เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย⁽¹¹⁾ นอกจากนี้ basic fibroblast growth factor (bFGF) พบว่ามีการแสดงออกในเซลล์หลายชนิด ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการที่มีความสำคัญของเซลล์ เช่น การเพิ่มจำนวนของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ หรือแม้แต่การลุกลามของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่า bFGF มีศักยภาพเป็น mitogen (คือ โมเลกุลที่กระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์แบบ mitosis) ในเซลล์หลายชนิด ได้แก่ เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle cells) ไมโอไฟโบรบลาสต์ (myofibroblasts) ไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts)⁽¹⁴⁾ มีการศึกษาพบว่า bFGF มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดการหนาตัวของอวัยวะหลายชนิดในร่างกาย เช่น การหนาตัวของกล้ามเนื้อหัวใจในผู้ป่วยที่เป็นโรคหัวใจโต⁽¹⁵⁾ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า bFGF และ TGF- β 1 มีบทบาทร่วมกันในการควบคุมปริมาณคอลลาเจนใน extracellular matrix ของเซลล์เส้นเอ็นรอบฟัน (periodontal ligament cells) โดยผ่านการแสดงออกของ matrix metalloproteinase1 (MMP1)⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ จากการศึกษาดังกล่าว จึงคาดว่า การแสดงออกของ bFGF น่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดพังผืด (fibrosis) และการหนาตัวของ ligamentum flavum ในผู้ป่วยที่มีกระดูกสันหลังบริเวณเอวที่มีการเสื่อมร่วมกับเกิดภาวะโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบ ดังนั้นในการศึกษาคั้งนี้จึงให้ความสนใจต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกของยีน bFGF ภายใน ligamentum flavum กระดูกสันหลังบริเวณเอวที่มีการเสื่อมร่วมกับเกิดภาวะโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนและโปรตีน bFGF ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ในโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม
2. เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของยีนและโปรตีน bFGF ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคในโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนและโปรตีน bFGF เพศ และอายุของผู้ป่วย

ขอบเขตของการวิจัย



ข้อตกลงเบื้องต้น

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรง และความแม่นยำตามมาตรฐานของเครื่องมือชนิดนั้นๆ
2. ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยให้ความร่วมมือด้วยความเต็มใจตลอดการศึกษาวิจัยโดยมีการลงลายมือชื่อในเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยและรับทราบคำชี้แจงในทุกเรื่องก่อนเข้าร่วมโครงการ

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

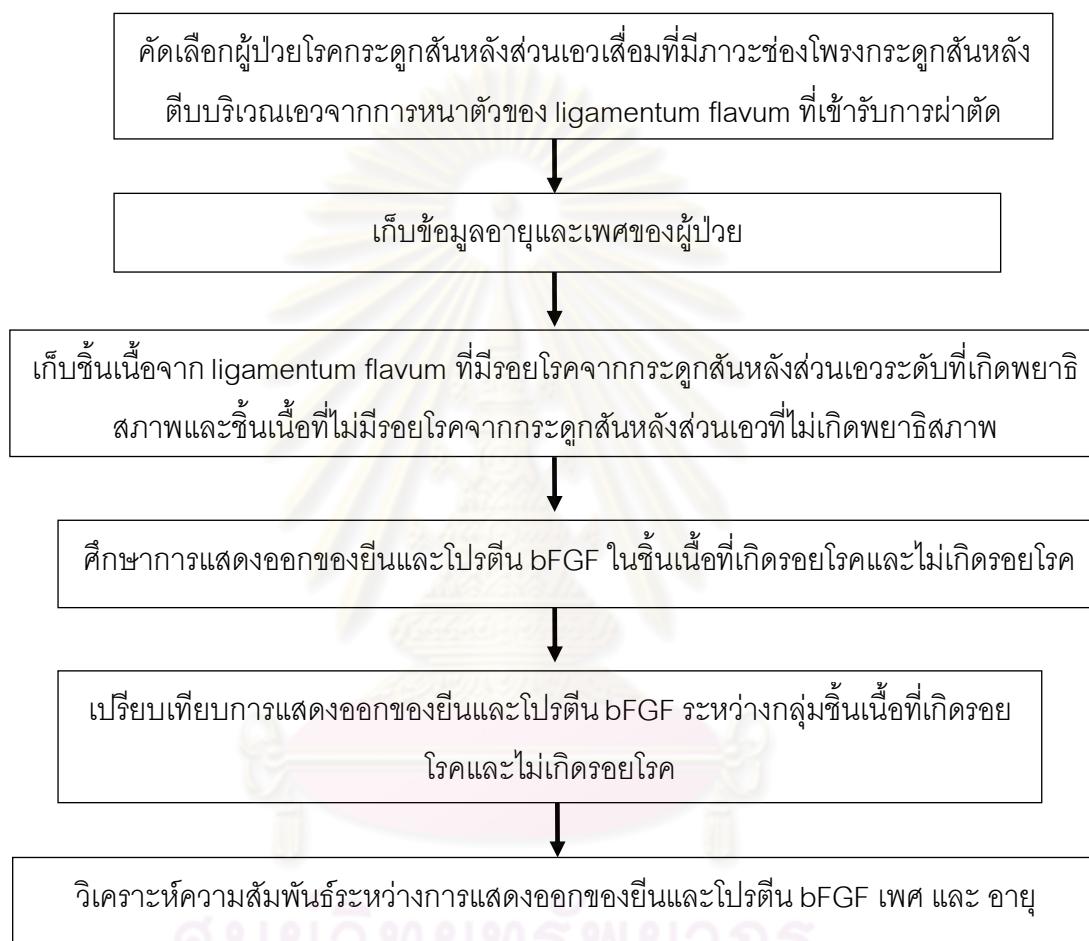
- Degenerative lumbar disease คือ โรคของกระดูกสันหลังส่วนเอวที่เกิดจากการเสื่อมสภาพของโครงสร้างกระดูก
- Real time RT-PCR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอ โดยที่สามารถตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้น⁽¹⁹⁾ โดยใช้การติดฉลากด้วยสารเรืองแสงประเภท Fluorochrome ไปพร้อมกับทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ทำให้วัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นได้ทันทีโดยไม่ต้องรอให้กระบวนการเสร็จสิ้น
- Primer คือ oligonucleotide หรือ ดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ที่ใช้เป็นแม่แบบของการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่
- Gel electrophoresis เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือ โปรตีนที่สนใจ โดยอาศัยหลักการความสามารถในการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันในสนามไฟฟ้า⁽²⁰⁾
- ELISA คือ วิธีการตรวจวัดสารโดยอาศัยหลักการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยทำการเคลือบพื้นผิวของแผ่นของแข็ง ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการตรวจวัดในสารตัวอย่าง ซึ่งจะถูกลบไปพร้อมกับแอนติเจน ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์คอนจูเกต (enzyme conjugate) โดยทั้งคู่จะแย่งกันลงไปจับกับแอนติบอดีที่เคลือบผิวเอาไว้ ซึ่งจะขึ้นอยู่กับปริมาณสารที่ต้องการตรวจหา ดังนั้นถ้าตัวอย่างมีแอนติเจนมากกว่าก็จะจับกับแอนติบอดีได้มากกว่าและเมื่อเติมสารตั้งต้น (substrate) ก็จะได้สีที่เข้มต่างกันตามจำนวนของ แอนติเจน และแอนติบอดีคอนจูเกต⁽²¹⁾

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถบอกความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *bFGF* และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของ ligamentum flavum ในผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีภาวะโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ และอาจใช้ความสัมพันธ์ดังกล่าวในการทำนายสาเหตุการเกิดโรค การดำเนินโรคได้หรือผลในการรักษาโรคดังกล่าว เนื่องจากในปัจจุบันเรายังไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริงของการเกิดโรคนี้ทำให้เกิดอาการทางคลินิก ทำให้การวินิจฉัยโรคยังคงอาศัยวิธีการประเมินจากอาการทางคลินิกเป็นหลัก อีกทั้งอาจนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์เพื่อใช้พัฒนาองค์ความรู้ใหม่ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาโรคนี้ เช่น ประสิทธิภาพการตรวจ การแยกวินิจฉัยโรคออกจากโรคอื่นได้แม่นยำมากขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มความถูกต้องในการวินิจฉัย ตลอดจนการ

ตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยโรคในระยะเวลาแรก ซึ่งสามารถลดความรุนแรงของโรค อีกทั้งยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการรักษา

วิธีดำเนินการวิจัย



ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. ยื่นเสนอโครงร่างวิทยานิพนธ์ต่อคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ และคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง
2. แสดงเอกสารข้อมูลโครงการวิจัยและเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยให้แก่อาสาสมัครโครงการวิจัย
3. เก็บข้อมูลอายุ และ เพศ จากอาสาสมัครโครงการวิจัยที่ลงชื่อยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย
4. เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อจาก ligamentum flavum
5. สกัด total RNA จากชิ้นเนื้อ

6. ศึกษาการแสดงออกของยีน *bFGF*
7. สกัดโปรตีนจากชิ้นเนื้อ
8. ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน *bFGF*
9. เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนและโปรตีน *bFGF* ระหว่างกลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค
10. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *bFGF* ระดับความเข้มข้นของโปรตีน *bFGF* เพศ และอายุของผู้ป่วย
11. สรุปผลการวิจัย เขียนรายงานผลการวิจัย และนำเสนอผลงานวิจัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

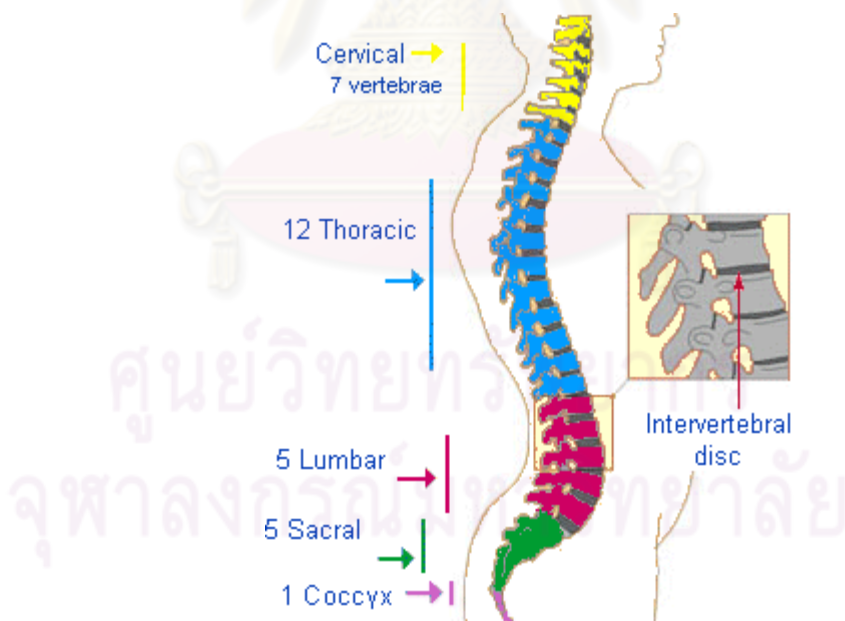
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

กายวิภาคของกระดูกสันหลังบริเวณเอว

สันหลัง (vertebral column) ของคน เป็นกระดูกแนวกลางของร่างกาย (axial skeleton) ประกอบด้วยกระดูกสันหลัง (vertebrae) หลายอันเรียงซ้อนกันในแนวตั้งโดยมีข้อต่อหลายข้อทำหน้าที่เป็นส่วนยึด ทำให้ได้แนวแกน (axis) ของร่างกายที่มีความมั่นคงแต่เคลื่อนไหวได้ จำนวนกระดูกสันหลังในร่างกายทั้งหมด 33 ชิ้นโดยแบ่งเป็นช่วงคอ (cervic) 7 ชิ้น, ช่วงอก (thoracic) 12 ชิ้น, ช่วงเอว (lumbar) 5 ชิ้น ช่วงกระเบนเหน็บ (sacrum) 5 ชิ้น และช่วงก้นกบ (coccyx) 4 ชิ้น กระดูกสันหลังแต่ละชิ้นจะเชื่อมกันด้วยหมอนรองกระดูกสันหลังทางด้านหน้า และข้อฟาเซ็ตทางด้านหลัง โดยมีเอ็นและกล้ามเนื้อเสริมความแข็งแรงแก่กระดูกสันหลัง⁽²²⁾



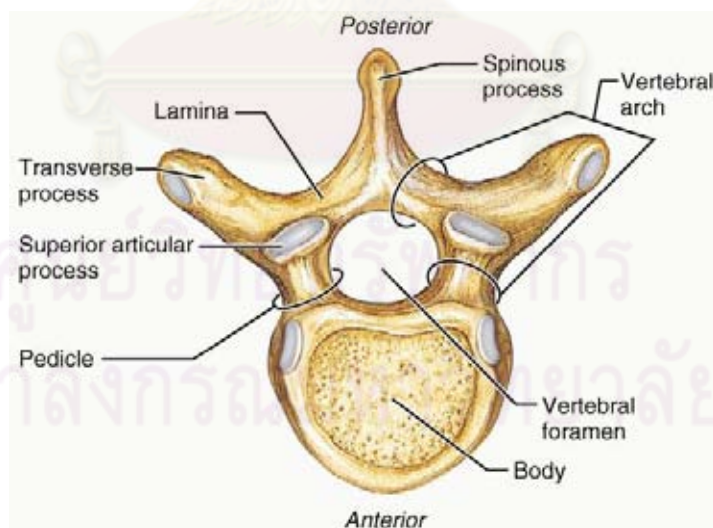
รูปที่ 1 แสดงลักษณะกระดูกสันหลังของคน

(จาก <http://webschoolsolutions.com>)

กระดูกสันหลังส่วนเอว (lumbar spine)^(3,6-7)

กระดูกสันหลังบริเวณเอวประกอบด้วย

1. ตัวกระดูก (lumbar vertebral body) อยู่ด้านหน้าของ spinal canal ตัวกระดูกแต่ละชิ้นจะเชื่อมด้วยหมอนรองกระดูก ซึ่งทำหน้าที่ร่วมกันในการรับน้ำหนัก ตัวกระดูกจะมีขนาดที่เปลี่ยนแปลงตามระดับและรูปร่างของกระดูกสันหลัง ตัวกระดูกของกระดูกสันหลังบริเวณเอวจะมีขนาดใหญ่กว่ากระดูกสันหลังในส่วนคอและอก เนื่องจากต้องทำหน้าที่แบกรับน้ำหนักมากกว่าในบริเวณอื่น
2. Vertebral arch หรือ vertebral neural เป็นโครงสร้างที่อยู่ล้อมรอบช่องไขสันหลัง (spinal canal) เกิดจากกระดูก pedicle, laminae และส่วน dorsum ของตัวกระดูกมาประกอบเป็นช่องไขสันหลัง บริเวณรอยต่อของ pedicle และ laminae จะพบ transverse process, superior articular process และ inferior articular process โดยที่ inferior articular processes ของกระดูกสันหลังอันบนจะมาเชื่อมกับ superior articular process ของกระดูกสันหลังอันล่างต่อเนื่องกันไป เกิดเป็นข้อฟาเซต (facet joint)



รูปที่ 2 แสดงส่วนประกอบกระดูกสันหลังบริเวณเอว

(จาก <http://legacy.owensboro.kctcs.edu>)

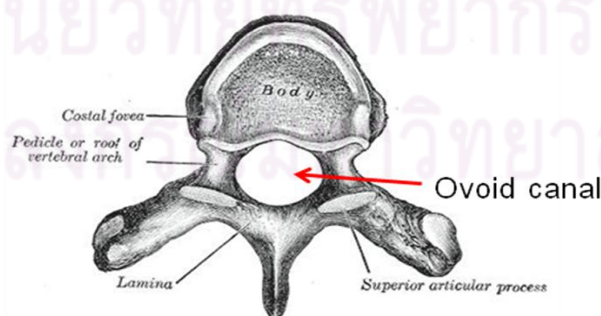
กระดูกสันหลังส่วนเอวแต่ละอันจะมีลักษณะเป็น 3-joint complex คือ ข้อต่อฟาเซตซ้าย, ขวา และหมอนรองกระดูกสันหลังมาประกอบกัน ซึ่ง 3-joint complex เป็นส่วนที่ทำให้เกิดการตีบแคบของช่องไขสันหลัง กล่าวคือ เมื่อเกิดการเสื่อมของหมอนรองกระดูกสันหลังจะทำให้เกิดการยุบตัวของหมอนรองกระดูกสันหลัง เป็นผลทำให้ช่องระหว่างหมอนรองกระดูกสันหลัง (disc space) ลดลง ผลที่ตามมาคือข้อต่อฟาเซตต้องรับน้ำหนักเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ข้อต่อฟาเซต เสื่อมและเกิดการหนาตัว นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดการหนาตัวของ ligamentum flavum อีกด้วย ซึ่งผลสรุปสุดท้าย คือ ปริมาตรช่องไขสันหลังลดลง และเกิดการกดทับเส้นประสาทไขสันหลังตามมา⁽⁸⁾

ช่องไขสันหลัง (spinal canal)⁽⁸⁾

ช่องไขสันหลัง (spinal canal) เป็นช่องที่อยู่ของเส้นประสาทไขสันหลัง สามารถแบ่งรูปร่าง 3 แบบ ได้แก่

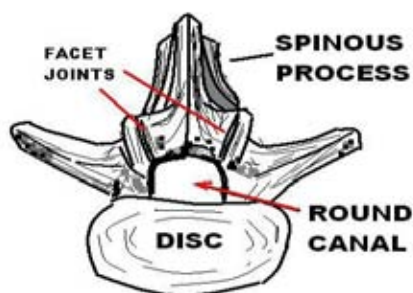
รูปร่างแบบ ovoid และ round เป็นแบบที่มีขนาดของช่องว่างมากที่สุด ทั้งบริเวณส่วนกลางและด้านข้าง (แสดงดังรูปที่ 3 และ 4) พบว่าค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางแนวหน้าหลัง (AP diameter) ของช่องไขสันหลังบริเวณเอวเท่ากับ 12 มิลลิเมตร จากการศึกษาโดยใช้ CT scan พบว่า ค่า absolute และ relative central stenosis จะเท่ากับหรือน้อยกว่า 10 และ 13 มิลลิเมตรตามลำดับ

รูปร่างแบบ trefoil เป็นแบบที่พบเพียง 15 เปอร์เซ็นต์ และเป็นแบบที่มีขนาดช่องว่างน้อยที่สุด (แสดงดังรูปที่ 5) และ พบว่าผู้ป่วยที่มีภาวะโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบ (spinal stenosis) จะมีลักษณะช่องไขสันหลังเป็นรูแบบนี้มากที่สุด



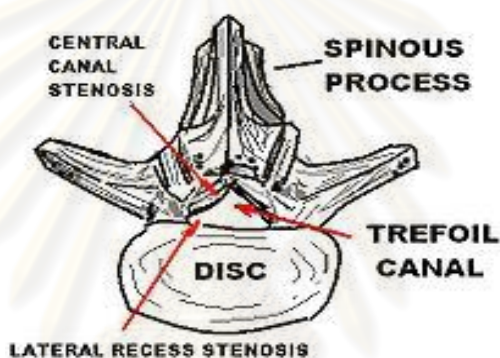
รูปที่ 3 แสดงรูปร่างของช่องไขสันหลังแบบ ovoid shape

(จาก <http://www.consumersresearchcncl.org>)



รูปที่ 4 แสดงรูปร่างของช่องไขสันหลังแบบ round shape

(<http://www.google.co.th>)

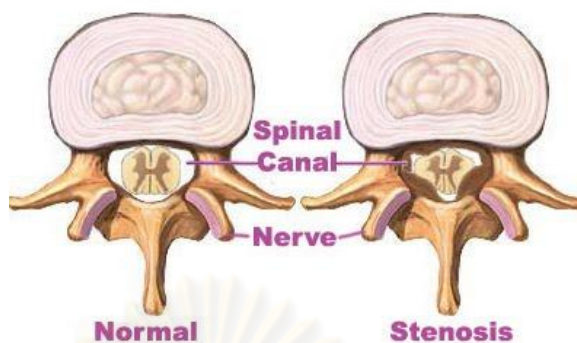


รูปที่ 5 แสดงรูปร่างของช่องไขสันหลังแบบ trefoil shape

(จาก <http://www.necksecret.com>)

โรคกระดูกสันหลังเอวเสื่อม (Degenerative lumbar disease)

โรคกระดูกสันหลังเอวเสื่อม (degenerative lumbar disease) คือ โรคของกระดูกสันหลังส่วนเอวที่เกิดจากการเสื่อมสภาพของโครงสร้างกระดูก ซึ่งมีสาเหตุได้หลายประการ เช่น การใช้งานกระดูกสันหลังอย่างหนักโดยการยกหรือแบกวัตถุที่มีน้ำหนักมากต่อเนื่องเป็นระยะเวลาาน การเสื่อมที่เกิดจากอายุที่เพิ่มมากขึ้น โรคดังกล่าวนี้พบว่ามักมีการเสื่อมของเนื้อเยื่อรอบไขสันหลัง⁽²³⁾ เช่น หมอนรองกระดูกสันหลัง (vertebral disc) ข้อต่อฟาเซต และ ligamentum flavum⁽²³⁾ ซึ่งภาวะดังกล่าวจะส่งผลนำไปสู่ภาวะโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบ (spinal stenosis) และเกิดการกดทับเส้นประสาทไขสันหลังตามมา (แสดงดังรูปที่ 6)



รูปที่ 6 แสดงลักษณะช่องไขสันหลังบริเวณเอวปกติและมีการตีบแคบ

(จาก <http://spinalstenosispain.net>)

ลักษณะการตีบแคบของกระดูกสันหลัง แบ่งได้ 3 ชนิด ได้แก่^(2,8)

1. Central canal stenosis เกิดจาก

- Ligamentum flavum มีการเปลี่ยนแปลง เช่น มีการหนาตัว
- หมอนรองกระดูกแตก (disc protusion)
- กระดูกสันหลังเคลื่อน (spondylolisthesis)
- ข้อต่อฟาเซ็ต มีการเปลี่ยนแปลง เช่น มีการหนาตัวหรือเสื่อม

Central stenosis ร้อยละ 40 เกิดจากเนื้อเยื่ออ่อนหนาตัว (soft tissue hypertrophy) กล่าวคือ เมื่อช่องระหว่างหมอนรองกระดูกสันหลัง (disc space) ลดลงและข้อต่อฟาเซ็ตเลื่อนตัว (subluxation) จะมีผลทำให้ขนาดตามแนวยาวของช่องไขสันหลังลดลง ซึ่งจะส่งผลให้ส่วนประกอบเนื้อเยื่ออ่อน (soft tissue) บริเวณนั้นมีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างสัมพันธ์ตามแนวขวางเดิม (relative larger) ซึ่งจะทำให้เกิดการตีบแคบของช่องไขสันหลัง ผลดังกล่าวนี้อธิบายได้ในผู้ป่วยที่ จะมีอาการปวดหลังมากขึ้นเมื่ออยู่ในท่าแอ่นหลัง (lumbar extension) และจะมีอาการดีขึ้นเมื่ออยู่ในท่าก้มหลัง (lumbar flexion) กล่าวคือ เมื่อมีการแอ่นหลังจะส่งผลให้ ligamentum flavum ม้วนตัวเข้าไปอยู่ด้านในช่องไขสันหลัง ทำให้ขนาดช่องไขสันหลังเล็กลง

2. Lateral spinal canal stenosis

พบได้ร้อยละ 8-11 และมักเป็นสาเหตุของอาการ lumbar radiculopathy สำหรับพยาธิสภาพ การเกิดการตีบแคบชนิดนี้สามารถแบ่งตามกายวิภาคของ lateral spinal canal และ เส้นประสาท (nerve) ได้เป็น 3 ส่วน ได้แก่

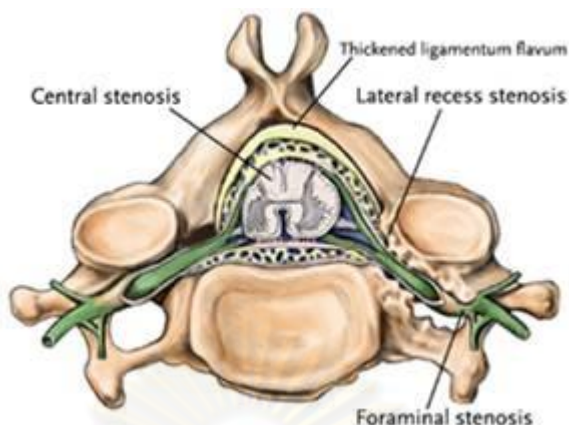
- ส่วนทางเข้า (lateral recess) จะมีส่วนที่มีขนาดเล็กที่สุดเท่ากับ 5 มิลลิเมตร โดยจะถือว่าเป็นการตีบแคบ เมื่อ lateral recess มีขนาด 3-4 มิลลิเมตร โดยสาเหตุส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิด lateral recess stenosis คือ superior articular facet hypertrophy หรือ posterolateral disc protrusion
- ส่วนกลาง (mid zone) จะมีรากประสาท (nerve root) ทอดตัวในลักษณะทอดตัวลงต่ำในแนวเฉียง (downward, oblique trajectory) โดยต่อเนื่องไปยัง foramen โดยสาเหตุส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดการกดทับเส้นประสาทบริเวณส่วนกลาง คือ pars defects และ fibrocartilaginous tissue
- ส่วนทางออก (exit zone , intervertebral foramen) โดยปกติ intervertebral foramen จะมีขนาด 20-30 มิลลิเมตร ความกว้างด้านบน 8-10 มิลลิเมตร โดยจะมี พื้นที่ 40-160 ตาราง มิลลิเมตร มีการศึกษาในศพที่เป็น foraminal nerve root compression พบว่า ความสูง ของ foramen น้อยกว่า 15 มิลลิเมตร ความสูงของ posterior disc น้อยกว่า 4 มิลลิเมตร

3. Foraminal stenosis

มักพบได้บ่อยใน lower lumbar region โดยพบ L₅ ร้อยละ 75, L₄ ร้อยละ 15, L₃ ร้อยละ 5.3, L₂ ร้อยละ 4 สาเหตุของ intervertebral foramen stenosis เกิดได้จาก 2 กลไก คือ

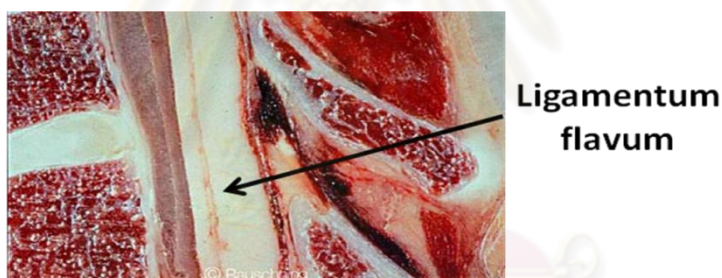
กลไก static พบว่า spondylosis เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดการตีบแคบของ foramen

กลไก dynamic มีการอธิบายกลไก คือ เมื่อมีการก้มและการแอ่นหลัง (lumbar flexion & extension) จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาตรของ central canal ซึ่งได้มีการศึกษาพบว่า เมื่อมีการก้มจะส่งผลให้ปริมาตรของ central canal เพิ่มมากขึ้นร้อยละ 12 เมื่อมีการแอ่นหลังจะส่งผลให้ปริมาตรของ central canal ลดลงร้อยละ 15 และยังพบว่า การถูกกดของรากประสาท (nerve root) พบได้มากกว่าเมื่อมีการแอ่นหลัง (ในท่าก้มพบได้น้อยกว่า) foraminal stenosis จะมี ส่วนเกี่ยวข้องที่ทำให้เกิดอาการ failed back syndrome



รูปที่ 7 แสดงลักษณะการตีบแคบของช่องไขสันหลังแบบ central canal stenosis, lateral spinal canal stenosis และ foraminal stenosis (จาก www.lordexpdx.com)

Ligamentum flavum

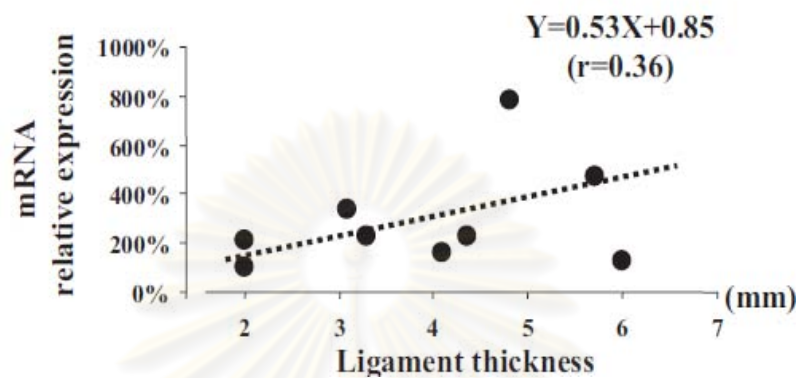


รูปที่ 8 ลักษณะของ ligamentum flavum ของคน (จาก www.spineuniverse.com)

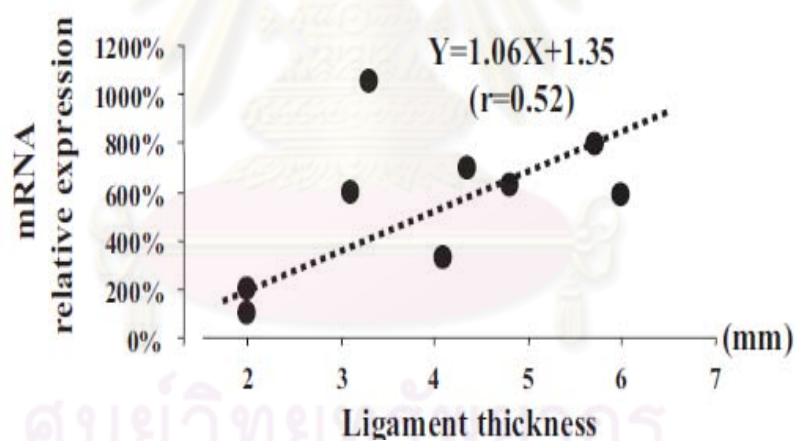
Ligamentum flavum เป็นแผ่นเอ็นที่หุ้มไขสันหลัง (แสดงดังรูปที่ 8) ซึ่งมีอีลาสตินและคอลลาเจนเป็นส่วนประกอบในอัตราส่วน 2:1 ประมาณร้อยละ 60-70^(11,24) จากการศึกษาของ Hirofumi Kosaka และคณะพบว่าเมื่อคนอายุเพิ่มขึ้นอัตราส่วนของอีลาสตินต่อคอลลาเจนจะลดลง กล่าวคือ มีการเพิ่มการแสดงออกของคอลลาเจนเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่อีลาสตินมีการเพิ่มการแสดงออกเพียงเล็กน้อย เป็นผลให้ความยืดหยุ่นของ ligamentum flavum ลดลงและเกิดพังผืด (fibrosis) ขึ้นที่เอ็น และเกิดการหนาตัวของเอ็นตามมา⁽¹¹⁾ (แสดงดังรูปที่ 9) มีรายงานจำนวนมากได้ศึกษาความแตกต่างระหว่างความหนาของ ligamentum flavum ในผู้ป่วยโรค degenerative lumbar spinal stenosis และ ligamentum flavum ที่ปกติ โดยวัดความหนาจาก

ฟิล์ม MRI พบว่า ligamentum flavum ในผู้ป่วยโรค degenerative lumbar spinal stenosis จะหนากว่า ligamentum flavum ที่ปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ^(12,13,25)

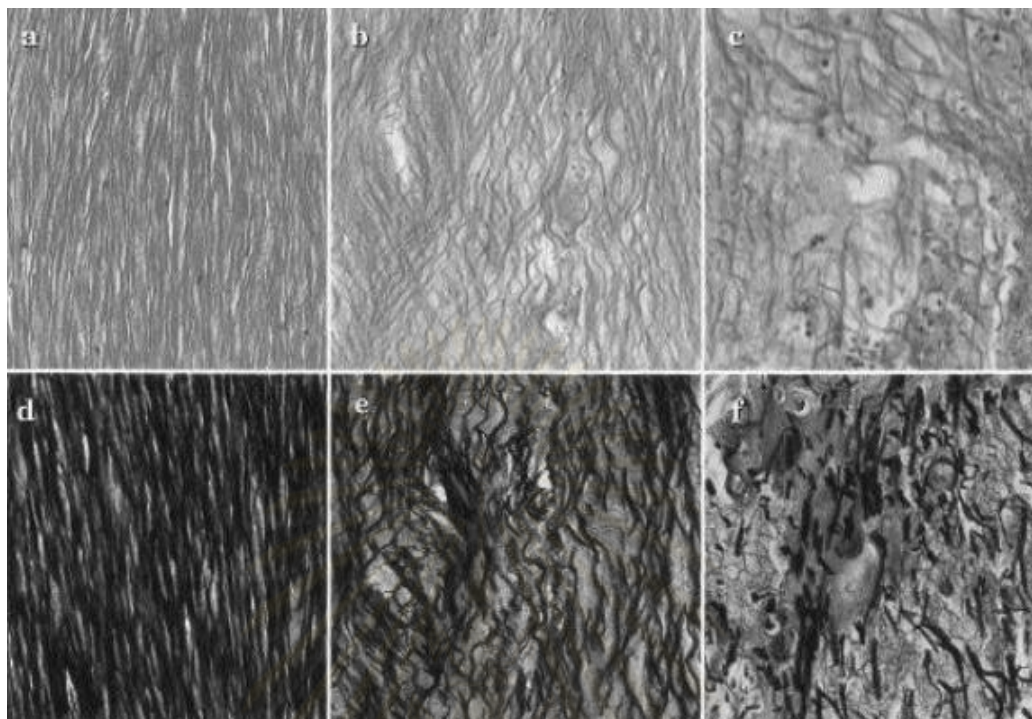
Thickness of LF and elastin expression



Thickness of LF and collagen type I expression



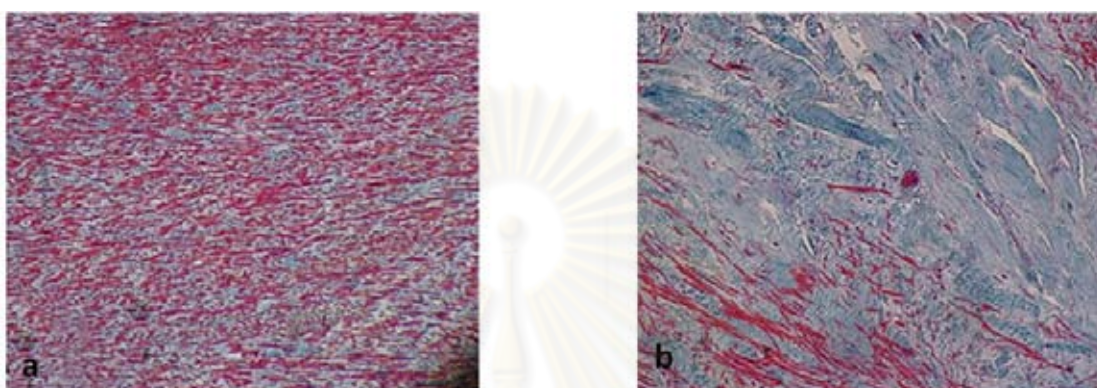
รูปที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง mRNA (elastin และ collagen type 1) กับความหนาของ ligamentum flavum⁽¹¹⁾



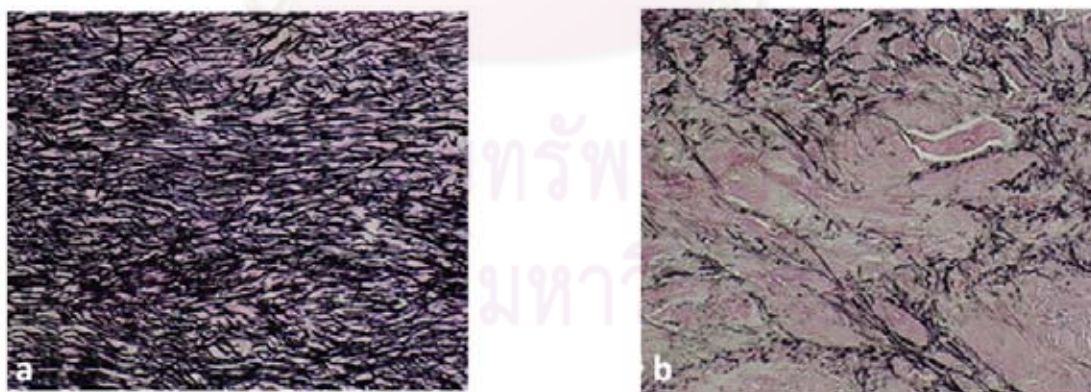
รูปที่ 10 รูปเปรียบเทียบลักษณะการจัดเรียงตัวของอีลาสตินไฟเบอร์ในชั้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เสื่อมและปกติ ; รูป a และ d (a:HE,x10,d:elastic van Gieson,x10) แสดงการจัดเรียงตัวของเส้นใยอีลาสตินในชั้นเนื้อ ligamentum flavum ที่ปกติโดยเส้นใยอีลาสตินจะเรียงขนานกัน รูป b และ e (b:HE,x10 , e :elastic van Gieson,x10) แสดงการจัดเรียงตัวของอีลาสตินในชั้นเนื้อ ligamentum flavum ที่มีการหนาตัวโดยเส้นใยอีลาสติกจะเรียงไม่เป็นระเบียบ รูป c และ f แสดงการเกิดพังผืด (fibrosis) ซึ่งมีการเพิ่มของเส้นใยคอลลาเจน และการลดลงของเส้นใยอีลาสติน และยังพบว่าในบริเวณนี้มีการขยายตัวของ chondrocytes (c:HE,x10,f:elastic van Gieson,x10)⁽⁴⁷⁾

การหนาตัวของ ligamentum flavum เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการตีบแคบของช่องโพรงกระดูกสันหลัง โดยการหนาตัวของเอ็นดังกล่าวจะไปกดเบียดรากประสาท ทำให้เกิดอาการแสดงทางคลินิก เช่น อาการปวดร้าวลงต้นขา^(11,22) มีรายงานการพบการหนาตัวของ ligamentum flavum ครั้งแรกในปี 1913 โดย Elsberg⁽²⁷⁾ จากการศึกษาของ Koichi Sairyō และคณะในปี 2007 โดยการนำชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ของผู้ป่วยโรค degenerative lumbar spinal stenosis มาทำการย้อมด้วย Masson trichrome stain เพื่อดูการเกิดพังผืด (fibrosis) และย้อมด้วย Verhoeff-van Gieson elastin stain เพื่อดูอีลาสตินไฟเบอร์ และนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบ

กับความหนาของ ligamentum flavum พบว่า ligamentum flavum ที่มีการหนาตัวมากจะมีการติดสี Masson trichrome stain และ Verhoeff–van Gieson elastin stain มาก ในขณะที่ ligamentum flavum ที่มีการหนาตัวเล็กน้อยจะติดสีน้อยกว่า⁽²⁹⁾ (แสดงดังรูปที่ 11 และ 12)



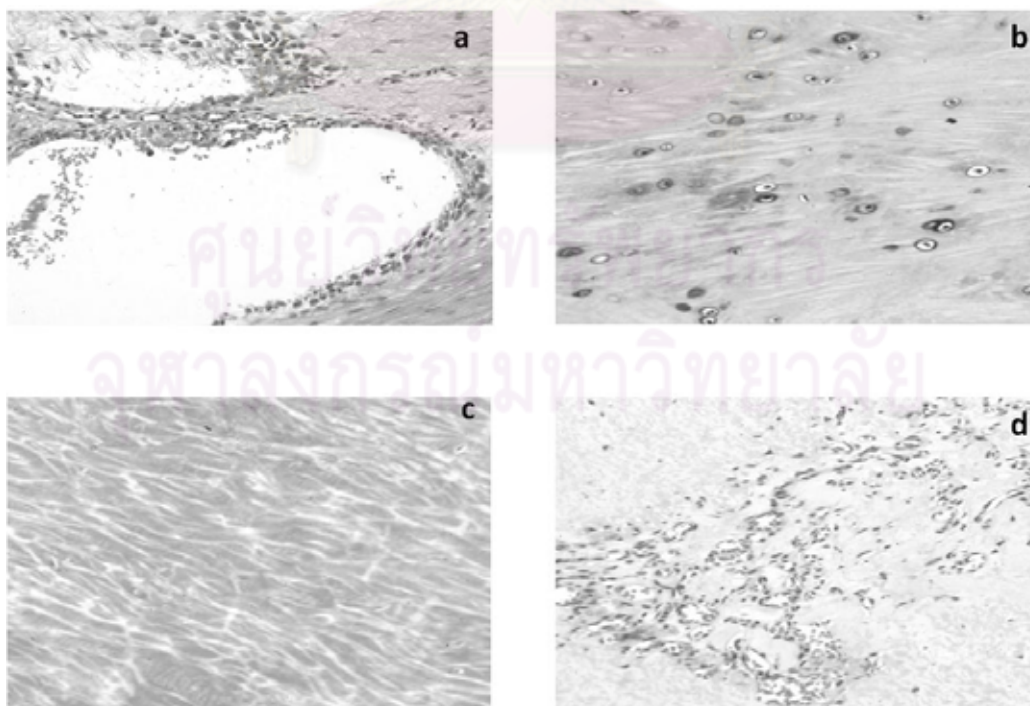
รูปที่ 11 รูปเปรียบเทียบปริมาณฟังก์สิดในชั้นเนื้อ ligamentum flavum ที่มีความหนาต่างกัน ในผู้ป่วยโรค degenerative lumbar spinal stenosis โดยย้อมด้วย Masson trichrome stain รูป a แสดง ชั้นเนื้อ ligamentum flavum ที่มีการหนาตัวเล็กน้อย จะมีการติดสี Masson trichrome stain (สีฟ้า) น้อย; รูป b แสดง ชั้นเนื้อ ligamentum flavum ที่มีการหนาตัวมาก จะมีการติดสี Masson trichrome stain (สีฟ้า) มาก⁽²⁹⁾

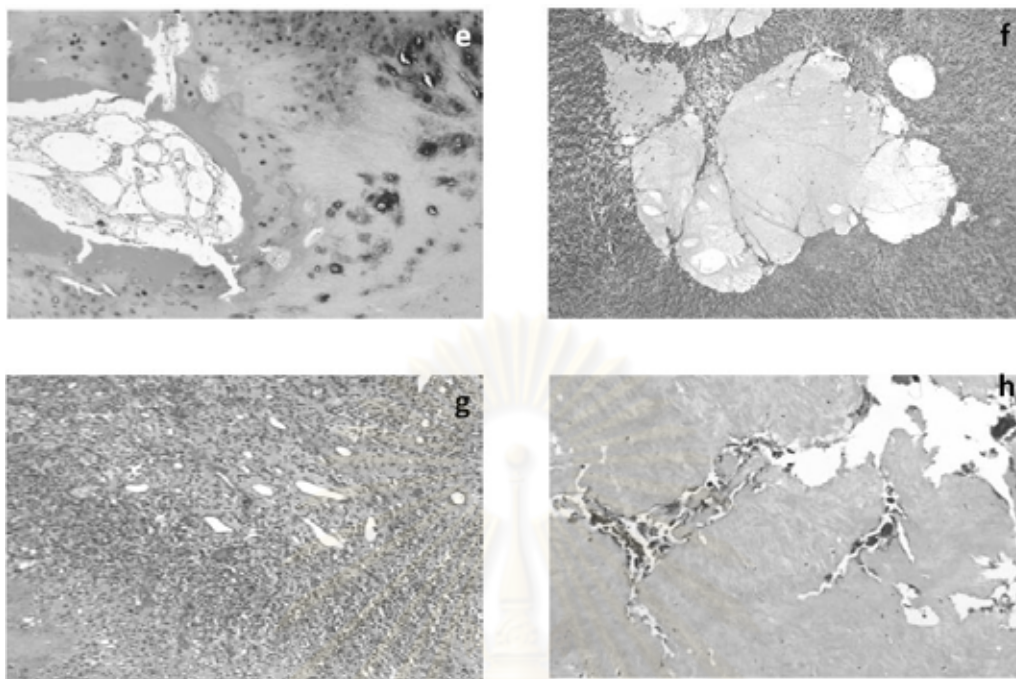


รูปที่ 12 รูปเปรียบเทียบปริมาณอีลาสตินไฟเบอร์ในชั้นเนื้อ ligamentum flavum ที่มีความหนาต่างกัน ในผู้ป่วยโรค degenerative lumbar spinal stenosis โดยย้อมด้วย Verhoeff–van Gieson elastin stain รูป A แสดง ชั้นเนื้อ ligamentum flavum ที่มีการหนาตัวเล็กน้อย จะมีการติดสี

Verhoeff–van Gieson elastin stain (สีดำ) มาก ; รูป B แสดง ชั้นเนื้อ ligamentum flavum ที่มีการหนาตัวมากจะมีการติดสี Verhoeff–van Gieson elastin stain น้อย⁽²⁹⁾

นอกจากจะมีการศึกษาพบว่าใน ligamentum flavum ที่เสื่อมมีการลดลงของอีลาสตินไฟเบอร์ ยังมีการศึกษาพบว่ามีหินปูนสะสม (calcification) ใน ligamentum flavum ที่หนาตัว เช่น จากการศึกษาของ Peter K. และคณะในปี 1999 โดยการนำ histology โดยการนำชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ของผู้ป่วยโรค degenerative lumbar spinal stenosis มาทำการย้อมด้วย Van Kossa และนำไปวัดปริมาณการเกิดหินปูนในชิ้นเนื้อ พบว่ามีผู้ป่วย 35 ราย จาก 38 ราย มีการย้อมติดสี Van Kossa และปริมาณหินปูนในชิ้นเนื้อมีความสัมพันธ์กับอายุที่เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่ามีเกิดการเกิดพังผืดและมีการลดลงของอัตราส่วนของอีลาสตินต่อคอลลาเจนในบริเวณที่เกิดหินปูนอีกด้วย⁽³⁰⁾ จากการศึกษาของ Teruaki Okuda และคณะในปี 2004 โดยการนำชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ของผู้ป่วยโรค degenerative lumbar spinal stenosis มาทำ histology เพื่อดูลักษณะการเกิดรอยโรคแบบต่างๆในชิ้นเนื้อ พบว่ามีรอยโรคที่เกิดใน ligamentum flavum แบบต่างๆคือ ganalion like cystic, chondroid cells, mucinous degeneration, calcification, vascularization, granulation และร่องในเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังพบว่า มีการเพิ่มจำนวนของ fibroblasts จำนวนมากรอบ chondriod cells⁽³³⁾ (แสดงดังรูปที่ 13)





รูปที่ 13 ลักษณะรอยโรคที่พบใน ligamentum flavum ที่เสื่อมจากการทำ histology ได้แก่ ganglion-like cystic lesions (a), chondroid cells (b), mucinous degeneration (c), small vessels (d), ossification (e), calcification (f), granulation (g), และร่องในเนื้อเยื่อ (h)⁽³³⁾

การแสดงออกของยีนใน ligamentum flavum ของผู้ป่วย degenerative lumbar disease

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนใน ligamentum flavum ที่เสื่อมในผู้ป่วยโรค degenerative lumbar spinal stenosis มีรายงานหลายการศึกษาพบว่า *TGF-β1* มีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดการหนาตัวของ ligamentum flavum^(12,13) เช่น ในปี 2001 Jong bome และคณะได้ทำการศึกษาบทบาทของ *TGF-β1* ใน ligamentum flavum ที่เกิดการหนาตัวขึ้นในผู้ป่วยที่มีภาวะช่องโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบบริเวณเอวเปรียบเทียบกับ ligamentum flavum ในผู้ป่วยที่มีภาวะหมอนรองกระดูกแตกและกดทับเส้นประสาท (disc herniation) พบว่าใน ligamentum flavum ที่เกิดการหนาตัวขึ้นในผู้ป่วยที่มีภาวะช่องโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบจะมีการแสดงออกของ *TGF-β1* ในระดับที่สูงกว่า ligamentum flavum ในผู้ป่วยที่มีภาวะหมอนรองกระดูกแตกและกดทับเส้นประสาท (disc herniation)⁽¹²⁾ และในปี 2009 Zong Zm และ Chen JT ได้ทำการศึกษาบทบาทของ *TGF-β1* ใน ligamentum flavum ที่มีความเสื่อมในผู้ป่วยที่มีภาวะช่องโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบบริเวณเอวที่มารับการผ่าตัดพบว่า ligamentum flavum ของผู้ป่วยจะมีการหนาตัวและมีการแสดงออกของ *TGF-β1* ที่มากกว่าของคนปกติ⁽¹³⁾

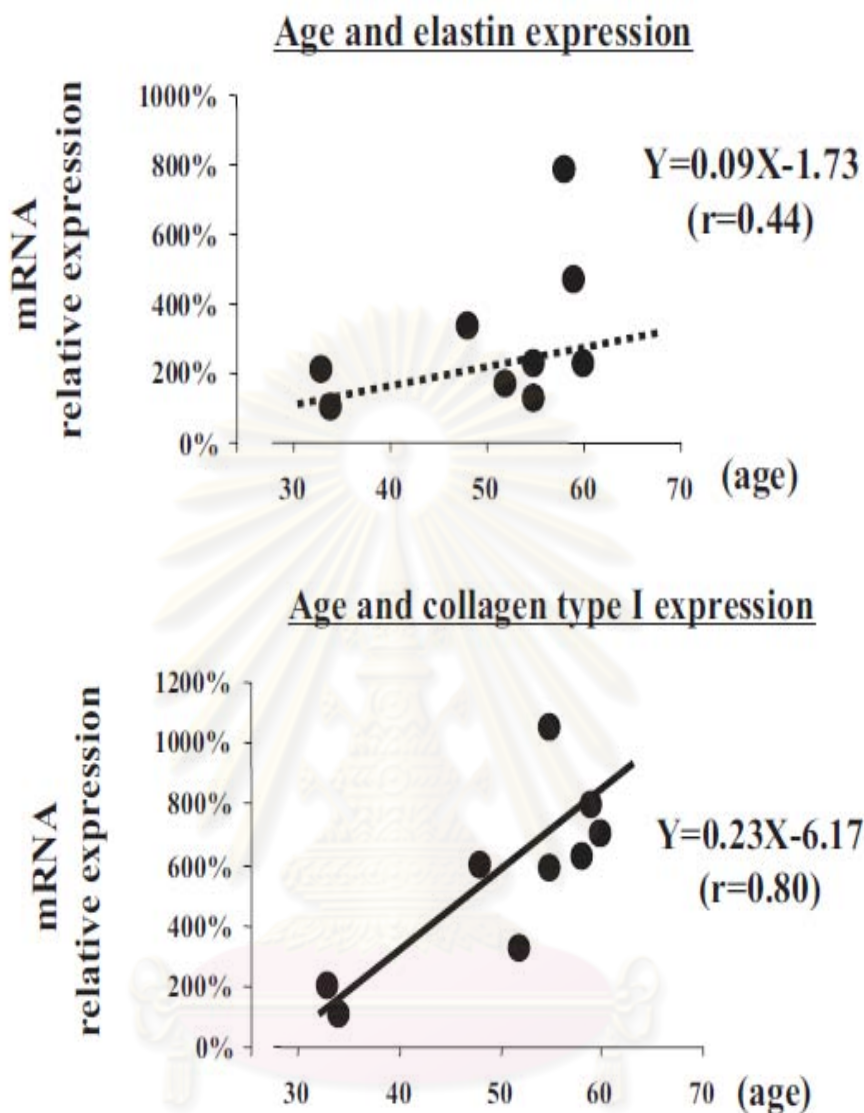
- ยีนอื่นที่มีบทบาทสนับสนุนให้ ligamentum flavum เกิดการหนาตัว ได้แก่ TIMPs (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase) ซึ่งเป็นยีนที่สร้างเอนไซม์ TIMPs ที่อยู่ใน extracellular matrix ทำหน้าที่รักษาสมดุล (homeostasis) ของโปรตีนใน extracellular matrix คู่กับเอนไซม์ matrix metalloproteinase (MMPs) โดยที่ TIMPs จะป้องกันการสลายของคอลลาเจนโดยยับยั้งเอนไซม์ MMPs ซึ่งมีหน้าที่ย่อยคอลลาเจนที่อยู่ใน extracellular matrix โดยการรักษาระดับ TIMPs : MMPs ในอัตราส่วน 1:1⁽²⁴⁾ จากการศึกษาของ Jong bome และคณะในปี 2005 พบว่ามีการแสดงออกของ TIMP2 ใน ligamentum flavum ของผู้ป่วยที่มีภาวะช่องโพรงกระดูกสันหลัง การตีบแคบบริเวณเววมมากกว่าชั้นเนื้อปกติดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽²⁴⁾

- ในปี 2007 Koichi Sayori และคณะทำการศึกษาโดยเทคนิค real time-PCR พบว่ามีการแสดงออกของยีน COX2 ใน ligamentum flavum ที่มีการหนาตัวของผู้ป่วยโรค spinal stenosis⁽²⁹⁾

- ในปี 2009 จากการศึกษาการแสดงออกของยีน MMP3 ของ In Soo Oh และ Kee Yong Ha โดยเทคนิค real time-PCR พบว่ามีการแสดงออกของยีน MMP3 ในชั้นเนื้อ ligamentum flavum ของผู้ป่วยโรค degenerative spondylolisthesis⁽³¹⁾ และปีในเดียวกัน Jong Beom และคณะทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน MMP2, MMP3 และ MMP13 โดยการทำ immunohistochemistry และ Western blot ในผู้ป่วยโรค degenerative lumbar spinal stenosis พบว่ามีการแสดงออกของ MMP2, MMP3 และ MMP13 ในผู้ป่วยโรค degenerative lumbar spinal stenosis⁽³²⁾

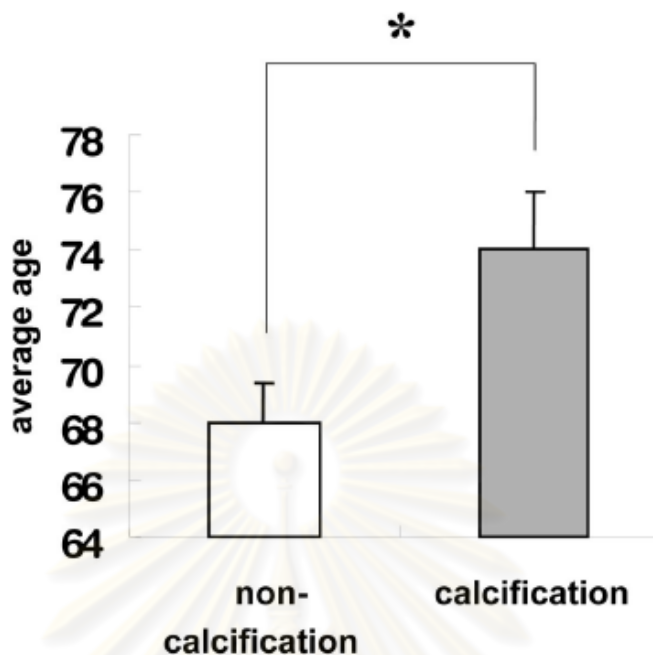
ความสัมพันธ์ระหว่างความเสื่อมของ ligamentum flavum ในโรค degenerative lumbar disease และอายุ

จากการศึกษาของ Hirofumi และคณะในปี 2007 โดยทำการศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของอีลาสตินและคอลลาเจนชนิดที่ 1 (collagen type 1) ในแต่ละช่วงอายุ พบว่าในผู้สูงอายุจะมีความยืดหยุ่น (elasticity) ของ ligamentum flavum ลดลง เนื่องจากในผู้สูงอายุจะมีการเพิ่มการแสดงออกของคอลลาเจนใน ligamentum flavum สัมพันธ์กับอายุที่เพิ่มมากขึ้นในขณะที่การเพิ่มของอีลาสตินจะมีความสัมพันธ์กับอายุน้อยกว่า⁽¹¹⁾ แสดงดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง mRNA (elastin และ collagen type 1) กับอายุของผู้ป่วย⁽¹¹⁾

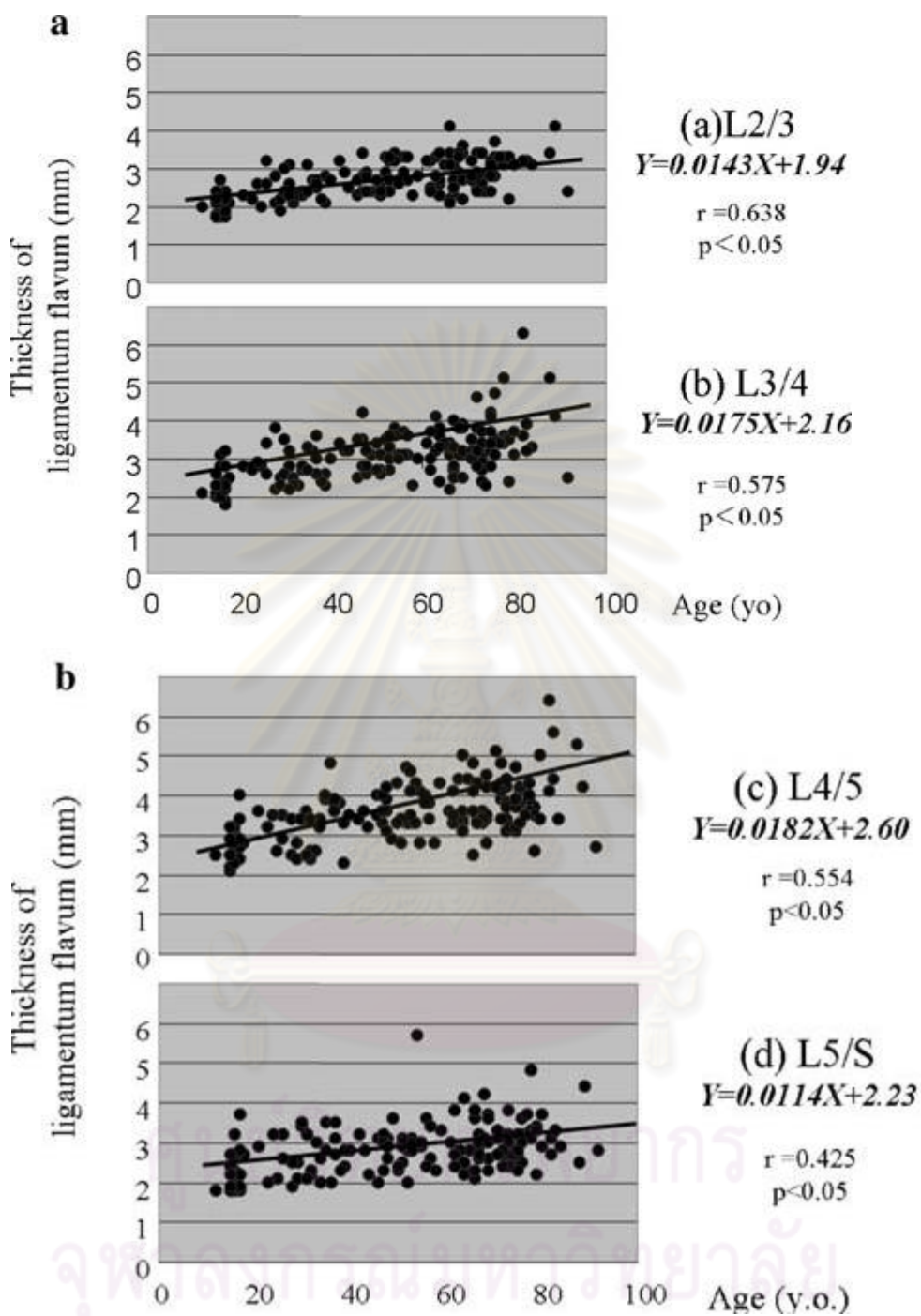
จากการศึกษาของ Teruaki Okuda และคณะในปี 2004 โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอายุของผู้ป่วยโรค degenerative lumbar disease ระหว่างกลุ่มที่มีการเกิดหินปูน (calcification) และไม่มี การเกิดของหินปูนใน ligamentum flavum พบว่าในผู้ป่วยกลุ่มที่มีหินปูนจะมีค่าเฉลี่ยอายุที่สูงกว่ากลุ่มที่ไม่มีหินปูนใน ligamentum flavum อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽³³⁾ (แสดงดังรูปที่ 15)



รูปที่ 15 กราฟเปรียบเทียบอายุเฉลี่ยในผู้ป่วยโรค degenerative lumbar disease ระหว่างกลุ่มที่มีการเกิดหินปูน (calcification) และไม่มีการเกิดของหินปูนใน ligamentum flavum⁽³³⁾

จากการศึกษาของ Tadanori Sakamaki และคณะในปี 2009 และ Janan Abbas และคณะในปี 2010 โดยทำการวัดความหนาของ ligamentum flavum ที่ระดับ L₂-L₃, L₃-L₄, L₄-L₅ และ L₅-S₁ ในแต่ละช่วงอายุ ซึ่งการศึกษาทั้งสองรายงานผลที่คล้ายกัน คือพบว่าความหนาของ ligamentum flavum ที่ระดับต่างๆ ดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับอายุ^(25,26) (แสดงดังรูปที่ 16)

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนาของ ligamentum flavum กับอายุของผู้ป่วยโรค lumbar spinal stenosis โดยแบ่งตามระดับกระดูกสันหลังที่เกิดการตีบแคบ ดังนี้ L₂-L₃, L₃-L₄, L₄-L₅ และ L₅-S₁ แสดงดังรูป a-d ตามลำดับ⁽²⁵⁾

ความสัมพันธ์ระหว่างเพศและความเสื่อม ของ ligamentum flavum ในโรค degenerative lumbar disease

จากการศึกษาของ Ha KY และคณะในปี 2005 พบว่ามีการแสดงออกของ estrogen receptor ใน articular cartilage ของข้อต่อฟาเซตในผู้ป่วยสตรีวัยหมดประจำเดือนที่เป็นโรค degenerative spondylolisthesis มากกว่าในผู้ป่วยสตรีวัยหมดประจำเดือนที่เป็นโรค lumbar spinal stenosis⁽⁵¹⁾

ในปี 2010 จากการศึกษานี้ของ Janan Abbas⁽²⁶⁾ และ Alp Alper⁽²⁸⁾ ทำการศึกษาโดยวัดความหนาของ ligamentum flavum ที่มีการหนาตัวในผู้ป่วยโรค lumbar spinal stenosis เปรียบเทียบระหว่างเพศชายและหญิงพบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

Basic fibroblast growth factor (bFGF)

Basic fibroblast growth factor หรือที่รู้จักในชื่อ bFGF หรือ FGF2 เป็นสมาชิกในกลุ่มของ fibroblast growth factors มีการค้นพบครั้งแรกโดย Bohlen และคณะในปี 1984 โดยทำการสกัดโปรตีน bFGF ออกมาจากต่อมใต้สมองวัวซึ่ง พบว่ามีบทบาทในการกระตุ้น การแบ่งเซลล์ของ fibroblast⁽³⁴⁾ หลังจากนั้นต่อมาได้มีรายงานการศึกษามากมายที่พบว่า bFGF มีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์หลายอย่าง เช่น กระบวนการเจริญของหลอดเลือด (angiogenesis) การสมานแผล (wound healing) และการพัฒนาเป็นตัวอ่อน นอกจากนี้ยังพบว่า bFGF มีศักยภาพเป็นโมเลกุลที่กระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์แบบ mitosis (mitogen) ในเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle cells), myofibroblasts, fibroblasts⁽¹⁴⁾

Basic fibroblast growth factor และ การเกิดการหนาตัว

มีการศึกษายืนยันว่ามีการแสดงออกของ bFGF ในอวัยวะหลายชนิด เช่น หัวใจ ไต ปอด ตับ ซึ่ง bFGF มีบทบาททำให้อวัยวะดังกล่าวเกิดการหนาตัวหรือมีพังผืดเกิดขึ้น เช่น ในปี 1993 Henke C และคณะพบว่าในเนื้อเยื่อปอดที่เกิดการบาดเจ็บแบบเฉียบพลัน (acute lung injury) จะมีระดับการแสดงออกของ bFGF เพิ่มสูงขึ้น⁽³⁶⁾ และอีก 3 ปีต่อมามี Inoue Y และคณะพบว่าในผู้ป่วยที่เป็นโรคพังผืดที่ปอดชนิดเรื้อรัง (chronic pulmonary fibrosis) จะมี mast cells เป็นต้นกำเนิดในการผลิต bFGF⁽³⁷⁾ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Yoshikazu Inoue และคณะในปี 2002 ที่พบว่าจะมีการแสดงออกของ bFGF และตัวรับ (receptor) ของ bFGF ในผู้ป่วยที่มีพังผืดที่ปอดแต่กำเนิด (idiopathic pulmonary fibrosis)⁽¹⁴⁾

ในปี 2000 Frank Strutz และคณะ ตรวจพบว่ามีการแสดงออกของ bFGF ทั้งในเนื้อเยื่อไตปกติ และเนื้อเยื่อไตที่เกิดพังผืด แต่ในเนื้อเยื่อไตที่เกิดพังผืดพบว่าการเพิ่มการแสดงออกของ

bFGF ที่สูงกว่าในเนื้อเยื่อไตปกติและยังพบว่ามีการแสดงออกของ bFGF ไม่เท่ากันในเนื้อเยื่อแต่ละตำแหน่งอีกด้วย โดยจะมีการแสดงออกมากในบริเวณ glomerulus และ vascular และมีการแสดงออกน้อยในบริเวณ tubule⁽³⁸⁾

มีการศึกษายืนยันว่าการที่มีการผลิตคอลลาเจนที่มากเกินไปในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจของผู้ป่วยที่เป็นโรคกล้ามเนื้อหัวใจเป็นผลมาจากการแสดงออกของ bFGF⁽¹⁵⁾ นอกจากนี้การศึกษาของ Chua CC และคณะในปี 1991 ได้ทำการศึกษาผลการแสดงออกของ bFGF และ TGF β -1 ที่มีต่อการแสดงออกของ collagen, collagenases and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) พบว่า bFGF และ TGF β -1 มีบทบาทร่วมกันในการควบคุมการสันดาป (metabolism) ของคอลลาเจนซึ่งพบในเซลล์ fibroblasts ของหัวใจมนุษย์⁽³⁹⁾

Basic fibroblast growth factor และการเสื่อมของกระดูกและข้อ

มีรายงานการศึกษาพบว่า bFGF ก่อให้เกิดการเสื่อมของกระดูกอ่อนบริเวณข้อ (articular cartilage) เช่น จากการศึกษาของ Muddasani และคณะในปี 2008 พบว่า bFGF มีผลเพิ่มการแสดงออกของ mRNA ของคอลลาเจนชนิดที่ 1 และ 2 แต่จะทำให้อัตราส่วนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ต่อคอลลาเจนชนิดที่ 2 ในกระดูกลดลง และพบว่าคุณสมบัติ mitogen ของ bFGF ยังมีผลกระตุ้นสร้าง เซลล์ fibrocartilage แทนที่ hyaline cartilage ซึ่งมีผลทำให้คุณสมบัติการทำงานของกระดูกอ่อนบริเวณข้อลดลง⁽⁴⁰⁾ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า bFGF เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวและการหนาตัวของเซลล์เยื่อหุ้มข้อ (synovial proliferation and hyperplasia)⁽⁴¹⁾ โดยมีการตรวจพบ bFGF ในน้ำไขข้อและพบว่าปริมาณ bFGF ที่พบสัมพันธ์กับ Lasen' s grade (ใช้สำหรับวัดระดับการถูกทำลายของกระดูก)⁽⁴²⁾ ในผู้ป่วยโรค rheumatoid arthritis

ตลอดจนมีหลักฐานแสดงให้เห็นว่า bFGF เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของการทำลายข้อของผ่าน MMPs และ aggrecanases โดยมีการศึกษาพบว่า bFGF ยังมีผลต่อสมดุลใน extracellular matrix ของกระดูกอ่อนบริเวณข้อ (articular cartilage homeostasis) ของมนุษย์ โดยพบว่า bFGF จะไปกระตุ้นการแสดงออกของ MMP13 และ ADAMTS-4 และ ADAMTS-5 และไปยับยั้งการสร้าง proteoglycan นอกจากนี้ยังพบว่า bFGF ยังเป็น antagonist ของ BMP7 และยังสามารถกระตุ้น pro-inflammatory cytokine หลายชนิด เช่น IL-6 และ TNF- α จากผลของ bFGF ข้างต้น มีผลให้เกิดความเสื่อมของกระดูกอ่อนบริเวณข้อตามมา⁽⁴³⁾

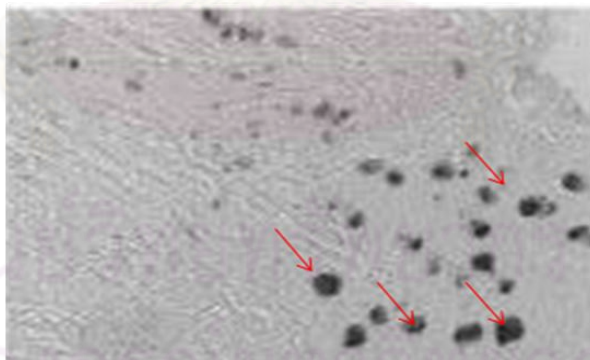
รายงานการศึกษาแสดงว่า bFGF ก่อให้เกิดการเสื่อมของหมอนรองกระดูกโดย bFGF จะมีผลต่อสมดุลของ extracellular matrix ของหมอนรองกระดูกนำไปสู่การเกิดความเสื่อมของหมอนรองกระดูกในเวลาต่อมา เช่น จากการศึกษาของ Peng และคณะในปี 2006 พบว่า bFGF มีการเพิ่ม

การแสดงออกอย่างมากในเซลล์จากหมอนรองกระดูกที่มีการเสื่อมของผู้ป่วยที่มีอาการการปวดหลังเมื่อเทียบกับเซลล์จากหมอนรองกระดูกจากคนปกติ⁽⁴⁴⁾ จากการศึกษาของ Jukka Tolonen และคณะโดย immunohistochemistry พบว่า มีการแสดงออกของ TGF β -1, TGF β -2, TGF β receptor type 2 และ bFGF ใน chondrocytes และ fibroblasts ของหมอนรองกระดูกที่มีการเสื่อม⁽⁴⁵⁾

จากการศึกษาการแสดงออกของ cytokine ใน subcromial bursa ของผู้ป่วยที่มีการเสื่อมของ rotator cuff ของไหล่ของ Jana Neuwirth และคณะในปี 2006 โดยวิเคราะห์ด้วย real time-PCR พบว่ามีการแสดงออกของ bFGF ใน subcromial bursa ของผู้ป่วยที่มีการเสื่อมของ rotator cuff ของข้อไหล่⁽⁴⁶⁾

Basic fibroblast growth factor และ ligamentum flavum

จากการศึกษาของ Yayama T และคณะในปี 2005 ได้ทำการศึกษาการเกิดผลึกแคลเซียม (calcium pyrophosphate dehydrate crystals หรือ CPPD crystals) ที่พบใน ligamentum flavum ที่เกิดการหนาตัว จากการใช้เทคนิค immunohistological staining พบว่า มีการย้อมติดสีของ bFGF ภายในผลึกแคลเซียมที่พบใน ligamentum flavum ที่เกิดการหนาตัว⁽⁴⁷⁾ (แสดงดังรูปที่ 17)



รูปที่ 17 ลักษณะ bFGF ที่พบใน ligamentum flavum ที่เกิดการหนาตัว⁽⁴⁷⁾

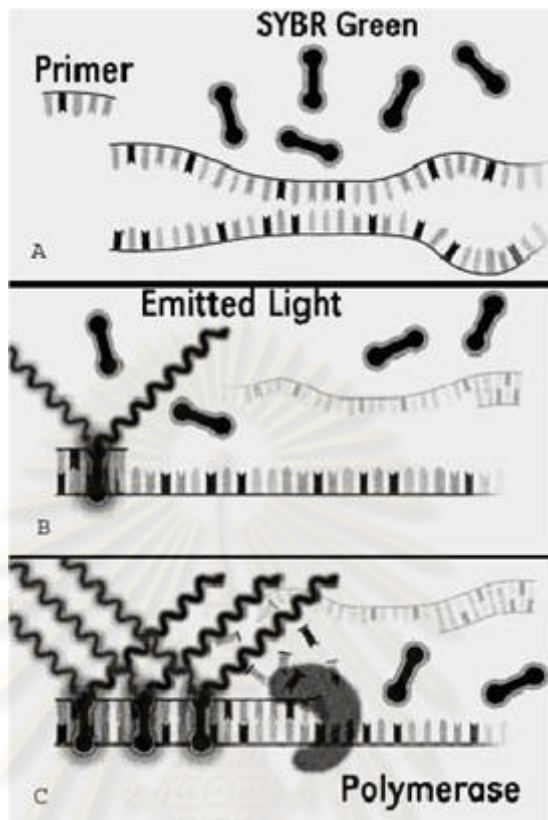
Real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (Real time RT-PCR)

Real time RT-PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจจาก RNA ต้นแบบ โดยหลักการ คือ ทำการสกัด RNA ให้มีความบริสุทธิ์ จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA โดยกระบวนการ reverse transcription โดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase เอนไซม์นี้ทำงาน

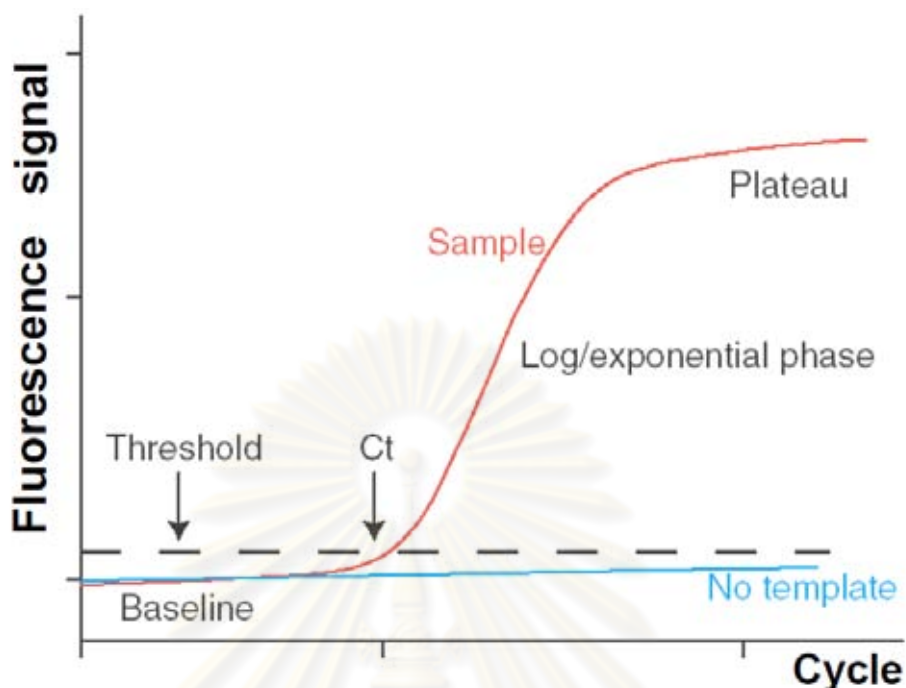
โดยสร้างสายได้ทั้งจากแม่พิมพ์ที่เป็น DNA และ RNA โดยใช้ primer ที่เป็น gene specific primer ซึ่งเป็น primer ที่สามารถใช้ในการสร้างสาย cDNA ที่จำเพาะที่สุดหรือใช้ oligo (dt) primer ซึ่งการใช้ primer ประเภทนี้จะมี RNA จำเพาะที่เป็น Poly (A)⁺ RNA เท่านั้นที่ถูกนำมาใช้เป็นแม่แบบในการสร้างสาย cDNA หรือการใช้ random primer เป็น primer ที่ไม่มีความจำเพาะ จึงสามารถเข้าจับกับ RNA ทุกชนิด ดังนั้น cDNA ที่เกิดขึ้นจึงมีความหลากหลาย จากนั้นอาศัย cDNA ที่ถูกสร้างขึ้นมาเป็นแม่แบบ สร้างสาย DNA ขึ้นมาใหม่ ซึ่งมีลักษณะรูปแบบการทำเหมือน PCR ธรรมดา ในท้ายที่สุดจะได้สาย DNA ที่เพิ่มจำนวนมากมายจากสาย RNA เริ่มต้น การติดตามวัดปริมาณการเพิ่มจำนวนของ DNA เป้าหมายโดยอาศัยการตรวจวัดสัญญาณสารเรืองแสงที่เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ DNA ที่เพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยาในแต่ละรอบที่เกิดปฏิกิริยา ซึ่งสามารถติดตามวัดปริมาณการเพิ่มจำนวนของ DNA ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดปฏิกิริยา (real-time detection)

การตรวจสอบการเพิ่มจำนวน DNA ด้วย SYBR Green

SYBR Green I เป็นสารเรืองแสง (fluorochrome) ประเภทหนึ่งที่สามารถเข้าจับกับ minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่ เมื่อ SYBR Green I เกาะกับดีเอ็นเอสายคู่และถูกกระตุ้น (excite) ด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ต จะมีการคายพลังงาน (emission) ออกมาในรูปของแสงในช่วงคลื่นยาวขึ้น สามารถตรวจจับได้ด้วยตัวรับสัญญาณแสงที่ติดตั้งอยู่กับเครื่อง real time thermocycler แม้ว่า การจับของ SYBR Green I กับดีเอ็นเอสายคู่ เป็นแบบไม่จำเพาะ แต่สามารถแยกสัญญาณการเรืองแสง (fluorescence signal) ที่เกิดจาก primer-dimer และ/หรือ non-specific products อื่น ๆ ออกจาก specific amplified product ได้ด้วยการเปรียบเทียบค่า T_m โดยค่า T_m เป็นคุณสมบัติเฉพาะของดีเอ็นเอสายคู่แต่ละสาย แปรผันโดยตรงกับ % GC content และความยาวของดีเอ็นเอสายคู่ การหาค่า T_m จากเครื่อง real time สามารถวิเคราะห์ได้จาก melting curve โดย สัญญาณการเรืองแสงที่ลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง พวก non-specific products หรือ primer-dimer จะมีค่า T_m แตกต่างจาก specific amplified product เช่น T_m ของพวก primer-dimer จะมีค่าต่ำ เนื่องจากมีขนาดสั้น (15-30 คู่เบส) ต่างจาก amplified DNA ซึ่งจะมีขนาดยาวกว่า (>100 คู่เบส) และมีค่า T_m ที่สูงกว่า (แสดงดังรูปที่ 18)



รูปที่ 18 การตรวจวัด PCR product โดย SYBR Green I (A) ในช่วงของการ denature เพื่อสลาย ดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว SYBR Green I ยังไม่สามารถเข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ (B) เมื่อ PCR primer เข้าจับและสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ SYBR Green I จะเริ่มสอดแทรกเข้าสู่ สายคู่ของดีเอ็นเอและจะมีการเรืองแสง (emission) เมื่อถูกกระตุ้น (excite) ด้วยแสง (C) ในช่วง DNA elongation จะมี SYBR Green I เข้าแทรกในดีเอ็นเอสายคู่เป็นจำนวนมาก สามารถตรวจจับการเรืองแสงอย่างต่อเนื่องแบบ real time ได้ และเมื่อ PCR cycle เวียนกลับมาสู่ ช่วงของการ denature SYBR Green I จะหลุดออกจากสายดีเอ็นเอ การเรืองแสงจะลดลง (จาก <http://www.virusrama.org>)



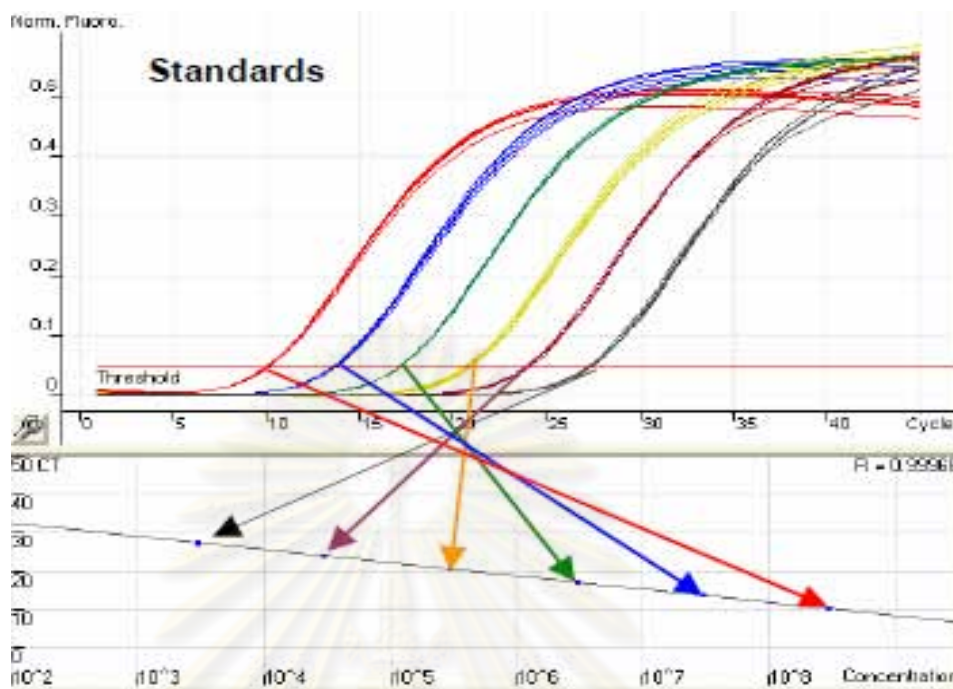
รูปที่ 19 กราฟการเพิ่มจำนวน DNA (amplification plot) ด้วยเทคนิค real time PCR โดยแสดงปริมาณสารเรืองแสง (แกน Y) เทียบกับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X)⁽⁴⁸⁾

การตรวจวัด PCR product โดยอาศัยการวัดปริมาณสารเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบของปฏิกิริยา และใช้ค่า threshold cycle (Ct) เป็นตัวบ่งชี้ปริมาณ DNA ที่มีในสารตั้งต้น (แสดงดังรูปที่ 19) ดังนั้นตัวอย่างที่มีปริมาณ DNA ตั้งต้นมาก จะมีค่า Ct ต่ำ เนื่องจากมีปริมาณ DNA ตั้งต้นมาก จึงใช้จำนวนรอบของปฏิกิริยาเพียงเล็กน้อยก็สามารถเพิ่มปริมาณสารเรืองแสงให้สูงกว่าระดับ threshold ได้ ในขณะที่ตัวอย่างที่มีปริมาณ DNA ตั้งต้นน้อย จะมีค่า Ct สูง เนื่องจากมีปริมาณ DNA ตั้งต้นน้อยจึงต้องใช้รอบในการทำปฏิกิริยามาก

การหาปริมาณสัมบูรณ์ (absolute quantitation) โดย เทคนิค real time-PCR⁽⁴⁸⁾

ในการหาปริมาณสัมบูรณ์ของ DNA ในตัวอย่างที่สนใจโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ที่สร้างจาก DNA มาตรฐานที่ทราบปริมาณและเจือจาง DNA มาตรฐานให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า (10-fold serial dilutions) แล้วนำเอา DNA มาตรฐานดังกล่าวมาใช้เป็น DNA template สำหรับทำ real time-PCR และบันทึกค่า Ct จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐาน โดยที่แกน Y แสดงค่า Ct และแกน X แสดงค่า log concentration ซึ่งจะได้กราฟที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง (แสดงดังรูปที่ 20)

เมื่อต้องการหาปริมาณ DNA ของยีนที่จำเพาะจากตัวอย่างที่สนใจ สามารถทำ real time-PCR และบันทึกค่า Ct เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับ standard curve ก็จะสามารถระบุปริมาณสัมบูรณ์ของ DNA จากตัวอย่างที่สนใจได้ ซึ่งจะแสดงออกมาในหน่วย copies ต่อไมโครลิตร



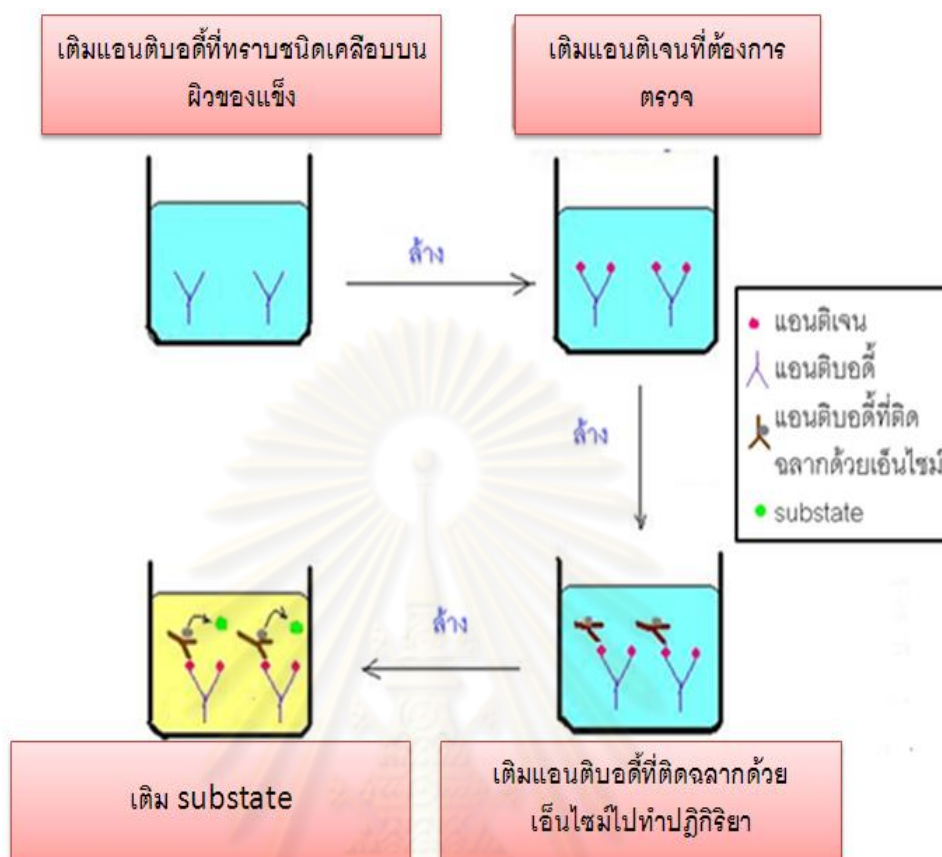
รูปที่ 20: แสดงการสร้างกราฟมาตรฐาน จากค่า Ct จาก DNA มาตรฐานที่ถูกเจือจาง⁽¹⁹⁾

การหาปริมาณเชิงเปรียบเทียบ (relative quantitation) โดยเทคนิค real-time PCR⁽⁴⁸⁾

เป็นการคำนวณหาปริมาณเชิงเปรียบเทียบของ DNA ระหว่างตัวอย่างที่สนใจกับตัวอย่างควบคุม โดยการนำค่า Ct ของตัวอย่างที่สนใจ (sample) และตัวอย่างควบคุม (control) ที่ได้จากรéal time-PCR มาคำนวณ โดยผลที่ได้จะแสดงออกมาในรูปจำนวนเท่าที่แตกต่างกัน โดยสูตรการคำนวณแสดงดังภาคผนวก ง

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

เป็นวิธีตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดี โดยการให้แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ทราบชนิดเคลือบติดบนผิวของแข็ง (solid phase) หลังจากนั้น เติมแอนติบอดีที่ต้องการตรวจลงไป ส่วนที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออก เติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ไปทำปฏิกิริยาอีกชั้นหนึ่ง และเติมสารตั้งต้น (substrate) ลงไป ดังนั้นการย่อยสารตั้งต้นจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณแอนติบอดีในสิ่งส่งตรวจ (แสดงดังรูปที่ 21)



รูปที่ 21 หลักการของเทคนิค ELISA สำหรับการตรวจหาแอนติเจนที่สนใจ
(ภาพปรับปรุงจาก <http://en.wikibooks.org>)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

ประชากร (target population) ผู้เข้ารับการผ่าตัดรักษาโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีภาวะโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบจากการหนาตัวของ ligamentum flavum อายุระหว่าง 40-80 ปี

ประชากรกลุ่มตัวอย่าง (sample population) ผู้เข้ารับการผ่าตัดรักษาโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีภาวะโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบจากการหนาตัวของ ligamentum flavum อายุระหว่าง 40-80 ปี จากแผนกออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

เกณฑ์การคัดเลือกเข้าศึกษา (inclusion criteria) ผู้เข้ารับการผ่าตัดรักษาโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีภาวะโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบจากการหนาตัวของ ligamentum flavum อายุระหว่าง 40-80 ปี ที่ไม่มีโรคอื่นร่วมด้วย และยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้

เกณฑ์การคัดออก (exclusion criteria) ผู้เข้ารับการผ่าตัดรักษาโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีภาวะโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบจากการหนาตัวของ ligamentum flavum ที่อายุไม่อยู่ในเกณฑ์ และ /หรือมีโรคอื่นร่วมด้วย และ /หรือไม่ยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้

ขนาดของประชากรตัวอย่าง (sample size) การศึกษาในครั้งนี้จะใช้จำนวนกลุ่มประชากรตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีภาวะช่องโพรงกระดูกสันหลังตีบบริเวณเอวจากการหนาตัวของ ligamentum flavum ที่เข้ารับการผ่าตัดรักษาภาวะช่องโพรงกระดูกสันหลังตีบบริเวณเอว จากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งจะคำนวณกลุ่มตัวอย่าง โดยใช้สูตรคำนวณ⁽⁵³⁾ ดังนี้

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} \sqrt{P_1 Q_1} + Z_{\beta} \sqrt{P_2 Q_2})^2}{(P_1 - P_2)^2}$$

$$\text{ที่ } \alpha \equiv 0.05; Z_{\alpha/2} = 1.96$$

$$\beta = 0.10; Z_{\beta} = 1.28$$

Z = ค่า Z score ที่ระดับความเชื่อมั่น

P_1 = อัตราการเกิดการแสดงออกของยีนในชิ้นเนื้อปกติ (control)

P_2 = อัตราการเกิดการแสดงออกของยีนในชิ้นเนื้อที่เกิดโรค

Q = $(1 - \text{อัตราการเกิดการแสดงออกของยีนในชิ้นเนื้อ})$

$$n = \frac{[1.96 \sqrt{(0.25)(0.75)} + 1.28 \sqrt{(0.6)(0.4)}]^2}{(0.25 - 0.6)^2} = 17.77 \text{ ตัวอย่าง}$$

เพราะฉะนั้นจะต้องใช้ตัวอย่างในการศึกษาวิจัยครั้งนี้อย่างน้อย 18 ตัวอย่าง แต่เนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องการเก็บตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวจะได้มาเมื่อผู้ป่วยที่มีโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่ามีภาวะโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบบริเวณเอว (lumbar spinal stenosis) และจำเป็นต้องรักษาโดยการผ่าตัดเท่านั้น

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- 1.1 Autoclave (Hydroclave Harvey, USA)
- 1.2 Automatic adjustable micropipette (Eppendorf, Germany)
- 1.3 Balance (Satorius)
- 1.4 Centrifuge, refrigerated centrifuge (Eppendorf, USA)
- 1.5 Centrifuge, microcentrifuge high speed (Eppendorf, USA)
- 1.6 Combs (BIO-RAD, Hercules, California, USA)
- 1.7 NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer (scientific: USA)
- 1.8 Blade (Parabolar, Germany)
- 1.9 Pelsel and motor
- 1.10 Cylinder : 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml (Pyrex, USA)
- 1.11 Rotor gene 3000 (BIO-RAD, USA)
- 1.12 Electrophoresis chamber set (BIO-RAD, USA)
- 1.13 Freezer -80 °C (Forma Scientific, USA)
- 1.14 Gel Doc 1000 (BIO-RAD, USA)
- 1.15 Multi-block heater (Techne DRI Block, USA)
- 1.16 Multi-channel pipettor (Biohit, Finland)
- 1.17 Pipette rack (Autopack, USA)

- 1.18 ELISA Plate Reader (BIO-RAD, USA)
- 1.19 Reagent bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Duran, USA)
- 1.20 Refrigerator (Sanyo, Japan)
- 1.21 Vortex mixer (Scientific Industry, USA)
- 1.22 Water purification equipment (Water pro Ps, Labconco USA)

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. Pierce[®] BCA[™] protein assay kit (Piercenet, USA)
2. Centrifuge tube, sterile (Elkay, USA)
3. Disposable gloves (Proglove, Thailand)
4. Micro tube 1.5 ml (BIO-RAD, USA)
5. Needle No.20, sterile (Nipro, Japan)
6. Syringe disposable (Nipro, Japan)
7. PCR marker (Bioexcellence, UK)
8. Pipette tip (AxyGen, USA)
9. RNA isolation RNeasy Mini kit (Qiagen, Germany)
10. RNA later[™] (Qiagen, Germany)
11. SuperScript[™] III Platinum[®] One-Step quantitative RT-PCR (Invitrogen, USA)
12. ProteinExtract[®] Protein precipitation Kit (Meck, USA)
13. Quantikine[®] Human FGF basic Immunoassay (R&D Systems, USA)
14. 10000X SYBR (Invitrogen, USA)

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. สารเคมีทั่วไป
 - 1.1 70% ethanol
2. สารเคมีสำหรับการสกัด RNA
 - 2.1 Liquid nitrogen
 - 2.2 Buffer RLT
 - 2.3 Buffer RW1

- 2.4 Buffer RPE
3. สารเคมีสำหรับการทำ Real time RT-PCR
 - 3.3.1.1 DepC water
 - 3.3.2 10 μ M primer forward
 - 3.3.3 10 μ M primer reverse
 - 3.3.4 2X buffer mix (Invitrogen, USA)
 - 3.3.5 SuperScriptTM III Platinum[®] (Invitrogen, USA)
 - 3.3.6 SYBR (Invitrogen, USA)
4. สารเคมีสำหรับการทำ agarose gel electrophoresis
 - 3.4.1 Agarose molecular biology grade
 - 3.4.2 PCR marker (
 - 3.4.3 Loading dye
 - 3.4.4 1X TAE buffer
 - 3.4.5 Ethidium bromide
5. สารเคมีสำหรับการทำ ligation
 - 3.5.1 pGEM vector
 - 3.5.2 5X T4 ligase buffer
 - 3.5.3 T4 ligase enzyme
6. สารเคมีสำหรับการทำ Transformation
 - 3.6.1 LB broth
 - 3.6.2 IPTG
 - 3.6.3 X-gal
 - 3.6.4 Ampicillin
7. สารเคมีสำหรับการทำ สกัดโปรตีน
 - 3.7.1 0.9% Normal saline
 - 3.7.2 Precipitation 1
 - 3.7.3 Precipitation 2
 - 3.7.4 Precipitation 3
 - 3.7.5 Precipitation 4

- 3.7.6 Wash buffer
- 8. สารเคมีสำหรับการทำ ELISA
 - 3.8.1 bFGF conjugate
 - 3.8.2 bFGF standard
 - 3.8.3 Assay diluent RD 1-43
 - 3.8.4 Calibrator diluent RD 1-54
 - 3.8.5 Wash buffer
 - 3.8.6 Color reagent A
 - 3.8.7 Color reagent B
 - 3.8.8 Stop solution

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. อายุและเพศของผู้ป่วย
2. ปริมาณ RNA
3. ภาพถ่ายจากการทำ agarose gel electrophoresis
4. ค่า Ct ที่ได้จากการทำ real time RT-PCR
5. ค่าความเข้มของแถบ DNA บน agarose gel electrophoresis
6. ปริมาณโปรตีน

ข้อมูลทั้งหมดที่ได้ทำการเก็บโดยการจัดเก็บและบันทึกลงคอมพิวเตอร์

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัดโดยเก็บชิ้นเนื้อจาก ligamentum flavum ขนาด 0.2× 0.2 เซนติเมตร จากผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่ามีภาวะโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบบริเวณเอว (lumbar spinal stenosis) ในระดับกระดูกสันหลังซึ่งเกิดพยาธิสภาพและไม่เกิดพยาธิสภาพ

การเก็บชิ้นเนื้อ

1. ทำการเก็บชิ้นเนื้อบริเวณ ligamentum flavum ของผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีภาวะโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบบริเวณเอว ทั้งในระดับกระดูกสันหลังที่เกิดรอยโรค และระดับไม่เกิดรอยโรค

2. นำชิ้นเนื้อที่ได้จากผู้ป่วยมาตัดแบ่งและชั่งน้ำหนักให้แต่ละชิ้นหนักประมาณ 30 มิลลิกรัม
3. นำชิ้นเนื้อที่ได้จากข้อ 1. ไปใส่ใน microtube และเติมน้ำยารักษาสภาพ RNA ลงไป 300 ไมโครลิตร (สัดส่วน 10 ไมโครลิตร ต่อน้ำหนักชิ้นเนื้อ 1 มิลลิกรัม)
4. นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -80 °C เพื่อรอสกัด RNA ต่อไป

สกัดแยก total RNA จากชิ้นเนื้อ

ขั้นตอน

1. นำชิ้นเนื้อ 30 มิลลิกรัมออกจากน้ำยารักษาสภาพ RNA มาใส่ครกบด
2. การทำให้ชิ้นเนื้อแตกละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน (disruption & homogenization)
 - ใช้ครกและสากบดชิ้นเนื้อใน liquid nitrogen จนเป็นผง
 - เทผงและ liquid nitrogen ลงใน microcentrifuge tube
 - ปล่อยให้ liquid nitrogen จนหมด
 - เติม buffer RLT 600 ไมโครลิตร
3. ทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenization) โดย ผ่านสารละลายเซลล์ (lysate) เข้าออกเข็มเบอร์ 20 จำนวน 5-10 ครั้ง
4. ปั่นตกตะกอน (centrifuge) สารละลายเซลล์ (lysate) เป็นเวลา 3 นาทีที่ความเร็วสูงสุด และดูดเอาแต่ของเหลวที่อยู่ชั้นบน (supernatant) ใส่ใน microcentrifuge tube อันใหม่
5. เติม 70% ethanol 1 เท่าผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลง
6. ดูดสารละลายเซลล์ (lysate) 700 ไมโครลิตร นำไปใส่ใน spin column ที่ใส่อยู่ใน collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตรนำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที เทของเหลวที่ไหลลงสู่ collection tube
7. เติม Buffer RW1 700 ไมโครลิตร ลงใน RNeasy spin column นำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที เทของเหลวที่ไหลลงสู่ collection tube ทิ้ง
8. เติม Buffer RPE 500 ไมโครลิตร ลงใน RNeasy spin column นำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที เทของเหลวที่ไหลลงสู่ collection tube ทิ้ง

9. เติม Buffer RPE 500 ไมโครลิตร ลงใน RNeasy spin column นำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
10. เปลี่ยน spin column ใส่ collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร อันใหม่ centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
11. เปลี่ยน spin column ใส่ collection tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม RNase-free-water 30-50 ไมโครลิตร ลงใน RNeasy spin column membrane นำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อล้าง RNA ออกจาก membrane จะได้สารละลาย RNA
12. วัดปริมาณและคุณภาพ RNA ที่ได้ทั้งหมดด้วยเครื่อง NanoDrop 1000 ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (RNA ที่มีคุณภาพจะมีค่าอยู่ระหว่างช่วง 1.8-2.0)
13. ปรับความเข้มข้นให้ RNA แต่ละตัวอย่างมีความเข้มข้นเท่ากับ 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

การศึกษาการแสดงออกของยีน *bFGF* ด้วยเทคนิค real time RT-PCR (real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction)

ตาราง 1 แสดง primers ที่ใช้ในการทำ real time RT-PCR

| ชื่อ Primer | ลำดับเบส (5' → 3') | ขนาด (คู่เบส) | อ้างอิง |
|-----------------|-------------------------------|---------------|---------|
| bFGF (Forward) | TAC-AAC-TTC-AAG-CAG-AAG -AG | 283 | 46 |
| bFGF (Reverse) | CAG-CTC-TTA-GCA-GAC-ATT-GG | | |
| GAPDH (Forward) | GTG-AAG-GTC-GGA-GTC-AAC-GG | 107 | - |
| GAPDH (Reverse) | TCA-ATG-AAG-GGG-TCA-TTG-ATG-G | | |

ตารางที่ 2 แสดงชนิดและปริมาณสารเคมีที่ใช้ทำ real time RT-PCR

| สารเคมี | ปริมาณ(ไมโครลิตร) |
|--|-------------------|
| DepC water | 5.25 |
| Forward primer แต่ละยีน (ยีน <i>bFGF, GAPDH</i>) | 0.375 |
| Reverse primer แต่ละยีน (ยีน <i>bFGF, GAPDH</i>) | 0.375 |
| 2x buffer mix | 7.5 |
| Enzyme (Reverse transcriptase และ Taq polymerase) | 0.3 |
| SYBR (10x) | 0.3 |
| Template (ยีน <i>bFGF, GAPDH</i> , positive control และ DNA มาตรฐาน) | 1 |
| รวม | 15 |

ขั้นตอน

- ผสมสารละลายสำหรับ real time RT-PCR ดังตารางที่ 2
- ดูสารละลายที่ผสมจากข้อ 1. ใส่หลอดทดลองสำหรับทำ real time RT-PCR
- นำไปวัดการแสดงออกของยีนโดยเครื่อง real time-PCR โดยใช้สภาวะดังตารางที่ 3
- ตรวจสอบขนาดของยีน *bFGF* และ *GAPDH* โดยการทำให้ agarose gel electrophoresis โดยผสม PCR product 15 ไมโครลิตรกับ 6X loading dye 3 ไมโครลิตร หยดลงในหลุมของ 2 % agarose gel ใช้ marker ที่มีขนาด 100 คู่เบสวัดขนาดของยีน ใช้ 1X TAE buffer เป็นตัวกลาง และจ่ายกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลาประมาณ 40 นาที จากนั้นนำ gel ไปย้อมด้วย 0.2% ethidium bromide เป็นเวลานาน 10-15 นาที ล้าง gel ด้วยน้ำเปล่า 2-3 ครั้ง แล้วนำ gel ไปผ่านเครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต Gel Doc 1000 (BIO-RAD, USA)
- ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *bFGF* และ *GADPH* ดังนี้
 - ใช้โปรแกรม Quantity One และนำผลจากการตรวจวิเคราะห์ความเข้มของแถบ DNA ของ *bFGF* และ *GADPH* ของแต่ละตัวอย่างมาคิดอัตราส่วน
 - บันทึกค่า Ct เพื่อนำไปคำนวณปริมาณเชิงเปรียบเทียบและนำไปเปรียบเทียบกับ standard curve เพื่อคำนวณปริมาณสัมบูรณ์ของ DNA จากตัวอย่าง และนำปริมาณสัมบูรณ์ของ DNA ที่คำนวณได้ของ *bFGF* และ *GADPH* ของแต่ละตัวอย่างมาคิดอัตราส่วน

ตารางที่ 3 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ real time RT-PCR

| PCR cycle | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | เวลา (นาที) |
|-----------------------|----------------------------|-------------|
| Reverse transcription | 50 | 30.00 |
| Pre-denaturation | 95 | 3.00 |
| Denaturation | 95 | 0.15 |
| Annealing | | |
| - bFGF | 55 | 0.30 |
| - GAPDH | 60 | 0.30 |
| Extention | 72 | 0.30 |

การเตรียม positive control และสารละลาย DNA มาตรฐานของยีน *bFGF* และ *GAPDH*

1. การสกัดแถบ DNA ออกจาก gel โดยมีขั้นตอนดังนี้
 - 1.1 นำตัวอย่างที่มีการแสดงออกของยีน *bFGF* ซึ่งได้จากการทำ agarose gel electrophoresis มาตัดเจลในบริเวณที่มีแถบ DNA ขนาดที่ต้องการ
 - 1.2 สกัดแถบ DNA จาก gel ที่ตัดออกมาโดยชุดสกัด GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification kit ซึ่งมีวิธีการดังนี้
 - นำ gel ที่ตัดได้มาชั่งน้ำหนัก
 - เติมสารละลาย capture buffer 10 ไมโครลิตรต่อน้ำหนัก gel 10 มิลลิกรัม
 - นำไปบ่ม (incubation) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจน gel ละลายหมด
 - ดูดสารละลาย 600 ไมโครลิตรมาใส่ GFX column ที่อยู่ใน collection tube
 - บ่ม (incubation) ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที
 - ปั่นตกตะกอนที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
 - เติม wash buffer 500 ไมโครลิตร
 - ปั่นตกตะกอนที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
 - เปลี่ยน GFX column ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตรอันใหม่
 - เติม elution buffer 50 ไมโครลิตร
 - ปั่นตกตะกอนที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
 - นำสารละลายที่ได้เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการ ligation ต่อไป

2. ทำการเชื่อม (ligation) PCR product กับ plasmid (pGAM-T) เพื่อเตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (recombinant plasmid) โดยเตรียมส่วนผสมดังนี้

| | | |
|-----------------|-----|-----------|
| - 2X buffer | 5.0 | ไมโครลิตร |
| - T4 DNA ligase | 1.0 | ไมโครลิตร |
| - pGAM-T | 1.0 | ไมโครลิตร |
| - PCR product | 3.0 | ไมโครลิตร |

จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3. Transformation ด้วยวิธี heat shock เพื่อนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้า competent cells มีวิธีดังนี้

- เตรียม competent cells ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เตรียมได้จากข้อ 1 ปริมาตร 2 ไมโครลิตรลงไป

- นำสารละลายที่ได้ไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที
- นำไป heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 50 วินาที
- นำกลับมาแช่น้ำแข็งอีกครั้งเป็นเวลา 2 นาที
- เติม SOC medium ปริมาตร 950 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง
- นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง
- นำไปปั่นตกตะกอนที่ 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
- เติสารละลายที่อยู่บน (supernatant) ทั้ง จะเหลือแต่ตะกอนของเซลล์ที่กั้นหลอด

ประมาณ 45 ไมโครลิตร

- เติม X-gal 15 ไมโครลิตรและ IPTG 5 ไมโครลิตรลงในหลอด ผสมให้เข้ากัน
- นำมากระจาย (spread plate) ให้ทั่วจานที่ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (LB agar plate)
- นำจานเลี้ยงเชื้อไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาข้ามคืน

4. ทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (Blue/White colony selection) ดังนี้

- เลือกเชื้อ (pick colony) เฉพาะโคโลนีสีขาวที่ขึ้นบนจานเลี้ยงเชื้อ เพื่อนำไปทำ colony PCR เพื่อตรวจสอบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่แบคทีเรียรับไว้ว่ามีชิ้นส่วนของยีน *bFGF* อยู่หรือไม่ โดยใช้ primer M13 ซึ่งเป็น primer ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณ pGEM-T vector และตรวจสอบผลด้วยการทำ agarose gel electrophoresis

- เชื้อโคโลนีสีขาวตำแหน่งเดียวกับที่ใช้ทำ colony PCR นำไปใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (LB brot) ที่อยู่ในหลอดทดลองปริมาตร 2 มิลลิลิตร

- นำไปเขย่า (shaking) ที่ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ

5. การสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดออกจากแบคทีเรีย (Plasmid extraction)

- ดูดแบ่ง bacteria culture ที่เตรียมได้จากข้อ 4. จำนวนปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำมาใส่หลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร

- นำไปปั่นตกตะกอนที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- เติมน้ำที่ละลายที่อยู่นบน (supernatant) ที่ทิ้ง จะเหลือแต่ตะกอนของเซลล์ที่กั้นหลอด
- เติมน้ำ lysis solution ที่เย็นจัดปริมาตร 400 ไมโครลิตร
- Vortex 30 วินาทีและปั่นที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที
- ดูดสารละลายเซลล์ (lysate) ใส่ spin column และปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที
- เติมน้ำ wash buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที
- เติมน้ำละลายส่วนที่ผ่าน spin column ที่ทิ้งและปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที
- นำ spin column ใส่ลงใน collection tube อันใหม่และเติมน้ำ elution buffer 50

ไมโครลิตร

- นำไปปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาทีจะได้สารละลายพลาสมิดที่บริสุทธิ์ 50 ไมโครลิตร เพื่อนำไปใช้ทำ positive control และสารละลาย DNA มาตรฐานต่อไป

การสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) จากสารละลาย DNA มาตรฐาน

1. นำสารละลายพลาสมิดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง Nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร
2. คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายพลาสมิดในหน่วย coppise/ไมโครลิตร ดังนี้

$$[\text{DNA}] = \frac{[\text{DNA}](\text{g}/\mu\text{L}) \times 6.02 \times 10^{23}}{\text{recombinant plasmid (nt)} \times 660}$$

โดยที่ pGEM-T vector มีขนาดเท่ากับ 3,015 nucleotides (nt)

3. เมื่อทราบความเข้มข้นของสารละลายพลาสมิดแล้วจึงนำมาทำการเจือจางสารละลายเป็น DNA มาตรฐานเป็นความเข้มข้นที่ลดลงครั้งละ 10 เท่า (10 fold serial dilution) โดยให้ความเข้มข้นของสารละลายพลาสมิดอยู่ระหว่าง 10^9 - 10^0 coppies/ไมโครลิตรของ PCR reaction
4. นำสารละลาย DNA มาตรฐานที่ได้จากข้อ 3.ไปทำเป็น template สำหรับทำ real time RT-PCR และบันทึกค่า Ct จาก amplification plot จากนั้นสามารถสร้างกราฟมาตรฐาน

(standard curve) โดยที่แกน Y แสดงค่า Ct และแกน X แสดงค่า log concentration ซึ่งจะได้กราฟที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง (ดังแสดงในภาคผนวก ค)

- หาปริมาณ DNA ของยีน *bFGF* และ *GAPDH* จากตัวอย่าง โดยทำ real time RT-PCR และบันทึกค่า Ct และนำไปเปรียบเทียบกับ standard curve ก็จะสามารถคำนวณปริมาณสัมบูรณ์ของ DNA จากตัวอย่างได้

ศึกษาหาปริมาณโปรตีนที่แสดงออกในชั้นเนื้อ ligamentum flavum

การสกัดโปรตีนจากชั้นเนื้อ

ขั้นตอน

- นำชั้นเนื้อหนัก 30 มิลลิกรัม มาใส่ครกบดใน liquid nitrogen จนเป็นผง
- เทผงและ liquid nitrogen ลงใน microcentrifuge tube
- ปล่อยให้ liquid nitrogen จนหมด
- เติม 0.9% NSS 200 ไมโครลิตร
- Vortex และปั่นตกตะกอนที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- ดูดเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวส่วนบน (supernatant) ใส่ใน microcentrifuge tube ใหม่
- เติมสารสำหรับตกตะกอนโปรตีน (precipitation agent) ที่เย็นจัด 800 ไมโครลิตร
- Vortex และนำไปบ่ม (incubation) ที่ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที
- ปั่นตกตะกอนที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิต่ำจะได้ก้อนโปรตีน (pellet protein)
- ล้างก้อนโปรตีนด้วย wash solution
- Vortex และปั่นตกตะกอนที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิต่ำ
- ดูด wash solution ทิ้ง
- ทำขั้นที่ 10 และ 11 ซ้ำ
- วางทิ้งไว้ให้ก้อนโปรตีนให้แห้ง
- นำไปละลายน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ
- นำไปเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์โปรตีนต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วย Pierce[®] BCA[™] protein assay kit

(Piercenet, USA)

มีขั้นตอนดังนี้

1. ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานดังตารางที่ 4 และ 5
2. ดูดสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัดโปรตีน และสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้จากข้อ 1. ตัวอย่างละ 25 ไมโครลิตร ลงใน 96 well-plate
3. ทำการเตรียมสารละลาย working reagent โดยผสม reagent A และ reagent B ในอัตราส่วน 50:1
4. ดูดสารละลาย working reagent 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมที่ใส่สารละลายตัวอย่าง
5. ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที
6. เมื่อครบเวลาทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ทำการคำนวณหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด

ตารางที่ 4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ในช่วงความเข้มข้น 5 - 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

| หลอดที่ | ปริมาตร diluents (ไมโครลิตร) | ปริมาตร BSA (ไมโครลิตร) | ความเข้มข้น BSA (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) |
|---------|---------------------------------|----------------------------|--|
| 1 | 700 | 100 ของ stock | 250 |
| 2 | 400 | 400 ของหลอดที่ 1 | 125 |
| 3 | 450 | 300 ของหลอดที่ 2 | 50 |
| 4 | 400 | 400 ของหลอดที่ 3 | 25 |
| 5 | 400 | 100 ของหลอดที่ 4 | 5 |
| 6 | 400 | 0 | 0 (blank) |

ตารางที่ 5 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA (ในช่วงความเข้มข้น 20 - 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

| หลอดที่ | ปริมาตร diluents (ไมโครลิตร) | ปริมาตร BSA (ไมโครลิตร) | ความเข้มข้น BSA (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) |
|---------|---------------------------------|----------------------------|--|
| 1 | 0 | 300 ของ stock | 2,000 |
| 2 | 125 | 375 ของ stock | 1,500 |
| 3 | 325 | 325 ของ stock | 1,000 |
| 4 | 175 | 175 ของหลอดที่ 2 | 750 |
| 5 | 325 | 325 ของหลอดที่ 3 | 500 |
| 6 | 325 | 325 ของหลอดที่ 5 | 250 |
| 7 | 325 | 325 ของหลอดที่ 6 | 125 |
| 8 | 400 | 100 ของหลอดที่ 7 | 25 |
| 9 | 400 | 0 | 0 (blank) |

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน bFGF

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน bFGF โดยวิธี ELISA โดยใช้ Quantikine® Human FGF basic Immunoassay (R&D Systems, USA) มีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมสารละลายสำหรับใช้งานดังนี้

1.1 เจือจาง wash buffer 20 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น 480 มิลลิลิตร

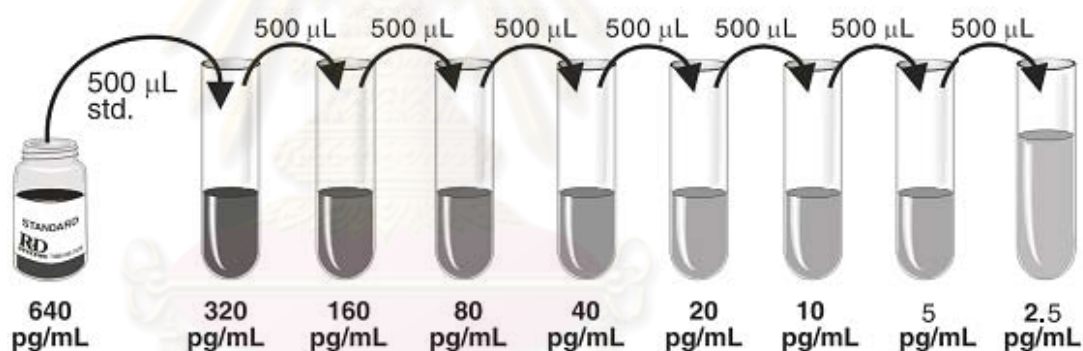
1.2 เตรียม substrate solution โดยผสม reagent A และ reagent B ปริมาณอย่างละเท่า
เข้าด้วยกัน

1.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน โดย

1.3.1 ดูดสารละลาย bFGF standard stock solution ที่มีความเข้มข้น 640 พิโคกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตรผสมกับ สารละลาย calibrator diluent RD-5-14 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ดังนั้นจะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 320 พิโคกรัม/ไมโครลิตร

1.3.2 ผสมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 320 พิโคกรัม/ไมโครลิตรกับ สารละลาย calibrator diluent RD-5-14 ปริมาตร 500 ไมโครลิตรจะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 160 พิโคกรัม/ไมโครลิตร

1.3.3 ทำต่อจนกระทั่งได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 2.5 พิโคกรัม/ไมโครลิตร (ดังแสดงรูปที่ 22) และใช้สารละลาย calibrator diluent RD-5-14 เป็น สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0 พิโคกรัม/ไมโครลิตร



รูปที่ 22 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐาน สำหรับวัดปริมาณโปรตีน bFGF โดยเทคนิค

ELISA (จาก <http://www.rndsystems.com>)

2. เติมสารละลาย diluent RD-1-43 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของ microplate
3. เติมสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้จากข้อ 1.3 และสารละลายตัวอย่างที่สกัดจากชิ้นเนื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุมของ microplate และปิดด้วย cover strip
4. นำไปป้อนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
5. เทของเหลวออกจาก microplate และซับให้แห้ง
6. ล้างโดยการเติม wash buffer 400 ไมโครลิตรลงแต่ละหลุม โดยล้างทั้งหมด 4 ครั้ง
7. เติม bFGF conjugate ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงแต่ละหลุม
8. นำไปป้อนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
9. ล้างโดยการเติม wash buffer 400 ไมโครลิตรลงแต่ละหลุม โดยล้างทั้งหมด 4 ครั้ง

10. เติม substrate solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงแต่ละหลุม
11. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที
12. เติม stop solution ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงแต่ละหลุม
13. นำไปวัด OD (optical density) ที่ความยาวคลื่น 540 และ 450 โดยค่าที่ได้เท่ากับ $OD_{540} - OD_{450}$
15. นำค่า OD ของสารละลายมาตรฐานที่ได้มาสร้างกราฟสารละลายมาตรฐาน (แสดงในภาคผนวก ค) เพื่อคำนวณปริมาณโปรตีน bFGF ของแต่ละตัวอย่าง

การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) เป็นสถิติที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรวบรวมข้อมูล และการนำเสนอข้อมูล โดยจะแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย (mean) ค่ามัธยฐาน (median) เปอร์เซ็นไทล์ (percentile) ในรูปแบบกราฟและตาราง

สถิติเชิงอนุมาน (inferential statistic) เป็นสถิติที่ใช้สรุปผลของประชากร เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง ได้แก่ การเปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของยีน/โปรตีน bFGF ระหว่างชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรค/ไม่เกิดรอยโรค และ เพศชาย/หญิง โดยใช้ Mann-Whitney U test และในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน/โปรตีน bFGF และอายุจะใช้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์และความถดถอยเชิงเส้นตรงของโปรแกรม SPSS 16.0 ในการวิเคราะห์ข้อมูล ซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

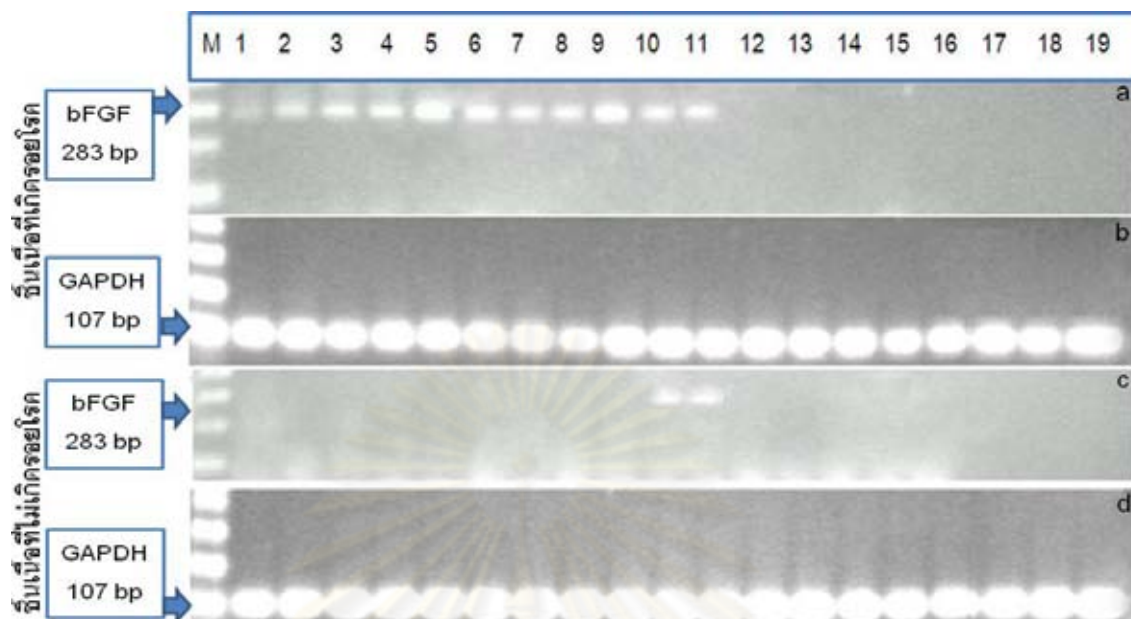
1. ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *bFGF* ระหว่างชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคของผู้ป่วยรายเดียวกัน

1.1 ผลการวิเคราะห์แถบความเข้มของ DNA ของยีน *bFGF* ระหว่างชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคของผู้ป่วยรายเดียวกันโดยวิธี agarose gel electrophoresis

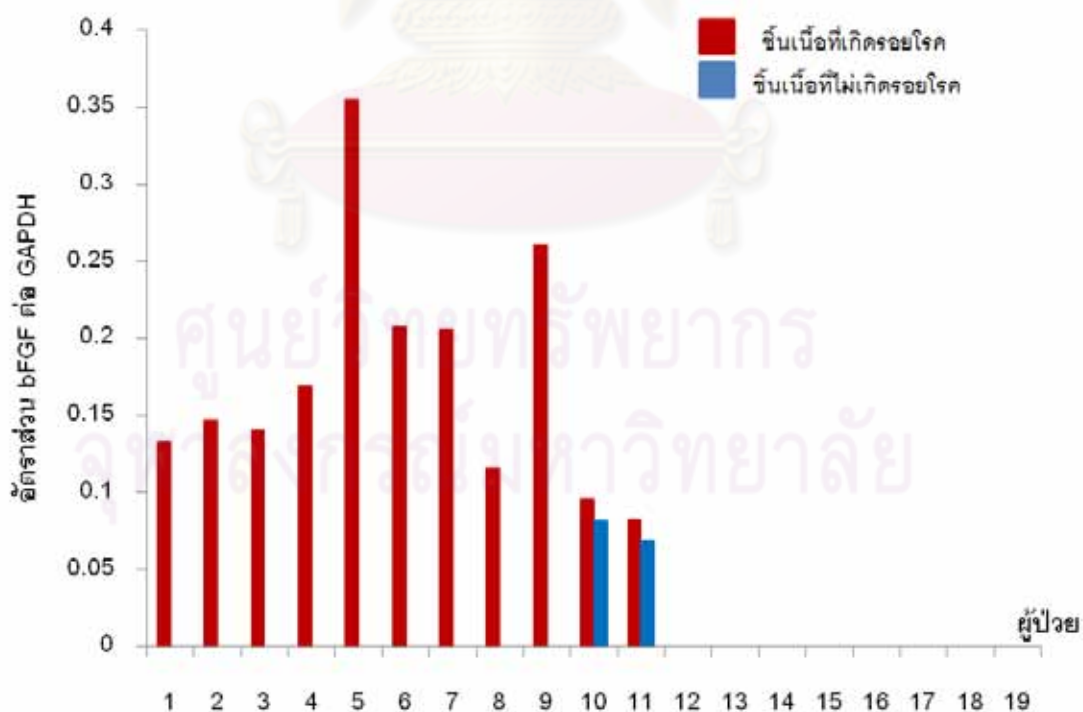
จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *bFGF* จากชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคในผู้ป่วยรายเดียวกัน โดยการทำให้ agarose gel electrophoresis ของ DNA ที่ได้จากการทำ real time RT-PCR ของยีน *bFGF* และ *GAPDH* จากนั้นย้อมด้วย ethidium bromide และนำไปส่องดูด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ตโดยเครื่อง Gel Doc 1000 (BIO-RAD, USA) และทำการบันทึกภาพ จากภาพแถบ DNA ที่บันทึกได้พบว่าแถบ DNA ของยีน *bFGF* และ *GAPDH* มีขนาด 283 และ 107 คู่เบส ตามลำดับ

จากการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *bFGF* ระหว่างชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคจากภาพแถบ DNA ยีน *bFGF* ของผู้ป่วยจำนวน 19 ราย พบว่าการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคจำนวน 11 ราย ไม่พบการแสดงออกของยีน *bFGF* จำนวน 8 ราย ส่วนในชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรคพบการแสดงออกของยีน *bFGF* จำนวน 2 ราย ไม่พบการแสดงออกของยีน *bFGF* จำนวน 17 ราย และพบว่าการแสดงออกของ *GAPDH* ในผู้ป่วยทุกรายทั้งในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค (แสดงดังรูปที่ 23)

จากการวิเคราะห์ค่าความเข้มของแถบ DNA ของยีน *bFGF* และ *GAPDH* ในชิ้นเนื้อที่มีรอยโรคและไม่มียีนโรคของผู้ป่วยแต่ละคน โดยโปรแกรม Quantity One และนำค่าที่ได้มาหาอัตราส่วนยีน *bFGF:GAPDH* พบว่าจากผู้ป่วยจำนวน 19 ราย มีผู้ป่วยจำนวน 9 รายมีระดับการแสดงออกของยีน *bFGF:GAPDH* ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคมากกว่าชิ้นเนื้อไม่เกิดรอยโรคและพบว่าผู้ป่วยจำนวน 10 ราย มีระดับการแสดงออกของยีน *bFGF:GAPDH* ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคแตกต่างกับชิ้นเนื้อไม่เกิดรอยโรคเล็กน้อย (แสดงดังรูปที่ 24)



รูปที่ 23 ภาพถ่ายแถบ DNA ของยีน *bFGF* และ *GAPDH* ของผู้ป่วยแต่ละราย จากการทำ agarose gel electrophoresis, M คือ maker แถวที่ 1-19 คือ ผู้ป่วยแต่ละคน , รูปa-b ภาพแถบ DNA จากชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคของยีน *bFGF* และ *GAPDH* ตามลำดับ, รูปc-d ภาพแถบ DNA จากชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรคของยีน *bFGF* และ *GAPDH* ตามลำดับ

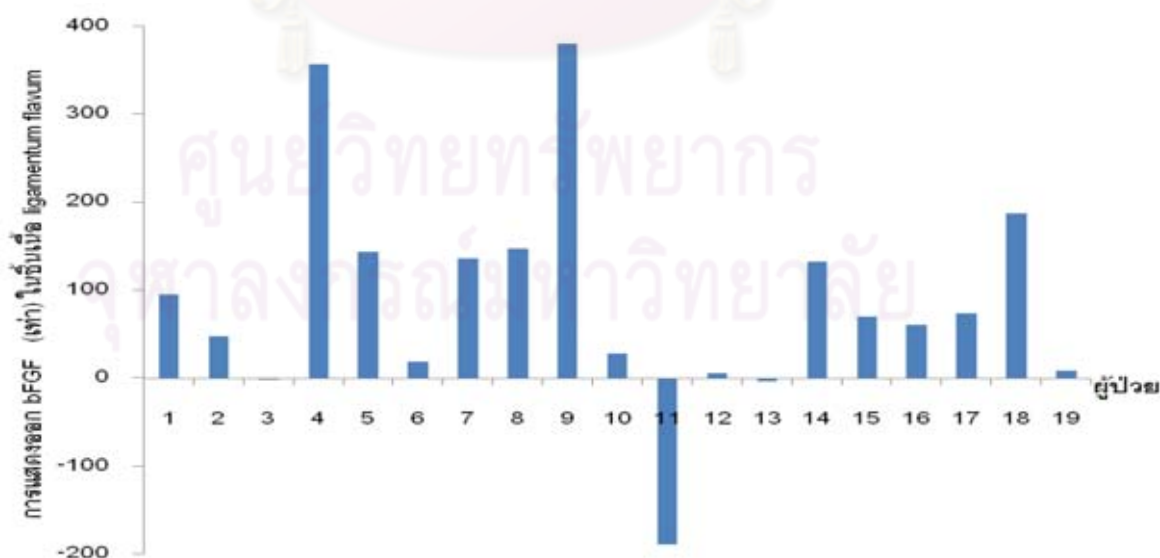


รูปที่ 24 กราฟแท่งแสดงการเปรียบเทียบอัตราส่วนความเข้มของแถบ DNA ของยีน *bFGF:GAPDH* ระหว่างชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคในผู้ป่วยรายเดียวกันของแต่ละคน

1.2 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบอัตราการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคของผู้ป่วยรายเดียวกันโดยวิธี real time RT-PCR

อัตราการแสดงออกของยีน *bFGF* สามารถวิเคราะห์จากการวัดปริมาณยีน *bFGF* และ *GAPDH* (reference gene) โดยเทคนิค real time RT-PCR และนำค่า Ct (cycle threshold) ที่ได้มาคำนวณหาปริมาณเชิงเปรียบเทียบ (relative quantitation) ของ DNA ระหว่างชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค โดยผลการเปรียบเทียบจะแสดงออกมาในรูปจำนวนเท่าของการแสดงออกของยีน *bFGF* ที่แตกต่างกันระหว่างชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ค) และใช้โปรแกรม Microsoft excel หาค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (geometric mean) เพื่อวิเคราะห์อัตราการแสดงออกเฉลี่ยของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคเปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค

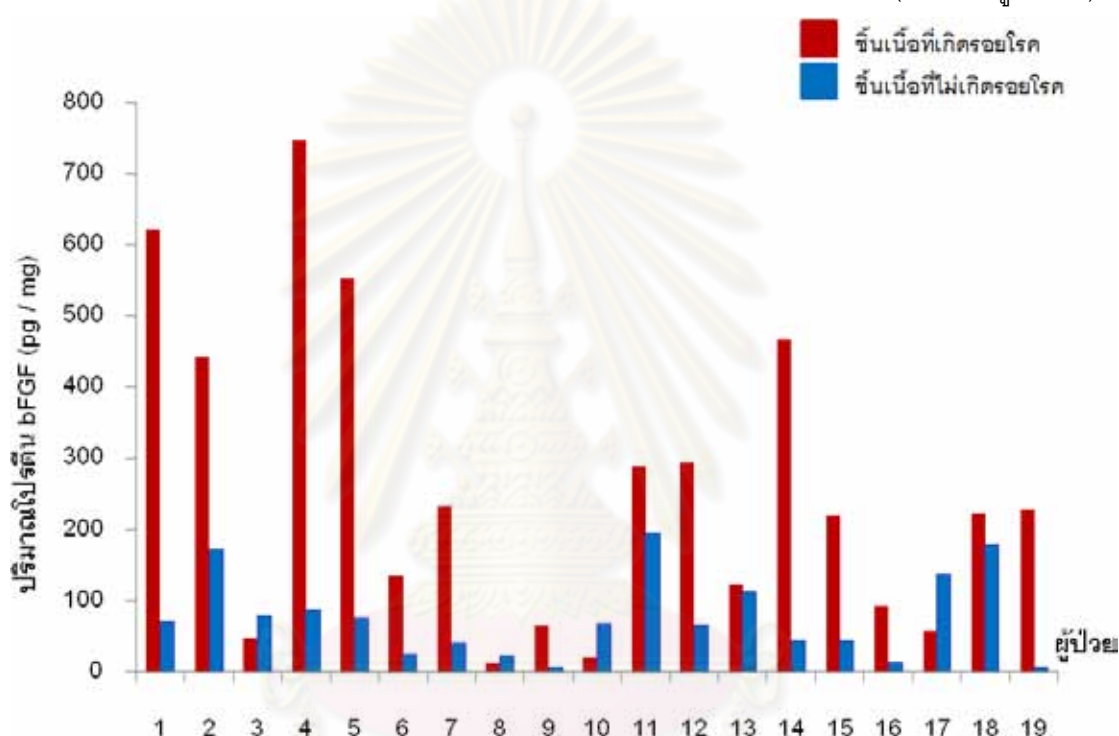
จากการศึกษาในผู้ป่วยจำนวน 19 ราย พบว่ามีการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคเปรียบเทียบกับไม่เกิดรอยโรคเฉลี่ยแตกต่างกันประมาณ 51 เท่า โดยมีผู้ป่วยจำนวน 16 รายมีอัตราการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคมากกว่าชิ้นเนื้อไม่เกิดรอยโรค มีอัตราการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคมากกว่าชิ้นเนื้อไม่เกิดรอยโรคเฉลี่ย 70.63 เท่า และมีผู้ป่วยจำนวน 3 รายมีอัตราการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคน้อยกว่าชิ้นเนื้อไม่เกิดรอยโรค โดยมีการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรคมากกว่าชิ้นเนื้อเกิดรอยโรคเฉลี่ย 10.48 เท่า (แสดงดังรูปที่ 25)



รูปที่ 25 กราฟแท่งเปรียบเทียบอัตราการแสดงออกของยีน *bFGF* ระหว่างชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคในผู้ป่วยแต่ละคน

1.3 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณโปรตีน bFGF ระหว่างชั้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคของผู้ป่วยรายเดียวกัน

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน bFGF ในชั้นเนื้อที่มีรอยโรคและชั้นเนื้อที่ไม่มีรอยโรคของผู้ป่วยแต่ละคน โดยวิธี ELISA จากผู้ป่วยจำนวน 19 ราย พบว่ามีผู้ป่วยจำนวน 16 รายมีปริมาณโปรตีน bFGF ในชั้นเนื้อที่เกิดรอยโรคมากกว่าชั้นเนื้อไม่เกิดรอยโรคและพบว่ามีผู้ป่วยจำนวน 3 รายมีปริมาณโปรตีน bFGF ในชั้นเนื้อที่เกิดรอยโรคน้อยกว่าชั้นเนื้อไม่เกิดรอยโรค (แสดงดังรูปที่ 26)



รูปที่ 26 กราฟแท่งแสดงการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน bFGF จากชั้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและชั้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรคในผู้ป่วยรายเดียวกันแต่ละคน

2. ผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน bFGF ระหว่างกลุ่มชั้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค

2.1 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของแถบ DNA ของยีน bFGF ใน ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มชั้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและชั้นเนื้อไม่เกิดรอยโรค

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน bFGF โดยการวัดความเข้มข้นของแถบ DNA จากชั้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคที่ได้จากการทำ real time RT-PCR ด้วยโปรแกรม Quantity One และนำค่าความเข้มข้นของแถบ DNA ที่ได้ของยีน bFGF และ

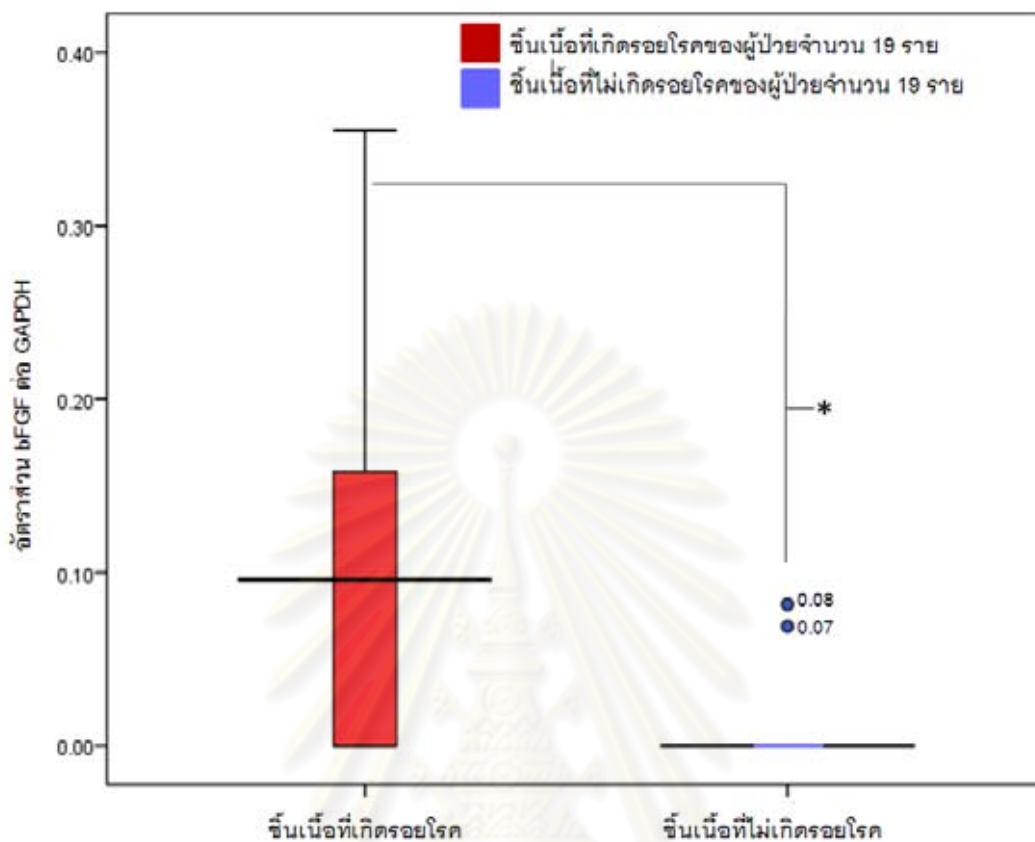
GADPH ของแต่ละตัวอย่างมาคำนวณอัตราส่วน พบว่าค่ามัธยฐาน หรือ เปอร์เซ็นไทล์ที่ 50 ของอัตราส่วน $bFGF : GADPH$ จากกลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและกลุ่มชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค มีค่าเท่ากับ 0.09 และ 0 ตามลำดับ (แสดงให้เห็นโดยเส้นสีดำตรงกลางระหว่าง box ของกราฟ) ของล่างของ box (เปอร์เซ็นไทล์ที่ 25) ของชิ้นเนื้อทั้งสองกลุ่มมีค่าเท่ากับ 0 ของบนของ box (เปอร์เซ็นไทล์ที่ 75) มีค่าเท่ากับ 0.17 และ 0 ตามลำดับ ค่า outlier ที่สูงกว่าเปอร์เซ็นไทล์ที่ 95 มีค่าเท่ากับ 0.36 และ 0.08 ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

จากการหาค่าเฉลี่ยความเข้มของแถบ DNA ของยีน $bFGF : GADPH$ ในกลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและกลุ่มชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรคพบว่า มีค่าเท่ากับ 0.10 และ 0.008 ตามลำดับ และจากการเปรียบเทียบความแตกต่างความเข้มของแถบ DNA ของยีน $bFGF : GADPH$ ระหว่างกลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและกลุ่มชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค พบว่ากลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคมีการแสดงออกของยีน $bFGF$ มากกว่ากลุ่มชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 6 และรูปที่ 27

ตารางที่ 6 ค่ามัธยฐานของความเข้มของแถบ DNA ยีน $bFGF : GADPH$ ใน ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและกลุ่มชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค

| | Median | Percentile 25 | Percentile 75 | Percentile 95 | Mean |
|--|--------|---------------|---------------|---------------|-------|
| กลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรค (n=19) | 0.09 | 0 | 0.17 | 0.36 | 0.10 |
| กลุ่มชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค (n=19) | 0 | 0 | 0 | 0.08 | 0.008 |
| P* | - | - | - | - | 0.004 |

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการทดสอบโดยใช้ Mann-Whitney test , $P < 0.01$ ถือว่าความแตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



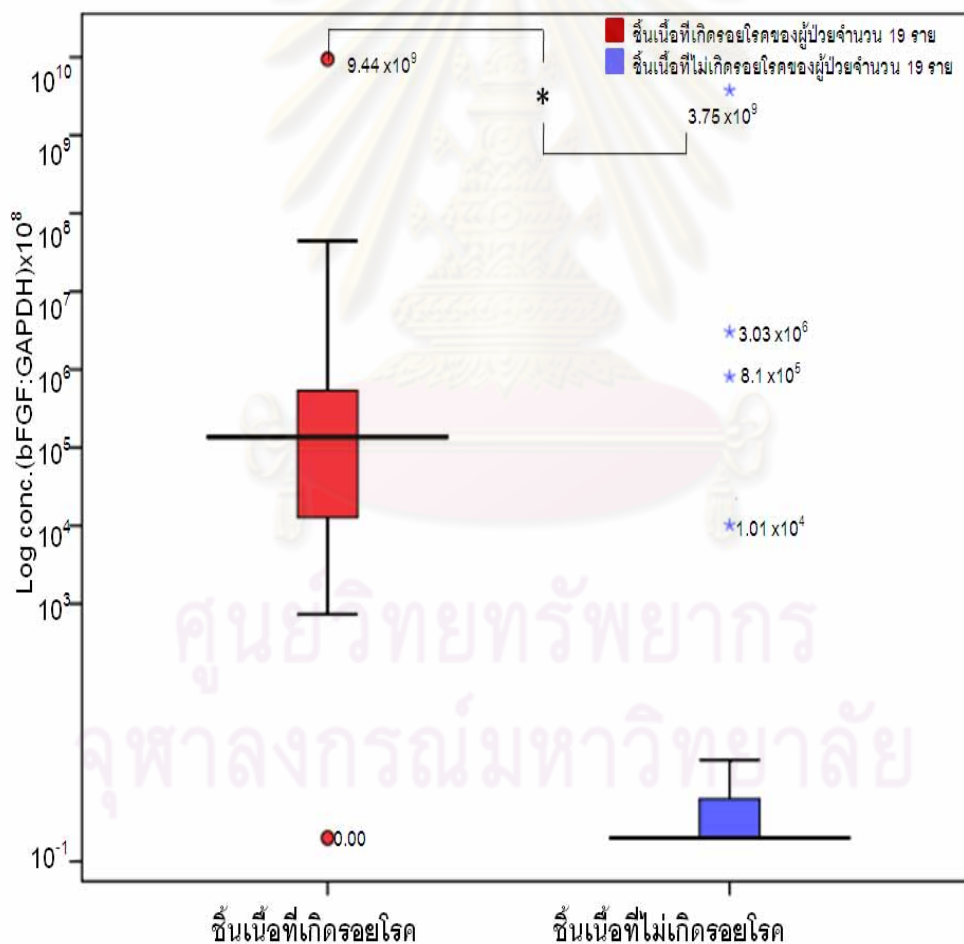
รูปที่ 27 แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบอัตราส่วนความเข้มของแถบ DNA ของยีน *bFGF:GAPDH* ระหว่างกลุ่มชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและชิ้นเนื้อไม่เกิดรอยโรค,* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

2.2 ผลการเปรียบเทียบปริมาณสัมบูรณ์ของ DNA ของยีน *bFGF* ใน ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและกลุ่มชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *bFGF* ระหว่างกลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและกลุ่มชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค โดยการนำค่า Ct ที่ได้จากการทำ real time RT-PCR ไปเปรียบเทียบกับกราฟ DNA มาตรฐานของยีน *bFGF* และ *GADPH* ที่ทราบปริมาณ (standard curve) และคำนวณปริมาณสัมบูรณ์ของ DNA ของ *bFGF* และ *GADPH* แต่ละตัวอย่าง (แสดงในภาคผนวก ค) และนำปริมาณสัมบูรณ์ของ DNA ที่คำนวณได้ของ *bFGF* และ *GADPH* ของแต่ละตัวอย่างมาคิดอัตราส่วน พบว่าค่ามัธยฐานของอัตราส่วน *bFGF : GAPDH* (เปอร์เซ็นต์ไทด์ที่ 50) จากชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและชิ้นเนื้อไม่เกิดรอยโรค มีค่าเท่ากับ 1.37×10^5 และ 0 ตามลำดับ ขอบล่างของ box (เปอร์เซ็นต์ไทด์ที่ 25) มีค่าเท่ากับ 1.27×10^4 และ 0 ตามลำดับ ส่วนขอบบนของ box

(เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 75) มีค่าเท่ากับ 1.03×10^6 และ 8.92 ตามลำดับ ค่า outlier ที่สูงกว่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 95 มีค่าเท่ากับ 9.44×10^9 และ 3.75×10^9 ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยปริมาณสัมบูรณ์ของยีน *bFGF : GADPH* ในกลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและชิ้นเนื้อไม่เกิดรอยโรค จากการคำนวณค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (geometric mean) โดยใช้โปรแกรม Microsoft excel พบว่าค่าเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.14×10^5 และ 26.12 ตามลำดับ และจากการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างการแสดงออกของยีน *bFGF* ระหว่างกลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและกลุ่มชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค พบว่าชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคมีการแสดงออกของยีน *bFGF* มากกว่าชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 7 และรูปที่ 28



รูปที่ 28 แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบปริมาณสัมบูรณ์ของ DNA ของยีน *bFGF* ระหว่างกลุ่มชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค, * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางที่ 7 ค่ามัธยฐานของปริมาณสัมบูรณ์ของยีน *bFGF:GAPDH* ใน ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและกลุ่มชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค

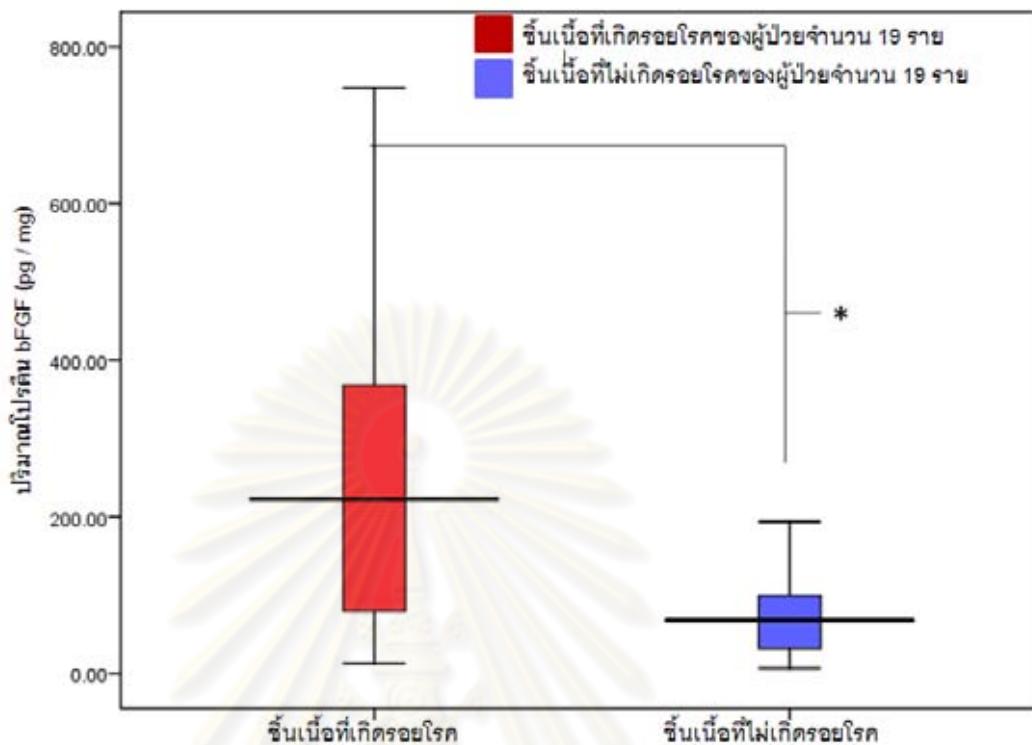
| | Median | Percentile 25 | Percentile 75 | Percentile 95 | Mean |
|-------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| ชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรค (n=19) | 1.37×10^5 | 1.27×10^4 | 1.03×10^6 | 9.44×10^9 | 1.14×10^5 |
| ชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค (n=19) | 0 | 0 | 8.92 | 3.75×10^9 | 26.12 |
| P* | - | - | - | - | 0.001 |

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการทดสอบโดยใช้ Mann-Whitney test ,
P<0.01 ถือว่าความแตกต่างนั้นมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.3 ผลการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน bFGF ใน ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและกลุ่มชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค

ผลการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน bFGF จากชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและกลุ่มชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค พบว่าค่ามัธยฐานของปริมาณโปรตีน bFGF (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 50) จากกลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและกลุ่มชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค มีค่าเท่ากับ 223 และ 67.9 พิกโคกรัม/มิลลิกรัม ตามลำดับ ขอบล่างของ box (ค่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25) มีค่าเท่ากับ 66.2 และ 24.4 พิกโคกรัม/มิลลิกรัม ตามลำดับ ส่วนขอบบนของ box (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 75) มีค่าเท่ากับ 443 และ 67.9 พิกโคกรัม/มิลลิกรัม ตามลำดับ ค่า outlier ที่สูงกว่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 95 มีค่าเท่ากับ 748 และ 194 พิกโคกรัม/มิลลิกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีน bFGF ในกลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและกลุ่มชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค พบว่ามีค่าเท่ากับ 256.68 และ 75.72 พิกโคกรัม/มิลลิกรัม ตามลำดับ และจากการทดสอบค่ามัธยฐานทางสถิติ พบว่าปริมาณโปรตีน bFGF จากกลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและกลุ่มชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรคแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.01) ดังแสดงในรูปที่ 29 และตารางที่ 8



รูปที่ 29 แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน bFGF ระหว่างกลุ่มชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค,* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$)

ตารางที่ 8 ค่ามัธยฐานของปริมาณโปรตีน bFGF ใน ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและกลุ่มชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค

| | Median (pg/mg) | Percentile25 (pg/mg) | Percentile75 (pg/mg) | Percentile95 (pg/mg) | Mean (pg/mg) |
|-------------------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------|
| ชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรค (n=19) | 223 | 66.2 | 443 | 748 | 256.68 |
| ชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค (n=19) | 67.9 | 24.4 | 67.9 | 194 | 75.72 |
| P* | - | - | - | - | 0.003 |

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการทดสอบโดยใช้ Mann-Whitney test ,
 ¶ $P<0.01$ ถือว่าความต่างนั้นมีนัยสำคัญทางสถิติ

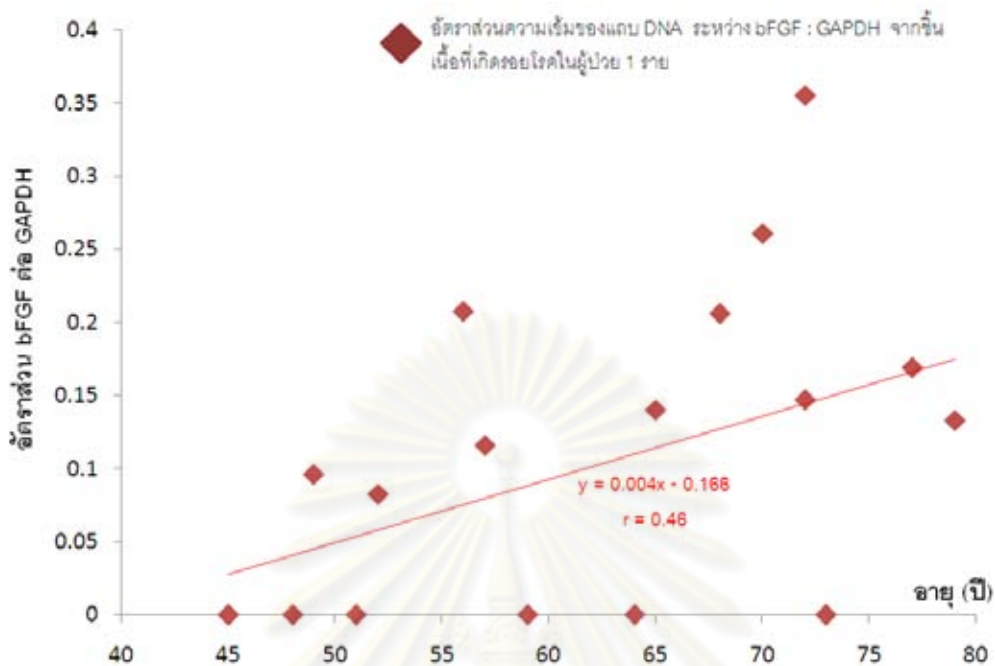
3. ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์การแสดงออกของยีน *bFGF* และอายุผู้ป่วย

3.1 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของแถบ DNA ยีน *bFGF* และอายุผู้ป่วย

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *bFGF* จากชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ในตำแหน่งที่เกิดรอยโรค โดยการวัดความเข้มของแถบ DNA ของยีน *bFGF:GAPDH* ที่ได้จากการทำ real time RT-PCR และนำไปคำนวณความสัมพันธ์กับอายุ โดยการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (pearson's correlation coefficient หรือ r) เพื่อดูระดับความสัมพันธ์ ซึ่งสามารถแปลผลได้ดังนี้ ค่า r อยู่ระหว่าง 0.8-1 แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมาก ค่า r อยู่ระหว่าง 0.5-0.8 แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันปานกลาง ค่า r อยู่ระหว่าง 0.2-0.5 แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันเล็กน้อย และถ้าค่า r น้อยกว่า 0.2 แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน⁽⁵³⁾ นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์ความถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression) เพื่อใช้พิจารณาค่าทำนายสำคัญทางสถิติของความสัมพันธ์ ซึ่งทั้งค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์และความถดถอยเชิงเส้นตรงจะวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS 16.0

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของแถบ DNA ของยีน *bFGF:GAPDH* ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและอายุผู้ป่วย พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ระหว่างชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคกับอายุผู้ป่วย มีค่าเท่ากับ 0.46 (แสดงดังรูปที่ 30) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน *bFGF* มีความสัมพันธ์กับอายุผู้ป่วยปานกลาง นอกจากนี้ค่า r ที่พบยังมีค่าเป็นบวก ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอายุผู้ป่วย และจากการทดสอบค่าทำนายสำคัญทางสถิติของความสัมพันธ์ดังกล่าว พบว่าการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคมีความสัมพันธ์กับอายุ ($P < 0.05$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของแถบ DNA ของยีน *bFGF:GAPDH* ในชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรคและอายุผู้ป่วย พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ระหว่างชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรคกับอายุผู้ป่วย มีค่าเท่ากับ 0.35 (แสดงดังรูปที่ 31) จากการทดสอบค่าทำนายสำคัญทางสถิติของความสัมพันธ์ดังกล่าว พบว่าการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรคกับอายุไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)



รูปที่ 30 กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของแถบ DNA ของยีน *bFGF:GAPDH* ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและอายุผู้ป่วย

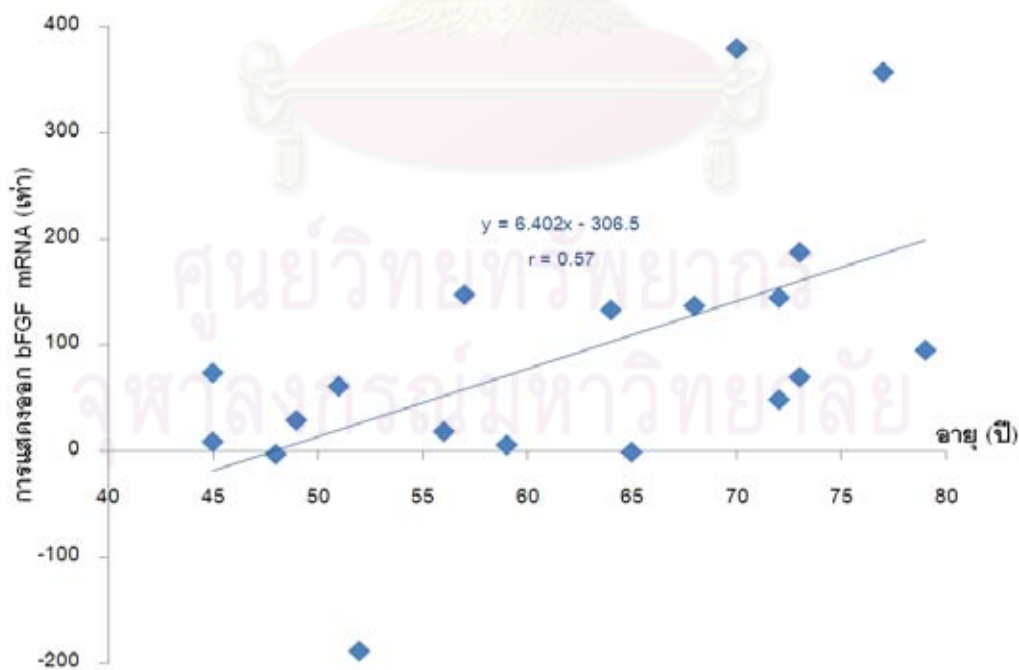


รูปที่ 31 กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของแถบ DNA ของยีน *bFGF:GAPDH* ในชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรคและอายุผู้ป่วย

3.2 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของอัตราการแสดงออกของยีน *bFGF* และอายุผู้ป่วย

จากการวิเคราะห์อัตราการแสดงออกของยีน *bFGF* โดยการคำนวณหาปริมาณเชิงเปรียบเทียบของ DNA (relative quantitation) ของยีน *bFGF* ระหว่างชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค โดยผลการเปรียบเทียบจะแสดงออกมาในรูปจำนวนเท่าของการแสดงออกของยีน *bFGF* ที่แตกต่างกันระหว่างชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค (สูตรการคำนวณแสดงในภาคผนวก ค) และนำค่าที่ได้ดังกล่าวไปหาความสัมพันธ์กับอายุโดยดูจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient หรือค่า r) ที่คำนวณโดยโปรแกรม SPSS 16.0

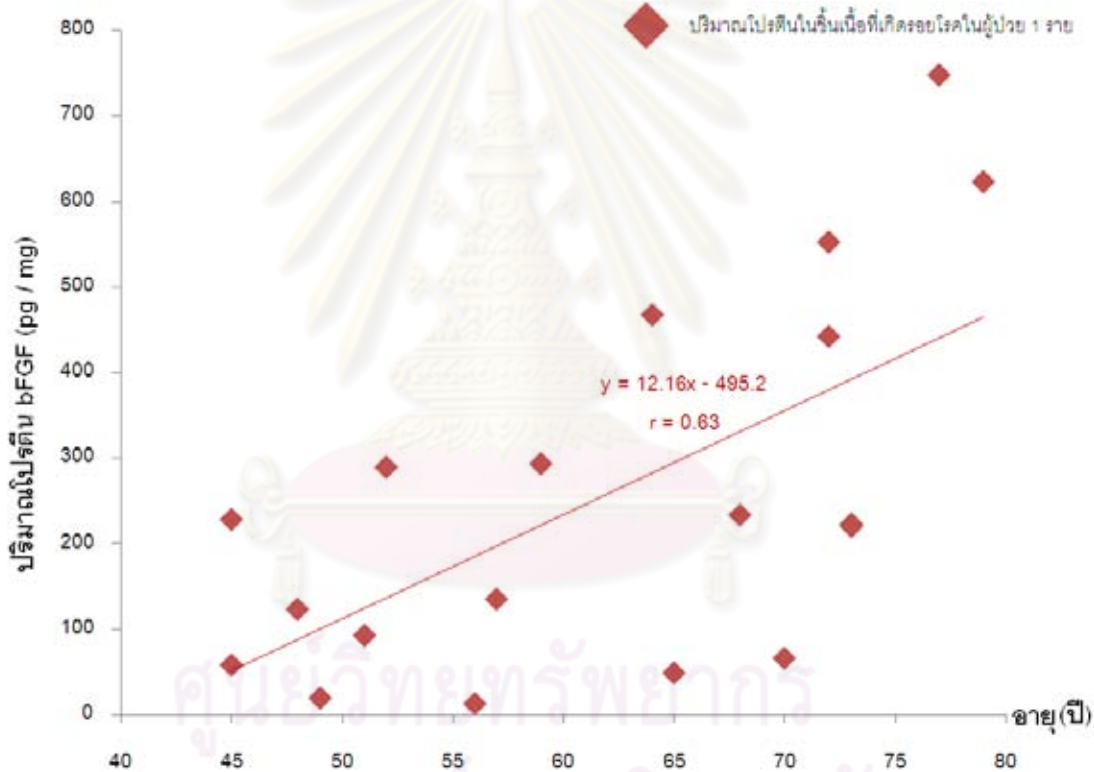
จากการนำค่าอัตราการแสดงออกของยีน *bFGF* ไปหาความสัมพันธ์กับอายุโดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) พบว่าเท่ากับ 0.57 (แสดงดังรูปที่ 32) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีอัตราการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคของผู้ป่วยมีความสัมพันธ์กับอายุผู้ป่วยในระดับปานกลาง นอกจากนี้ค่า r ที่พบยังแสดงเป็นค่าบวก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัตราการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อจะ ligamentum flavum ของผู้ป่วยที่เป็นโรคจะเพิ่มมากขึ้นตามอายุ และจากการทดสอบค่านัยสำคัญทางสถิติของความสัมพันธ์ดังกล่าว พบว่า อัตราการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ของผู้ป่วยมีความสัมพันธ์กับอายุ ($P < 0.05$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



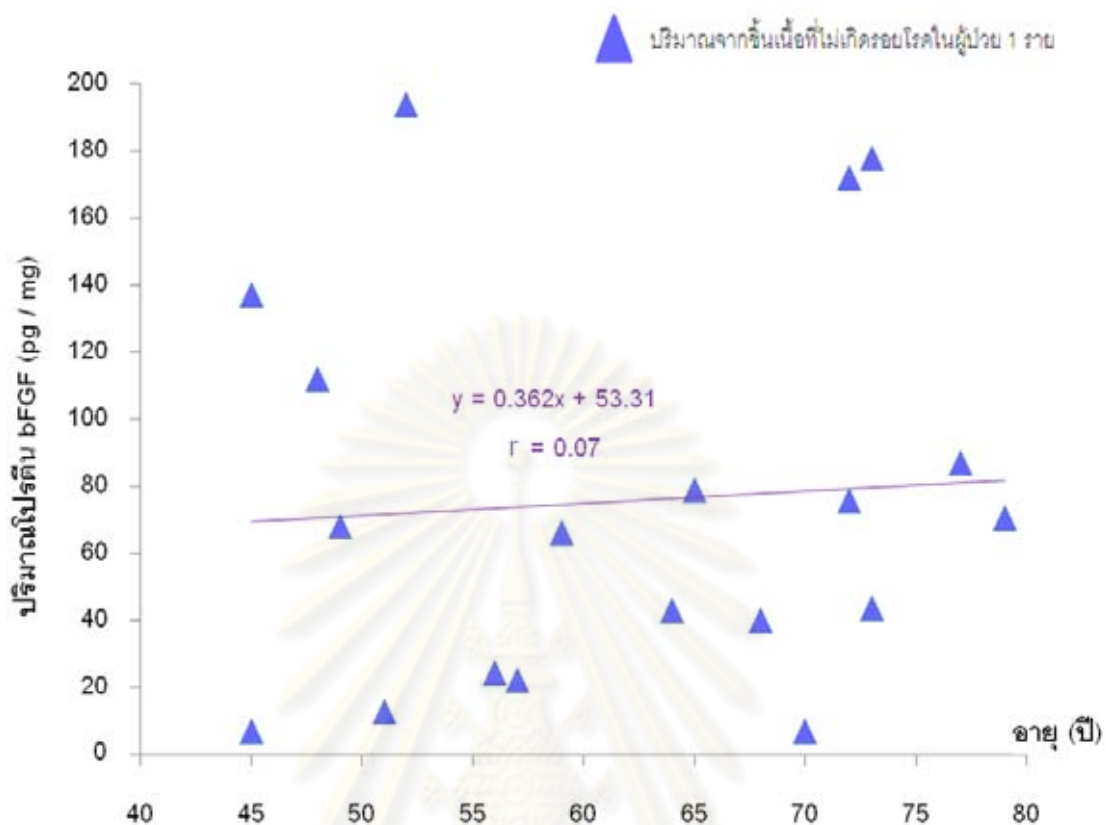
รูปที่ 32 กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum กับอายุผู้ป่วย

3.3 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน bFGF และอายุผู้ป่วย

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน bFGF ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค และนำไปหาความสัมพันธ์กับอายุโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าปริมาณโปรตีน bFGF ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคมีความสัมพันธ์กับอายุ ($r = 0.63$) และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอายุผู้ป่วย (แสดงดังรูปที่ 33) และจากการทดสอบค่านัยสำคัญทางสถิติของความสัมพันธ์ดังกล่าว พบว่าปริมาณโปรตีน bFGF ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคมีความสัมพันธ์กับอายุ ($P < 0.05$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 33 กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน bFGF ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคกับอายุผู้ป่วย



รูปที่ 34 กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน bFGF ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรคกับอายุผู้ป่วย

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน bFGF ในชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรคกับอายุ โดยพบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ระหว่างชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรคกับอายุ มีค่าเท่ากับ 0.07 (แสดงดังรูปที่ 34) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณโปรตีน bFGF ในชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรคกับอายุไม่มีความสัมพันธ์ต่อกัน และจากการทดสอบค่านัยสำคัญทางสถิติของความสัมพันธ์ดังกล่าว พบว่าปริมาณโปรตีน bFGF ในชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรคกับอายุไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เช่นกัน

4. ผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *bFGF* ระหว่างเพศหญิงและชาย

4.1 ผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของยีน *bFGF* ระหว่างเพศหญิงและชาย

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคระหว่างเพศชายและหญิง โดยการวัดความเข้มข้นของแถบ DNA ที่ได้จากการทำ real time RT-PCR โดยโปรแกรม Quantity One และนำค่าความเข้มข้นของแถบ DNA ที่ได้ของยีน *bFGF*

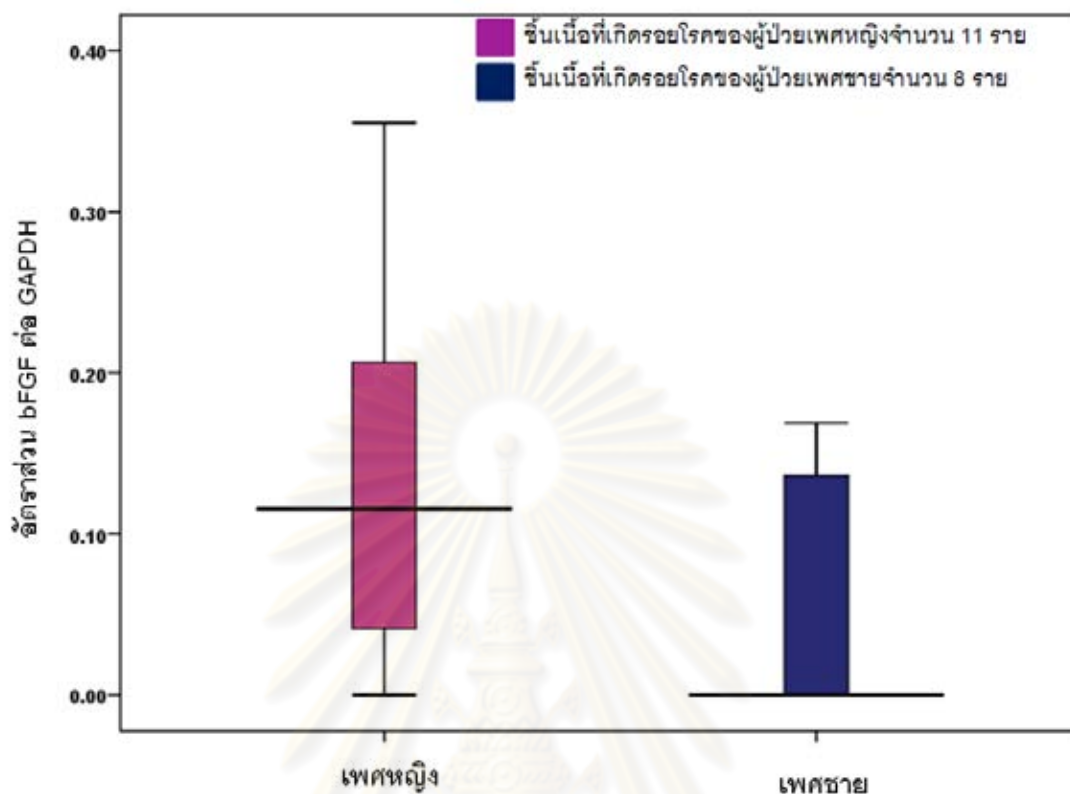
และ *GADPH* ของแต่ละตัวอย่างมาคำนวณอัตราส่วน พบว่าค่ามัธยฐาน หรือ เปอร์เซ็นไทล์ที่ 50 ของยีน *bFGF : GADPH* จากชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคของเพศหญิงและชาย มีค่าเท่ากับ 0.12 และ 0 ตามลำดับ ขอบล่างของ box (ค่าเปอร์เซ็นไทล์ที่ 25) มีค่าเท่ากับ 0 ทั้งของเพศหญิงและชาย ขอบบนของ box (เปอร์เซ็นไทล์ที่ 75) มีค่าเท่ากับ 0.21 และ 0.14 ตามลำดับ ค่า outlier ที่สูงกว่าเปอร์เซ็นไทล์ที่ 95 มีค่าเท่ากับ 0.36 และ 0.17 ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

จากการหาค่าเฉลี่ยความเข้มของแถบ DNA ของยีน *bFGF : GADPH* ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคของเพศหญิงและชายพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.13 และ 0.06 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างความเข้มของแถบ DNA ของยีน *bFGF : GADPH* ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรกระหว่างเพศหญิงและชายพบว่าเพศหญิงมีความเข้มของแถบ DNA ของยีน *bFGF : GADPH* ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคมากกว่าเพศชาย แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 35

ตารางที่ 9 ค่ามัธยฐานของความเข้มของแถบ DNA ยีน *bFGF : GADPH* ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรกระหว่างเพศหญิงและชาย

| | Median | Percentile 25 | Percentile 75 | Percentile 95 | Mean |
|-------------------|--------|------------------|------------------|------------------|------|
| เพศหญิง (n=11) | 0.12 | 0 | 0.21 | 0.36 | 0.13 |
| เพศชาย (n=8) | 0 | 0 | 0.14 | 0.17 | 0.06 |
| P | - | - | - | - | 0.16 |

P<0.05 ถือว่าความแตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 35 แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของแถบ DNA ยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคระหว่างเพศหญิงและชาย

4.2 ผลการเปรียบเทียบอัตราการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ระหว่างผู้ป่วยเพศหญิงและชาย

จากการวิเคราะห์อัตราการแสดงออกของยีน *bFGF* โดยการหาปริมาณเชิงเปรียบเทียบ (relative quantitation) ของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคทั้งเพศชายและหญิง โดยผลการเปรียบเทียบจะแสดงออกมาในรูปจำนวนเท่าที่แตกต่าง (สูตรการคำนวณแสดงในภาคผนวก ค) จากผลการศึกษาพบว่า ค่ามัธยฐาน (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 50) ของอัตราการแสดงออกของยีน *bFGF* ของเพศหญิงและชาย มีค่าเท่ากับ 47.84 และ 71.53 เท่า ตามลำดับ ขอบล่างของ box (ค่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25) มีค่าเท่ากับ 8.46 และ 19.37 เท่า ตามลำดับ ส่วนขอบบนของ box (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 75) มีค่าเท่ากับ 147.03 และ 123.14 เท่า ตามลำดับ ค่า outlier ที่สูงกว่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 95 มีค่าเท่ากับ 380 และ 357 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

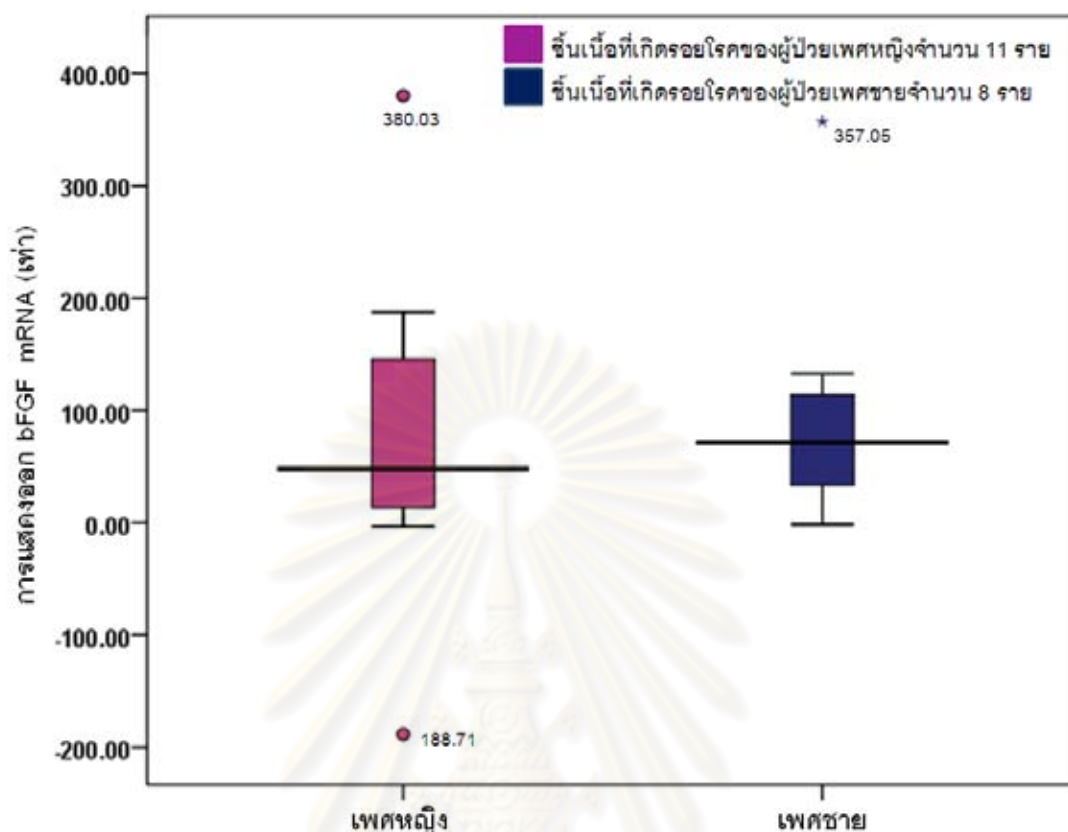
จากการหาค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (geometric mean) โดยใช้โปรแกรม Microsoft excel พบว่าค่าเฉลี่ยอัตราการแสดงออกเฉลี่ยของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรค :ชิ้นเนื้อไม่เกิดรอย

โรคระหว่างเพศหญิงและชายมีค่าเท่ากับ 58.85 และ 43.67 เท่า ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างอัตราการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคต่อชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรคระหว่างเพศหญิงและชาย พบว่าในกลุ่มเพศหญิงมีการแสดงออกของยีน *bFGF* มากกว่าเพศชายเล็กน้อย แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 10 และ รูปที่ 36

ตารางที่ 10 ค่ามัธยฐานอัตราการแสดงออกของ ยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ระหว่างผู้ป่วยเพศหญิงและชาย

| | Median (เท่า) | Percentile 25 (เท่า) | Percentile 75 (เท่า) | Percentile 95 (เท่า) | Mean (เท่า) |
|-------------------|------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------|
| เพศหญิง (n=11) | 47.84 | 8.46 | 147.03 | 380 | 58.85 |
| เพศชาย (n=8) | 71.53 | 19.37 | 123.14 | 357 | 43.67 |
| P | - | - | - | - | 1.00 |

|| $P < 0.05$ ถือว่าความแตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 36 แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบอัตราการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคระหว่างเพศชายและหญิง

4.3 ผลการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน bFGF ระหว่างผู้ป่วยเพศหญิงและชาย

ผลการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน bFGF ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum จากชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคระหว่างเพศหญิงและชาย พบว่าค่ามัธยฐาน (ค่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 50) ของปริมาณโปรตีนในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรค ของเพศหญิงและชายมีค่าเท่ากับ 223 และ 257 พิกโคกรัม/ไมโครกรัม ตามลำดับ ขอบล่างของ box (ค่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25) มีค่าเท่ากับ 66.2 และ 67 พิกโคกรัม/ไมโครกรัม ตามลำดับ ส่วนขอบบนของ (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 75) มีค่าเท่ากับ 289 และ 584 พิกโคกรัม/ไมโครกรัม ตามลำดับ และค่า outlier ที่สูงกว่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 95 มีค่าเท่ากับ 553 และ 748 พิกโคกรัม/ไมโครกรัม (ตารางที่ 11)

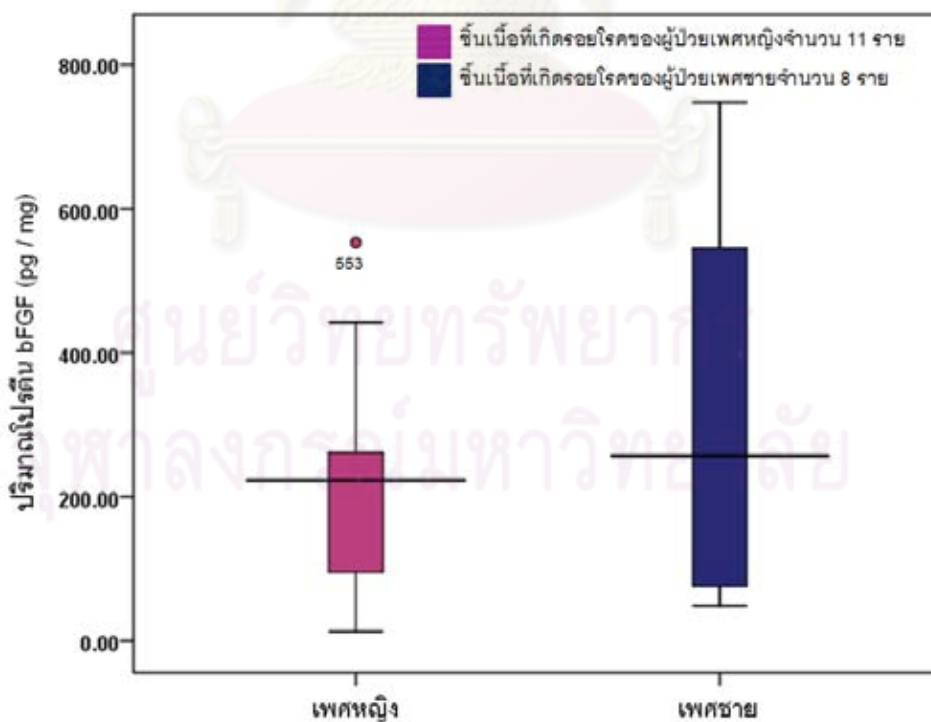
จากการหาค่าเฉลี่ย พบว่าค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีน bFGF ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคของเพศหญิงและชายมีค่าเท่ากับ 221 และ 391 พิกโคกรัม/ไมโครกรัม ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปริมาณโปรตีน bFGF ในกลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคระหว่างเพศหญิงและ

ชาย ไม่พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 11 และรูปที่ 37

ตารางที่ 11 ค่ามัธยฐานของปริมาณโปรตีน bFGF ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum จากตำแหน่งที่เกิดรอยโรคของเพศหญิงและชาย

| | Median (pg/mg) | Percentile25 (pg/mg) | Percentile75 (pg/mg) | Percentile95 (pg/mg) | Mean (pg/mg) |
|----------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------|
| หญิง (n=11) | 223 | 66.2 | 289 | 553 | 211 |
| ชาย (n=8) | 257 | 67 | 584 | 748 | 391 |
| P | - | - | - | - | 0.46 |

$P < 0.05$ ถือว่าความแตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 37 แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน bFGF ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคระหว่างเพศชายและหญิง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาที่ชัดเจนว่ามีการแสดงออกของยีนใดบ้างที่มีผลทำให้เกิดการเกิดการหนาตัวของ ligamentum flavum ในผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม แม้ว่ามียางานการศึกษายืนยันว่ามีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการหนาตัวของ ligamentum flavum ซึ่งสามารถนำมาอธิบายอาการที่เกิดขึ้นทางคลินิก เช่น *TGF-β1*, *MMP2*, *MMP3*, *MMP13* และ *TIMPs* เป็นต้น แต่ยังไม่สามารถอธิบายการเกิดการหนาตัวของ ligamentum flavum ได้อย่างชัดเจน ซึ่งอาจจะมีโปรตีนที่เป็นปัจจัยการเจริญเติบโตเข้ามาเกี่ยวข้อง ดังนั้นในการศึกษานี้จึงให้ความสนใจต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกของยีน *bFGF* ภายใน ligamentum flavum ผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

การวิจัยครั้งนี้ใช้ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่มารับการผ่าตัดรักษาโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวกดทับเส้นประสาท แขนกอร์โรโปติกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ มีจำนวนทั้งสิ้น 19 ราย เป็นชาย 8 รายและหญิง 11 ราย อายุเฉลี่ย 61.84 ± 11.01 ปี ผลจากการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *bFGF* ระหว่างชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคของผู้ป่วยรายเดียวกัน โดยเทคนิค real time RT-PCR ทั้งจากการวิเคราะห์แถบความเข้มของ DNA และการวิเคราะห์อัตราการแสดงออกของยีน *bFGF* พบว่าผู้ป่วยจำนวน 11 รายจาก 19 รายมีการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคมากกว่าไม่เกิดรอยโรค และพบว่าอัตราการแสดงออกของยีน *bFGF* ระหว่างชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคในผู้ป่วยแต่ละรายแตกต่างกันเฉลี่ยประมาณ 51 เท่าและจากผลการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคของผู้ป่วยรายเดียวกัน โดยวิธี ELISA พบผู้ป่วยจำนวน 16 รายจาก 19 ราย มีปริมาณโปรตีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคมากกว่าชิ้นเนื้อไม่เกิดรอยโรค

จากผล การ ศึกษา เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *bFGF* ระหว่างกลุ่มชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค ทั้งจากการวิเคราะห์แถบความเข้มของ DNA และการเปรียบเทียบปริมาณสัมบูรณ์ของ DNA พบว่ากลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคมีการแสดงออกของยีน *bFGF* มากกว่ากลุ่มชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) (แสดงดังรูปที่ 27 และ 28) และจากผลการการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในชิ้นเนื้อทั้งสองกลุ่มพบว่ากลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคมีปริมาณโปรตีน *bFGF* มากกว่ากลุ่มชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) (แสดงดังรูปที่ 29)

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *bFGF* และอายุของผู้ป่วย จากการนำอายุผู้ป่วยมาศึกษาความสัมพันธ์กับความเข้มของแถบ DNA พบว่าการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคเกิดสัมพันธ์กับอายุที่เพิ่มขึ้น และมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่การแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรคเกิดสัมพันธ์กับอายุเล็กน้อย แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และจากการนำอายุผู้ป่วยมาศึกษาความสัมพันธ์กับอัตราการแสดงออกของยีน *bFGF* พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (แสดงดังรูปที่ 32)

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน *bFGF* จากชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ในที่เกิดรอยโรค และไม่เกิดรอยโรค และนำไปศึกษาความสัมพันธ์กับอายุ ผลการวิเคราะห์พบว่าปริมาณโปรตีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคมีความสัมพันธ์กับอายุอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรคกับอายุ ปริมาณโปรตีน *bFGF* กับอายุ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ต่อกัน และจากการทดสอบค่านัยสำคัญทางสถิติพบว่าปริมาณโปรตีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรคกับอายุไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เช่นกัน

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคระหว่างเพศชายและหญิง ทั้งโดยการวัดความเข้มของแถบ DNA ที่ได้จากการทำ real time RT-PCR และจากการวิเคราะห์อัตราการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อ พบว่าเพศหญิงมีการแสดงออกของยีน *bFGF* มากกว่าเพศชาย แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ผลการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum จากชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคระหว่างเพศหญิงและชาย พบว่า ในกลุ่มเพศชายมีปริมาณโปรตีน *bFGF* มากกว่าเพศหญิงเล็กน้อย แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคระหว่างเพศชายและหญิงอาจจะมีการแสดงออกไม่แตกต่างกัน

อภิปรายผลการวิจัย

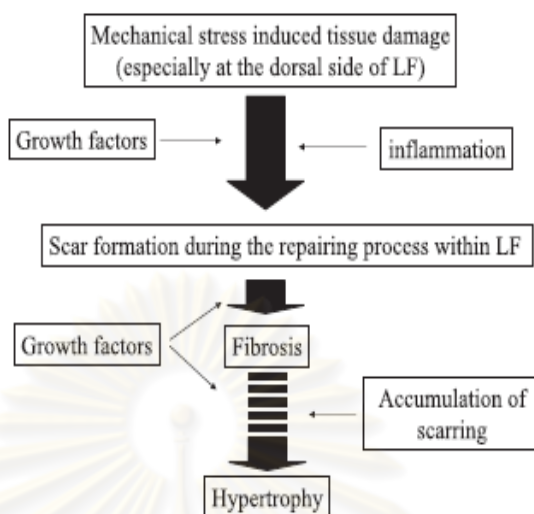
การเกิดการหนาตัวของ ligamentum flavum เป็นภาวะที่พบบ่อยในผู้สูงอายุที่มีการเสื่อมของกระดูกสันหลังโดยเฉพาะกระดูกสันหลังส่วนเอว แม้การศึกษาก่อนหน้านี้จะมีผู้สันนิษฐานว่าการเกิดการหนาตัวและการเกิดพังผืดของ ligamentum flavum ในโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมว่าอาจจะมีผลมาจากกลไกการเสื่อมตามอายุ^(11,26,28) และการใช้งาน (mechanical stress)⁽²⁴⁾ แต่

กลไกการเกิดโรคที่แท้จริงยังไม่สามารถหาข้อสรุปได้แน่ชัดในปัจจุบัน คาดว่าน่าจะมีปัจจัยอื่น เช่น growth factors เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย⁽¹¹⁾

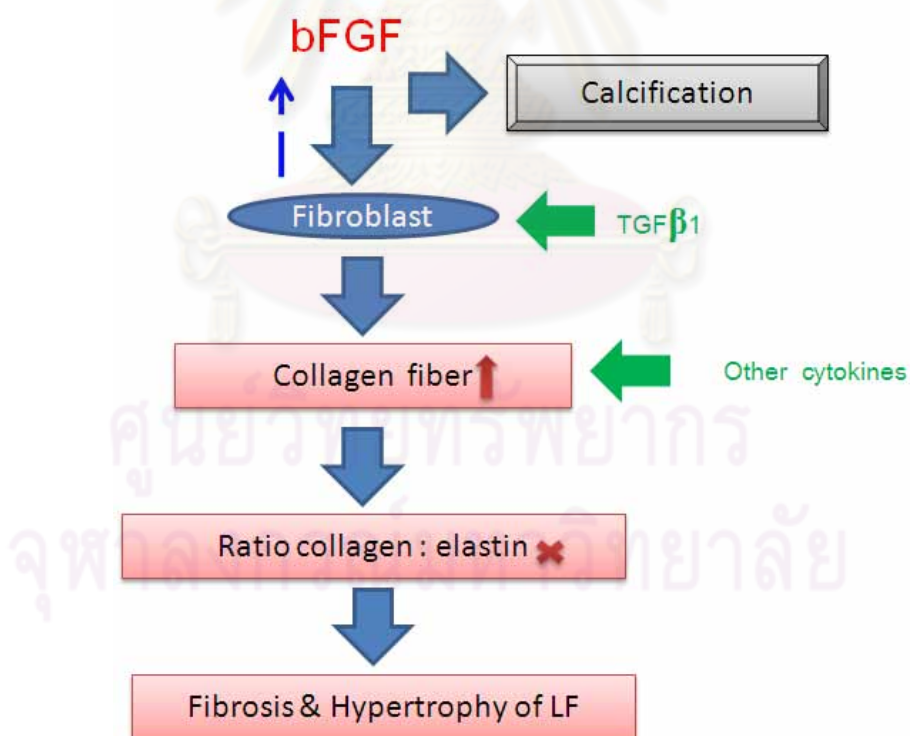
จากผลการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *bFGF* ระหว่างชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรค และไม่เกิดรอยโรคของผู้ป่วยรายเดียวกันพบว่า มีการแสดงออกของยีน *bFGF* ในผู้ป่วยบางราย โดยจากผู้ป่วยจำนวน 19 ราย พบว่ามี 11 รายมีการแสดงออกของยีน *bFGF* (แสดงดังรูปที่ 23) โดยในผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของยีน *bFGF* พบว่ามีอายุเฉลี่ย 65.18 ± 9.73 ปี ในขณะที่ผู้ป่วยที่ไม่มีการแสดงออกของยีน *bFGF* พบว่ามีอายุเฉลี่ย 57.25 ± 11.76 ปี ซึ่งผลในส่วนนี้ทำให้คาดว่า ยีน *bFGF* จะมีการแสดงออกมากในผู้สูงอายุที่เป็นโรค degenerative lumbar disease สำหรับใน ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรคที่พบว่ามีมีการแสดงออกของยีน *bFGF* ของผู้ป่วยจำนวน 2 ราย คาดว่าในตำแหน่งนั้นอาจมีการเสื่อมอยู่แล้ว แต่ยังอาจไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า ซึ่งอาจจะยืนยันได้โดยการนำชิ้นเนื้อไปศึกษา histology โดยอาจย้อมชิ้นเนื้อเพื่อศึกษาการจัดเรียงตัวของอีลาสตินไฟเบอร์ ซึ่งถ้าพบว่ามีมีการจัดเรียงตัวผิดปกติ การจัดเรียงตัวของอีลาสตินไฟเบอร์ จะไม่ขนานกัน ซึ่งเกิดจากการแตกออกของมัดอีลาสติน (elastin fiber bundle) เป็นลักษณะที่พบใน ligamentum flavum ที่มีการเสื่อม⁽⁵⁾ (แสดงดังรูปที่ 10)

จากผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *bFGF* ระหว่างกลุ่มชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค ซึ่งพบว่ากลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคมีการแสดงออกของยีน *bFGF* มากกว่ากลุ่มชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ซึ่งสมมุติฐานของงานวิจัยคาดว่า การแสดงออกของยีน *bFGF* อาจจะมีบทบาททำให้เกิดการหนาตัวของ ligamentum flavum โดยจากการกระตุ้นของ *bFGF* มีผลทำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ปกติจะเป็นเซลล์ที่สร้างโปรตีนเส้นใยอีลาสตินและคอลลาเจน เกิดการแบ่งเซลล์ (proliferation) เพิ่มขึ้น จนมีผลทำให้อัตราส่วนอีลาสตินต่อคอลลาเจนเปลี่ยนแปลง จนเกิดการเสื่อมของ ligamentum flavum ตามมาในที่สุด ซึ่งข้อสันนิษฐานนี้คล้ายกับกับข้อสันนิษฐานของ Jong Bome และคณะในปี 2005⁽²⁴⁾ ซึ่งคาดว่า *TIMP2* อาจมีผลทำให้เกิดการหนาตัวของ ligamentum flavum โดย *TIMP2* จะมีผลส่งเสริมกระบวนการแบ่งเซลล์ (proliferation) และยับยั้งการตาย (apoptosis) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) แต่จากการทดสอบสมมุติฐาน สรุปได้ว่า *TIMP2* อาจมีผลทำให้เกิดการหนาตัวและผังพืด (fibrosis) แต่ไม่มีผลต่อ programmed cell death ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ใน ligamentum flavum ที่เสื่อม และจากการศึกษา ของ Yayama T และคณะได้ตั้งสมมุติฐานว่าใน ligamentum flavum ของผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม บริเวณที่มีการลดลงของเส้นใยอีลาสติน (elastin fiber) และเส้นใยคอลลาเจน (collagen fiber) อาจเป็นบริเวณ

ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดผังพืด ซึ่ง Yayama T เสนอแนะข้อคิดเห็นไว้ว่า การเกิดผังพืดอาจเป็นผลมาจากการกระตุ้นโดยโปรตีน bFGF ที่หลั่งมาจาก เซลล์กระดูกอ่อนที่เกิดการหนาตัว (hypertrophic chondrocytes) ขึ้น⁽⁴⁷⁾ ซึ่งการศึกษาของ Teruaki และคณะพบว่ามีกลุ่มเซลล์ตัวอ่อนของเซลล์กระดูกอ่อน (chondroid cells) และการเกิดกระบวนการสร้างเซลล์กระดูกอ่อน (chondrogenesis) ใน ligamentum flavum ที่เกิดการเสื่อม⁽³³⁾ จากรายงานการศึกษาข้างต้นทำให้ผู้วิจัยคาดว่า การหนาตัวของ ligamentum flavum อาจไม่ได้มีผลมาจากกระบวนการแบ่งเซลล์อย่างผิดปกติของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และนำไปสู่การตั้งสมมุติฐานใหม่ที่ว่าใน ligamentum flavum ที่เสื่อม อาจมาจากเซลล์กระดูกอ่อนใน ligamentum flavum ที่ได้รับการบาดเจ็บ และมีการอักเสบขึ้นบ่อยครั้ง^(29,52) จะสร้างและหลั่ง bFGF ซึ่ง bFGF อาจทำงานร่วมกับไซโตไคน์ตัวอื่น⁽⁴⁹⁾ (แสดงดังรูปที่ 39) มีผลชักนำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์มีการผลิตเส้นใยคอลลาเจนเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว⁽⁴⁷⁾ และนอกจากนี้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ และ TGF- β ยังมีผลชักนำให้เกิดการหนาตัวของเซลล์กระดูกอ่อนอีกด้วย^(47,50) ยังมีการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมร้อยละ 80 มีหินปูนเกิดขึ้นใน ligamentum flavum ร่วมด้วยเสมอโดยเฉพาะบริเวณที่มีการหนาตัวของเซลล์กระดูกอ่อน⁽³³⁾ และที่สำคัญจากการศึกษาโดยการย้อมแอนติบอดีที่จำเพาะ (immunohistochemistry) ต่อโปรตีน bFGF ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ของผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบและโรคหมอนรองกระดูกแตกเปรียบเทียบกัน พบว่าชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ของผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบมีการแสดงออกของ bFGF บริเวณที่มีการหนาตัวของเซลล์กระดูกอ่อน ซึ่งอยู่บริเวณโดยรอบผลึกแคลเซียม แต่ไม่พบลักษณะเช่นนี้ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ของผู้ป่วยโรคหมอนรองกระดูกแตก⁽⁴⁷⁾ จากผลที่ได้จึงอาจมีความเป็นไปได้ที่ว่าเซลล์กระดูกอ่อนที่หนาตัว (hypertrophic chondrocytes) (พบเฉพาะใน ligamentum flavum ที่เสื่อม) อาจเกี่ยวข้องกับการก่อตัวของหินปูนโดยการหลั่ง bFGF จากผลการศึกษาของรายงานข้างต้นจึงคาดว่าผลการศึกษาที่พบว่ามี การแสดงออกของยีน bFGF ใน ligamentum flavum ที่เสื่อม อาจมีกลไกทางพยาธิสรีรวิทยาตามที่อธิบายไว้ข้างต้น (แสดงดังรูปที่ 39)



รูปที่ 38 แสดงสมมุติฐานการเกิดภาวะหนาตัวของ ligamentum flavum ⁽²⁹⁾



รูปที่ 39 แสดงสมมุติฐานกลไกการเสื่อมของ ligamentum flavum ของผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนและโปรตีน bFGF และอายุของผู้ป่วยที่พบว่ามีการแสดงออกในชั้นเนื้อที่เกิตรอยโรคเกิดสัมพันธ์กับอายุที่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่ายีน *bFGF* อาจเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดความเสื่อม เช่นเดียวกับคอลลาเจนที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ว่ามีการแสดงออกเพิ่มตามอายุ⁽¹¹⁾ โดยจากผลการศึกษาที่พบว่าการแสดงออกของยีนและโปรตีน bFGF ในชั้นเนื้อที่เกิตรอยโรคเพิ่มตามอายุนั้นแสดงให้เห็นว่าว่ายีน *bFGF* อาจจะมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นเฉพาะ ligamentum flavum เสื่อมเท่านั้นและปริมาณของการแสดงออกของยีนนี้จะเพิ่มมากขึ้นตามอายุ นั่นคือในผู้ป่วยที่มีอายุมากอาจมีการแสดงออกของยีนและมีปริมาณโปรตีนมากกว่าผู้ป่วยที่มีอายุน้อย แต่ในขณะที่คนปกติที่อายุใกล้เคียงกันอาจมีการแสดงออกของยีน *bFGF* ไม่ต่างกัน เนื่องจากผลการศึกษาในชั้นเนื้อที่ไม่เกิตรอยโรคไม่พบความสัมพันธ์กับอายุ จากการศึกษารายชื่อของ Teruyaki และคณะที่พบว่าค่าเฉลี่ยอายุของผู้ป่วยโรค degenerative lumbar disease ที่มีหินปูนเกาะใน ligamentum flavum มีค่ามากกว่าผู้ป่วยที่ไม่มีหินปูนเกาะใน ligamentum flavum⁽³³⁾ จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเกิดหินปูนจะพบมากในผู้สูงอายุ ซึ่งคาดว่าผู้ป่วยสูงอายุจะมีการสะสมของหินปูน ดังนั้นในผู้ที่อายุมากจึงมีการสะสมของหินปูนมาก จากสมมุติฐานของผู้วิจัยที่กล่าวไว้ข้างต้นว่ามีหินปูนเกิดขึ้นใน ligamentum flavum ที่เสื่อมอาจเป็นผลมาจากเซลล์กระดูกอ่อนที่หนาตัวหลัง bFGF ออกมาควบคุมการก่อตัว (formation) ของหินปูนนั้น⁽⁴⁷⁾ อาจสามารถนำมาใช้อธิบายได้ว่าเหตุใด bFGF และการเกิดหินปูนในชั้นเนื้อที่เกิตรอยโรคจึงมีการเพิ่มการแสดงออกมากขึ้นตามอายุ โดยผู้วิจัยคาดว่าอาจเกิดจากการที่เซลล์กระดูกอ่อนที่หนาตัวหลัง bFGF ออกมาควบคุม จึงทำให้พบว่าทั้งการแสดงออกของ bFGF และการเกิดของหินปูนมีความสัมพันธ์กับอายุ แต่นอกจากนี้ผู้วิจัยคาดว่าอาจมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องอีก เช่น ระยะเวลาที่เป็นโรค การดำเนินชีวิตประจำวัน (life style) เป็นต้น ทำให้ในผู้ที่อายุน้อยแต่มีระยะเวลาที่เป็นโรคนานอาจมีหินปูนและการแสดงออกของยีน *bFGF* ที่มากกว่าผู้สูงอายุที่เพิ่งเกิดโรคก็ได้ โดยสามารถอธิบายได้จากการที่มีผู้ป่วยบางรายที่มีอายุน้อยแต่กลับพบว่ามีการแสดงออกของทั้งยีนและโปรตีน bFGF มาก หรือผู้ป่วยที่อายุมากแต่กลับมีการแสดงออกของยีนและโปรตีน bFGF น้อย (แสดงดังรูปที่ 30, 32 และ 34) แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษารั้งนี้ไม่ได้เก็บข้อมูลอื่นๆ เช่น ระยะเวลาการเกิดโรคของผู้ป่วย เป็นต้น ซึ่งสมมุติฐานในส่วนนี้จะทำการศึกษาในโอกาสต่อไป สำหรับการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชั้นเนื้อที่ไม่เกิตรอยโรคจะพบว่าปริมาณการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่น้อยกว่าในชั้นเนื้อที่เกิตรอยโรค และไม่สัมพันธ์กับอายุ คาดว่าในชั้นเนื้อที่ไม่เกิตรอยโรค อาจยังไม่มีกระบวนการเกิดการหนาตัวของเซลล์กระดูกอ่อน หรืออาจพบเซลล์กระดูกอ่อนเล็กน้อยที่ใน ligamentum flavum ซึ่งเซลล์กระดูกอ่อน

อาจมีการหลังโปรตีน bFGF ได้บ้างแต่ในปริมาณน้อย จึงไม่มีผลต่อการก่อตัวของหินปูนหรือมีผลน้อย ดังนั้นจึงอาจไม่พบหรือพบการเกิดหินปูนได้น้อยใน ligamentum flavum ผู้ป่วยที่อายุน้อยจึงอาจทำให้ผลการศึกษาที่พบมี bFGF มีปริมาณในแต่ละช่วงอายุไม่แตกต่างกันและพบในปริมาณที่น้อยกว่าในชั้นเนื้อที่เก็ตรอยโรค

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชั้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เก็ตรอยโรคระหว่างเพศชายและหญิง ซึ่งพบว่าทั้งการวิเคราะห์โดยการวัดความเข้มของแถบ DNA และการวิเคราะห์หัตถการการแสดงออกของยีน เพศหญิงจะมีการแสดงออกของยีน *bFGF* มากกว่าเพศชายแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) นอกจากนี้ผลการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน bFGF ในชั้นเนื้อ ligamentum flavum จากชั้นเนื้อที่เก็ตรอยโรคระหว่างทั้งสองเพศพบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เช่นกัน จึงคาดว่า การแสดงออกของยีนและโปรตีน bFGF มีการแสดงออกไม่แตกต่างกันทั้งในทั้งสองเพศ โดยผลที่ได้ยังสอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบก่อนหน้านี้ที่ทำการศึกษาโดยวัดความหนาของ ligamentum flavum ที่มีการหนาตัวในผู้ป่วยโรค lumbar spinal stenosis เปรียบเทียบระหว่างเพศชายและหญิงพบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ^(26,28) แต่ยังมีบางการศึกษาที่มีข้อเสนอแนะว่าการหนาตัวของ ligamentum flavum อาจมีอิทธิพลมาจากฮอร์โมนเพศ⁽⁵⁰⁾

ข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาการแสดงออกของยีนระหว่างกลุ่ม และศึกษาความสัมพันธ์ของยีน แต่อันเนื่องมาจากข้อจำกัดในการเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยและระยะเวลาในการทำวิจัย ดังนั้นเพื่อให้ผลชัดเจน ควรจะเก็บตัวอย่างเพิ่ม เพื่อนำมาใช้ประเมินผลได้ชัดเจนขึ้น

2. ในการศึกษาการแสดงออกของยีนควรเลือกใช้เทคนิค real time-PCR มากกว่า conventional PCR เนื่องจาก conventional PCR จะให้ผลแบบ end-point detection ซึ่งไม่มีความถูกต้องและแม่นยำเท่า real time-PCR ซึ่งให้ผลแบบ real-time detection

รายการอ้างอิง

- [1] Leonid Kalichman, Robert Cole, et al. Spinal stenosis prevalence and association with symptoms: the Framingham Study. The Spine Journal 9(2009):545–550.
- [2] Marek Szpalski and Robert Gunzburg. Lumbar spinal stenosis in the elderly : an overview. Eur. Spine 12(2003):170-175.
- [3] ปิยะพันธ์ ธาราณัติ. Spinal stenosis treatment option and outcome. The year book of orthopaedic review 2002:114-123.
- [4] Darren S, Stephen M. Nonsurgical management of low back pain and lumbar disk degeneration. Instr Course Lect 54(2005):279-286.
- [5] Eberhard Siebert. Lumbar spinal stenosis: syndrome, diagnostics and treatment. Nat Rev Neurol 5(2009):392–403.
- [6] อนันต์ ทรรคนิภาส. Lumbar spinal stenosis. The year book of orthopaedic review. กรุงเทพมหานคร :บพิธการพิมพ์, 2545.
- [7] ก่อแก้ว เชียงทอง. Anatomy of the lumbosacral spine. โรคกระดูกสันหลังเสื่อม. โรงพิมพ์แสงทอง, 2551.
- [8] Herkowitz, Harry N. Spinal stenosis: Pathophysiology, Clinical Diagnosis, Differential Diagnosis. The spine 2006:995-1031.
- [9] Eric Truumees. Spinal stenosis: Pathophysiology, clinical and radiologic classification. Instr Course Lect 54(2005):287-302.
- [10] Jeffrey Katz and Mitchel B. Lumbar spinal stenosis. N Eng J Med 385(2008): 818-825.
- [11] Hirofumi K, Natsuo Y. et al. Pathomechanism of Loss of Elasticity and Hypertrophy of Lumbar Ligamentum Flavum in Elderly Patients With Lumbar Spinal Canal Stenosis. Spine 32(2007):2805-2811.
- [12] Park JB, Chang H, Lee JK. Quantitative analysis of transforming growth factor-beta 1 in ligamentum flavum of lumbar spinal stenosis and disc herniation. Spine 26(2001):492–495.
- [13] Zhong ZM, Chen JT. Overexpression of transforming growth factor-beta1 in

degenerative ligamentum flavum. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao
29(2009):316-318.

- [14] Yoshikazu Inoue. Basic Fibroblast Growth Factor and Its Receptors in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Lymphangiomyomatosis. Am J Respir Crit Care Med 166(2002):765-773.
- [15] Seyedhossein ,Aharinejad. Differential Role of TGF-b 1/bFGF and ET-1 in Graft Fibrosis in Heart Failure Patients. Am J Transplant 9(2005):2185-2192.
- [16] Karina Gonzales Silverio-Ruiz, et al. Opposite effects of bFGF and TGF- β on collagen metabolism by human periodontal ligament fibroblasts. Cytokine 39(2007):130–137.
- [17] Palmon A, Roos H, Edel J, Zax B, Savion N, Grosskop A, et al. Inverse dose- and time-dependent effect of basic fibroblast growth factor on the gene expression of collagen type I and matrix metalloproteinase-1 by periodontal ligament cells in culture. J Periodontol 71(2000):974–980.
- [18] Palmon A, Roos H, Reichenberg E, Grosskop A, Bar Kana I, Pitaru S, et al. Basic fibroblast growth factor suppresses tropoelastin gene expression in cultured human periodontal fibroblasts. J PeriodontalRes 36(2001):65–70.
- [19] อโณทัย โภคาธิกรณ. Introduction to Real time-PCR and its applications. เอกสารประกอบประชุมเชิงปฏิบัติการ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น,2549.
- [20] อรดี หาญวิวัฒน์วงศ์.เทคนิค electrophoresis. วิทยานุกุมคุ้มกันพื้นฐานและคลินิก. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ภาพพิมพ์, 2551.
- [21] นภาธร บานชื่น. หลักการทดสอบในห้องปฏิบัติการสำหรับการตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดี. อิมมูโนวิทยา กรุงเทพฯ:บริษัท พีพีเอสซายส์เทคนิคส์ จำกัด,2543.
- [22] ธเนศ วรธนอภิสิทธิ์. comprehensive spine course 2006. กรุงเทพฯ, 2549.
- [23] Michel Benoist, Natural history of the aging spine. Eur Spine J 12(2003):86–89.
- [24] Park JB, et al. Hypertrophy of ligamentum flavum in lumbar spinal stenosis associated with increased proteinase inhibitor concentration. The Journal of

bone and joint surgery 27(2005):50-57.

- [25] Tadanori Sakamaki, et al. Measurements of ligamentum flavum thickening at lumbar spine using MRI. Arch. Orthop Trauma Surg 129(2009):1415-1419.
- [26] Janan Abbas, et al. Ligamentum flavum thickness in normal and stenotic lumbar spines. Spine 35(2010):1225-1230.
- [27] Elsberg CA. Experiences in spinal surgery. Surg Gynecol Obstet 16(1913):117-132.
- [28] Alp Alper Safek, Murat Dosoglu. et al. The thickness of ligamentum flavum in relation to age and gender. Clinical Anatomy 23(2010):79-83.
- [29] Koichi Sairyo, et. Lumbar ligamentum flavum hypertrophy is due to accumulation of ligamentum flavum of inflammation-related scar tissue. Spine 32(2007):340-347
- [30] Peter K. and Schrader, et al. Histology of the ligamentum flavum in patients with degenerative lumbar spinal stenosis. Eur spine 8(1999):323-328.
- [31] In-Soo Oh, Kee-Yong Ha, Matrix Metalloproteinase-3 on Ligamentum Flavum in Degenerative Lumbar Spondylolisthesis. Spine 34(2009):552-557.
- [32] Park JB, et al, The Increased Expression of Matrix Metalloproteinases Associated with Elastin Degradation and Fibrosis of the Ligamentum Flavum in Patients with Lumbar Spinal Stenosis. Clinics in Orthopedic Surgery 1(2009):81-89.
- [33] Teruaki Okuda, et al. The pathology of ligamentum flavum in degenerative lumbar disease. Spine 29(2004):1689-1697.
- [34] Bohlen P, Biad A. Isolation and Partial molecular characterization of pituitary fibroblast growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 81(1984):5364-5368.
- [35] Michael B, et al. Biological impact of the fibroblast growth factor family on articular cartilage and intervertebral disc homeostasis. Gene 420(2008):82-89.
- [36] Henke C, Marineili W, Jessurun J, Fox J, Harms D, Peterson M, Chiang L, Doran P. Macrophage production of basic fibroblast growth factor in the fibroproliferative disorder of alveolar fibrosis after lung injury. Am J Pathol 143(1993):1189-1199.

- [37] Inoue Y, King TE Jr, Tinkle SS, Dockstader K, Newman LS. Human mast cell basic fibroblast growth factor in pulmonary fibrotic disorders. Am J Pathol 146(1996):2037–2054.
- [38] Frank Strutz. Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation. Kidney International 57(2000):1521–1538.
- [39] Chua CC, Chua BH, Zhao ZY, Krebs C, Diglio C, Perrin E. Effect of growth factors on collagen metabolism in cultured human heart fibroblasts. Connect Tissue Res 26(1991):271–281.
- [40] Muddasani P, Kim GH, Davis F, et al. Basic fibroblast growth factor accelerates matrix degradation via a neuro-endocrine pathway in human adult articular chondrocytes. J Cell Physiol 215(2008):452-463.
- [41] Kobayashi T, Okamoto K, et al. Differential regulation of Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synoviocytes by tumor necrosis factor alpha and basic fibroblast growth factor is associated with the expression of apoptosis-related molecules. Arthritis Rheum 43(2000):1106-1114.
- [42] Manabe N, Oda H, et al. Involvement of fibroblast growth factor-2 in joint destruction of rheumatoid arthritis patients. Rheumatology (Oxford) 38(1999):714-720
- [43] Muddasani P, Norman JC, et al. Basic fibroblast growth factor activates the MAPK and NFkappaB pathways that converge on Elk-1 to control production of matrix metalloproteinase-13 by human adult articular chondrocytes. J Biol Chem 282(2007):31409-31421.
- [44] Peng, et al. Possible pathogenesis of painful intervertebral disc degeneration. Spine 31(2006):560-566.
- [45] Jukka Tolonen, et al, Growth factor expression in degenerated intervertebral disc tissue An immunohistochemical analysis of transforming growth factor beta, fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor. Eur Spine J 15(2006):588–596.
- [46] Jana Neuwirth, Renée AE Fuhrmann, et al. Expression of bioactive bone

- morphogenetic proteins in the subacromial bursa of patients with chronic degeneration of the rotator cuff. Arthritis Research & Therapy 8(2005):1-9.
- [47] Yayama T,H Baba, et al.Pathogenesis of calcium cystal deposition in ligamentum flavum correlates with lumbar spinal canal stenosis. Clinical and Experimental Rheumatology 23(2005):637-643.
- [48] สัจชัย พยุงภร.Real time PCR.เทคนิคทางชีวเคมีและอณูชีววิทยา. ภาควิชาชีวเคมี.คณะแพทยศาสตร์.จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2552.
- [49] Micheal Kjear. Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading. Physiol Rev 84(2004):649–698.
- [50] Yayama T, H Baba , et al. Pathogenesis of calcium cystal deposition in ligamentum flavum correlates with lumbar spinal canal stenosis:role of sex hormone and TGF β . Aceta Histochem and cytochem.86(2003):83-91.
- [51] Kee Yong Hee , et al. Expression of estrogen receptor of facet joint in degenerative spondylolisthesis. Spine 30(2005):562-566.
- [52] Prasuna Muddasni, Hee Jeong Im, et al. Basic fibroblast growth factor Activates the MAPK and NFkB pathway that converge on Elk-1 to control production of articular chondrocytes. Jornal of Biology chemistry 282(2007):31409-31421.
- [53] ปิยะลัมพร หะวานนท์.การพิจารณาขนาดตัวอย่าง. หลักการทำวิจัยให้สำเร็จ. กรุงเทพฯ:บริษัท เท็กซ์แอนด์เจอร์นัลพับลิเคชั่น จำกัด,2550.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

เอกสารข้อมูลสำหรับอาสาสมัครโครงการวิจัย
(Information sheet for research volunteer)

ชื่อโครงการวิจัย : การศึกษาความสัมพันธ์ของไซโตไคน์และความรุนแรงของโรคกระดูกสันหลังส่วน
เอวเสื่อม

แพทย์ผู้ทำวิจัย

ชื่อ นพ.สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก

ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4482 , 0850425466 (ที่ทำงานและมือถือ)

แพทย์ผู้ร่วมในโครงการวิจัย

ชื่อ อาจารย์ นพ. ชูเกียรติ เฉลิมพันธ์พิพัฒน์

ที่อยู่ ภาควิชากายวิภาค คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4510 , 0818070917 (ที่ทำงานและมือถือ)

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่แสดงข้อมูลเพื่อใช้ประกอบการตัดสินใจของท่านในการเข้าร่วมการ
ศึกษาวิจัย อย่างไรก็ตามก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่าน
เอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้
หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย หรือแพทย์ผู้ร่วมทำ
วิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์
ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าจะ
เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

คำชี้แจงเกี่ยวกับโรคที่อาสาสมัครได้รับการวินิจฉัย

ภาวะกระดูกสันหลังเอวเสื่อม หมายถึง การเกิดการสึกหรอและเสื่อมสภาพของกระดูก
สันหลังบริเวณเอว และเนื้อเยื่อหรือข้อต่อบริเวณโดยรอบกระดูกสันหลังที่มีพยาธิสภาพเกิดขึ้น โรค
กระดูกสันหลังเอวเสื่อม (degenerative lumbar disease) ที่พบได้บ่อย ได้แก่ ภาวะโพรงกระดูกสัน
หลังตีบแคบบริเวณเอว (lumbar spinal stenosis) หมอนรองกระดูกสันหลังเคลื่อน (disc
herniation) และโรคกระดูกสันหลังเคลื่อน (spondylolisthesis) ซึ่งการเสื่อมของกระดูกสันหลัง

มักจะนำไปสู่เกิดภาวะโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบตามมา

เนื่องจาก การเสื่อมของกระดูก , เอ็น และเนื้อเยื่อบริเวณกระดูกสันหลังที่มีพยาธิสภาพเกิดขึ้นทำให้โครงสร้างเดิมเปลี่ยนไป เช่น กระดูกสันหลังหรือหมอนรองกระดูกเสื่อม ทำให้มีการยื่นหรือแตกออกมา , เอ็นและข้อหนามากขึ้น สิ่งเหล่านี้จะไปมีผลต่อช่องไขสันหลังซึ่งเป็นที่อยู่ปกติของเส้นประสาท ทำให้เกิดอาการปวดดังกล่าว

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

วัตถุประสงค์หลักจากการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อศึกษารูปแบบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของสารพันธุกรรมในข้อต่อและเอ็นบริเวณกระดูกสันหลังที่ผิดปกติในผู้ป่วยที่มีภาวะกระดูกสันหลังเอวเสื่อม ได้แก่ โรคโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบบริเวณเอว หมอนรองกระดูกสันหลังเคลื่อน และโรคกระดูกสันหลังเคลื่อน เพื่อใช้ในการศึกษาหาสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการต่างๆ เช่น อาการปวด หรือขาในผู้ป่วยที่เกิดภาวะนี้ โดยประมาณจำนวนผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยรวม 20 คน

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

หลังจากท่านให้ความยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะขอเก็บชิ้นเนื้อขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร จากบริเวณข้อต่อและ/หรือเอ็นในบริเวณกระดูกสันหลังซึ่งได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าผิดปกติและมีความจำเป็นต้องได้รับการผ่าตัดเพื่อนำชิ้นเนื้อดังกล่าวออก โดยผู้ทำการวิจัยจะขอเก็บชิ้นเนื้อดังกล่าวในขณะที่ท่านได้รับการผ่าตัดแก้ไขภาวะกระดูกสันหลังที่ผิดปกติโดยศัลยแพทย์ โดยการเก็บชิ้นเนื้อดังกล่าวจะเก็บจากข้อต่อและ/หรือเอ็นที่ผิดปกติซึ่งถูกตัดออกมาแล้วตามแผนการรักษาตามปกติของทีมแพทย์ที่ดูแลรักษาผู้ป่วยท่านนั้น

ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

เพื่อให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องได้รับความร่วมมือจากท่าน โดยท่านจะต้องปฏิบัติตามคำแนะนำของแพทย์ผู้ทำวิจัยอย่างเคร่งครัด รวมทั้งแจ้งอาการผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับท่านระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัยให้ผู้ทำวิจัยได้รับทราบ

ความเสี่ยงที่อาจได้รับ

อาสาสมัครอาจจะรับความเสี่ยงและความไม่สะดวกสบายจากการเก็บชิ้นเนื้อดังกล่าวเพียงเล็กน้อย เนื่องจากการเก็บชิ้นเนื้อดังกล่าวจะเก็บจากข้อต่อและ /หรือเอ็นที่ผิดปกติซึ่งถูกตัดออกมาแล้วตามแผนการรักษาตามปกติของทีมแพทย์ที่ดูแลรักษาผู้ป่วยท่านนั้น หากท่านมีข้อสงสัยใด ๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยท่านสามารถสอบถามจากแพทย์

ผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

ความเสี่ยงที่ไม่ทราบแน่นอน

ท่านอาจเกิดอาการข้างเคียง หรือความไม่สบาย ซึ่งอาการข้างเคียงเหล่านี้เป็นอาการที่ไม่เคยพบมาก่อน เพื่อความปลอดภัยของท่าน ควรแจ้งผู้ทำวิจัยให้ทราบทันทีเมื่อเกิดความผิดปกติใดๆ เกิดขึ้น

หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

หากมีการค้นพบข้อมูลใหม่ ๆ ที่อาจมีผลต่อความปลอดภัยของท่านในระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัย ผู้ทำวิจัยจะแจ้งให้ท่านทราบทันที เพื่อให้ท่านตัดสินใจว่าจะอยู่ในโครงการวิจัยต่อไปหรือจะขอถอนตัวออกจากโครงการวิจัย

การพบแพทย์ในกรณีที่เกิดอาการข้างเคียง

ในขณะที่พักรักษาอยู่ในโรงพยาบาลหากท่านมีอาการข้างเคียงใดๆ ที่เกิดจากผลของการทำวิจัย ขอให้ท่านรีบแจ้งแพทย์เจ้าของไข้หรือแพทย์ผู้ทำวิจัยทันที หรือขณะกลับไปพักรักษาตัวที่บ้านหากมีอาการผิดปกติให้ท่านรีบมาพบแพทย์ที่สถานพยาบาลทันที ถึงแม้ว่าจะอยู่นอกตารางการนัดหมาย เพื่อแพทย์จะได้ประเมินอาการข้างเคียงของท่าน หากอาการต่าง ๆ ดังกล่าวเป็นผลจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะได้รับการรักษาทางการแพทย์ที่เหมาะสม โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

อาสาสมัครจะได้รับการตรวจรูปแบบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของสารพันธุกรรมในข้อต่อและเอ็นบริเวณกระดูกสันหลังที่ผิดปกติ ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการต่างๆ เช่น อาการปวด หรือขาในผู้ป่วย ซึ่งอาจจะนำไปสู่การป้องกันหรือการประเมินความเสี่ยงได้ แต่ไม่ได้รับรองว่าสุขภาพของท่านจะดีขึ้นหรือความรุนแรงของโรคจะลดลงอย่างแน่นอน

วิธีการและรูปแบบการรักษาอื่น ๆ ซึ่งมีอยู่สำหรับอาสาสมัคร

ท่านไม่จำเป็นต้องเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้เพื่อประโยชน์ในการรักษาโรคที่ท่านเป็นอยู่ เนื่องจากมีแนวทางการรักษาอื่น ๆ หลายแบบสำหรับรักษาโรคของท่านได้ ดังนั้นจึงควรปรึกษาแนวทางการรักษาวิธีอื่นๆ กับแพทย์ผู้ให้การรักษาทันทีก่อนตัดสินใจเข้าร่วมในการวิจัย

ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมในโครงการวิจัย

ขอให้ท่านปฏิบัติดังนี้

- ขอให้ท่านให้ข้อมูลทางการแพทย์ของท่านทั้งในอดีต และปัจจุบัน แก่ผู้ทำวิจัยด้วย

ความสัตย์จริง

- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่ท่านร่วมในโครงการวิจัย

อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยและความรับผิดชอบของผู้ทำวิจัย

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัย ท่านจะได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมทันที หากพิสูจน์ได้ว่าท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของทีมผู้ทำวิจัยแล้ว ผู้ทำวิจัย /ผู้สนับสนุนการวิจัยยินดีจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของท่าน และการลงนามในเอกสารให้ความยินยอม ไม่ได้หมายความว่าท่านได้สละสิทธิ์ทางกฎหมายตามปกติที่ท่านพึงมี

ในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใด ๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ท่านสามารถ

ติดต่อกับผู้ทำวิจัยคือ นพ .สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก โทรศัพท์ 02-256-4482 , 0850425466 หรือ อาจารย์ นพ .ชูเกียรติ เฉลิมพันธ์พิพัฒน์ โทรศัพท์ 02-256-4510 , 0818070917 ได้ตลอด 24 ชั่วโมง

ค่าใช้จ่ายของท่านในการเข้าร่วมการวิจัย

ท่านจะไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายใดๆจากการเข้าร่วมโครงการวิจัย โดยผู้วิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบค่าใช้จ่ายที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งหมด (ค่าใช้จ่ายอื่นไม่เกี่ยวข้องกับการวิจัย เช่น ค่าธรรมเนียมทางการแพทย์ ค่าวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ท่านต้องเป็นผู้รับผิดชอบเอง)

ค่าตอบแทนสำหรับผู้เข้าร่วมวิจัย

ท่านจะไม่ได้รับเงินค่าตอบแทนจากการเข้าร่วมในการวิจัยในครั้งนี้

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอลงนามออกจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาโรคของท่านแต่อย่างใด

ผู้ทำวิจัยอาจถอนท่านออกจากการเข้าร่วมการวิจัย เพื่อเหตุผลด้านความปลอดภัยของท่าน หรือ ในกรณีดังต่อไปนี้

- ท่านไม่สามารถปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัย
- ท่านเกิดอาการข้างเคียง หรือความผิดปกติที่เป็นผลมาจากการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร

ข้อมูลนี้อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

จากการลงนามยินยอมของท่านผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัยสามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของท่านได้แม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่านต้องการยกเลิกการให้สิทธิ์ดังกล่าว ท่านสามารถแจ้ง หรือเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอม โดยส่งไปที่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตาม ข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อ ประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

จากการลงนามยินยอมของท่านแพทย์ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของท่านที่เกี่ยวข้องกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

สิทธิ์ของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิ์ดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ รวมทั้งสารเคมี และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่จะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
5. ท่านจะได้รับการเปิดเผยถึงประโยชน์และความเสี่ยงที่ท่านอาจได้รับ
6. ท่านจะได้รับทราบแนวทางในการรักษา ในกรณีที่พบโรคแทรกซ้อนภายหลังการเข้าร่วมในโครงการวิจัย
7. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
8. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลกระทบใด ๆ ทั้งสิ้น
9. ท่านจะได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
10. ท่านจะได้โอกาสในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการ

ใช้สิทธิพลบังคับข่มขู่ หรือการหลอกลวง

หากท่านไม่ได้รับการชดเชยอันควรต่อการบาดเจ็บหรือเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นโดยตรงจากการวิจัย หรือท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอำนวยการชั้น 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2256-4455 ต่อ 14, 15 ในเวลาราชการ

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย

การวิจัยเรื่อง การศึกษาความสัมพันธ์ของไซโตไคน์และความรุนแรงของโรคกระดูกสันหลังส่วนเอว
เสื่อม

วันที่ให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ข้าพเจ้า นาย /นาง /นางสาวได้อ่าน
รายละเอียดพร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบ
ยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลา
ของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตรายหรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะ
เกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียดจนมีความเข้าใจอย่างดี

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว ผู้เข้าร่วมวิจัยจะ
ได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัย
เมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษา
โรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อ
ได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการ
พิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน ผู้ได้รับอำนาจมอบหมายอาจได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจสอบและ
ประมวลข้อมูลของผู้เข้าร่วมวิจัย ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์ตรวจสอบความถูกต้องของ
ข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบ
ข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของผู้เข้าร่วมวิจัยได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่าข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและ
สามารถเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะ
ผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลลงในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การ
วิเคราะห์ และการรายงานเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิทยาศาสตร์ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ใน
อนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นและมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีเข้าร่วมในการวิจัย
ด้วยความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมนี้

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม
 (.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง
 วันที่เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการไม่พึงประสงค์หรือความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย
 (.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง
 วันที่เดือน.....พ.ศ.....

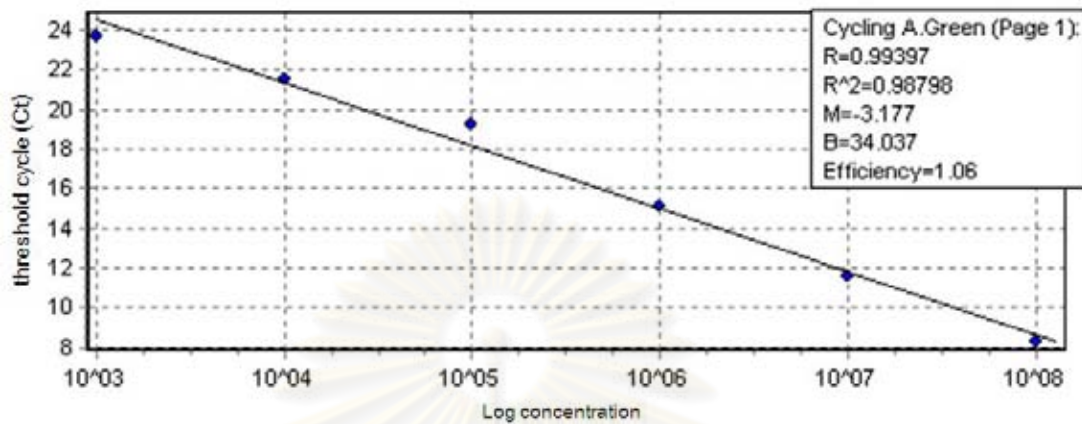
.....ลงนามพยาน
 (.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง
 วันที่เดือน.....พ.ศ.....

ศูนย์วิทยพัชกร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียม 10X Tris-acetic EDTA buffer (TAE buffer)
 - 1.1 ชั่ง Tris base 48.4 g ละลายด้วยน้ำกลั่น ประมาณ 50 ml
 - 1.2 เติม glacial acetic 17.0 ml คนให้เข้ากัน
 - 1.3 เติม 0.5 M EDTA, pH 8.0 7.44 ml คนให้เข้ากัน
 - 1.4 เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 ml ปรับ pH 7.8
2. การเตรียม 2% agarose gel
 - 2.1 ชั่งผง agarose 0.8 g เติลงใน flask ขนาด 250 ml
 - 2.2 เติม TAE buffer จนได้ปริมาตร 40 ml
 - 2.3 อุ่นด้วย microwave จนละลายเข้ากันดี และเทลงแบบพิมพ์ (tray)
3. การเตรียม LB agar
 - 3.1 ชั่ง Tryptone 1 g, NaCl 0.5 g, Yeast extract 0.5 g และ Agar 1.5 g
 - 3.2 เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 ml
 - 3.3 นำทั้งหมดไปเข้าเครื่อง autoclave ที่ 121 °C, 15 pound เป็นเวลา 15 นาที
 - 3.4 เติม ampicillin 100 mg/ml 200 µl ผสมให้เข้ากัน
 - 3.5 เทใส่จานเลี้ยงเชื้อประมาณ 30 ml ตั้งทิ้งไว้จนแข็ง
 - 3.6 เติม IPTG 250 mg/ml 4 µl และ X-Gal 50 mg/ml กระจายให้ทั่วจานเลี้ยงจนแห้ง
4. การเตรียม LB broth
 - 4.1 ชั่ง Tryptone 1 g, NaCl 0.5 g และ Yeast extract 0.5 g เติมน้ำกลั่นประมาณ 100 ml
 - 4.2 นำทั้งหมดไป autoclave ที่ 121 °C, 15 pound นาน 15 นาที
 - 4.3 เติม ampicillin 100 mg/ml 200 µl
5. การเตรียม Soc medium
 - 5.1 ชั่ง Tryptone 2 g, 1 M NaCl 0.06 g, 1 M KCl 0.25 ml และ Yeast extract 0.5 g
 - 5.2 เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 ml นำไป autoclave ที่ 121 °C, 15 pound นาน 15 นาที
 - 5.3 เติมสารละลาย 2 M Mg²⁺ และ 2 M glucose 1 ml
6. การเตรียม DEPC water
 - 6.1 ผสม DEPC 0.1 ml และน้ำกลั่น 100 ml เขย่าและนำไปบ่มที่ 37 °C นาน 12 ชั่วโมง
นำไป autoclave

ภาคผนวก ค

การคำนวณหาปริมาณ DNA ของยีน *bFGF*

ค่า threshold cycle (Ct) จากการทำ real time RT-PCR ของตัวอย่าง เท่ากับ 23.25

$$y = (-3.177)x + 34.037$$

แทนค่าลงในสมการ

$$23.25 = (-3.177)x + 34.037$$

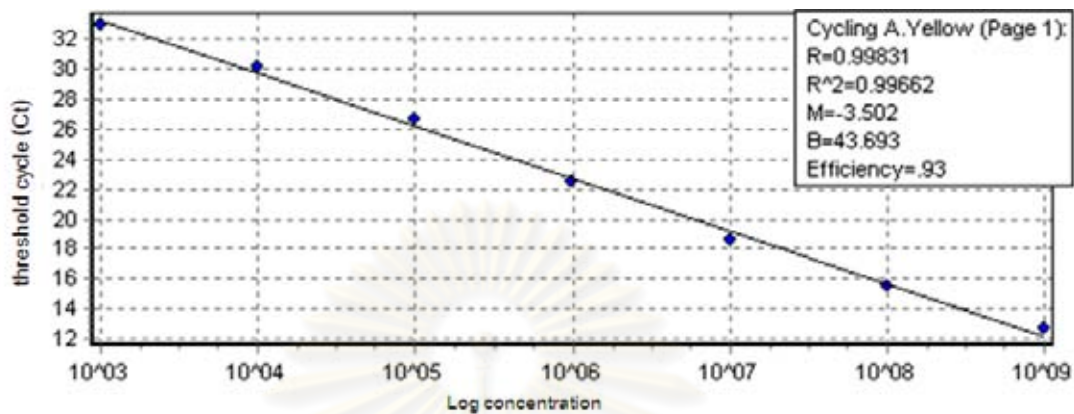
$$X = 3.395$$

$$\text{concentration} = 10^{\text{concentration}}$$

$$\text{concentration} = 10^{3.395} = 2485.08 \text{ copies}/\mu\text{L}$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การคำนวณหาปริมาณ DNA ของยีน GAPDH



ค่า threshold cycle (Ct) จากการทำ real time RT-PCR ของตัวอย่าง เท่ากับ 25.61

$$y = (-3.502)x + 43.693$$

แทนค่าลงในสมการ

$$25.61 = (-3.502)x + 43.693$$

$$x = 5.163$$

$$\text{concentration} = 10^{\text{concentration}}$$

$$\text{concentration} = 10^{5.163} = 145,545.90 \text{ copies}/\mu\text{L}$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การคำนวณหาปริมาณเชิงเปรียบเทียบ (relative quantitation)

สูตร $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{sample}) - \Delta Ct (\text{calibrator})$

$\Delta Ct (\text{sample}) = Ct (\text{target gene of sample}) - Ct (\text{reference gene of sample})$

$\Delta Ct (\text{calibrator}) = Ct (\text{target gene of calibrator}) - Ct (\text{reference gene of calibrator})$

$\Delta Ct (\text{sample}) = Ct (\text{target gene of sample}) - Ct (\text{reference gene of sample})$

แทนค่า $\Delta Ct (\text{patho LF}) = Ct (\text{bFGF of patho LF}) - Ct (\text{GAPDH of patho LF})$

$$= 30 - 25 = 5$$

$\Delta Ct (\text{calibrator}) = Ct (\text{target gene of calibrator}) - Ct (\text{reference gene of calibrator})$

แทนค่า $\Delta Ct (\text{non patho LF}) = Ct (\text{bFGF of non patho LF}) - Ct (\text{GAPDH of non patho LF})$

$$= 40 - 29 = 11$$

อัตราส่วนการแสดงออกของยีน bFGF ใน

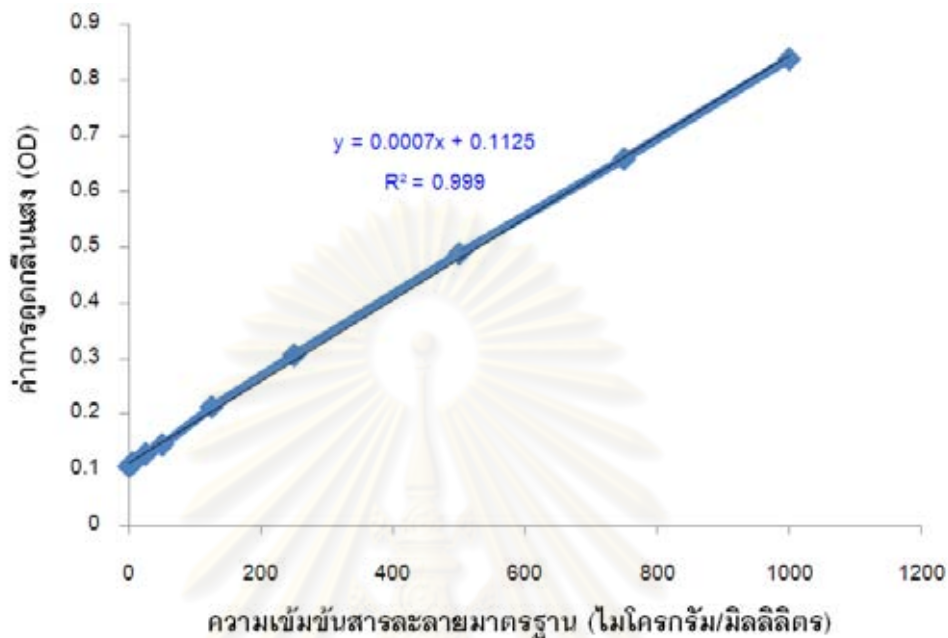
ชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรค : ชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค = $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$

$$= 2^{-(5-11)} = 64$$

ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า ชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรค มีการแสดงออกของยีน bFGF ในระดับ mRNA มากกว่ากลุ่มชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค ประมาณ 64 เท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การคำนวณหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein)



รูปแสดงค่าสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)

ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 570 นาโนเมตร ของสารละลายตัวอย่าง = 0.132

แทนค่าลงในสมการ

$$y = 0.0007x + 0.1125$$

$$0.132 = 0.0007x + 0.1125$$

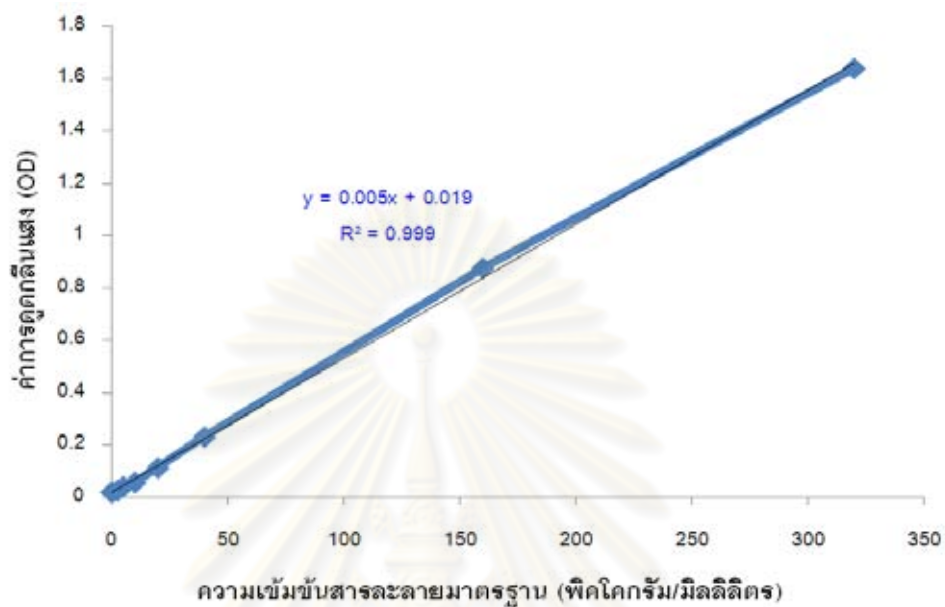
$$0.132 - 0.1125 = 0.0007x$$

$$x = 27.86$$

ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่มีในสารตัวอย่าง คือ 27.86 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การคำนวณหาปริมาณโปรตีน bFGF



รูปแสดงค่าสารละลายมาตรฐาน bFGF

ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 570-450 นาโนเมตร ของสารละลายตัวอย่าง = 0.366

แทนค่าลงในสมการ $y = 0.0005x + 0.019$

$$0.366 = 0.0005x + 0.019$$

$$0.366 - 0.019 = 0.0005x$$

$$x = 86.6$$

ปริมาณโปรตีน bFGF ที่มีในสารตัวอย่าง คือ 27.86 พิคโคกรัม/มิลลิลิตร

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

แสดงรายงานการตีพิมพ์บางส่วนของวิทยานิพนธ์ในวารสารการประชุมวิชาการ มอบ.วิจัย ครั้งที่ 4
ณ. โรงแรมลายทอง จังหวัดอุบลราชธานี ระหว่างวันที่ 9 – 10 สิงหาคม 2553

ชื่อวารสาร The 4th Ubon Ratchathani University Research Conference
หัวข้อเรื่อง การศึกษาความสัมพันธ์ของไซโตไคน์และความรุนแรงของโรคกระดูกสันหลังส่วน
เอวเสื่อม (RELATIONSHIP OF CYTOKINE WITH SEVERITY IN
DEGENERATIVE LUMBAR DISEASE)
หน้า 208 - 216
ลำดับการนำเสนอ 247
ชื่อผู้นำเสนอ นางสาวจริยา พูลภักดิ์



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาความสัมพันธ์ของไซโตไคน์และความรุนแรงของโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

Relationship of cytokine with severity in degenerative lumbar disease

จริญญา พูลภักดี^{1*} ชูเกียรติ เฉลิมพันธ์พิพัฒน์² สันชัย พยุงภร³ และ สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก³

¹ คณะแพทยศาสตร์ สาขาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

² คณะแพทยศาสตร์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

³ คณะแพทยศาสตร์ ภาควิชาชีวเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

*E-mail: jariya_m.sc@hotmail.com

บทคัดย่อ

โรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมเป็นโรคที่เกิดจากการเสื่อมอย่างเรื้อรังของกระดูกสันหลังส่วนเอว สาเหตุส่วนหนึ่งเกิดจากการหนาตัวของ ligamentum flavum. ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นเซลล์จำพวกไฟโบรบลาสต์ (fibroblastic cells) ที่สามารถแบ่งตัวได้โดยการควบคุมของยีน basic fibroblast growth factor (*bFGF*) ดังนั้นการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่มีการหนาตัวในผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมในระดับกระดูกสันหลังที่เกิดพยาธิสภาพและ ligamentum flavum ที่ปกติในระดับกระดูกสันหลังที่ไม่เกิดพยาธิสภาพ จำนวน 16 ราย จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *bFGF* ด้วยวิธี RT-PCR พบว่ากลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดพยาธิสภาพมีการแสดงออกของยีน *bFGF* มากกว่าชิ้นเนื้อกลุ่มที่ไม่เกิดพยาธิสภาพอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ผลการศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่ายีน *bFGF* อาจมีความสัมพันธ์กับกระบวนการเสื่อมของ ligamentum flavum ในโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

คำสำคัญ: โรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม Ligamentum flavum ยีน basic fibroblast growth factor (*bFGF*)

Abstract

Degenerative lumbar disease is a chronic degenerative lumbar disorder resulting from thickening and hypertrophic ligamentum flavum. Fibroblastic cells which present in the ligamentum flavum are stimulated by Basic fibroblast growth factor gene (*bFGF*) expression The objective of this research was to study and compare *bFGF* expression in ligamentum flavum tissues from pathogenic and non-pathogenic lesions of patients with degenerative lumbar disease. A total of sixteen patients with degenerative lumbar diseases were enrolled in this study. The *bFGF* expression of ligamentum flavum tissue from these patients were analysed by using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The results showed that *bFGF* expression of pathologic tissues were significantly higher than those of non-pathologic tissues ($P < 0.01$). Our study showed that increased *bFGF* expression may be associated with the chronic inflammatory process of ligamentum flavum in degenerative lumbar diseases.

Keywords: Degenerative lumbar disease, Ligamentum flavum, Basic fibroblast growth factor (*bFGF*),

บทนำ

ปัจจุบันความเจ็บป่วยที่เกี่ยวข้องกับกระดูกสันหลังเป็นโรคที่พบได้บ่อยขึ้นโรคหนึ่ง เนื่องจากกระดูกสันหลังบริเวณเอวเป็นตำแหน่งที่มีการรับน้ำหนักและมีการเคลื่อนไหวมากในหลายทิศทางจึงทำให้สึกหรอและเสื่อมสภาพได้ง่าย โรคกระดูกสันหลังเอวส่วนเสื่อม (degenerative lumbar disease) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกระดูกสันหลัง พบว่าการหนาตัวของ ligamentum flavum เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคนี้ ligamentum flavum เป็นแผ่นเอ็นที่หุ้มไขสันหลัง จัดเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิด dense connective tissue มีซึ่งมีเซลล์ไฟโบรบลาส (fibroblast) เป็นส่วนประกอบ เซลล์ไฟโบรบลาสจะเป็นเซลล์ที่สร้างโปรตีนเส้นใยอีลาสตินและคอลลาเจน ปกติ ligamentum flavum มีอีลาสตินและคอลลาเจนเป็นส่วนประกอบในอัตราส่วน 2:1 พบว่าเมื่อคนเราอายุเพิ่มขึ้นอัตราส่วนของอีลาสตินต่อคอลลาเจนจะลดลง เป็นผลให้ความยืดหยุ่นของ ligamentum flavum ลดลงเป็นผลทำให้เกิดพังผืด (fibrosis) การหนาตัวของเอ็นตามมา⁽²⁾ ผลจากการหนาตัวของเอ็นดังกล่าวเป็นผลให้ช่องไขสันหลัง (spinal canal) มีขนาดเล็กลงจนมีผลทำให้ไปกดรากประสาท ทำให้ผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้เกิดอาการอ่อนแรงหรืออาการปวด ทำให้ผู้ป่วยไม่สามารถใช้ชีวิตประจำวันได้อย่างปกติ

ในปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าสาเหตุของการเกิดการหนาตัวของ ligamentum flavum เกิดจากการแสดงออกของยีนตัวใดบ้าง ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาพบว่ามียีนหลายชนิดเกี่ยวข้องกับการเกิดการหนาตัวของ ligamentum flavum เช่น พบว่ามีการแสดงออกของยีน *TGF-β* และ *TIMP* ใน ligamentum flavum ที่หนาตัวในผู้ป่วยที่มีภาวะโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบ⁽¹⁻⁴⁾ แต่อย่างไรก็ตามก็ยังไม่มียางานการศึกษาที่พบว่ามี การแสดงออกของยีนที่สามารถอธิบายการเกิดการหนาตัวของ ligamentum flavum ได้อย่างสมบูรณ์ คาดว่า น่าจะมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโปรตีนที่ปัจจัยที่ช่วยในการเจริญเติบโต (growth factor) อื่น เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย⁽⁴⁾

Basic fibroblast growth factor (*bFGF*) เป็นยีนเกี่ยวข้องกับการผลิตโปรตีนที่เป็นปัจจัยที่ช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์ พบว่ามีบทบาทเกี่ยวข้องกับการบวนการที่มีความสำคัญของเซลล์ เช่น การเพิ่มจำนวนของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ การลุกลามของเซลล์มะเร็ง เป็นต้น⁽⁷⁻⁸⁾ นอกจากนี้พบว่า *bFGF* สามารถกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ในเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle cell) เซลล์ไมโอไฟโบรบลาส (myofibroblast) , เซลล์ไฟโบรบลาส (fibroblast) เป็นต้น⁽⁵⁾ มีการศึกษาพบว่ามีการแสดงออกของ *bFGF* ในเนื้อเยื่อที่มีการเสื่อม เช่น เซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) และ เซลล์ไฟโบรบลาสของหมอนรองกระดูกที่มีการเสื่อม⁽⁶⁾ หรือพบใน subacromial bursa ของผู้ป่วยที่มีการเสื่อมของไหล่⁽⁹⁾ จากการศึกษาดังกล่าว จึงคาดว่า การแสดงออกของ *bFGF* อาจจะเกี่ยวข้องกับการเกิดพังผืด (fibrosis) และการหนาตัวของ ligamentum flavum ในผู้ป่วยที่มีกระดูกสันหลังบริเวณเอวเสื่อมร่วมกับเกิดภาวะโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงให้ความสนใจต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกของยีน *bFGF* ภายใน ligamentum flavum บริเวณเอวที่มีการเสื่อม

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออก *bFGF* และ โรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีภาวะโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบจากการหนาตัวของ ligamentum flavum

2. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของ *bFGF* ในระดับของ mRNA ในชั้นเนื้อ ligamentum flavum ในโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีภาวะโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบในตำแหน่งที่เกิดพยาธิสภาพและไม่เกิดพยาธิสภาพ

วิธีการวิจัย

กลุ่มประชากรเป้าหมาย

ผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีภาวะช่องโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบจากการหนาตัวของ ligamentum flavum ที่เข้ารับการผ่าตัดรักษาภาวะช่องโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบจากแผนกออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย อายุ 45 ปีขึ้นไป โดยไม่มีโรคอื่นร่วมด้วย จำนวน 16 ราย แบ่งเป็นเพศชาย 8 รายและเพศหญิง 8 ราย

การเก็บชิ้นเนื้อ

ทำการเก็บชิ้นเนื้อขนาด 0.2×0.2 เซนติเมตร บริเวณ ligamentum flavum ของผู้ป่วย ทั้งในระดับกระดูกสันหลังที่เกิดรอยโรค (pathologic lesion) และระดับไม่เกิดรอยโรค (non-pathologic lesion) นำชิ้นเนื้อที่ได้จากผู้ป่วยมาตัดแบ่งและชั่งน้ำหนักให้แต่ละชิ้นหนักประมาณ 30 มิลลิกรัม เก็บในน้ำยารักษาสภาพ RNA เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -80 °C เพื่อรอสกัด RNA ต่อไป

การสกัด total RNA

ทำการสกัดแยก total RNA จากชิ้นเนื้อโดยชุดสกัด RNA isolation RNeasy Mini kit (Qiagen) และนำ RNA ที่สกัดได้ไปวัดปริมาณ RNA ที่ได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยอาศัยคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของ RNA ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร โดยที่ $A_{260} = 1 = 40$ ไมโครกรัม/ไมโครลิตร RNA และวัดคุณภาพ RNA โดยดูจากสัดส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร ซึ่ง RNA ที่มีคุณภาพจะมีค่าอยู่ระหว่างช่วง 1.8-2.0

การศึกษาหาปริมาณการแสดงออกของยีน

นำ total RNA ที่สกัดได้แต่ละตัวอย่างเจือจางให้มีความเข้มข้น 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนยีน *bFGF* และ *GAPDH* ด้วยเทคนิค RT-PCR (Reverse transcriptase polymerase chain reaction) โดยผสม Master mix สำหรับ RT-PCR ดังนี้ reverse transcriptase enzyme และ Taq polymerase 0.2 ไมโครลิตร, 2X buffer mix 5 ไมโครลิตร, forward primer และ reverse primer ของแต่ละยีน (ตารางที่ 1) อย่างละ 0.25 ไมโครลิตร, DepC water 3.5 ไมโครลิตร และ total RNA 1 ไมโครลิตร และทำการเพิ่มจำนวนยีน *bFGF* และ *GAPDH* โดยเครื่อง PCR รุ่น Mastercycler personal (Eppendorf) โดยใช้สภาวะดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 แสดง primers ที่ใช้ในการทำ RT-PCR

| ชื่อ Primer | ลำดับเบส(5'→3') | ขนาด (คู่เบส) | อ้างอิง |
|------------------------|-------------------------------|---------------|---------|
| <i>bFGF</i> (Forward) | TAC-AAC-TTC-AAG-CAG-AAG -AG | 283 | 9 |
| <i>bFGF</i> (Reverse) | CAG-CTC-TTA-GCA-GAC-ATT-GG | | |
| <i>GAPDH</i> (Forward) | GTG-AAG-GTC-GGA-GTC-AAC-GG | 107 | - |
| <i>GAPDH</i> (Reverse) | TCA-ATG-AAG-GGG-TCA-TTG-ATG-G | | |

ตารางที่ 2 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ RT-PCR

| PCR cycle | อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส) | เวลา(นาที) |
|-----------------------|------------------------|------------|
| Reverse transcription | 50 | 30.00 |
| Pre-denaturation | 95 | 3.00 |
| Denaturation | 95 | 0.15 |
| Annealing | | |
| - bFGF | 55 | 0.30 |
| - GAPDH | 60 | 0.30 |
| Extention | 72 | 0.30 |

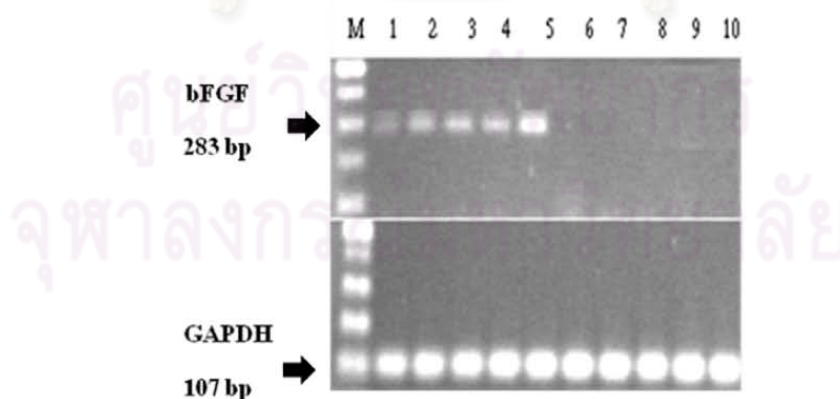
หลังจากทำ RT-PCR แล้วจะทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *bFGF* และ *GAPDH* โดยการทำให้ gel electrophoresis ซึ่งจะผสม PCR product 5 ไมโครลิตรกับ 6X loading dye 1 ไมโครลิตร หยอดลงในหลุมของ 2% agarose gel ใช้ marker ที่มีขนาด 100 คู่เบสวัดขนาดของยีน ใช้ 1X TAE buffer เป็นตัวกลางและจ่ายกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลาประมาณ 40 นาที จากนั้นนำ gel ไปย้อมด้วย 0.1% ethidium bromide เป็นเวลานาน 10-15 นาที ล้าง gel ด้วยน้ำเปล่า 2-3 ครั้ง แล้วนำ gel ไปผ่านเครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต Gel Doc 1000 (BIO-RAD, USA) จากนั้นทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *bFGF* และ *GAPDH* โดยใช้โปรแกรม Quantity One และนำผลจากการตรวจวิเคราะห์ความเข้มของแถบ DNA ของ *bFGF* และ *GAPDH* ของแต่ละตัวอย่างมาหาอัตราส่วน

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยโปรแกรม SPSS โดยใช้ Mann-Whitney test เปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง โดยจะถือว่าความแตกต่างนั้นมีนัยสำคัญทางสถิติก็ต่อเมื่อ $P < 0.05$

ผลการวิจัย

การแสดงออกของ *bFGF* และ *GAPDH* สามารถแสดงจากขนาดแถบของ PCR product ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis ซึ่งมีขนาด 283 และ 107 คู่เบสตามลำดับ (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 การแสดงออกของยีน *bFGF* และ *GAPDH* จากการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR ; แถว M แสดงแถบของ marker, แถว 1-5 แสดงแถบ PCR product ของชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรค, แถว 6-10 แสดงแถบ PCR product ของชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค

การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *bFGF* ระหว่างชั้นเนื้อ ligamentum flavum ที่มีรอยโรคจากกระดูกสันหลังที่เกิดพยาธิสภาพและชั้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรคจากกระดูกสันหลังที่ไม่มีพยาธิสภาพในผู้ป่วยคนเดียวจากผู้ป่วยทั้งหมด 16 ราย (อายุเฉลี่ย 62.56 ± 11.11 ปี) แบ่งเป็นเพศชาย 8 ราย (อายุเฉลี่ย 64.13 ± 12.13 ปี) และเพศหญิง 8 ราย (อายุเฉลี่ย 61 ± 10.56 ปี) โดยการนำ PCR product ที่ได้จากการทำ RT-PCR มาทำ agarose gel electrophoresis และทำการบันทึกรูปภาพเพื่อตรวจการแสดงออกของยีน *bFGF* พบว่าผู้ป่วย 10 ราย มีการแสดงออกของยีน *bFGF* จากชั้นเนื้อเกิดรอยโรคเพียงอย่างเดียว ผู้ป่วย 4 ราย ไม่พบการแสดงออกของยีน *bFGF* ทั้งจากชั้นเนื้อเกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค และผู้ป่วย 2 รายพบการแสดงออกยีน *bFGF* ทั้งในชั้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค ในขณะที่การแสดงออกของยีน *GAPDH* พบทั้งในชั้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคของผู้ป่วยทุกราย

จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของยีน *bFGF* ระหว่างกลุ่มชั้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและกลุ่มชั้นเนื้อไม่เกิดรอยโรค โดยนำความเข้มของแถบ DNA ของยีน *bFGF* และ *GAPDH* ที่ได้จาก RT-PCR มาหาอัตราส่วนและหาความสัมพันธ์ทางสถิติ พบว่าชั้นเนื้อที่เกิดรอยโรคมีการแสดงออกของยีน *bFGF* มากกว่าชั้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรค และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 2

จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของยีน *bFGF* ระหว่างเพศชายและเพศหญิงในชั้นเนื้อที่เกิดรอยโรค โดยนำความเข้มของแถบ DNA ของยีน *bFGF* และ *GAPDH* ที่ได้จาก RT-PCR มาหาอัตราส่วนและหาความสัมพันธ์ทางสถิติ พบว่าชั้นเนื้อที่เกิดรอยโรคที่ได้จากผู้ป่วยเพศหญิงมีการแสดงออกของยีน *bFGF* มากกว่าชั้นเนื้อที่เกิดรอยโรคที่ได้จากผู้ป่วยเพศชาย และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 4 และรูปที่ 3

ตาราง 3 แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณการแสดงออกของยีน *bFGF* ระหว่างชั้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคโดย RT- PCR

| | ชั้นเนื้อที่เกิดรอยโรค | ชั้นเนื้อไม่เกิดรอยโรค | P* |
|--|------------------------|------------------------|------------------|
| ความเข้มของแถบ DNA ยีน <i>bFGF:GAPDH</i> | 0.765 ± 0.13 | 0.656 ± 0.02 | 0.007 \ddagger |

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการทดสอบโดยใช้ Mann-Whitney test ,

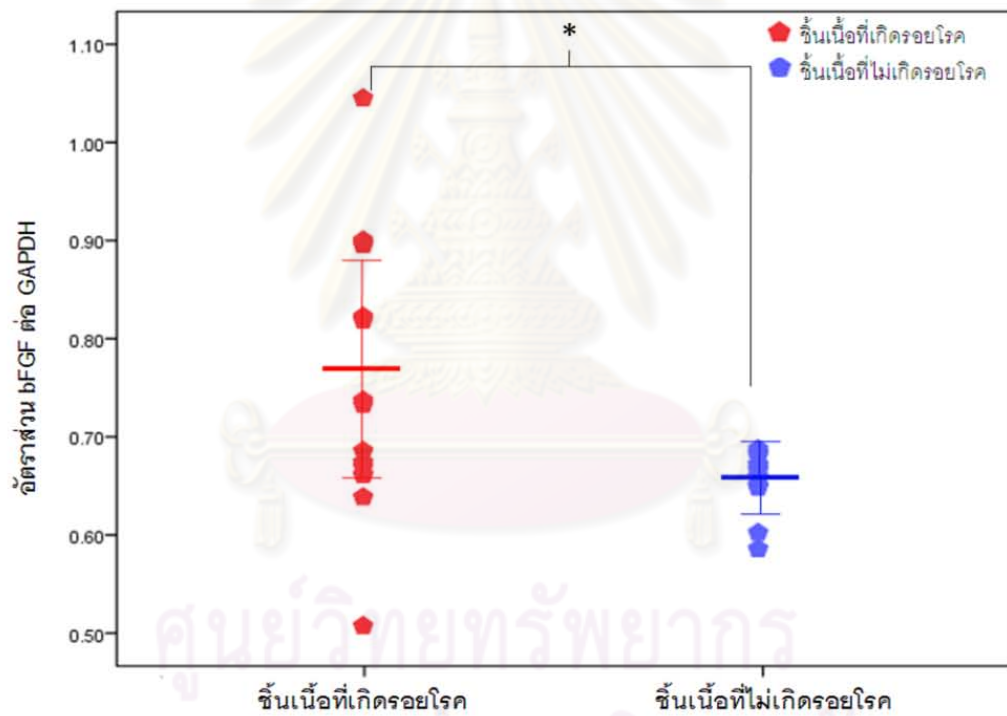
$\ddagger P < 0.01$ ถือว่าความแตกต่างนั้นมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตาราง 4 แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณการแสดงออกของยีน *bFGF* ระหว่างเพศหญิงและเพศชายในชั้นเนื้อที่เกิดรอยโรคโดย RT-PCR

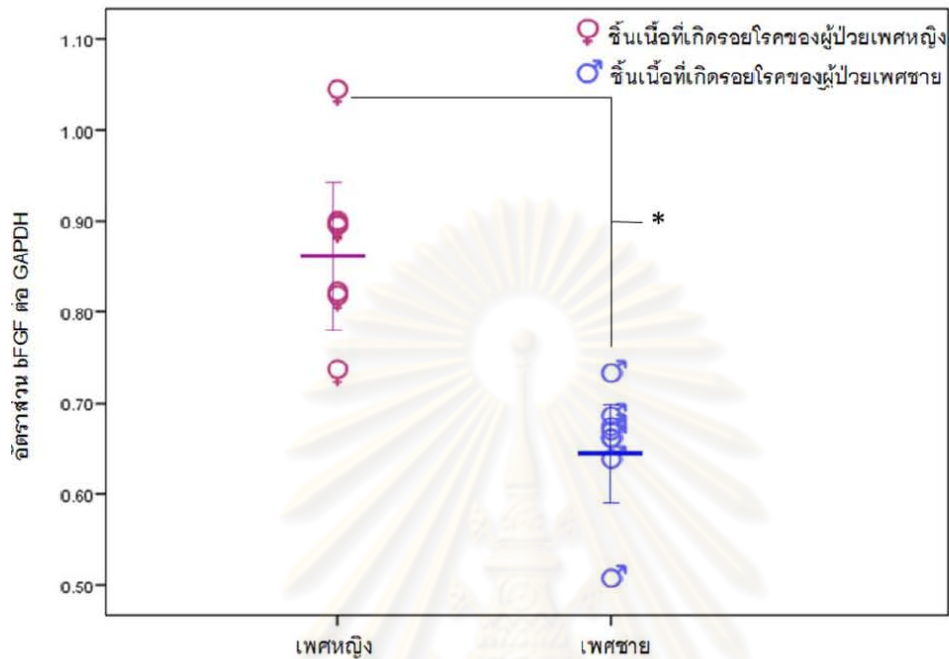
| | เพศหญิง | เพศชาย | P* |
|---|-------------|-------------|--------|
| ความเข้มข้นของแถบ DNA ยีน <i>bFGF:GAPDH</i> | 0.877±0.089 | 0.653±0.065 | 0.001¶ |

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการทดสอบโดยใช้ Mann-Whitney test ,

¶ P<0.01 ถือว่าความแตกต่างนั้นมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 2 เปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของยีน *bFGF* ระหว่างชั้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและชั้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรคโดย RT-PCR , * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.01)



ที่ 3 เปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของยีน *bFGF* ระหว่างเพศหญิงและเพศชายในชั้นเนื้อที่เกิดรอยโรคโดย RT-PCR, * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

อภิปรายผล

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *bFGF* ระหว่างชั้นเนื้อ ligamentum flavum ที่มีรอยโรคและไม่มียโรคในผู้ป่วยรายเดียวกัน เนื่องจากต้องการวิเคราะห์แนวโน้มการแสดงออกของ *bFGF* ระหว่างตำแหน่งกระดูกสันหลังที่เกิดพยาธิสภาพและไม่เกิดพยาธิสภาพว่ามีการแสดงออกของยีน *bFGF* ต่างกันอย่างไรในผู้ป่วยที่เป็นโรคกระดูกสันหลังตีบแคบแต่ละคน และเพื่อลดปัจจัยรบกวน (confounding factor) เช่น การดำเนินชีวิตประจำวันที่แตกต่างกันในผู้ป่วยแต่ละคนอาจจะมีผลทำให้การแสดงออกของยีน *bFGF* แตกต่างกันได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำชั้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรคมาเป็นกลุ่มควบคุมในการศึกษาความแตกต่างการแสดงออกของยีน *bFGF* ระหว่างกลุ่มชั้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคเพื่อให้ได้อายุของผู้ป่วยระหว่างกลุ่มตัวแปรตามและตัวแปรควบคุมไม่แตกต่างกัน เนื่องจากในการศึกษาทั่วไปจะทำการเก็บชั้นเนื้อ ligamentum flavum จากศพหรือผู้ป่วยโรคอื่นที่ ligamentum flavum ไม่มีรอยโรค ซึ่งทำให้อาจได้ช่วงอายุระหว่างตัวแปรงกัน จากผลการศึกษาที่พบว่า มีผู้ป่วย 10 รายมีการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชั้นเนื้อที่เกิดรอยโรคมมากกว่าไม่เกิดรอยโรคซึ่งจากการนำอายุผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าวมาหาค่าเฉลี่ยพบว่า มีค่าเฉลี่ย 66.2 ± 10.24 ปี และในผู้ป่วยที่พบการแสดงออกในชั้นเนื้อที่เกิดรอยโรคมีค่าเฉลี่ยอายุเท่ากับ 57.5 ± 9.73 ปี จากผลการศึกษาที่พบจึงอาจมีความเป็นไปได้ว่ายีน *bFGF* อาจมีการแสดงออกใน ligamentum flavum ที่มีการหนาตัวในกระดูกสันหลังส่วนเอวของผู้สูงอายุ

ระดับการแสดงออกของ *bFGF* ที่วิเคราะห์โดย RT-PCR ซึ่งพบว่าในกลุ่มของชั้นเนื้อที่เกิดรอยโรคมีการแสดงออกมากกว่ากลุ่มชั้นเนื้อไม่เกิดรอยโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ซึ่งอาจมีความเป็นไปได้ที่ยีน *bFGF* อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดพังผืดใน ligamentum flavum เป็นผลให้เอ็นดังกล่าวเกิดการหนาตัวไป

กดเส้นประสาทไขสันหลัง ทำให้เกิดภาวะโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบตามมา ผลการศึกษาที่พบสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า *bFGF* สามารถกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์แบบ mitosis ในเซลล์หลายชนิด รวมทั้งเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast)⁽⁵⁾ ซึ่งคาดว่า การแสดงออกของ *bFGF* อาจจะมีผลทำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบใน ligamentum flavum มีการแบ่งเซลล์เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้การที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นอาจจะมีผลเกี่ยวข้องกับเปลี่ยนแปลงสัดส่วนอีลาสตินต่อคอลลาเจน เนื่องจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์จะเป็นเซลล์ที่สร้างโปรตีนเส้นใยอีลาสตินและคอลลาเจน ดังนั้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์อาจมีผลทำให้มีคอลลาเจนสะสมในเนื้อเยื่อ ligamentum flavum มากกว่าปกติ เป็นผลให้เอ็นดิงกล่าวมีความยืดหยุ่นลดลง มีการหนาตัวและเกิดพังผืดตามมา ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *bFGF* และการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนอีลาสตินต่อคอลลาเจนจะทำการศึกษาในครั้งต่อไป

จากผลการศึกษาที่พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *bFGF* ในกลุ่มของชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคของผู้ป่วยเพศหญิงมีการแสดงออกมากกว่าผู้ป่วยเพศชายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) จากผลการศึกษาดังกล่าวอาจมีความเป็นไปได้ที่ยีน *bFGF* อาจมีการแสดงออกที่แตกต่างกันระหว่างเพศหญิงและเพศชาย โดยยีน *bFGF* อาจจะมีการแสดงออกมากกว่าในเพศหญิง ซึ่งจะได้ทำการศึกษาต่อไปโดยเก็บตัวอย่างมาศึกษาเพิ่ม

จากการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *bFGF* ระหว่างชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคในผู้ป่วยคนเดียวกัน ซึ่งพบว่า มีผู้ป่วยจำนวน 2 รายที่ไม่พบความแตกต่างของยีน *bFGF* ระหว่างตำแหน่งทั้งสองโดยพบว่ามีมีการแสดงออกของยีน *bFGF* ทั้ง ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค คาดว่าเนื่องจากการตรวจวัดการเพิ่มจำนวนของ DNA โดยเทคนิค RT-PCR นั้นเป็นแบบ end-point detection เนื่องจากต้องปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาจนถึงรอบสุดท้ายก่อน จึงจะสามารถนำสารละลายจากปฏิกิริยามาตรวจสอบ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการเพิ่มจำนวน DNA ระหว่าง 2 ตัวอย่างที่มีปริมาณ DNA สุดท้ายใกล้เคียงกันมากอาจได้ค่าความเข้มของแถบ DNA ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงมีโอกาสที่การแสดงออกของยีน *bFGF* ระหว่างชิ้นเนื้อจากกระดูกสันหลังที่เกิดรอยโรคและกระดูกสันหลังที่ปกติในผู้ป่วยคนเดียวกันจะมีการแสดงออกไม่แตกต่างกัน ซึ่งในการศึกษาครั้งต่อไปผู้วิจัยจะทำการศึกษาโดยวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *bFGF* โดยเทคนิค real-time PCR นำมาเปรียบเทียบความถูกต้อง เนื่องจาก real-time PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA แบบ real-time detection โดยอาศัยการตรวจวัดสัญญาณสารเรืองแสงที่เพิ่มขึ้น และใช้ค่า threshold cycle (Ct) เป็นตัวบ่งชี้ปริมาณ DNA ที่มีในสารตั้งต้น ตัวอย่างที่มีปริมาณ DNA ตั้งต้นมาก จะมีค่า Ct ต่ำ เนื่องจากมีปริมาณ DNA ตั้งต้นมาก จึงใช้จำนวนรอบของปฏิกิริยาเพียงไม่กี่รอบก็สามารถเพิ่มปริมาณสารเรืองแสงให้สูงกว่าระดับ threshold ได้ และตัวอย่างที่มีปริมาณ DNA ตั้งต้นน้อยจะให้ผลในทางตรงข้ามดังนั้น real-time PCR จึงสามารถบอกผลการแสดงออกของยีนได้ชัดเจนกว่า RT-PCR นอกจากนี้ยังอาจนำค่า Ct ที่ได้จากการทำ real-time PCR มาคำนวณหาปริมาณเชิงเปรียบเทียบของ DNA (relative quantitation) ระหว่างชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค ซึ่งจะให้ผลออกมาเป็นจำนวนเท่าที่แตกต่างกันระหว่างการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค ซึ่งสามารถบอกความแตกต่างได้ชัดเจนกว่าการทำ RT-PCR จากผลที่พบว่า มีผู้ป่วย 2 รายที่พบการแสดงออกของยีน *bFGF* ในชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรคคาดว่าอาจมีการหนาตัวหรือการเสื่อมเกิดขึ้นในชิ้นเนื้ออยู่แล้ว แต่ผู้ป่วยอาจยังไม่มีอาการ ซึ่งอาจตรวจสอบได้โดยนำชิ้นเนื้อดังกล่าวไปวิเคราะห์ด้วย histology เพื่อดูลักษณะการจัดเรียงตัวของเส้นใยอีลาสติน เป็นต้น

บทสรุป

จากการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *bFGF* ระหว่างชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค แสดงว่ายีน *bFGF* มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในชิ้นเนื้อเอ็นที่มียโรค และมีการ

แสดงออกในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย ดังนั้น bFGF อาจจะมีความสัมพันธ์กับกระบวนการเสื่อมของ ligamentum flavum ในโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

เอกสารอ้างอิง

1. Hirofumi K, Natsuo Y. et al. Pathomechanism of Loss of Elasticity and Hypertrophy of Lumbar Ligamentum Flavum in Elderly Patients With Lumbar Spinal Canal Stenosis. *Spine* 2007;32:2805-11.
2. Park JB, Chang H, Lee JK. Quantitative analysis of transforming growth factor-beta 1 in ligamentum flavum of lumbar spinal stenosis and disc herniation. *Spine* 2001;26:492-5.
3. Zhong ZM, Chen JT. Overexpression of transforming growth factor-beta1 in degenerative ligamentum flavum. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2009;29:316-8.
4. Park JB, et al. Hypertrophy of ligamentum flavum in lumbar spinal stenosis associated with increased proteinase inhibitor concentration. *J Bone Joint Surg Am* 2005;27:50-57.
5. Yoshikazu Inoue. Basic Fibroblast Growth Factor and Its Receptors in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Lymphangiomyomatosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:765-73.
6. Jukka Tolonen, et al, Growth factor expression in degenerated intervertebral disc tissue An immunohistochemical analysis of transforming growth factor beta, fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor. *Eur Spine J* 2006;15:588-96.
7. Takayama S, Murakami S, Miki Y, Ikezawa K, Tasaka S, Terashima A, et al. Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 1997;32:667-75.
8. Karina Gonzales Silverio-Ruiz, et al. Opposite effects of bFGF and TGF- β on collagen metabolism by human periodontal ligament fibroblasts. *Cytokine* 2007;39:130-37.
9. Jana Neuwirth, Renee AE Fuhrmann ,et al. Expression of bioactive bone morphogenetic proteins in the subacromial bursa of patients with chronic degeneration of the rotator cuff. *Arthritis Res Ther* 2005;8:1-9.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อผู้วิจัยหลัก (ภาษาไทย) นางสาวจริยา พูลภักดิ์
 ตำแหน่งทางวิชาการ ไม่มี
 (ภาษาอังกฤษ) Miss Jariya Poonphakdee
 ตำแหน่ง นิสิตวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตพิเศษ
 สาขาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี
 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 โทรศัพท์ 08-977-06166
 ที่อยู่ปัจจุบัน 128/89 บางกอกน้อย บางขุนนนท์ กทม.10700

ประวัติการศึกษา

| สถานศึกษา | ปริญญา | สาขา | ปี พ.ศ. ที่สำเร็จการศึกษา |
|------------------|------------------------------|-----------|---------------------------|
| มหาวิทยาลัยมหิดล | พยาบาลศาสตรบัณฑิต (พย.บ.) | การพยาบาล | 2547 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย