การศึกษาผลของวิตามินอีต่อระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

นางสาวธันยวัน สวนทวี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

THE EFFECT OF VITAMIN E ON OXIDATIVE STRESS IN BLOOD AND SYNOVIAL FLUID OF PATIENTS WITH KNEE OSTEOARTHRITIS

Miss Tanyawan Suantawee

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 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาผลของวิตามินอีต่อระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม
โดย	นางสาวธันยวัน สวนทวี
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ อารี ตนาวลี
	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริชัย อดิศักดิ์ วัฒนา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ โศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์)

…….. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก)

…… อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ อารี ตนาวลี)

…… อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริชัย อดิศักดิ์ วัฒนา)

…… กรรมการ
(อาจารย์ ดร.สัญชัย พยุงภร)

…… กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ลินดา จุฬาโรจน์มนตรี)

ธันยวัน สวนทวี : การศึกษาผลของวิตามินอีต่อระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม. (THE EFFECT OF VITAMIN E ON OXIDATIVE STRESS IN BLOOD AND SYNOVIAL FLUID OF PATIENTS WITH KNEE OSTEOARTHRITIS) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. นพ. สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ. นพ. อารี ตนาวลี, ผศ.ดร.สิริชัย อดิศักดิ์วัฒนา 126 หน้า.

โรคข้อเข่าเสื่อมเป็นโรคที่เกิดจากการเสื่อมสภาพของข้อเข่าซึ่งพบได้บ่อยในผู้สูงอายุ ปัจจุบันมีหลักฐานงานวิจัยพบว่าภาวะเครียดจากออกซิเดชันมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคข้อเข่าเสื่อม วิตามินอีเป็นสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและสามารถลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันได้ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาผลของการเสริมวิตามินอีต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม การศึกษานี้แบ่งกลุ่มตัวอย่างเป็นสามกลุ่ม กลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี 35 ราย กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี 35 ราย และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิตทุกวันโดยการรับประทาน เป็นระยะเวลา 2 เดือน 31 ราย โดยได้ทำการตรวจวัดสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ nitrite, malondialdehyde, vitamin E, trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), ferric reducing antioxidant power (FRAP), inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ 3-nitrotyrosine ผลการทดลองพบว่าผู้ป่วย หลังได้รับการเสริมวิตามินอีมีระดับ molondialdehyde ในเลือดและน้ำไขข้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ระดับ vitamin E, TEAC และ FRAP ในเลือดหรือน้ำไขข้อเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของระดับ nitrite และ iNOS ในเลือดและน้ำไขข้อ นอกจากนี้ยังพบการย้อมติดสีของ 3-nitrotyrosine ในเยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ดังนั้นการเสริมวิตามินอีสามารถเพิ่มระดับสารต้านอนุมูลอิสระและลดสารอนุมูลอิสระ การศึกษานี้จึงส่งเสริมประโยชน์ของวิตามินอีในการลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา 2554 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

537 46377 30 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY
KEYWORDS : KNEE OSTEOARTHRITIS / VITAMIN E / OXIDATIVE STRESS / ANTIOXIDANT / SYNOVIAL FLUID

TANYAWAN SUANTAWEE : THE EFFECT OF VITAMIN E ON OXIDATIVE STRESS IN BLOOD AND SYNOVIAL FLUID OF PATIENTS WITH KNEE OSTEOARTHRITIS. ADVISOR : ASSOC. PROF. SITTISAK HONSAWEK, M.D., CO-ADVISOR : ASSOC.PROF. AREE TANAVALEE, M.D., ASST.PROF. SIRICHAI ADISAKWATTANA, Ph.D., 126 pp.

Knee osteoarthritis (KOA), one of the most common degenerative joint diseases, is a major cause of morbidity in the elderly. Increasing evidences suggest that oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of osteoarthritis. Since vitamin E is one of the major dietary antioxidants, the objective of this study was to evaluate the effect of vitamin E supplementation on oxidative stress in blood and synovial fluid from patients with KOA. Subjects were divided into three groups, 35 healthy controls, 35 KOA patients without vitamin E supplementation and 31 KOA patients with oral vitamin E 400 IU/day for 2 months. Nitrite, malondialdehyde, vitamin E, trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), ferric reducing antioxidant power (FRAP), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and 3-nitrotyrosine were determined. After vitamin E supplementation, malondialdehyde levels in blood and synovial fluid were decreased significantly ($P<0.05$). Vitamin E, TEAC and FRAP levels in blood or synovial fluid were significantly increased after supplementation with vitamin E. However, nitrite and iNOS levels in blood and synovial fluid were not statistically significant. These data showed 3-nitrotyrosine in synovial tissue of KOA patients. Therefore, vitamin E supplementation provided positive outcome of blood and synovial fluid in antioxidant status. These results supported a beneficial effect of vitamin E in the degenerative process of osteoarthritis.

Department : Biochemistry Student's Signature .....
Field of Study : Medical Biochemistry Advisor's Signature .....
Academic Year : 2011 Co-advisor's Signature .....
Co-advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหลายฝ่าย

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ อารี ตนาวลี และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริชัย อดิศักดิ์ วัฒนาอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ช่วยเหลือในทุกขั้นตอนของการทำวิทยานิพนธ์ ทั้งให้คำแนะนำและคำสั่งสอน ตั้งแต่การรวบรวมข้อมูล การทดลอง การทำรูปเล่มและการนำเสนอ อย่างดียิ่งเสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ ที่ยินดีเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.สัญชัย พยุงภร และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ลินดา จุฬาโรจน์มนตรี ที่ยินดีเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ท่านอื่น ๆ ทั้งในและนอกภาควิชาชีวเคมีที่ช่วยประสิทธิ์ ประสาทวิชาความรู้ต่าง ๆ เจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ เช่น การออกจดหมาย การจัดงาน การเตรียมสถานที่ การเบิกใช้สิ่งของต่าง ๆ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์วิจัยคณะแพทยศาสตร์ และห้องปฏิบัติการภาควิชาโภชนาการและการกำหนดอาหาร คณะสหเวชศาสตร์ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ตลอดจนคำแนะนำในการใช้อุปกรณ์วิจัยอย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนสนับสนุนการวิจัย “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” จากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวสวนทวี ที่ให้การอบรมสั่งสอนด้วยความรักและให้กำลังใจในการต่อสู้กับปัญหาและอุปสรรคเสมอมา รวมถึงเพื่อน ๆ ทุกคนที่มอบแรงกายแรงใจ ให้การสนับสนุน ให้คำปรึกษาเป็นอย่างดียิ่งตลอดระยะเวลาการศึกษาและการทำวิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…… ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง…… ญ

สารบัญภาพ…….... ฎ

บทที่ 1 บทนำ…… 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา…… 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย……... 3

ขอบเขตของการวิจัย…….. 3

ข้อตกลงเบื้องต้น…… 3

ข้อจำกัดของการวิจัย……. 4

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย…… 4

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ……. 4

วิธีดำเนินการวิจัย……... 5

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย…… 6

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……. 7

โรคข้อเข่าเสื่อม…….. 7

ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (Oxidative stress)…….. 11

การศึกษาภาวะเครียดจากออกซิเดชันกับโรคข้อเข่าเสื่อม…… 12

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidat)……. 17

การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระกับโรคข้อเข่าเสื่อม…… 18

ผลของการเสริมวิตามินอี (Vitamin E supplementation) ในโรคต่าง ๆ…….. 19

Immunohistochemistry (IHC)…… 23

เอมไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซ (Enzyme-linkd immunosorbent assay, ELISA)……... 24

High performance liquid chromatography (HPLC)..... 27
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 32
ประชากร..... 32
เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย..... 34
การเก็บรวบรวมข้อมูล..... 37
การดำเนินการวิจัย..... 38
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ..... 51
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์..... 52
กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา..... 52
ผลการวิเคราะห์ระดับไนไตรต์ในเลือด..... 56
ผลการวิเคราะห์ระดับไนไตรต์ในน้ำไขข้อ..... 58
ผลการวิเคราะห์ระดับ malondialdehyde (MDA) ในเลือด..... 59
ผลการวิเคราะห์ระดับ malondialdehyde (MDA) ในน้ำไขข้อ..... 61
ผลการวิเคราะห์ระดับวิตามินอีในเลือด..... 62
ผลการวิเคราะห์ระดับวิตามินอีในน้ำไขข้อ..... 64
ผลการวิเคราะห์ระดับ Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) ในเลือด..... 65
ผลการวิเคราะห์ระดับ Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) ในน้ำไขข้อ..... 67
ผลการวิเคราะห์ระดับ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ในเลือด..... 68
ผลการวิเคราะห์ระดับ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ในน้ำไขข้อ.. 70
ผลการวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ iducible nitric oxide synthase (iNOS) ในเลือด... 71
ผลการวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ iducible nitric oxide synthase (iNOS) ในน้ำไขข้อ..... 73
การตรวจทางฮิสโตวิทยาจากการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไนโตรไทโรซีน (3-nitrotyrosine)..... 74
การตรวจทางฮิสโตวิทยาจากการย้อมด้วยฮีมาทอกไซลีนและอีโอซิน (hematoxylin and eosin)..... 75
ผลการวิเคราะห์จำนวน inflammatory cells ต่อ high power field..... 76

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... 80
สรุปผลการวิจัย..... 80
อภิปรายผล..... 84
ข้อเสนอแนะ..... 90
รายการอ้างอิง..... 91
ภาคผนวก..... 100
ภาคผนวก ก..... 101
ภาคผนวก ข..... 118
ภาคผนวก ค..... 119
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 126

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การจัดระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมตามเกณฑ์ของ Kellgren และ Lawrence…….....	10
2	การจัดระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมตามเกณฑ์ของ Ahlback……	10
3	ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่าง (mean ± S.E.M.)……	55
4	ผลการวิเคราะห์จำนวน inflammatory cells ต่อ high power field (mean ± S.E.M.)…….....	78

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	พยาธิสภาพภายในข้อเข่าของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม…….	8
2	พยาธิกำเนิดของโรคข้อเข่าเสื่อม (pathogenesis of osteoarthritis)……..…	9
3	กลไกการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน……...	12
4	การสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์..……...	14
5	Inflammatory mediators ที่สร้างจากกระดูกอ่อนและน้ำไขข้อ……..…...	15
6	สารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์……..	17
7	โครงสร้างของวิตามินอี……...	20
8	กลไกการทำงานของวิตามินอีในการลดการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase……...	22
9	หลักการ immunohistochemistry (IHC)…….	24
10	หลักการ indirect ELISA……...	25
11	หลักการ sandwich ELISA……...	26
12	หลักการ competitive ELISA……...	27
13	เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)……	28
14	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ mobile phase ชนิดต่างๆ……..	29
15	โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานภายนอกวิตามินอี (RT = 9.5 นาที) และโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานภายในวิตามินอี อะซีเตต (RT = 13.7 นาที)..……	31
16	วิธีการเก็บตัวอย่าง……	39
17	หลักการตรวจตวัดไนไตรต์……	39
18	การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐานไนไตรต์……	40
19	หลักการตรวจวัด malondialdehyde (MDA)……	41
20	การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน malondialdehyde……..	41
21	การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี……	43
22	หลักการตรวจวัด trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)……...	44
23	การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน trolox……..	45

24	หลักการการตรวจวัด ferric reducing antioxidant power (FRAP)……	46
ภาพที่		หน้า
25	การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน $FeSO_4$……..	47
26	การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน iNOS……	48
27	แผนภูมิแท่งแสดงระดับไนไตรต์ในเลือด……	57
28	แผนภูมิแท่งแสดงระดับไนไตรต์ในน้ำไขข้อ……	58
29	แผนภูมิแท่งแสดงระดับ malondialdehyde (MDA) ในเลือด……...	60
30	แผนภูมิแท่งแสดงระดับ malondialdehyde (MDA) ในน้ำไขข้อ……..	61
31	แผนภูมิแท่งแสดงระดับวิตามินอีในเลือด……..	63
32	แผนภูมิแท่งแสดงระดับวิตามินอีในน้ำไขข้อ……..	64
33	แผนภูมิแท่งแสดงระดับ trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) ในเลือด…….	66
34	แผนภูมิแท่งแสดงระดับ trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) ในน้ำไขข้อ……..	67
35	แผนภูมิแท่งแสดงระดับ ferric reducing antioxidant power (FRAP) ในเลือด..	69
36	แผนภูมิแท่งแสดงระดับ ferric reducing antioxidant power (FRAP) ในน้ำไขข้อ……..	70
37	แผนภูมิแท่งแสดงระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ในเลือด…….....	72
38	แผนภูมิแท่งแสดงระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ในน้ำไขข้อ……..	73
39	ภาพการย้อม 3-nitrotyrosine ในเยื่อหุ้มข้อ……..	74
40	ภาพการย้อม hemotoxylin and eosin (H&E) ในเยื่อหุ้มข้อ……	75
41	ภาพแสดงลักษณะ inflammatory cells ในเยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่กำลังขยาย 40X……..	77
42	แผนภูมิแท่งแสดง inflammatory cells ต่อ high power field ในเยื่อหุ้มข้อ……	79

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคข้อเข่าเสื่อม (knee osteoarthritis, KOA) เป็นโรคที่เกิดจากความเสื่อมของข้อเข่าทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการเจ็บปวดอย่างเรื้อรังและอาจสูญเสียการทำงานของข้อเข่า ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการทำให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยด้อยลงจนไม่สามารถดำเนินชีวิตได้ตามปกติ การเกิดโรคสัมพันธ์กับภาวะอ้วนและผู้สูงอายุ จากรายงานพบว่าร้อยละ 9.6 ของเพศชายและร้อยละ 18 ของเพศหญิงทั่วโลกที่มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 60 ปีมีอาการแสดงของโรคข้อเข่าเสื่อมและมีแนวโน้มที่การเกิดโรคจะเพิ่มสูงขึ้นในผู้ที่มีอายุน้อย [1, 2] ซึ่งสอดคล้องกับอุบัติการณ์ของโรคข้อเข่าเสื่อมที่พบในประเทศไทย ที่พบว่าร้อยละ 35-46 ของคนไทยที่อายุมากกว่า 60 ปี ป่วยเป็นโรคข้อเข่าเสื่อม [3] ดังนั้นการรักษาโรคดังกล่าวจึงเป็นสิ่งจำเป็น ถึงแม้ว่าจะไม่สามารถทำให้ผู้ป่วยกลับสู่ภาวะปกติได้ แต่การรักษานั้นจะช่วยในการบรรเทาอาการเจ็บปวด ลดปัญหาเรื่องข้อติดหรือข้อโก่งงอได้ ซึ่งทำให้ต้องเสียค่ารักษาพยาบาลเป็นจำนวนมากในการดูแลรักษาเพื่อให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น

การรักษาผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมในปัจจุบันนั้น นิยมใช้ยาแก้ปวดเพื่อช่วยบรรเทาอาการ ทำให้ผู้ป่วยได้รับยาแก้ปวดเป็นระยะเวลานานซึ่งมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์หลายอย่าง [4] และหากผู้ป่วยมีอาการรุนแรงหรือข้อเข่าโก่งพิการมาก จำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัด วิธีการรักษาที่ได้รับความนิยมในปัจจุบันคือ การผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม

ในปัจจุบันสาเหตุของการเกิดข้อเข่าเสื่อมยังไม่ทราบแน่ชัด จากการศึกษาพบว่าเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายประการ เช่น ปัจจัยทางพันธุกรรม ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม และปัจจัยเชิงกล เป็นต้น ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อมนั้นเกี่ยวกับการเกิดอนุมูลอิสระ โดยสารอนุมูลอิสระมีบทบาทในการควบคุมการทำงานของเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocytes) เช่น การกระตุ้นเซลล์ การเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์และการปรับแต่งเนื้อพื้นกระดูกและกระดูกอ่อน (bone matrix) [5] หากเกิดความไม่สมดุลระหว่างสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ หรือภาวะเครียดจากออกซิเดชันซึ่งเป็นภาวะที่สารอนุมูลอิสระมีมากว่าสารต้านอนุมูลอิสระอาจก่อให้เกิดผลเสียต่อโครงสร้างและการทำหน้าที่ของเซลล์กระดูกอ่อน เช่น การตายของเซลล์ การสลายตัวของเนื้อพื้นกระดูกและกระดูกอ่อนโดยเฉพาะอย่างยิ่งไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) ซึ่งถูกสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส (nitric oxide synthase, NOS)

ในเซลล์กระดูกอ่อนจากการกระตุ้นของไซโตไคน์ (cytokines) ทำให้ได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

จากการศึกษาของ Karan และคณะ ในปี ค.ศ.2003 พบว่าระดับไนเตรต (nitrate) และไนไตรต์ (nitrite) ในพลาสมา (plasma) และน้ำไขข้อ (synovial fluid) ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$) [6] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ersoy และคณะ ในปี ค.ศ.2002 ที่พบว่าระดับไนเตรตและไนไตรต์ในซีรั่มของผู้ป่วยโรครูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis, RA) โรคข้อเข่าเสื่อม และโรคข้อสันหลังอักเสบชนิดยึดติด (ankylosing spondylitis, AS) สูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$) [7] จากผลการศึกษาจึงสนับสนุนสมมติฐานที่ว่าไนตริกออกไซด์เป็นปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์กระดูกอ่อนที่เกิดขึ้นภายในข้อเข่าของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมซึ่งทำให้เกิดรอยโรคที่รุนแรงขึ้น

การเกิดความไม่สมดุลระหว่างสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระทำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ดังนั้นจึงได้มีความพยายามเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายเพื่อลดความรุนแรงของภาวะเครียดจากออกซิเดชันซึ่งสามารถก่อให้เกิดความเสียหายต่อสารชีวโมเลกุลทั้งต่อคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิกในร่างกายได้ โดยทำการเสริมสารอาหารจำพวกวิตามินที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินอี (alpha-tocopherol) และวิตามินซี (ascorbic acid) เป็นต้น จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง และการศึกษาทางคลินิกในมนุษย์สนับสนุนบทบาทของวิตามินอีในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระช่วยในการเจริญของเซลล์กระดูกอ่อนและสามารถลดความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมได้ [8, 9] แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีงานวิจัยที่ยืนยันแน่ชัดว่าการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันและชะลอการถูกทำลายของเซลล์กระดูกอ่อนในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม [5]

ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงศึกษาผลจากการเสริมวิตามินอี ขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิต เป็นระยะเวลา 2 เดือนในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม แล้วทำการตรวจวิเคราะห์ระดับผลิตภัณฑ์อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วย และปริมาณเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ในเลือดและน้ำไขข้อเพื่อศึกษาผลของการเสริมวิตามินอีในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาตรวจวัดระดับผลิตภัณฑ์อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม
2. เพื่อศึกษาผลของวิตามินอีต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม
3. เพื่อศึกษาผลของวิตามินอีต่อระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

ขอบเขตของการวิจัย

1. ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการรักษาจากฝ่ายออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ซึ่งยินยอมเข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจตลอดระยะเวลาของการศึกษาวิจัย
2. กลุ่มควบคุม (control) เป็นอาสาสมัครคนปกติที่ไม่มีประวัติโรคข้อเข่าเสื่อม และโรคเรื้อรังต่าง ๆ ที่มีอายุและเพศใกล้เคียงกับผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม ซึ่งมารับการตรวจสุขภาพประจำปี

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. เครื่องมือ อุปกรณ์ และชุดการทดสอบต่างๆ ที่ใช้ในการวิจัย ต้องผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำของการทดสอบเครื่องมือ อุปกรณ์ และชุดการทดสอบนั้น ๆ
2. ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยเป็นผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่เตรียมมารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม จากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี
3. ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยให้ความร่วมมือด้วยความเต็มใจตลอดระยะเวลาการศึกษาวิจัย และมีการลงลายมือชื่อในใบยินยอม (informed consent) ด้วยความสมัครใจ ภายหลังจากที่ได้รับการชี้แจงให้ทราบขั้นตอนและข้อมูลต่าง ๆ เกี่ยวกับการวิจัยซึ่งรวมถึงความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น

ข้อจำกัดของการวิจัย

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ใช้สิ่งตัวอย่างจากมนุษย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำไขข้อ ซึ่งยากในการเก็บจากกลุ่มคนปกติและผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้ทำการผ่าตัด เปลี่ยนข้อเข่า

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) – เป็นภาวะที่เกิดความไม่สมดุลระหว่างสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ โดยมีระดับของสารอนุมูลอิสระสูงกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ สารอนุมูลอิสระสามารถทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุล เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก ทำให้สูญเสียหน้าที่การทำงานหรือถูกทำลายส่งผลให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บ (cell injury) และถูกทำลาย (cell damage) ตามมา

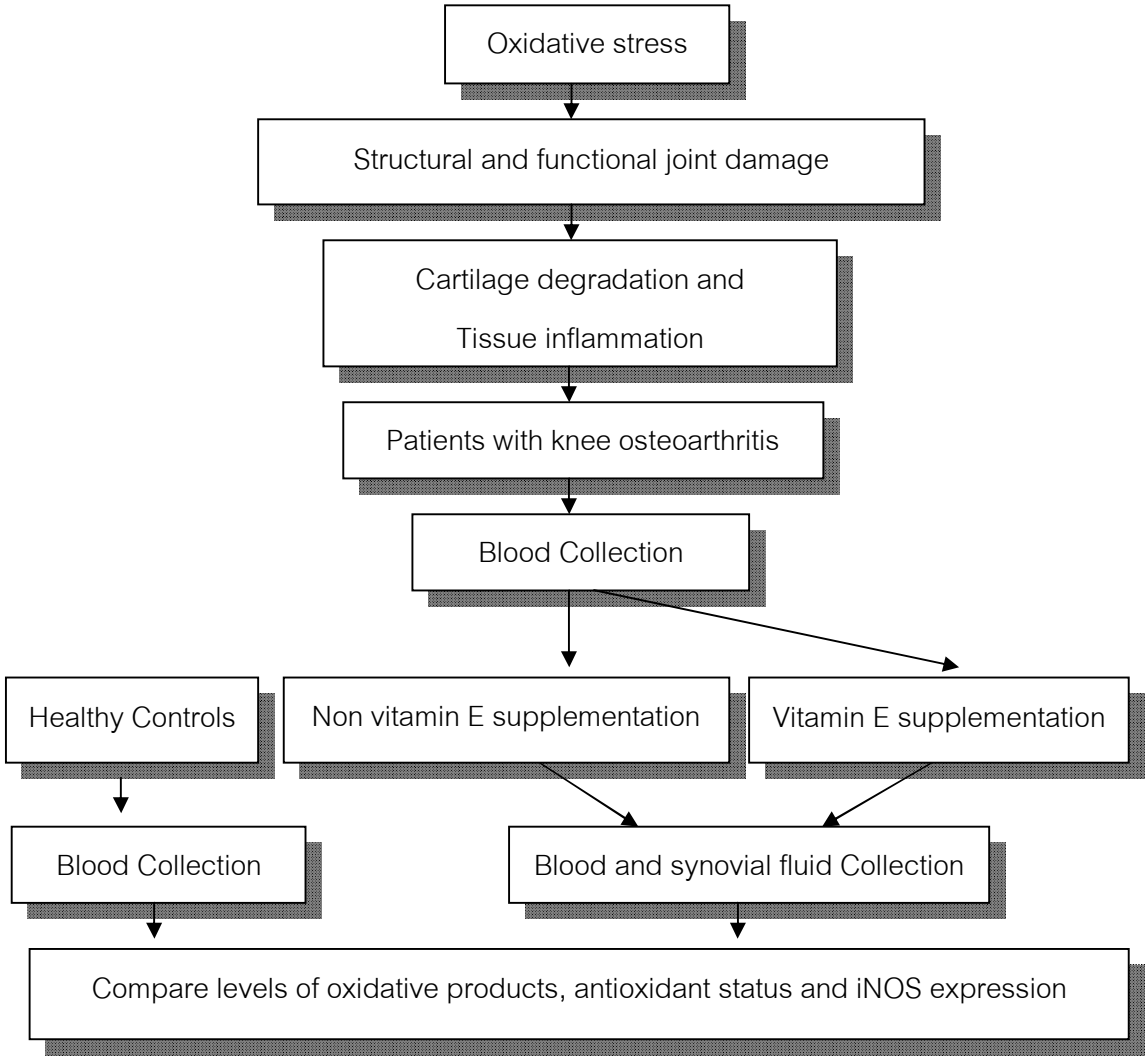
เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซ (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) – เป็นวิธีการตรวจหาโปรตีนที่สนใจ โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน (antigen) และแอนติบอดี (antibody) โดยการติดฉลากแอนติเจนหรือแอนติบอดีด้วยเอนไซม์ เอนไซม์ที่นิยมได้แก่ horseradish peroxidase และ alkaline phosphatase เอนไซม์หนึ่งโมเลกุลนั้นสามารถเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นได้หลายโมเลกุลจึงช่วยขยายความสามารถในการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดขึ้น

High performance liquid chromatography (HPLC) - เป็นเครื่องมือใช้สำหรับวิเคราะห์แยกชนิดสารประกอบและหาปริมาณสารในสิ่งตัวอย่างในสภาวะของเหลว กระบวนการแยกสารประกอบนั้นจะเกิดขึ้นโดยอาศัยการเคลื่อนผ่าน 2 วัฏภาค (phase) คือ วัฏภาคนิ่ง (stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถทราบระดับผลิตภัณฑ์อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระในเลือดของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มคนปกติ
2. ทราบความสัมพันธ์ของการเสริมวิตามินอีต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันและระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม
3. อาจพิจารณานำวิตามินอีไปใช้ในการเสริมรักษาผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

วิธีดำเนินการวิจัย



ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. ยื่นเสนอโครงร่างวิทยานิพนธ์ต่อคณะกรรมการวิทยานิพนธ์ และคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. แสดงเอกสารข้อมูลโครงการวิจัยและเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยให้แก่อาสาสมัครโครงการวิจัย
3. ดำเนินการเก็บตัวอย่างเลือด และน้ำไขข้อ จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ลงชื่อยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย และเก็บตัวอย่างเลือดจากคนปกติที่มีสุขภาพดีซึ่งลงชื่อยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย
4. ตรวจวิเคราะห์ระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในสิ่งตัวอย่าง
5. วิเคราะห์และสรุปผลการวิจัย เขียนรายงานผลการวิจัย
6. จัดทำบทความวิจัยและโปสเตอร์จากบางส่วนของวิทยานิพนธ์ เพื่อตีพิมพ์และนำเสนอผลงานวิจัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

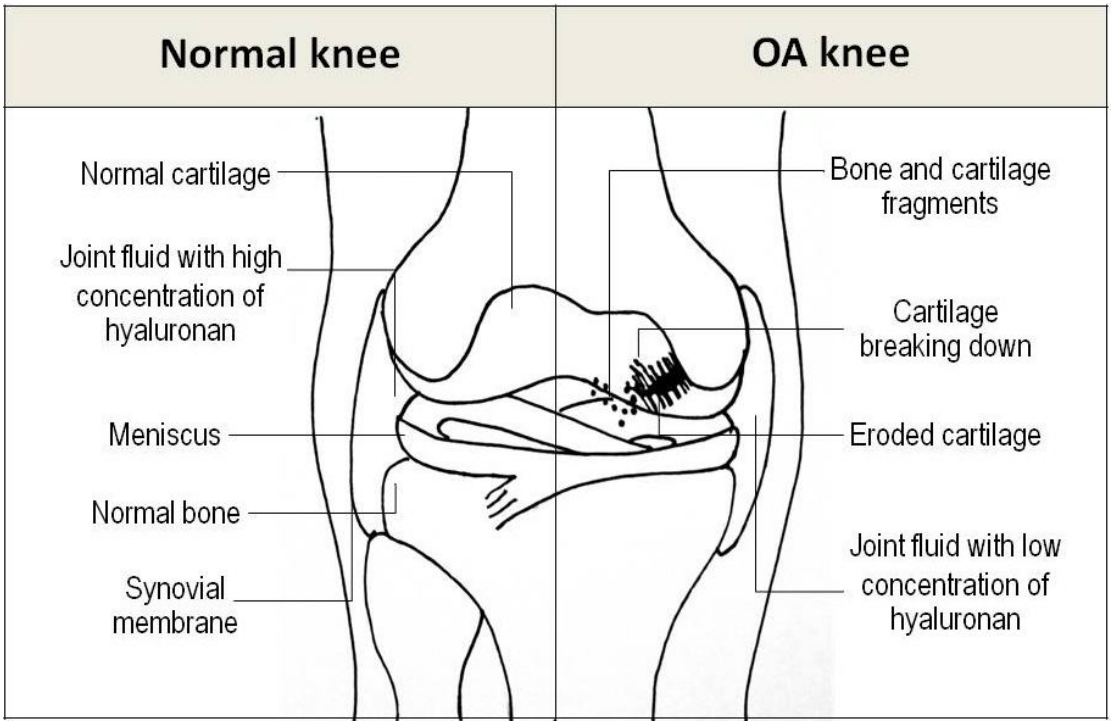
แนวคิดและทฤษฎี

โรคข้อเข่าเสื่อม (Knee Osteoarthritis)

โรคข้อเข่าเสื่อม (knee osteoarthritis, KOA) เป็นโรคที่เกิดจากการเสื่อมสภาพของกระดูกอ่อนผิวข้อ (articular cartilage) ทำให้เกิดการสูญเสียกระดูกอ่อนผิวข้ออย่างต่อเนื่อง เซลล์กระดูกอ่อน (chondrocytes) ในข้อไม่สามารถสังเคราะห์เส้นใยคอลลาเจน (collagen) สาร proteoglycan และเอนไซม์ proteinases ให้อยู่ในภาวะสมดุล ทำให้ไม่สามารถสร้างเนื้อพื้นที่มีคุณภาพดี ร่วมกับมีการหนาตัวของเนื้อกระดูกที่อยู่ใต้ผิวข้อ (subchondral bone) จึงทำให้ไม่สามารถทนแรงต้านทานหรือรองรับน้ำหนักได้ตามปกติ และมีการสูญเสียคุณสมบัติของน้ำไขข้อ จึงเพิ่มการเสียดสีระหว่างการเคลื่อนไหวจนเกิดการเสื่อมของกระดูกอ่อนผิวข้อที่รุนแรงขึ้น เมื่อเกิดภาวะข้อเข่าเสื่อมกระดูกอ่อนผิวข้อบางลง ผิวขรุขระ และอาจมีกระดูกงอกขอบข้อ (osteophytes) บริเวณขอบหรือมุมข้อ ดังภาพที่ 1 การอักเสบบริเวณข้อเข่ากระตุ้นให้มีการสร้างน้ำไขข้อเพิ่มขึ้นส่งผลให้ข้อเข่าและเอ็นรอบข้อมีขนาดใหญ่ขึ้น เกิดการเสียสมดุลระหว่างการสังเคราะห์และการทำลายสารเนื้อพื้นนอกเซลล์ (extracellular matrix) การสร้างเอนไซม์ proteinases ส่งผลทำลายเส้นใยคอลลาเจนและ aggrecans ร่วมกับการลดการสังเคราะห์สารที่ไปหยุดยั้งเอนไซม์ proteinases ที่เรียกว่า tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMPs) การทำงานของเซลล์กระดูกอ่อนที่ผิดปกติไปนั้น เกิดจากการกระตุ้นของไซโตไคน์ (cytokines) และ lipid mediators เช่น prostaglandins ไนตริกออกไซด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และ fibronectin fragment การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวดำเนินไปอย่างช้าๆ [10, 11] ดังภาพที่ 2 ในรายที่มีความรุนแรงมากกระดูกอ่อนผิวข้ออาจบางจนปลายกระดูกชนกันเกิดเสียงเสียดสีเวลาขยับข้อ

ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ได้แก่ อายุ เพศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเพศหญิงนั้นมีโอกาสเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมมากกว่าเพศชายประมาณสองเท่า เนื่องจากความแข็งแรงของกระดูกและกล้ามเนื้อในเพศหญิงนั้นน้อยกว่าเพศชาย น้ำหนักตัวโดยพบว่าผู้ที่มีน้ำหนักเกินและผู้ที่มีภาวะอ้วนจะทำให้ข้อเข่าเสื่อมได้เร็วขึ้น เชื้อชาติ การได้รับบาดเจ็บที่บริเวณข้อเข่า การใช้ข้อเข่ามากเกินไป กิจกรรมในชีวิตประจำวันก็ส่งผลต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

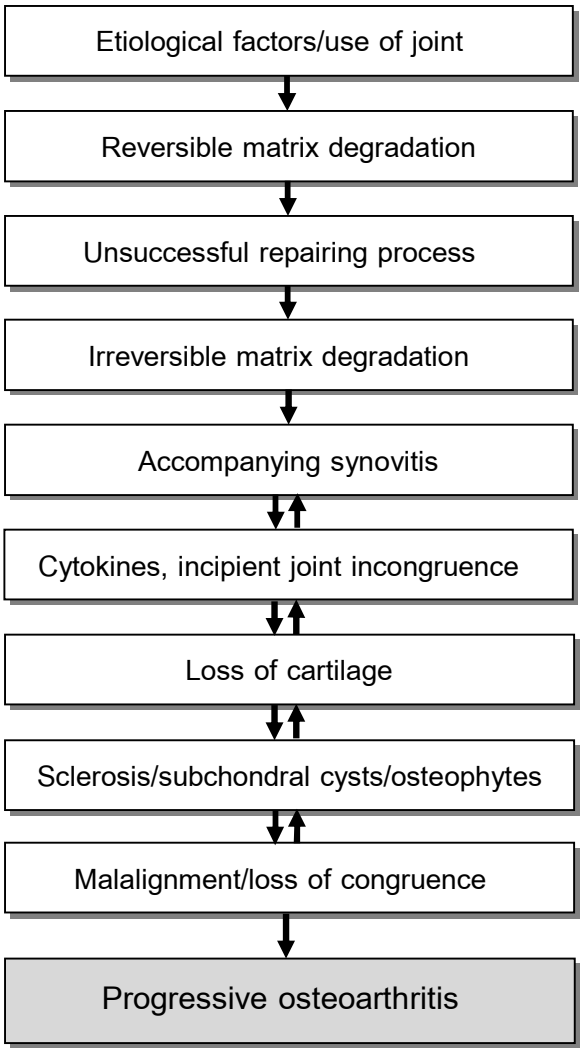
เช่น การนั่งยองๆ หรือนั่งขัดสมาธิเป็นประจำ การขาดการออกกำลังกาย และการรับประทานอาหารที่มากเกินไปจนทำให้เกิดภาวะอ้วน



ภาพที่ 1 พยาธิสภาพภายในข้อเข่าของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม [12]

ลักษณะของโรคข้อเข่าเสื่อม แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ข้อเข่าเสื่อมชนิดปฐมภูมิหรือชนิดที่ไม่ทราบสาเหตุ (primary osteoarthritis/idiopathic) เป็นภาวะที่ข้อเข่าเกิดความผิดปกติเนื่องจากสภาพร่างกายเปลี่ยนแปลงแบบถดถอยสัมพันธ์กับอายุที่เพิ่มมากขึ้นของผู้ป่วย และข้อเข่าเสื่อมชนิดทุติยภูมิหรือชนิดที่ทราบสาเหตุ (secondary osteoarthritis) เป็นภาวะที่ข้อเข่าเกิดความผิดปกติเนื่องจากมีการอักเสบของข้อเข่ามาก่อน เช่น การติดเชื้อ การบาดเจ็บหลังผ่าตัด โรคเกี่ยวกับต่อมไร้ท่อ กระดูกหัก เป็นต้น ซึ่งส่งผลให้กระดูกอ่อนผิวข้อเกิดความเสื่อมตามมา [4]

อาการที่สำคัญของโรคข้อเข่าเสื่อม ได้แก่ อาการปวดเข่าซึ่งเป็นอาการแรกเริ่ม โดยมีอาการปวดทั้งด้านหน้าและด้านหลังของข้อเข่า เมื่อเป็นมากขึ้นจะปวดเมื่อมีการเคลื่อนไหวข้อเข่า ลุกนั่งหรือเดินขึ้นบันได มีเสียงลั่นในข้อเข่าหรือเสียงเสียดสีกรอบแกรบในข้อเข่า อาการบวมจากการที่ข้อเข่าเกิดการอักเสบ ข้อเข่าโก่งงอโดยอาจโก่งออกนอกซึ่งพบได้มากกว่าโก่งเข้าในทำให้เดินได้ลำบากไม่สามารถเหยียดหรืองอขาได้สุดเหมือนเดิม



ภาพที่ 2 พยาธิกำเนิดของโรคข้อเข่าเสื่อม (pathogenesis of osteoarthritis) [4]

การวินิจฉัยโรคข้อเข่าเสื่อม แพทย์จะทำการซักประวัติการเจ็บป่วยและตรวจร่างกายโดยทำการตรวจบริเวณข้อเข่า ซึ่งลักษณะที่สำคัญของโรคข้อเข่าเสื่อม คือ ข้อบวมหรือขนาดของข้อเข่าใหญ่และมีการโก่งงอของข้อเข่า เมื่อทำการถ่ายภาพรังสีเอ็กซเรย์จะพบว่ามีช่องข้อแคบลง เนื่องจากกระดูกอ่อนผิวข้อถูกทำลาย พบกระดูกงอกขอบข้อ เป็นต้น สำหรับการตรวจวัดตัวบ่งชี้ทางชีวเคมี (biochemical marker) ของโรคข้อเข่าเสื่อมยังอยู่ระหว่างการศึกษาวิจัย โดยได้มีการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน osteopontin [13] โปรตีน bone morphogenetic protein-7 [14] และโปรตีน endoglin [15] เป็นต้น

เกณฑ์ในการจัดระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมอาศัยหลักเกณฑ์ของ Kellgren และ Lawrence ซึ่งพิจารณาจากภาพถ่ายรังสีเอ็กซเรย์บริเวณข้อเข่า แบ่งออกเป็น 5 ระดับ [16] แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การจัดระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมตามเกณฑ์ของ Kellgren และ Lawrence

Grade	**ลักษณะภาพถ่ายรังสี**
0	ไม่ปรากฏลักษณะข้อเข่าเสื่อม
1	มีปุ่มกระดูกงอกไม่ชัดเจน ซึ่งมีนัยสำคัญทางคลินิกน้อย
2	มีปุ่มกระดูกงอกชัดเจน แต่ช่องข้อยังไม่ผิดปกติ
3	มีปุ่มกระดูกงอกชัดเจน และช่องข้อแคบลงปานกลาง
4	มีปุ่มกระดูกงอกชัดเจน ร่วมกับช่องข้อแคบลงรุนแรงและมีเนื้อกระดูกใต้กระดูกอ่อนกระด้าง

นอกจากนี้ยังมีการจัดระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมตามหลักเกณฑ์ของ Ahlback ซึ่งแบ่งออกเป็น 5 ระดับ [17] แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การจัดระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมตามเกณฑ์ของ Ahlback

Grade	**ลักษณะภาพถ่ายรังสี**
1	ช่องข้อแคบลงน้อยกว่า 5 มิลลิเมตร
2	ช่องข้อแคบจนชิดติดกัน
3	มีกระดูกผิวข้อบางส่วนสบกัน
4	มีกระดูกผิวข้อสบกัน 5-10 มิลลิเมตร
5	มีกระดูกผิวข้อสบกันมากกว่า 10 มิลลิเมตร

การรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม ทำการรักษาโดยพิจารณาระดับความรุนแรงของโรค ในรายที่อาการไม่รุนแรงสามารถทำการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมโดยไม่ใช้ยา (nonpharmacologic therapy) ซึ่งได้แก่ การให้ความรู้เกี่ยวกับโรคข้อเข่าเสื่อม การลดน้ำหนักตัว การออกกำลังกายที่เหมาะสม โดยวิธีนี้สามารถชะลอการดำเนินของโรคได้ และหากอาการของโรคข้อเข่าเสื่อมมีความรุนแรงมากขึ้นควรได้รับการรักษาโดยการใช้ยา (systemic pharmacologic therapy) เช่น ยา acetaminophen ยาในกลุ่มที่ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบที่มิใช่ สเตียรอยด์ (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) ยา COX-2 inhibitors เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์อาหารเสริม เช่น กลูโคซามีน และคอนดรอยตินซัลเฟต แต่สารดังกล่าวไม่มีหลักฐานแน่ชัดถึงประสิทธิภาพในการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม และการรักษาโดยการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม ซึ่งสามารถลดความเจ็บปวดและเพิ่มคุณภาพชีวิตให้กับผู้ป่วยได้เป็นอย่างมาก [4]

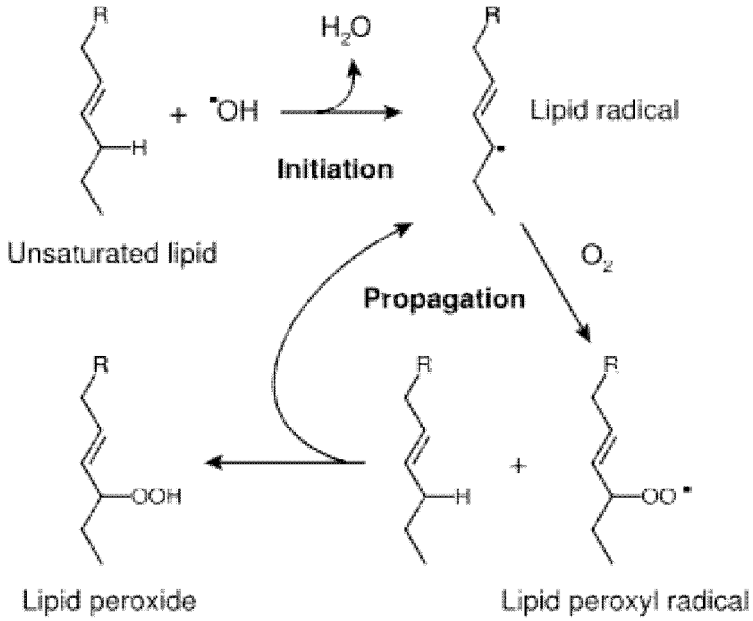
ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (Oxidative stress)

เซลล์ในภาวะปกติจะอาศัยกระบวนการสร้างพลังงานจากสารอาหารที่บริโภคโดยใช้ออกซิเจน ทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระ (oxidants) ที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) เช่น superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2) เป็นต้น และสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่เป็นอนุพันธ์ของไนโตรเจน (reactive nitrogen species, RNS) เช่น เปอร์ออกซิไนไตรต์ (peroxynitrite, $ONOO^-$) ซึ่งทั้งสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจนและไนโตรเจนเป็นอันตรายต่อสารชีวโมเลกุลทั้งคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน กรดนิวคลีอิก และยังเป็นอันตรายต่อเซลล์ด้วย โดยสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจนและไนโตรเจนไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุล ทำให้สารชีวโมเลกุลกลายเป็นอนุมูลอิสระพร้อมที่จะเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องไปเรื่อย ๆ กับโมเลกุลข้างเคียง (chain reaction) ส่งผลให้สารชีวโมเลกุลสูญเสียหน้าที่การทำงานและแตกสลายไปจนทำให้เกิดความเสื่อมหรือการตายของเซลล์ในที่สุด แต่อย่างไรก็ตามในภาวะปกติร่างกายมีกลไกที่จะทำลายหรือยับยั้งความเป็นพิษของสารอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับที่ไม่เกิดโทษต่อร่างกาย โดยอาศัยการทำหน้าที่ของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) เช่น กลูตาไทโอน (glutathione) วิตามินอี วิตามินซี เบต้าแคโรทีน เป็นต้น ในภาวะที่เกิดความเสื่อมของเซลล์ หน้าที่ในการป้องกันหรือยับยั้งของสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้จะเสียไป ทำให้มีสารอนุมูลอิสระมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ ส่งผลให้เกิดอันตรายต่อสารต่าง ๆ ภายในเซลล์ โดยสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์จะถูกออกซิไดซ์กลายเป็น

ผลิตภัณฑ์ออกซิเดชัน (oxidative damage product) เช่น malondialdehyde (MDA) จากปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) และ protein carbonyl จากโปรตีน เป็นต้น ซึ่งเรียกภาวะนี้ว่า ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน โดยพบว่าภาวะนี้เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญของการเกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคเบาหวาน โรคไต รวมทั้งโรคข้อเข่าเสื่อมด้วย

การศึกษาภาวะเครียดจากออกซิเดชันกับโรคข้อเข่าเสื่อม

ลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (Lipid peroxidation, LPO)



ภาพที่ 3 กลไกการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน [18]

ลิปิดเปอร์ออกซิเดชันเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเมื่อไขมันทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจน ดังภาพที่ 3 ซึ่งถูกสร้างระหว่างการเกิดเมแทบอลิซึมของเซลล์หรือภายใต้การกระตุ้นของภาวะเครียดจากออกซิเดชัน เช่น ไซโตไคน์ รังสีอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) เป็นต้น เมื่อ polyunsaturated fatty acid (PUFA) บริเวณผนังเซลล์ถูกทำลายด้วยสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจนและเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยเกิดการสร้างเป็น reactive lipid aldehydes หรือ malondialdehyde ซึ่งสามารถเกิดการแพร่จากจุดเริ่มต้นไปสร้างความเสียหายต่อเซลล์ได้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้เกิด

ความเสียหายอย่างรุนแรงต่อกรดนิวคลีอิกและโปรตีน ทำให้หน้าที่การทำงานเปลี่ยนไปและก่อให้เกิดการสูญเสียโครงสร้างต่างๆของเซลล์ได้ ดังนั้นเมื่อเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันระดับของ malondialdehyde จึงเพิ่มสูงขึ้นและสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันภายในเซลล์ได้ โดยจากการศึกษาของ Surapaneni และคณะ ในปี ค.ศ.2007 พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของระดับ malondialdehyde และการลดลงของระดับกลูตาไทโอน วิตามินซี วิตามินอี และการทำงานของเอนไซม์ catalase (CAT) ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทำให้สนับสนุนว่ามีการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม [19] แต่การศึกษาของ Ostalowska และคณะ ในปี ค.ศ.2006 ได้ทำการวัดระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน และ antioxidant enzyme ในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมชนิดปฐมภูมิและทุติยภูมิ กลับไม่พบความแตกต่างของระดับ malondialdehyde ในน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากการศึกษานี้ทำให้ทราบถึงภาวะของสารต้านอนุมูลอิสระที่ผิดปกติในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและการเพิ่มความหนืดของน้ำไขข้อในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม [20]

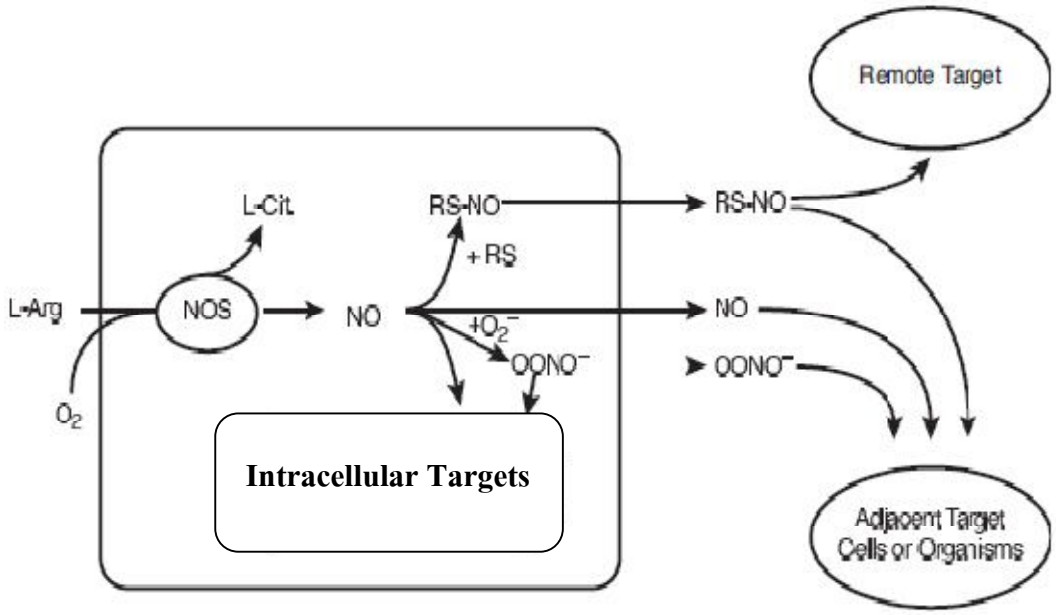
โปรตีนคาร์บอนิล (Protein carbonyl)

การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนเป็นการปรับเปลี่ยนโครงสร้างแบบโควาเลนต์โดยเกิดทั้งทางตรงจากการทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจนหรือทางอ้อมโดยทำปฏิกิริยากับ secondary by-products ของภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ซึ่งการเกิด protein oxidative modification นี้มีรูปแบบที่หลากหลายมากภายในเซลล์ โดยผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนที่พบได้บ่อยในสิ่งตัวอย่างทางชีววิทยา คือ กลุ่มอนุพันธ์โปรตีนคาร์บอนิลของกรดอะมิโน proline arginine และ lysine เป็นต้น ซึ่งอนุพันธ์เหล่านี้มีความเสถียรและสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงภาวะเครียดจากออกซิเดชันที่เกิดจากสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจนภายในเซลล์ได้ [21] และพบว่าระดับของโปรตีนคาร์บอนิลที่สูงขึ้นนั้นสัมพันธ์กับผู้ป่วยโรคมะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด และโรคที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ [22]

ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide, NO)

ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) และสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่เป็นอนุพันธ์ของไนโตรเจนมีความสามารถจับกับ heme iron หรือ thiol group superoxide anions ($O_2^{\cdot-}$) และโมเลกุลของออกซิเจนได้สูง เนื่องจากไนตริกออกไซด์สามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลเป้าหมายได้อย่างรวดเร็วจึงมีค่าครึ่งชีวิต (half-life) สั้นเป็นวินาที [23]

ไนตริกออกไซด์ถูกสังเคราะห์โดยกระบวนการออกซิเดชันของ L-argininge โดยอาศัยเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส (nitric oxide synthase, NOS) ดังภาพที่ 4 ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวมี 3 ไอโซฟอร์ม ได้แก่ endothelial nitric oxide synthase (eNOS), neuronal nitric oxide synthase (nNOS) เอนไซม์ทั้งสองเป็น constitutive NOS form โดยพบว่ามีการแสดงออกที่บริเวณเซลล์บุผิวและเซลล์สมองตามลำดับ และ inducible nitric oxide synthase (iNOS) เป็น inducible NOS form มีการแสดงออกที่บริเวณเซลล์กระดูกอ่อน เซลล์เยื่อบุข้อ (synoviocytes) เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ เป็นต้น

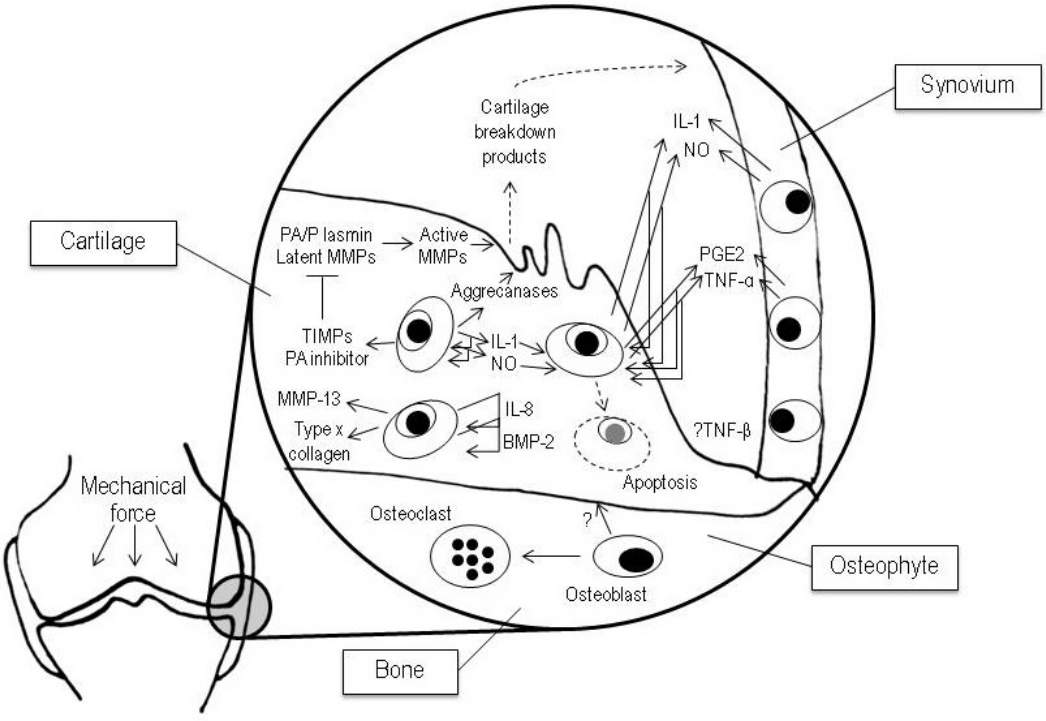


ภาพที่ 4 การสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์ [24]

ระดับไนตริกออกไซด์ที่สร้างจาก constitutive NOS form นั้นพบปริมาณอยู่ในระหว่างนาโนโมลาร์ (nM) ถึงพิโคโมลาร์ (pM) ในขณะที่ระดับไนตริกออกไซด์ที่สร้างจาก inducible form พบอยู่ในระหว่างนาโนโมลาร์ (nM) ถึงไมโครโมลาร์ (μM) [25] โดยไอโซฟอร์มที่เกี่ยวข้องกับโรคข้อเข่าเสื่อมคือ inducible nitric oxide synthase (iNOS) และในปี ค.ศ. 2004 Calvisi และคณะ ได้ศึกษาบทบาทของวิตามินอีต่อการแสดงออกของยีน iNOS และ

NADPH oxidase ใน c-Myc/TGF-α transgenic mouse ซึ่งเป็นแบบจำลองของโรคมะเร็งตับ พบว่าวิตามินอีมีบทบาทในการลดการแสดงออกของยีน iNOS และ NADPH oxidase ซึ่งทั้งสองยีนนี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจนในหนูทดลอง [26] นอกจากนี้ในปี ค.ศ.2005 Cipollone และคณะ ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการลดการแสดงออกของยีน BCL-2 ใน circulating mononuclear cell และผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1 (type I diabetes mellitus) ซึ่งเริ่มมีพยาธิสภาพที่ไต พบว่าการแสดงออกของยีน BCL-2 สัมพันธ์กับการเพิ่มการแสดงออกของ NF-kB และ iNOS รูปแบบการแสดงออกนี้สามารถทำให้กลับสู่ภาวะปกติด้วยวิตามินอี ทั้งในเซลล์ทดลอง (*in vivo*) และสัตว์ทดลอง (*in* vitro) [27] ดังนั้นวิตามินอีจึงอาจมีบทบาทต่อการแสดงออกของยีน iNOS ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมด้วย

ไนตริกออกไซด์สามารถทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณโดยผ่านผนังเซลล์ได้อย่างอิสระเนื่องจากโมเลกุลมีขนาดเล็กและมีประจุเป็นกลาง เมื่อเข้าไปในเซลล์จะกระตุ้น soluble guanylate cyclase (sGC) ให้ผลิต cGMP จาก GTP แล้ว cGMP จับกับโปรตีนต่าง ๆ อย่างจำเพาะ เช่น protein kinase phosphodiesterase และ cyclic nuclear ion channel ซึ่งทำให้เกิดผลทางชีวภาพตามมาอย่างมากมาย [24]



ภาพที่ 5 Inflammatory mediators ที่สร้างจากกระดูกอ่อนและน้ำไขข้อ [24]

เซลล์กระดูกอ่อนสามารถผลิต inflammatory mediator เช่น interleukin-1 (IL-1) tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), prostaglandins และไนตริกออกไซด์ ดังภาพที่ 5 โดยที่ปริมาณไนตริกออกไซด์ที่เพิ่มขึ้นนั้นเกิดหลังจากการที่ยีน iNOS ถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นทั้งจากปัจจัยทางกายภาพและทางชีวเคมี เช่น interleukin-1 beta (IL-1β) และ tumor necrosis factor-alpha โดยเฉพาะบริเวณ superficial zone [28] จากการศึกษาของ Pelletier และคณะ ในปี ค.ศ.1999 ได้แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน iNOS มีความสัมพันธ์กับโรคข้อเข่าเสื่อม โดยได้ทำการยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS ซึ่งมีผลทำให้ลด catabolic factors ต่าง ๆ เช่น interleukin-1 beta matrix metalloproteinases (MMPs) และเปอร์ออกซิไนไตรต์ เป็นต้น [29] และการศึกษาของ Salerno และคณะ ในปี ค.ศ. 2002 ที่ทำการ knockout ยีน iNOS ในหนูทดลอง พบว่าหนูทดลองดื้อต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม [30] แสดงให้เห็นว่าไนตริกออกไซด์ซึ่งสร้างจากยีน iNOS มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการสลายสารต่าง ๆ ในโรคข้อเข่าเสื่อม

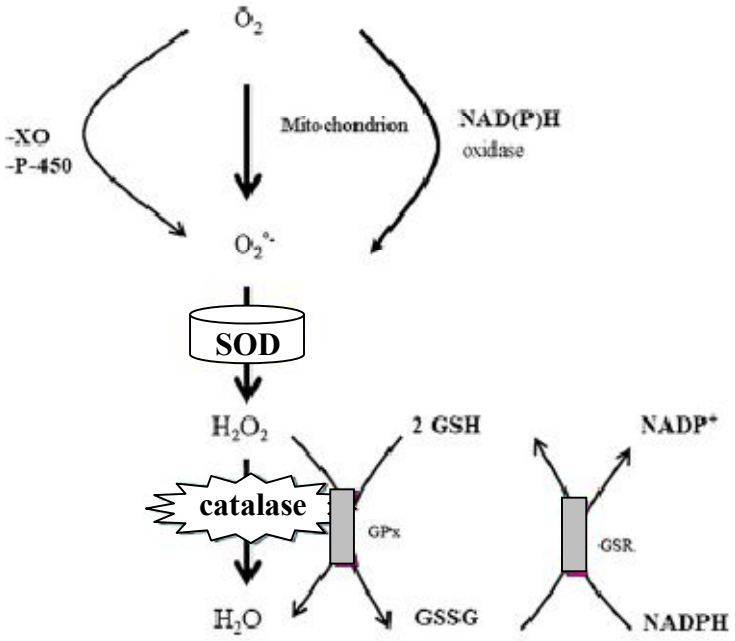
ไนตริกออกไซด์สามารถทำปฏิกิริยารวมกับ superoxide anions (O_2^-) เกิดเป็นเปอร์ออกซิไนไตรต์ซึ่งเป็นสารที่มีบทบาทในการเป็น proinflammatory และ proapoptosis ภายในเซลล์กระดูกอ่อน การศึกษาของ Whiteman และคณะ ในปี ค.ศ.2004 พบว่าเปอร์ออกซิไนไตรต์สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติของไมโทคอนเดียที่ต้องอาศัยแคลเซียมในการเหนี่ยวนำ caspase ให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์กระดูกอ่อน การศึกษานี้จึงสนับสนุนบทบาทของไนตริกออกไซด์ในการทำให้เกิดการสลายสารต่าง ๆ ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม แต่อย่างไรก็ตามไนตริกออกไซด์ยังแสดงบทบาทในการยับยั้งการสร้าง prostaglandin [31] การยับยั้ง nuclear factor–kappa B (NF- kB) [32] และการเพิ่มการสังเคราะห์สารคอลลาเจน [33] ภายใต้บางสภาวะ ดังนั้นจึงแสดงว่าบทบาทที่แท้จริงของไนตริกออกไซด์ในกระบวนการทำลายของโรคข้อเข่าเสื่อมยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

ผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของไนตริกออกไซด์ คือ ไนไตรต์ (NO_2^-) และไนเตรต (NO_3^-) ซึ่งเป็นรูปแบบโมเลกุลที่พบได้ในเลือด และมีความเสถียรมากกว่าไนตริกออกไซด์ [23] นอกจากนี้ยังสามารถตรวจวัดผลิตภัณฑ์ออกซิเดชันของเปอร์ออกซิไนไตรต์ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยการตรวจวัดโปรตีนไนโตรไทโรซีน (3-nitrotyrosine) โดยอาศัยหลักการ immunohistochemistry [34] ในปี ค.ศ.2003 Sandhu และคณะ ได้ทำการศึกษาการแพร่กระจายของโปรตีน 3-nitrotyrosine ในเยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วยโรครูมาตอยด์และผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่ามีโปรตีน

3-nitrotyrosine ทั้งในผู้ป่วยโครูมาตอยด์และผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม โดยเฉพาะบริเวณ stromal cells ของเยื่อหุ้มข้อ [35]

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ป้องกันหรือยับยั้งฤทธิ์ ของสารอนุมูลอิสระภายในร่างกายนั้น อาศัยกลไลหลักที่สำคัญสองกลไกคือ สารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ (enzymatic systems) เช่น เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) เอนไซม์ catalase (CAT) และเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) เป็นต้น และสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ (non-enzymatic systems) เช่น กลูตาไทโอน วิตามินอี วิตามินซี เบต้าแคโรทีน (beta carotene) กรดยูริก (uric acid) เป็นต้น



ภาพที่ 6 สารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ [36]

สารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ทำงานโดยอาศัยเอนไซม์ superoxide dismutase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนอนุมูลอิสระในรูป superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) ให้กลายเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หลังจากนั้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ถูกเปลี่ยนให้กลายเป็นน้ำโดยอาศัยเอนไซม์ catalase หรือเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) ดังภาพที่ 6

การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระกับโรคข้อเข่าเสื่อม

จากการศึกษาของ Maneesh และคณะ ในปี ค.ศ. 2005 ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) เอนไซม์ catalase และเอนไซม์ glutathione peroxidase ในเลือดระหว่างกลุ่มคนปกติและผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่าการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase ในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมสูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$) การทำงานของเอนไซม์ catalase และเอนไซม์ glutathione peroxidase ในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$) [37] แต่จากการศึกษาของ Surapaneni และคณะ ในปี ค.ศ. 2007 ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase เอนไซม์ catalase และเอนไซม์ glutathione peroxidase ในเลือดระหว่างกลุ่มคนปกติและผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเช่นเดียวกัน กลับพบว่าการทำงานของเอนไซม์ glutathione peroxidase ในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมสูงกว่ากลุ่มคนปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ($P < 0.01$) [19] ดังนั้นในปัจจุบันการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจึงยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

การตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระ (Total Antioxidant Status)

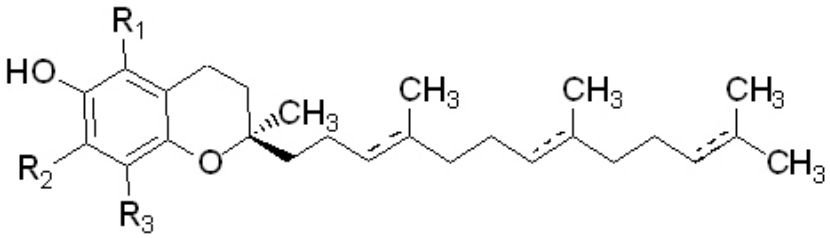
ในปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก โดยมีการนำสารต้านอนุมูลอิสระมาใช้ในการส่งเสริมสุขภาพ ป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ เพราะเชื่อว่าสามารถลดปฏิกิริยาออกซิเดชันและต้านการเกิดอนุมูลอิสระได้ วิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธี เช่น oxygen radical absorbance capacity (ORAC), 2, 2-diphennyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) free radical decolonization assay และ ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay เป็นต้น [38] จากการศึกษาของ Sarban และคณะ ในปี ค.ศ. 2005 พบว่าในผู้ป่วยโรครูมาตอยด์มีระดับซีรั่มของ total antioxidant capacity ต่ำกว่าในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$) ซึ่งระดับของ total antioxidant capacity ที่ลดลงเป็นผลเกี่ยวข้องกับการเกิดการอักเสบในผู้ป่วยโรครูมาตอยด์ [39] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Regan และคณะ ในปี ค.ศ.2008 ที่แสดงให้เห็นถึงการลดลงของสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำไขข้อของผู้ป่วย

โรคข้อเข่าเสื่อมเมื่อเปรียบเทียบกับผู้เป็น macroscopically intact cartilage และ subacute injury [40]

ผลของการเสริมวิตามินอี (Vitamin E supplementation) ในโรคต่าง ๆ

วิตามินอีเป็นวิตามินที่สามารถละลายได้ในไขมัน มีฤทธิ์ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โครงสร้างของวิตามินอีแสดงในภาพที่ 7 วิตามินอีตามธรรมชาติมีทั้งสิ้น 8 รูปแบบทางเคมี (alpha - tocopherol, beta - tocopherol, gamma - tocopherol, delta - tocopherol, alpha - tocotrienol, beta -tocotrienol, gamma - tocotrienol และ delta - tocotrienol) ทำให้คุณสมบัติทางชีวภาพ (biological activity) แตกต่างกัน ซึ่งรูปแบบที่มีความสำคัญในการดำรงชีวิตของมนุษย์ คือ alpha - tocopherol ระดับของวิตามินอีในเลือดนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหารที่ดูดซึมผ่านบริเวณลำไส้ แล้วถูกลำเลียงไปสู่ตับผ่านระบบน้ำเหลือง (lymphatic system) เมื่อวิตามินอีผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ภายในตับ ตับจะหลั่งวิตามินอีออกสู่ระบบไหลเวียนโลหิต (circulation system) โดยอาศัย hepatic alpha – tocopherol transfer protein (TTP) [41] จึงทำให้ alpha – tocopherol เป็นรูปแบบทางเคมีของวิตามินอีที่พบได้สูงที่สุดในเลือดของมนุษย์ สำหรับรูปแบบทางเคมีของวิตามินอีอื่นนั้นพบได้น้อยในกระแสเลือด จึงไม่ค่อยมีการศึกษาวิจัยกันมากนัก การศึกษาวิจัยส่วนใหญ่จึงเป็นการศึกษาฤทธิ์ ของวิตามินอีในรูป alpha – tocopherol ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีบทบาทในการลดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง และการศึกษาทางคลินิกในมนุษย์ได้สนับสนุนบทบาทของวิตามีนอีในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถใช้รักษาผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม [42-45] อย่างไรก็ตามกลไกในการทำงานของวิตามินอีในโรคข้อเข่าเสื่อมยังไม่ทราบแน่ชัด ในปี ค.ศ. 2009 Sutipornpalangkul และคณะ ได้ทำการศึกษาระดับของลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน กลูตาไทโอน วิตามินอี และ antioxidant enzyme ในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่าระดับวิตามินอีในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมต่ำกว่าผู้มีอาการบาดเจ็บในข้อเข่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$) [46] นอกจากนี้จากการศึกษาโรคข้อเข่าเสื่อมของ Framingham osteoarthritis cohort study โดยทำการศึกษา food frequency questionnaire พบว่าการบริโภคสารต้านอนุมูลอิสระปริมาณสูงช่วยลดความเสี่ยงในการสูญเสียกระดูกอ่อนและลดการดำเนินของโรคเรื้อรังได้ [42, 47] และมีการศึกษาทางคลินิกพบว่าวิตามินอีมีฤทธิ์ในการเสริมรักษาผู้ป่วยโรครูมาตอยด์และโรคข้อเข่าเสื่อมที่มีอาการ นอกจากนี้การศึกษาทางคลินิกในระยะสั้นในกลุ่มผู้ป่วยจำนวนน้อยซึ่งแนะนำว่าวิตามีนอี

อาจมีผลบรรเทาความเจ็บปวดในกลุ่มผู้ป่วยมากกว่ากลุ่มที่ได้รับยาหลอก [44] และอาจมีผลคล้ายกับกลุ่มที่ได้รับยา diclofenac [48] โดยจากการศึกษาของ Blankenhorn และคณะ ในปี ค.ศ.1986 ซึ่งทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับวิตามินอีขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิต เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับวิตามินอีนั้นมีอาการเจ็บปวดบริเวณข้อเข่าลดลง โดยพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับวิตามินอี [49] สอดคล้องกับงานวิจัยของ Machtey และคณะ ในปี ค.ศ. 1978 [50]



Compound	R_1	R_2	R_3
alpha-tocopherol	CH_3	CH_3	CH_3
gamma-tocopherol	H	CH_3	CH_3
beta-tocopherol	CH_3	H	CH_3
delta-tocopherol	H	H	CH_3
alpha-tocotrienol	CH_3	CH_3	CH_3
gamma-tocotrienol	H	CH_3	CH_3
beta-tocotrienol	CH_3	H	CH_3
delta-tocotrienol	H	H	CH_3

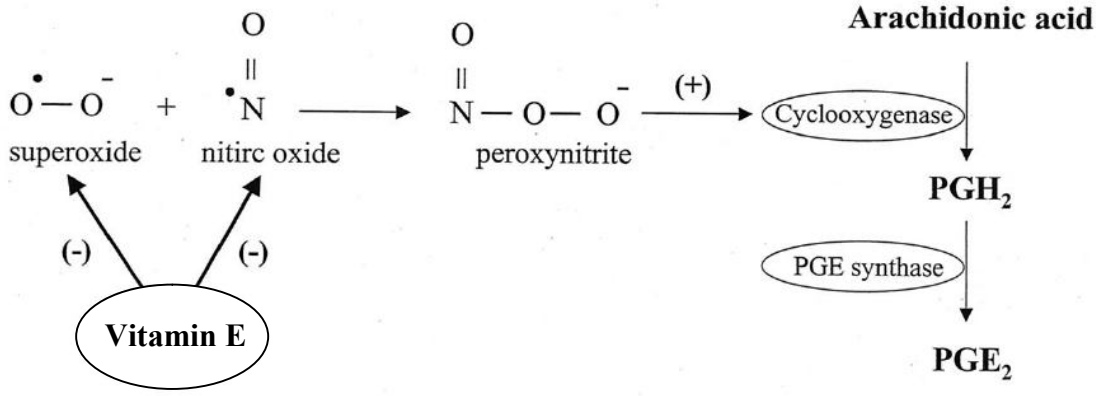
ภาพที่ 7 โครงสร้างของวิตามินอี [51]

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ ของวิตามินอีในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในผู้ป่วยโรคเรื้อรังอื่น ๆ และผู้สูงอายุที่มีสุขภาพดี จากการศึกษาของ Chin และคณะ ในปี ค.ศ.2011 ซึ่งทำการศึกษาผลของการเสริมวิตามินอีต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้สูงอายุที่มีสุขภาพดี โดยทำการเสริมวิตามินอี ขนาด 160 มิลลิกรัมต่อวัน เป็นระยะเวลา 6 เดือน แล้วจึงทำการตรวจวัดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเลือดตั้งแต่ก่อนการทดลอง เดือนที่ 3 และเดือนที่ 6 พบว่าภายหลังการเสริมวิตามินอี เป็นระยะเวลา 3 เดือน กลุ่มตัวอย่างมีระดับวิตามินอีในเลือดเพิ่งสูงขึ้น

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$) และเมื่อทำการเสริมวิตามินอีเป็นระยะเวลา 6 เดือน วิตามินอีช่วยเพิ่มระดับ high density lipoprotein - cholesterol (HDL-C) ลดระดับ protein carbonyl และ advanced glycation end products (AGEs) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ($P < 0.01$) การศึกษานี้จึงสนับสนุนบทบาทของวิตามินอีในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถช่วยส่งเสริมสุขภาพในผู้สูงอายุได้ [52] การศึกษาของ Nadeem และคณะ ในปี ค.ศ.2008 ได้ศึกษาเปรียบเทียบภาวะเครียดจากออกซิเดชันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) ที่ได้รับการเสริมวิตามินอีขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิต เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ กับผู้ป่วยโรคปอดอุดกั้นเรื้อรังที่ได้รับการรักษาตามมาตรฐานปกติ พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับการเสริมวิตามินอีมีระดับ plasma sulphydryls และระดับเอนไซม์ catalase ในเม็ดเลือดแดงเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบระดับไนไตรต์และไนเตรตกลับพบว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีมีระดับไนไตรต์และไนเตรตต่ำกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการเสริมวิตามินออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$) นอกจากนี้ยังไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$) ของระดับเอนไซม์ superoxide dismutase ในเม็ดเลือดแดง เอนไซม์ glutathione peroxidase ระดับกลูตาไทโอน และ plasma total antioxidant capacity ระหว่าง 2 กลุ่ม การศึกษานี้จึงไม่ได้สนับสนุนการเสริมวิตามินอีให้กับผู้ป่วยโรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง [53]

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลการเสริมวิตามินอีต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยโรคเอสแอลอี (systemic lupus erythematosus, SLE) การศึกษาของ Tam และคณะ ในปี ค.ศ. 2005 พบว่าการเสริมวิตามินอี ขนาด 800 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิต ร่วมกับวิตามินซี ขนาด 500 มิลลิกรัม ทุกวันเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ เพิ่มระดับวิตามินอีและวิตามินซีในเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก (placebo) นอกจากนี้การเสริมวิตามินอีและวิตามินซีร่วมกันยังช่วยลดระดับ malondialdehyde อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$) และระดับ ferric reducing antioxidant power ในผู้ป่วยที่ได้รับการเสริมวิตามินอีร่วมกับวิตามินซีเพิ่มสูงขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$) การศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นว่าการเสริมวิตามินอีและวิตามินซี ซึ่งต่างมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระช่วยลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันได้ [54] นอกจากนี้การศึกษาของ

Calvisi และคณะ ในปี ค.ศ. 2004 ได้รายงานว่าวิตามินอีลดการแสดงออกของยีน iNOS และ NADPH oxidase ใน c-Myc/TGF-α transgenic mouse ซึ่งเป็นแบบจำลองของโรคมะเร็งตับ โดยทั้งสองยีนนี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจนในหนูทดลองจึงสนับสนุนให้เห็นฤทธิ์ ของวิตามินอีในการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ [55] สอดคล้องกับการศึกษาของ Vaziri และคณะ ในปี ค.ศ.1999 ที่รายงานว่าการเสริมวิตามินอีมีผลลดการแสดงของออกเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase ในหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความดันโลหิตสูงด้วยตะกั่ว ซึ่ง Vaziri และคณะ ได้เสนอว่าการลดการแสดงออกของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase จะส่งผลให้ลดผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์ซึ่งคือไนตริกออกไซค์ ทำให้ลด 3-nitrotyrosine ซึ่งเป็น secondary by-product ของการทำปฏิกิริยาระหว่างไนตริกออกไซด์และสารอนุมูลอิสระที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจน และการศึกษานี้ยังพบว่าการเสริมวิตามินอีมีผลลดระดับความดันโลหิตที่หางของหนูทดลองและระดับ malondialdehyde ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$) [56] และจากการศึกษาของ Beharka และคณะ ในปี ค.ศ.2002 ได้รายงานถึงบทบาทของวิตามินอีในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สัมพันธ์กับกระบวนการอักเสบใน macrophage ของหนูแก่ โดยการลดระดับ peroxinitrite ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของการทำปฏิกิริยาระหว่างไนตริกออกไซด์และ superoxide anion (ภาพที่ 8) ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้สนับสนุนบทบาทของวิตามินอีในการชะลอความรุนแรงของโรคที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและความเสื่อม เช่น โรคข้อเข่าเสื่อม โรคมะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นต้น [57]

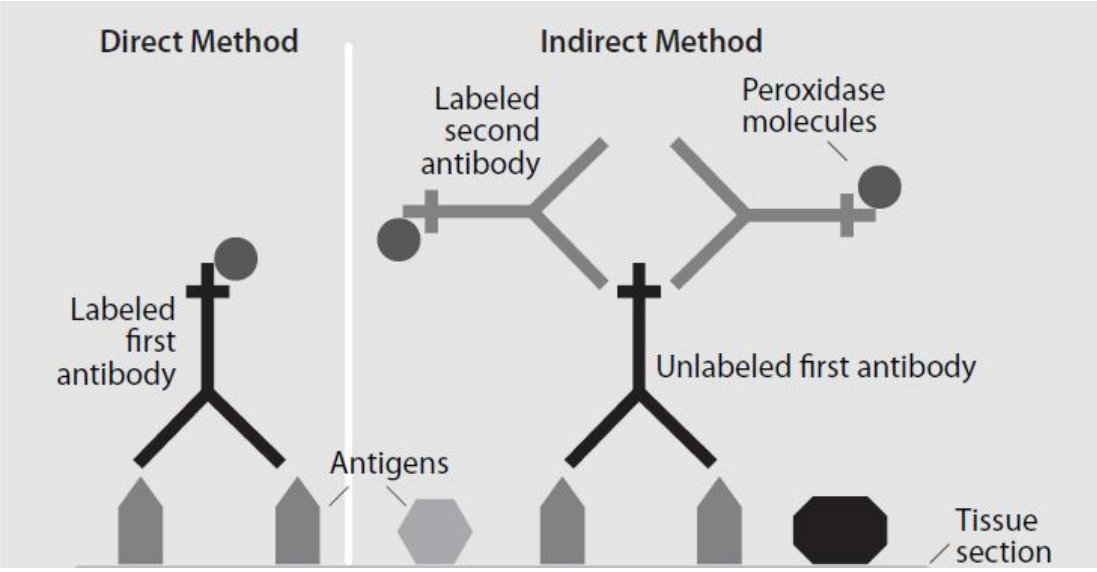


ภาพที่ 8 กลไกการทำงานของวิตามินอีในการลดการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase [57]

จากการศึกษาพบว่าวิตามินอีปริมาณสูงกว่า 1,000 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิตต่อวัน สามารถยั้บยั้งการออกฤทธิ์ ของวิตามินเค ซึ่งมีผลคล้ายกับการทำงานของยาwafarin ดังนั้น วิตามินอีปริมาณสูงอาจทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการ bleeding disorder ได้ อย่างไรก็ตามในผู้ป่วยที่บริโภควิตามินอี 800-1,000 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิตต่อวันพร้อมกับได้รับยา coumadin ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่า prothrombin time [58] ในปัจจุบันสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งชาติของประเทศสหรัฐอเมริกา (United States National Academy of Science) ได้กำหนดค่าสูงสุดในการบริโภควิตามินอีไว้เท่ากับ 1,500 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิตต่อวัน

Immunohistochemistry (IHC)

การตรวจชิ้นเนื้อทาง immunohistochemistry เป็นการย้อมชิ้นเนื้อเยื่อด้วยวิธีพิเศษทางเคมี โดยการใช้แอนติบอดี (antibody) ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจน (antigen) ที่ต้องการศึกษาในเนื้อเยื่อ ในระยะแรกการศึกษาทาง immunohistochemistry นิยมใช้เทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ซึ่งการติดสารเรืองแสง (fluorescein) กับแอนติบอดีแต่วิธีนี้มีข้อจำกัดมาก เช่น ต้องใช้ชิ้นเนื้อสด ตรวจดูได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์เท่านั้น สารเรืองแสงเสื่อมสภาพได้ง่าย เป็นต้น ต่อมาจึงได้มีผู้พัฒนาเทคนิคทาง immunohistochemistry โดยนำเอนไซม์มาติดกับแอนติบอดีแทนสารเรืองแสงเมื่อเอนไซม์ (เช่น alkaline phosphatase (AP) หรือ horseradish peroxidase (HRP)) ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น (substrate) (เช่น 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) หรือ nitro blue tetrazolium (NBT) 3,3'-Diaminobenzidine (DAB)) จะย้อมติดสีน้ำตาลหรือสีม่วงแล้วแต่ชนิดของเอนไซม์และสารตั้งต้น บริเวณตำแหน่งของเนื้อเยื่อที่มีแอนติบอดีจับกับแอนติเจน ดังแสดงในภาพที่ 9 วิธีนี้สามารถตรวจดูได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและเก็บสไลด์ได้นานกว่า เพราะเป็นการศึกษาจาก paraffin section ปัจจุบันได้มีการใช้เทคนิคทาง immunohistochemistry ในการวินิจฉัยโรคอย่างแพร่หลาย เช่น ตรวจหา tumor markers ในการวินิจฉัยโรคมะเร็ง เป็นต้น



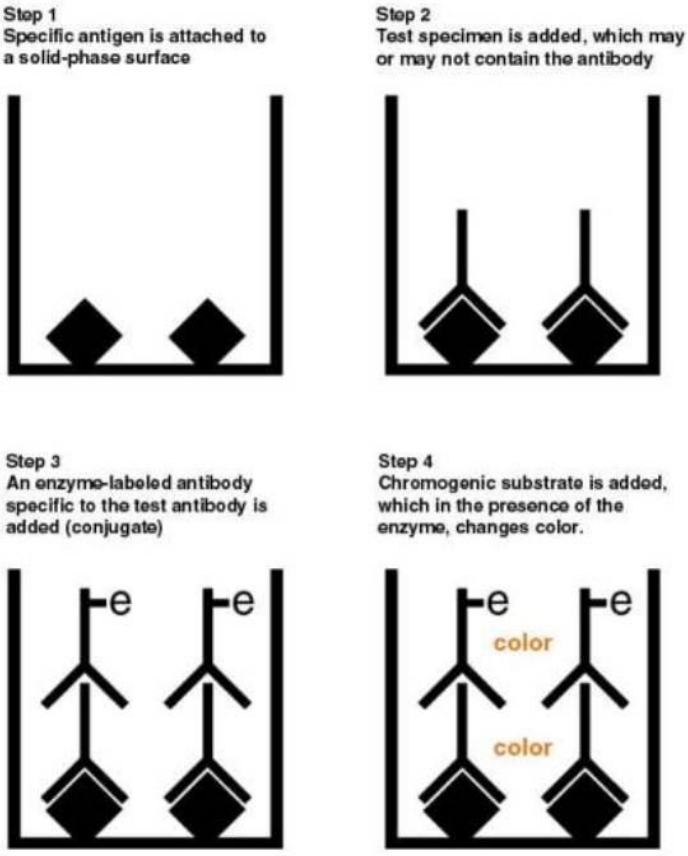
ภาพที่ 9 หลักการ immunohistochemistry (IHC) [59]

เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซ (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

หลักการของ ELISA อาศัยปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยการติดฉลากแอนติเจนหรือแอนติบอดีด้วยเอนไซม์ เอนไซม์ที่นิยม ได้แก่ horseradish peroxidase และ alkaline phosphatase เอนไซม์หนึ่งโมเลกุลนั้นสามารถเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นได้หลายโมเลกุล จึงช่วยเพิ่มความสามารถในการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถอาศัยการจับกันระหว่าง avidin และ biotin ในการทำปฏิกิริยา เมื่อเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้วสามารถวัดสีที่เกิดขึ้นได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงนำมาเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นของโปรตีนเป้าหมายมาตรฐาน (target standard protein) ที่ทราบค่า

ชนิดของ ELISA แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่

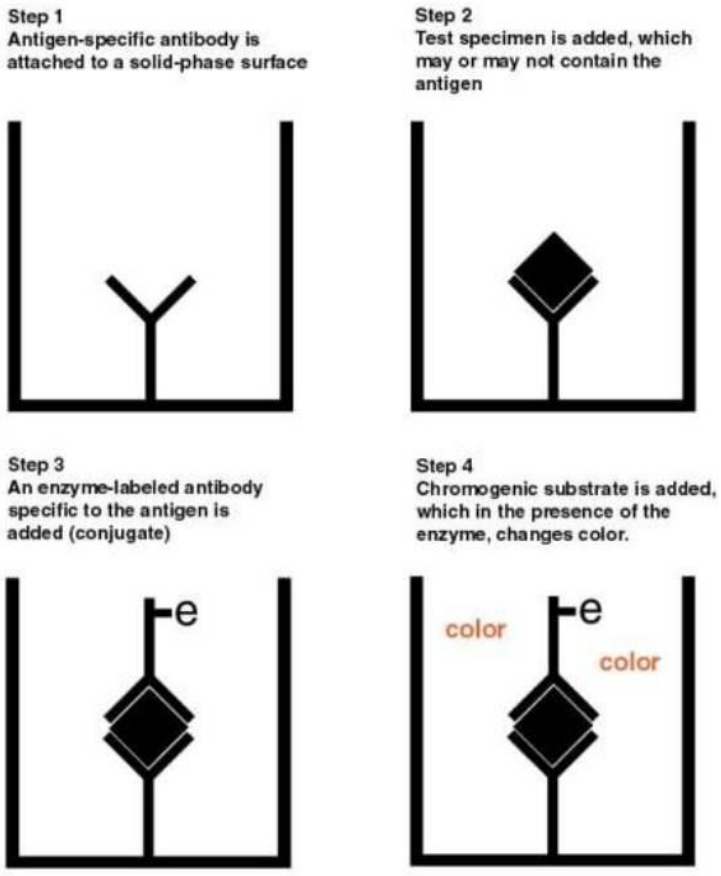
1. Indirect ELISA



ภาพที่ 10 หลักการ indirect ELISA [60]

หลักการ indirect ELISA ใช้ตรวจหาแอนติบอดีในสิ่งตัวอย่าง โดยอาศัยแอนติเจนบริเวณ solid phase ที่จำเพาะทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ต้องการตรวจ หลังจากนั้นจึงใช้ anti-immunoglobulin ติดฉลากด้วยเอนไซม์ทำปฏิกิริยาอีกขั้นตอนหนึ่ง ดังนั้นสารตั้งต้นที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์จึงบ่งชี้ถึงปริมาณแอนติบอดีที่มีในสิ่งตัวอย่าง แสดงในภาพที่ 10

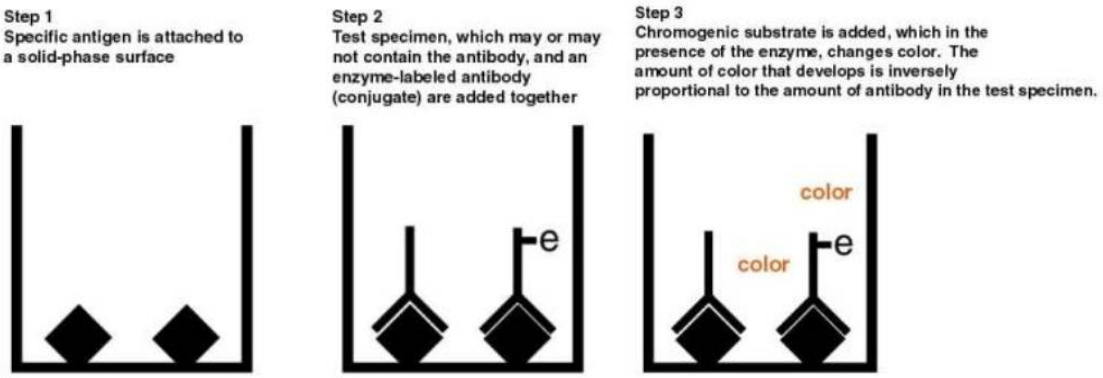
2. Sandwich ELISA



ภาพที่ 11 หลักการ sandwich ELISA [61]

หลักการ sandwich ELISA ใช้ตรวจหาแอนติเจนในสิ่งตัวอย่าง โดยการเคลือบ solid phase ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน จากนั้นเติมสิ่งตัวอย่างที่มีแอนติเจนที่ต้องการศึกษาเพื่อให้เกิดการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ล้างส่วนเกินที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออก แล้วจึงเติมแอนติบอดีที่จำเพาะซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาอีกขั้นตอนหนึ่ง ดังนั้นสารตั้งต้นที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์จึงบ่งชี้ถึงปริมาณแอนติเจนที่ต้องการศึกษาในสิ่งตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 11

3. Competitive ELISA



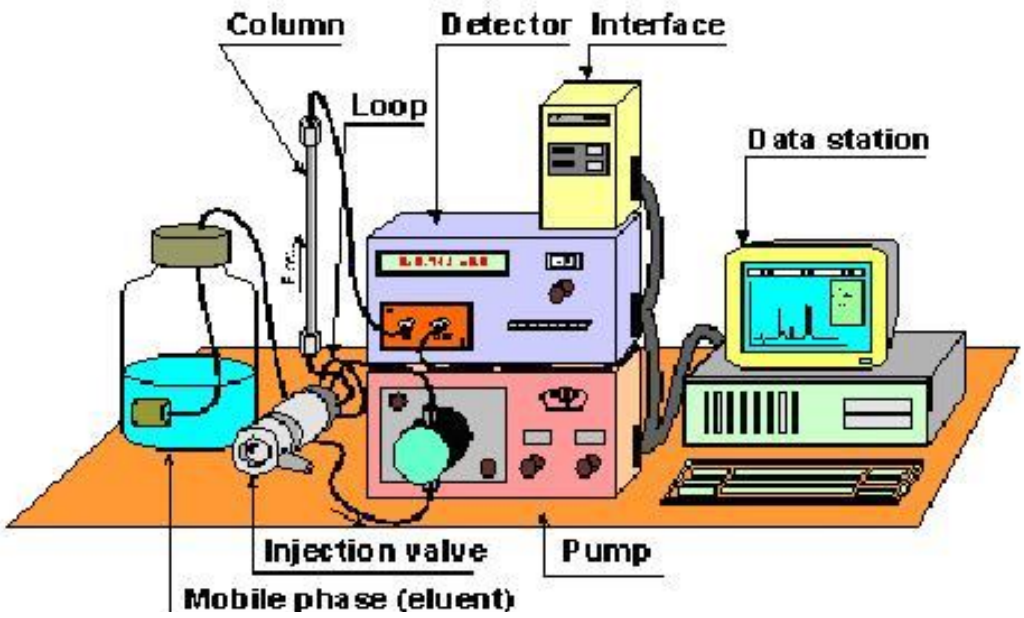
ภาพที่ 12 หลักการ competitive ELISA [62]

หลักการ competitive ELISA ใช้ตรวจหาได้ทั้งแอนติเจนและแอนติบอดี ในกรณีที่ต้องการตรวจหาแอนติเจนจะเคลือบ solid phase ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะจากนั้นจึงเติมแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์เพียงอย่างเดียวหนึ่งหลอด และอีกหนึ่งหลอดเป็นแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ผสมกับแอนติเจนที่อยู่ในสิ่งตัวอย่าง ดังนั้นความแตกต่างของปริมาณสารตั้งต้นที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ระหว่างหลอดที่ใส่แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์เพียงอย่างเดียวกับหลอดที่มีทั้งแอนติเจนที่ถูกติดฉลากด้วยเอนไซม์และแอนติเจนในสิ่งตัวอย่าง จึงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติเจนในสิ่งตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 12

High performance liquid chromatography (HPLC)

เครื่องมือ HPLC ใช้สำหรับวิเคราะห์แยกชนิดสารประกอบและตรวจหาปริมาณสารในสิ่งตัวอย่างในสภาวะของเหลว ดังแสดงในภาพที่ 13 กระบวนการแยกสารประกอบนั้นเกิดขึ้นโดยอาศัยการเคลื่อนผ่าน 2 วัฏภาค (phase) คือ วัฏภาคนิ่ง (stationary phase) มักเป็นของแข็ง เช่น silica และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) มักเป็นของเหลว เช่น เมทานอล (methanol) อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) สารผสมที่อยู่ในสิ่งตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันโดยอาศัยความสามารถในการเข้ากันได้ของสารนั้นกับ mobile phase หรือ stationary phase ถ้าสารประกอบชนิดไหนสามารถเข้ากันได้ดีกับ mobile phase สารชนิดนั้นจะเคลื่อนผ่านคอลัมน์ (column) ได้เร็วและถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ดีกับหรือ stationary phase จะเคลื่อนผ่านคอลัมน์ได้ช้า จึงถูกแยกออกมาทีหลัง ซึ่งสารที่แยกออกมานี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัด (detector) สัญญาณที่บันทึกได้จะมีลักษณะเป็นเส้นโค้งยอดแหลม (peak)

ซึ่งเรียกว่า โครมาโทแกรม (chromatogram) เครื่อง HPLC สามารถตรวจวัดได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณโดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

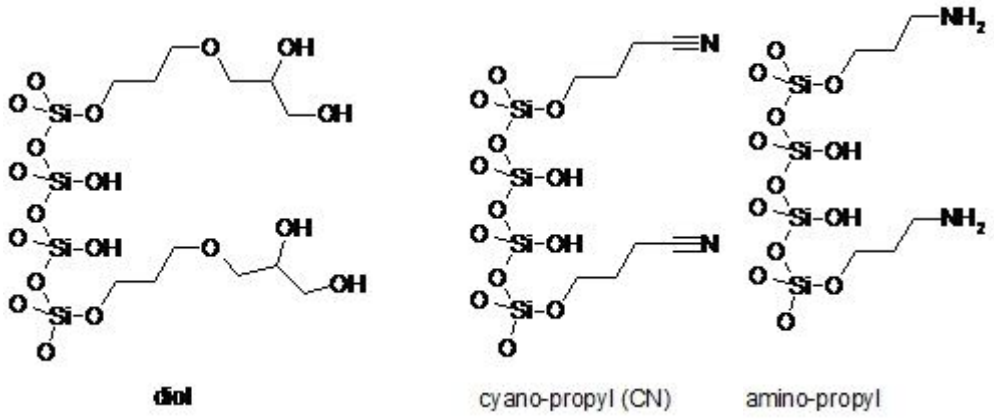


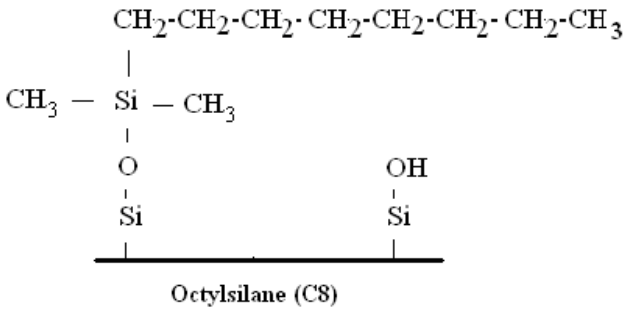
ภาพที่ 13 เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) [63]

phase chromatography แบ่งได้เป็น 2 ระบบ คือ

1. โครมาโทกราฟฟีแบบปกติ (normal phase chromatography) stationary phase จะมีสภาพมีขั้วสูง เช่น aminopropyl diol cyanopropyl เป็นต้น (ภาพที่ 14) และ mobile phase จะไม่มีขั้ว เช่น hexane ใช้สำหรับแยกสารที่มีสภาพขั้วสูงออกจากกัน โดยสารที่มีสภาพขั้วต่ำหรือไม่มีขั้วจะถูกชะออกมาก่อน และสารที่มีสภาพขั้วสูงจะถูกชะออกมาทีหลัง

2. โครมาโทกราฟฟีแบบผันกลับ (reversed phase chromatography) stationary phase จะไม่มีขั้ว เช่น octadecylsilane (ODS) octasilane เป็นต้น และ mobile phase จะมีสภาพมีขั้ว เช่น น้ำ เมทานอล อะซิโตไนไตรล์ เป็นต้น (ภาพที่ 14) ใช้สำหรับแยกสารที่มีสภาพขั้วต่ำออกจากกัน โดยสารที่มีสภาพขั้วสูงจะถูกชะออกมาก่อน และสารที่มีสภาพขั้วต่ำจะถูกชะออกมาทีหลัง





ภาพที่ 14 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ stationary phase ชนิดต่าง ๆ [64]

ส่วนประกอบสำคัญของเครื่อง HPLC ประกอบด้วย

1. วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase, solvent) คือ ตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารตัวอย่าง มีลักษณะเป็นของเหลว ทำหน้าที่นำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่ stationary phase เพื่อให้เกิดกระบวนการแยกภายในคอลัมน์

การใช้สารละลายชะสารต่าง ๆ ออกจากคอลัมน์พบได้ใน 2 ลักษณะ

- isocratic การแยกโดยใช้องค์ประกอบของ mobile phase แบบเดียวตลอดการแยก
- gradient elution การแยกโดยมีการเปลี่ยนองค์ประกอบของ mobile phase ระหว่างการแยกแบบต่อเนื่องหรือแบบทีละขั้น (stepwise)

2. ปั๊ม (pump) ทำหน้าที่สูบตัวทำละลายซึ่งเป็น mobile phase ให้ไหลเข้าสู่คอลัมน์ โดยอัตราเร็วเฉลี่ย 0.5 – 10 มิลลิลิตรต่อนาที และช่วยรักษาอัตราเร็วให้คงที่ตลอดการวิเคราะห์สิ่งตัวอย่าง

3. ตัวฉีด (injector/autosampler) ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ โดยสามารถกำหนดปริมาตรสารตัวอย่างที่แน่นอนได้

4. คอลัมน์ (stationary phase, column) ภายในบรรจุด้วยของแข็งหรือเจล ซึ่งทำหน้าที่เป็น stationary phase ทำให้เกิดกระบวนการแยกสารตัวอย่าง โดยเฉลี่ยแล้วมีความยาวประมาณ 100-250 มิลลิเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่น้อยกว่า 1 มิลลิเมตรจนถึงหลายมิลลิเมตร แล้วแต่ความเหมาะสมของชนิดสารตัวอย่างที่ต้องการแยกด้วย HPLC

5. detector คือ ตัวตรวจวัดสัญญาณ ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารตัวอย่างที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยกในคอลัมน์ เช่น UV-VIS detector fluorescence detector

6. เครื่องบันทึกผล ใช้แสดงและบันทึกผลการตรวจวัดสารที่แยกออกมาจากคอลัมน์ เพื่อนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของสารหรือคำนวณหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สนใจ ซึ่งสามารถคำนวณได้จากความสูงของเส้นโค้งยอดแหลม (peak high) หรือพื้นที่ใต้เส้นโค้งยอดแหลม (peak area)

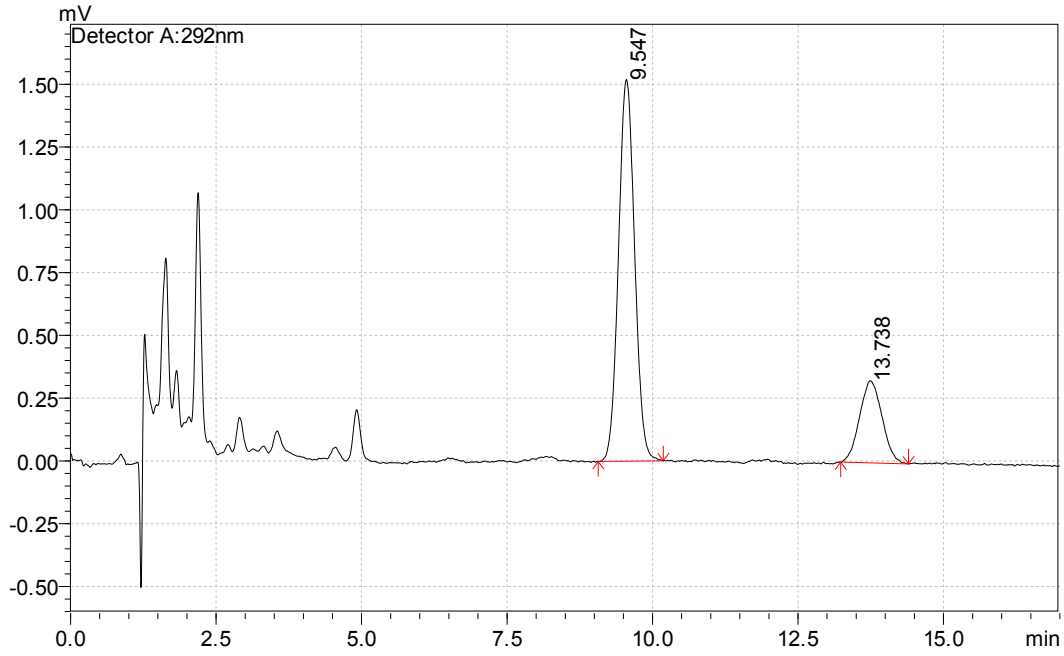
การคำนวณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สนใจด้วย HPLC

ในการคำนวณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สนใจด้วยเทคนิค HPLC นั้น จำเป็นต้องมีสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ โดยสร้างเป็นกราฟมาตรฐานของสารละลายตัวอย่างที่สนใจ ซึ่งในกรณีนี้คือ วิตามินอี สารละลายมาตรฐานที่ใช้ในเครื่อง HPLC มี 2 ลักษณะ คือ

1. สารมาตรฐานภายนอก (external standard) ควรใช้สารบริสุทธิ์ ชนิดเดียวกับสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ เช่น วิตามินอี ซึ่งต้องทราบความเข้มข้นที่แน่นอนแล้วจึงฉีดผ่านคอลัมน์เพื่อนำ peak high หรือ peak area ในแต่ละความเข้มข้นมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานภายนอก การฉีดสารมาตรฐานภายนอกช่วยในการยืนยันระยะเวลาที่สารตัวอย่างที่สนใจควรเคลื่อนผ่านคอลัมน์ด้วย [65]

2. สารมาตรฐานภายใน (internal standard) ควรใช้สารที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายสารตัวอย่างที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ เช่น วิตามินอี อะซีเตต (alpha – tocopherol acetate) แต่ระยะเวลาที่สารมาตรฐานภายในเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (retention time, RT) ควรแตกต่างอย่างชัดเจนกับสารละลายมาตรฐานภายนอก [66] การใช้สารละลาย

มาตรฐานภายในนั้นใช้โดยเติมสารละลายมาตรฐานภายในลงในสารมาตรฐานภายนอกหรือสิ่งตัวอย่างที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ ก่อนทำการฉีดผ่านคอลัมน์ ดังนั้นเมื่อเครื่อง HPLC แปลผลจึงเห็นลักษณะโครมาโทแกรมที่แยกออกจากกันสองโครมาโทแกรม เนื่องเพราะระยะเวลาที่สารละลายมาตรฐานทั้งสองชนิดเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์แตกต่างกัน (ภาพที่ 15) การสร้างกราฟมาตรฐานนั้นสามารถทำได้โดยใช้ แกน Y เป็นสัดส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานภายนอกในแต่ละความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานภายใน ส่วนแกน X เป็นค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานภายนอก การสร้างกราฟมาตรฐานในลักษณะนี้จะมีความถูกต้องมากกว่าเพราะได้เทียบสัดส่วนกับสารละลายมาตรฐานภายใน



ภาพที่ 15 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานภายนอกวิตามินอี (RT = 9.5 นาที) และโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานภายในวิตามินอี อะซีเตต (RT = 13.7 นาที)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target Population)

ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคข้อเข่าเสื่อมและเตรียมเข้ารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม จากฝ่ายออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และอาสาสมัคร ซึ่งเป็นคนปกติที่มีสุขภาพดีสนใจเข้าร่วมโครงการวิจัยจากป้ายประกาศรับอาสาสมัครภายในบริเวณโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

ประชากรตัวอย่าง (Sample population) มี 3 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มควบคุมซึ่งเป็นคนปกติที่มีสุขภาพดี
2. กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม
3. กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี

เกณฑ์การคัดเข้าศึกษา (Inclusion criteria) **สำหรับกลุ่มควบคุม**

1. กลุ่มควบคุมคนปกติมีอายุมากกว่า 50 ปี ไม่ดื่มสุราและไม่สูบบุหรี่
2. กลุ่มควบคุมคนปกติต้องมีอายุและเพศที่ใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ป่วย
3. กลุ่มควบคุมคนปกติต้องได้รับการตรวจสุขภาพประจำปี มีสุขภาพแข็งแรง และผลของการตรวจสุขภาพประจำปีอยู่ในเกณฑ์ปกติ

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria) **สำหรับกลุ่มควบคุม**

1. ผู้ป่วยที่มีโรคเรื้อรัง เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจตีบ โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคตับ โรคมะเร็ง และโรคข้อเข่าเสื่อม เป็นต้น

เกณฑ์การคัดเลือกเข้าศึกษา (Inclusion criteria) **สำหรับกลุ่มผู้ป่วย**

1. ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคตาม Ahlback grade ที่ 3, 4 และ 5 และเตรียมเข้ารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม จากฝ่ายออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย
2. ผู้ป่วยมีอายุมากกว่า 50 ปี ไม่ดื่มสุราและไม่สูบบุหรี่
3. ผู้ป่วยได้รับการตรวจทางห้องปฏิบัติการก่อนเข้ารับการผ่าตัด (pre admission for surgery) ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งได้รับการตรวจวัดการแข็งตัวของเลือดร่วมด้วย (CBC, platelet, PT, PTT, INR) และได้รับการรับรองให้ทำการผ่าตัดได้

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria) **สำหรับกลุ่มผู้ป่วย**

1. ผู้ป่วยที่มีแนวโน้มในการเกิดปัญหาการแข็งตัวของเลือด เช่น ผู้ป่วยที่ใช้ยาแอสไพริน (aspirin), วาร์ฟาริน (warfarin), เฮปาริน (heparin) เป็นต้น
2. ผู้ป่วยได้รับประทานยา phenobarbital, dilantin และ mineral oil เพราะมีผลลดการดูดซึมและการเกิดเมแทบอลิซึมของวิตามินอี
3. ผู้ป่วยที่เดิมรับประทานวิตามินอีหรือสารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ เสริมก่อนเข้าร่วมโครงการวิจัย

ขนาดประชากรตัวอย่าง (Sample size)

การศึกษาในครั้งนี้จะคำนวณกลุ่มตัวอย่าง โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

$$\text{โดย} \quad n = \frac{2(Z_{\frac{\alpha}{2}} + Z_{\beta})^2 \sigma^2}{(X_1 - X_2)^2}$$

α = 0.05, $Z_{\alpha/2}$ =1.96

β = 0.2, $Z\beta$ = 0.84

σ^2 จากการศึกษานำร่อง เท่ากับ 2.57

$(X_1 - X_2)^2$ จากการศึกษานำร่อง เท่ากับ 1.21

$$\text{ดังนั้น} \quad n = \frac{2(1.96 + 0.84)^2 2.57}{1.21}$$

$$= 33.3$$

เพราะฉะนั้นจากการคำนวณต้องใช้ตัวอย่างในการศึกษาวิจัยครั้งนี้อย่างน้อยกลุ่มละ 33 ตัวอย่าง แต่เนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องการเก็บตัวอย่างซึ่งตัวอย่างดังกล่าวได้มาเมื่อผู้ป่วยมาทำการตรวจติดตามการรักษาตามกำหนดเท่านั้น จึงทำให้ต้องมีการเก็บจำนวนตัวอย่างเพิ่มมากขึ้นกว่าที่คำนวณได้จำนวน 2 ตัวอย่าง เพื่อป้องกันการสูญหายของกลุ่มตัวอย่างขณะทำการวิจัย ดังนั้นการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงใช้ตัวอย่างกลุ่มละ 35 ตัวอย่าง รวมเป็น 105 ตัวอย่าง

เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือ

1.1 Autoclave (Hydroclave Harvey, USA)

1.2 Automatic adjustable micropipette (Gilson, France)

1.3 Balance (Sartorius)

1.4 Beaker: 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)

1.5 Centrifuge, refrigerated centrifuge (Eppendorf, USA)

1.6 Centrifuge, microcentrifuge high speed (Eppendorf, USA)

1.7 Cuvette 80-100 µl

1.8 Cylinder : 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)

1.9 Digital Timer

1.10 HPLC system controller (Shimadzu CBM-20A, Japan)

1.11 HPLC delivery pumps (Shimadzu LC-10AD, Japan)

1.12 HPLC variable-wavelength (Shimadzu SPD-10A, Japan)

1.13 Column (Inertsil ODS-3, GL Sciences, Japan)

1.14 Electrophoresis chamber set (BIO-RAD, USA)

1.15 Flask : 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)

1.16 Freezer -80 ^{o}C (Forma Scientific, USA)

1.17 Optical microscope (nikon , Japan)

1.18 Digital Dry Bath (Labnet, USA)

1.19 Multi-channel pipettor (Biohit, Finland)

1.20 pH meter (IQ Scientific Instruments, USA)

1.21 Pipette aid (Tecnomara, Switzerland)

1.22 Pipette rack (Autopack, USA)

1.23 ELISA Plate Reader (Multiascent, USA)

1.24 Reagent bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Duran, USA)

1.25 Refrigerator (Toshiba, Japan)

1.26 Microplate Spectrophotometer (Biotek, USA)

1.27 Stirring-magnetic bar

1.28 Vortex mixer (Scientific Industry, USA)

1.29 Water purification equipment (Water pro Ps, Labconco USA)

2. วัสดุอุปกรณ์

2.1 EDTA tube (vacuettee, Austria)

2.2 Disposable gloves (sempermed®, Thailand)

2.3 Glass pipette : 1 ml, 5 ml, 10 ml (Witeg, Germany)

2.4 Microcentrifuge tube : 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (Hycon, USA)

2.5 Needle, sterile (Nipro, Thailand)

2.6 Parafilm (Pechiney plastic packaging, USA)

2.7 Pipette tip : 10 µl, 200 µl, 1,000 µl (Brandtech, USA)

2.8 Plastic wrap

2.9 Polypropylene conical tube, sterile : 15 ml, 50 ml (Corning, USA)

2.10 Sanitary tissue paper (Celox, Thailand)

2.11 Syringe disposable (Nipro, Japan)

2.12 Petridish (Sterillin, UK)

2.13 96-well plates (Greiner bio-one, Germany)

2.14 Foil

2.15 C 18 column (GL Sciences, Japan)

2.16 Membrane filters (Whatman, USA)

2.17 Short Thread Vials (La-Pha-Pack, USA)

2.18 Cap silicone white (La-Pha-Pack, USA)

2.19 Glass micro-inserts (La-Pha-Pack, USA)

3. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.1 สารเคมีทั่วไป

3.1.1 70% ethanol

3.2 สารเคมีสำหรับตรวจวัดไนไตรต์

3.2.1 NED solution (0.1% N-1-napthylethylenediamine dihydrochloride in water) (Promega, USA)

3.2.2 Sulfanilamide solution (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid) (Promega, USA)

3.2.3 Nitrite standard (0.1M sodium nitrite in water) (Promega, USA)

3.3 สารเคมีสำหรับตรวจวัด Malondialdehyde (MDA)

3.3.1 Trichloroacetic acid (TCA) (Sigma Chemical, USA)

3.3.2 Thiobarbituric acid (TBA) (Sigma Chemical, USA)

3.3.3 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) (Sigma Chemical, USA)

3.3.4 Malondialdehyde tetrabutylammonium salt (Sigma Chemical, USA)

3.4 สารเคมีสำหรับตรวจวัดวิตามินอี

3.4.1 Ethanol HPLC grade (Merck, Germany)

3.4.2 Methanol HPLC grade (Merck, Germany)

3.4.3 Hexane HPLC grade (J.T.Baker®, USA)

3.4.4 alpha - tocopherol (Sigma Chemical , USA)

3.4.5 alpha - tocopherol acetate (Sigma Chemical, USA)

3.5 สารเคมีสำหรับตรวจวัด Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay (TEAC)

3.5.1 2,2-azinobis3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) (Sigma Chemical, USA)

3.5.2 Potassium persulfate ($K_2S_2O_4$) (Sigma Chemical, USA)

3.5.3 Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox) (Sigma Chemical, USA)

3.5.4 Phosphate buffered saline (PBS)

3.6 สารเคมีสำหรับตรวจวัด Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

3.6.1 Sodium acetate trihydrate (Sigma Chemical, USA)

3.6.2 2,4,6- tripyridyl-S-triazine (TPTZ) (Sigma Chemical, USA)

3.6.3 Hydrochloric acid (HCl) (Mallinckrodt Chemical, USA)

3.6.4 Acetic acid (Merck, Germany)

3.6.5 Iron (III) chloride ($FeCl_3$) (Ajax Finechem, Australia)

3.6.6 Iron sulfate ($FeSO_4$) (Ajax Finechem, Australia)

3.7 สารเคมีสำหรับการทำ ELISA

3.7.1 Sample diluents (Cusabio biotech, China)

3.7.2 Biotin-antibody diluents (Cusabio biotech, China)

3.7.3 HRP-avidin diluents (Cusabio biotech, China)

3.7.4 Biotin-antibody (Cusabio biotech, China)

3.7.5 HRP-avidin (Cusabio biotech, China)

3.7.6 Wash buffer (Cusabio biotech, China)

3.7.7 TMB substrate (Cusabio biotech, China)

3.7.8 Stop solution (Cusabio biotech, China)

การเก็บรวบรวมข้อมูล

ผู้วิจัยทำการเก็บรวบรวมข้อมูลการวิจัยโดยจดลงสมุดบันทึก และบันทึกลงเครื่องคอมพิวเตอร์ โดยได้จัดทำตารางเก็บข้อมูลพื้นฐานของแต่ละบุคคล ตารางบันทึกตัวชี้วัดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และตารางบันทึกตัวชี้วัดสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel

Record form 1 สำหรับจัดเก็บข้อมูลพื้นฐานของผู้ร่วมงานวิจัย

No.	Code number	sex	age	Weight	Height	BMI
1						
2						

Record form 2 สำหรับบันทึกตัวชี้วัดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน

No.	Code number	Nitrite	iNOS	MDA
1				
2				

Record form 3 สำหรับบันทึกตัวชี้วัดสารต้านอนุมูลอิสระ

No.	Code number	Vitamin E	FRAP	TEAC
1				
2				

การดำเนินการวิจัย

ประชากรศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมรวมถึงกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นคนปกติที่มีสุขภาพดี ได้รับคำแนะนำถึงวัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยครั้งนี้ และลงลายมือชื่อยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัยเป็นลายลักษณ์อักษร

การเสริมวิตามินอี

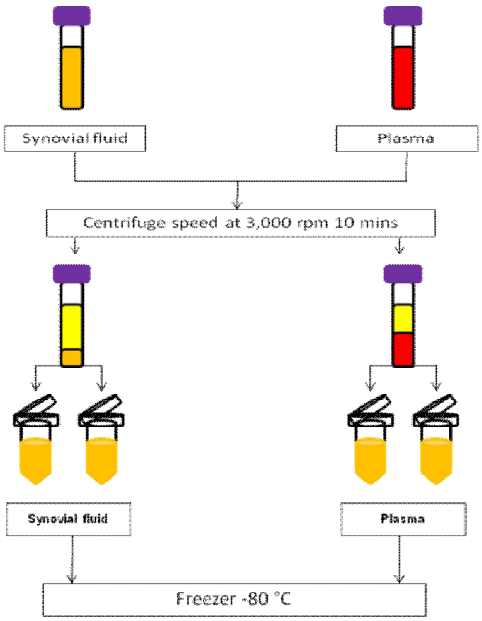
กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีจะได้รับการเสริมวิตามินอีในรูป alpha – tocopherol ขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิต โดยรับประทานวันละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลา 2 เดือน

การเก็บเลือด

เจาะเลือดจากหลอดเลือดดำบริเวณท้องแขนของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยด้วยชุดอุปกรณ์เจาะเลือดปริมาณ 5 มิลลิลิตร ใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง เก็บตัวอย่างพลาสมาโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาที แยกส่วนที่เป็นพลาสมาเก็บที่ -80 ºC ก่อนการวิเคราะห์ (ภาพที่ 16)

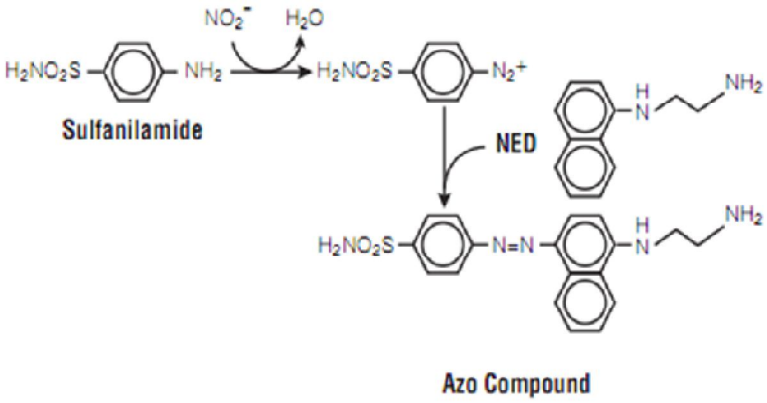
การเก็บน้ำไขข้อและเยื่อหุ้มข้อ

เก็บน้ำไขข้อและเยื่อหุ้มข้อในระหว่างที่ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข้าเทียมซึ่งต้องผ่าตัดเปิดข้อเข่าเพื่อใส่อุปกรณ์ข้อเทียมอยู่แล้วและทำการเก็บน้ำไขข้อและเยื่อหุ้มข้อ (ซึ่งปกติถูกกำจัดทิ้ง) มาทำการวิจัย ผู้วิจัยไม่ได้ทำการเจาะข้อเข่าผู้ป่วยเพิ่มเติมเพื่อเอาน้ำไขข้อและเยื่อหุ้มข้อ ปริมาณน้ำไขข้อที่เก็บประมาณ 3 มิลลิลิตร ใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง เก็บตัวอย่างโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาที แยกส่วนที่เป็นน้ำไขข้อเก็บที่ -80°C ก่อนการวิเคราะห์ และเยื่อหุ้มข้อจัดเก็บโดยตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดประมาณ 3 ตารางมิลลิเมตร หลังจากนั้นนำไปเก็บที่ -80 ºC ก่อนการวิเคราะห์ (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 วิธีการเก็บตัวอย่าง

การตรวจวัดระดับไนไตรต์

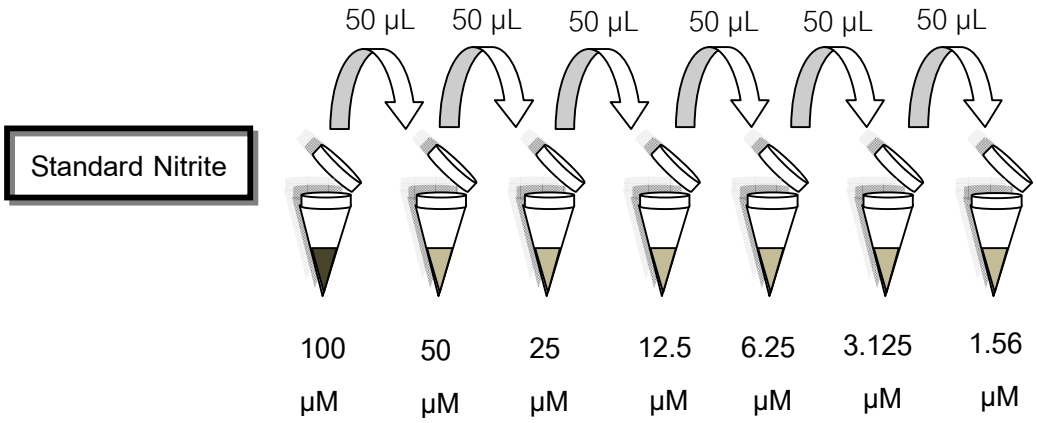


ภาพที่ 17 หลักการการตรวจวัดไนไตรต์ [67]

สามารถตรวจวัดระดับไนไตรต์ (total NO_2^-/NO_3^-) ได้โดยวิธีของ Griess ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีของ Sulfanilamide และ N-1-napthylenediamine dihydrochloride (NED) ในสภาวะกรด ทำให้เกิด azo compound (ภาพที่ 17) หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร [67]

1. ตั้งสารละลาย sulfanilamide และ NED ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 15-30 นาที

2. เติมสิ่งตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานของไนไตรต์ที่ผ่านการทำเป็น serial dilution ตามความเข้มข้นจากมากไปน้อย (100 µM – 1.56 µM) ดังแสดงในภาพที่ 18 ปริมาตร 50 µl ลงใน 96-well plates



ภาพที่ 18 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐานไนไตรต์

3. ใช้ multichannel pipette เติมสารละลาย sulfanilamide ปริมาตร 50 µl ลงใน 96-well plates

4. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยปราศจากแสงแดด เป็นเวลา 5-10 นาที

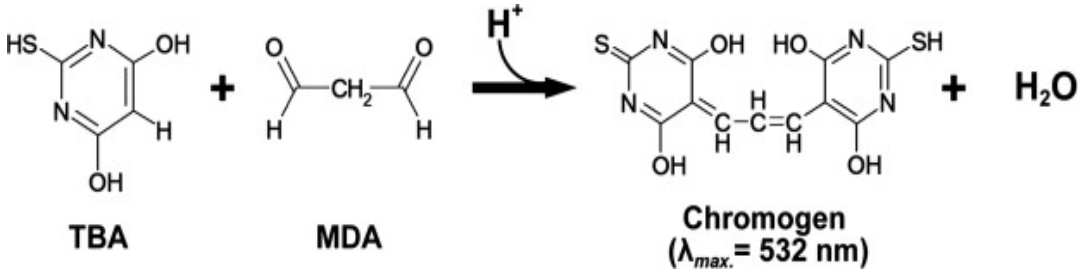
5. ใช้ multichannel pipette เติมสารละลาย NED ปริมาตร 50 µl ลงใน 96-well plates

6. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยปราศจากแสงแดด เป็นเวลา 5-10 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงสารละลายเริ่มเปลี่ยนเป็นสีม่วง

7. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ภายใน 30 นาที

8. นำค่าการดูดกลืนแสงของสิ่งตัวอย่างที่วัดได้มาคำนวณความเข้มข้นของไนไตรต์ โดยเปรียบเทียบจากสมการของกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายไนไตรต์ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับค่าการดูดกลืนแสง

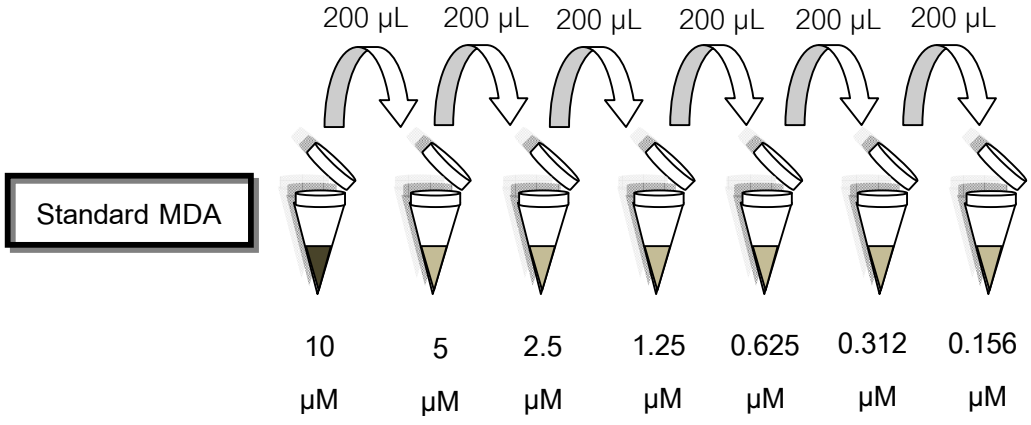
การตรวจวัดระดับ Malondialdehyde (MDA)



ภาพที่ 19 หลักการการตรวจวัด malondialdehyde (MDA) [68]

สามารถตรวจวัดโดยวิธี Thiobarbituric acid method โดยการเติม thiobarbituric acid ลงในสิ่งตัวอย่างในสภาวะกรด ซึ่งสาร malondialdehyde จะทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid ได้สารสีชมพู เรียกว่า MDA-TBA adduct (ภาพที่ 19) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร [69]

1. เตรียมสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) 15% W/V
2. เตรียมสารละลาย 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) 3.3 mM
3. เตรียมสารละลาย thiobarbituric acid (TBA) 0.67% W/V
4. เตรียมสารละลายมาตรฐาน malondialdehyde ที่ผ่านการทำ serial dilution ตามความเข้มข้นจากมากไปน้อย (10 µM – 0.156 µM) ดังแสดงในภาพที่ 20 ปริมาตร 200 µl ใส่ลง microtube



ภาพที่ 20 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน malondialdehyde

5. เตรียมสิ่งตัวอย่าง ปริมาตร 200 µl ใส่ลง microtube

6. เติมสารละลายในข้อ 1 ปริมาตร 400 µl และสารละลายในข้อ 2 ปริมาตร 40 µl ลงใน microtube

7. ปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C เป็นระยะเวลา 3 นาที

8. ดูดส่วนใสของ supernatant ใน microtube หลังจากตกตะกอนโปรตีน ปริมาตร 400 µl ใส่ microtube ใหม่

9. เติมสารละลายในข้อ 3 ปริมาตร 400 µl ลงใน microtube

10. นำ microtube ไปให้ความร้อนด้วย dry bath 95 °C เป็นระยะเวลา 10 นาที

11. ปล่อยให้สารละลายเย็น ที่อุณหภูมิห้อง ใช้ระยะเวลาประมาณ 10 นาที

12. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร

13. นำค่าการดูดกลืนแสงของสิ่งตัวอย่างที่วัดได้มาคำนวณความเข้มข้นของ malondialdehyde โดยเปรียบเทียบจากสมการของกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย malondialdehyde ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับค่าการดูดกลืนแสง

การตรวจวัดระดับของวิตามินอี (α-tocopherol)

สามารถตรวจวัดโดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เตรียมสิ่งตัวอย่างโดยการสกัดด้วยเอทานอล (ethanol) และเฮกเซน (hexane) จากนั้นทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ทำการละลายอีกครั้งด้วยเมทานอล ฉีดสิ่งตัวอย่างใส่เครื่อง HPLC ตรวจวัดโครมาโทแกรมที่ความยาวคลื่น 292 นาโนเมตร [70]

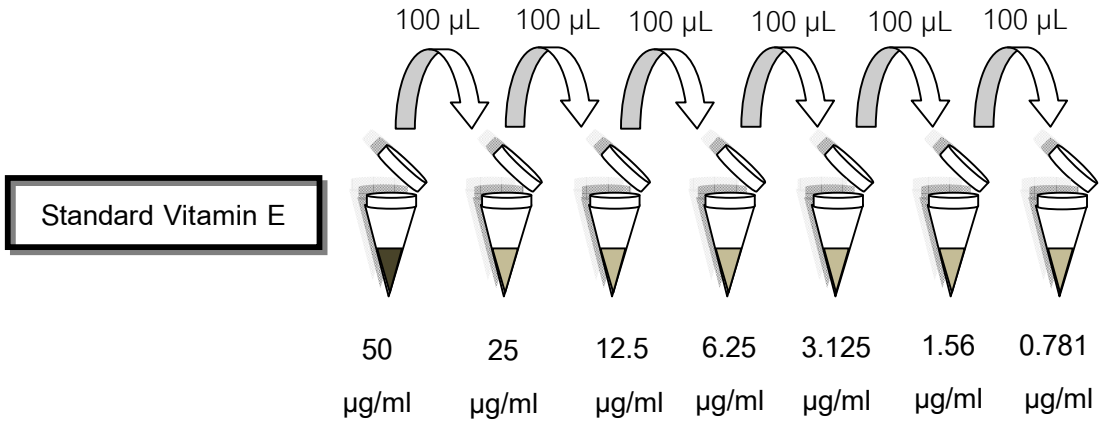
<u>การสกัดสิ่งตัวอย่าง</u>

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานของ α-tocopherol ที่ผ่านการทำ serial dilution ตามความเข้มข้นจากมากไปน้อย (50 µg/ml – 0.781 µg/ml) ดังแสดงในภาพที่ 21

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานภายใน โดยใช้ α-tocopherol acetate ที่ความเข้มข้น 25 µg/ml

3. เติมสิ่งตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 100 µl ลงใน mitrotube

4. เติมสารละลายมาตรฐานภายใน ปริมาตร 50 µl ลงใน microtube ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที



ภาพที่ 21 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี

5. เติมเอทานอล ปริมาตร 100 µl ลงใน microtube แล้วนำไป vortex 15 วินาที

6. เติมเฮกเซน ปริมาตร 200 µl ลงใน microtube แล้วนำไปใส่ over head shaker 10 นาที

7. ปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 นาที

8. ดูดส่วนใสด้านบนของเฮกเซนใส่ microtube ใหม่ นำไปเป่าให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ประมาณ 5 นาที

9. ละลายตะกอนที่ก้น microtube ด้วยเมทานอล ปริมาตร 150 µl จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที

10. ปิเปตส่วนใสด้านบนปริมาตร 100 µl ใส่ insert ใน vial สีชา เตรียม inject เข้าเครื่อง HPLC

<u>การตรวจวัด α-tocopherol ด้วยเครื่อง HPLC</u>

1. สภาวะสำหรับตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC

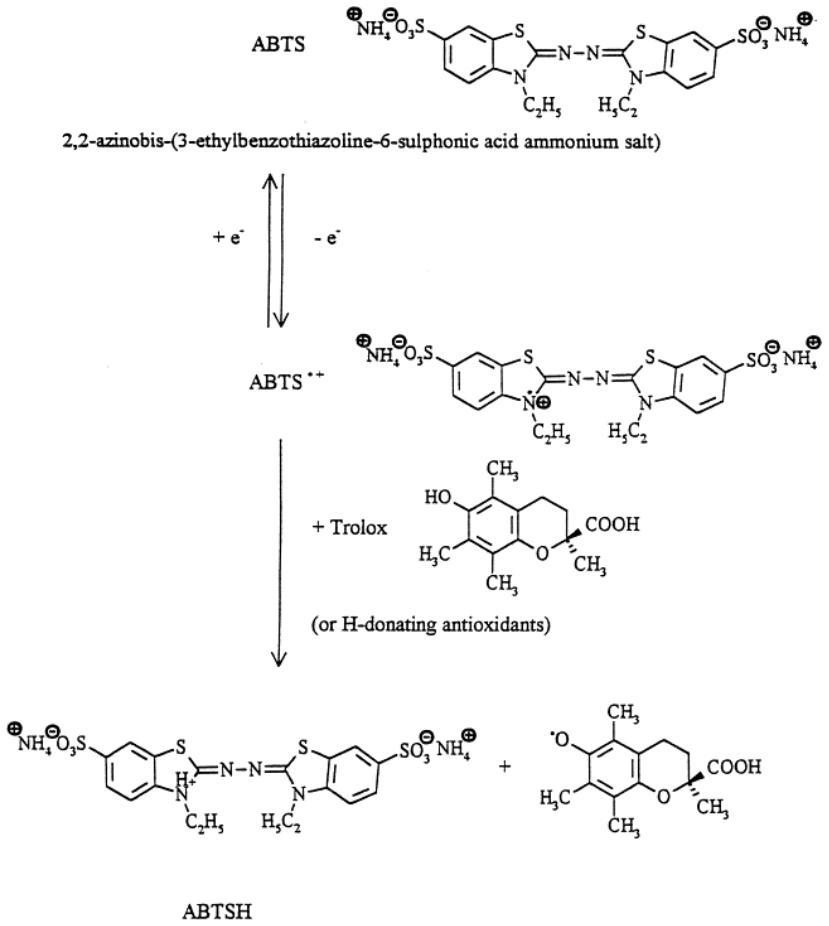
- stainless steel column C18, (4.6 mm × 150 mm)
- mobile phase: isocratic methanol/water (98:2, v/v)
- injection volume 30 µl
- flow rate 1.5 ml ต่อนาที
- retention time ของ α-tocopherol 9.5 นาที
- retention time ของ α-tocopherol acetate 13.7 นาที

- UV-detector ที่ความยาวคลื่น 292 นาโนเมตร

2. นำสัดส่วนพื้นที่ใต้กราฟหรือโครมาโทแกรมของ α-tocopherol ต่อ α-tocopherol acetate ในแต่ละความเข้มข้นของวิตามินอีมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายวิตามินอี

3. นำสัดส่วนพื้นที่ใต้กราฟหรือโครมาโทแกรมของ α-tocopherol ต่อ α-tocopherol acetate ในแต่ละสิ่งตัวอย่างที่ได้มาคำนวณความเข้มข้นของวิตามินอีโดยเปรียบเทียบจากสมการของกราฟมาตรฐานของวิตามินอี

การตรวจวัดระดับ Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)



ภาพที่ 22 หลักการการตรวจวัด trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) [71]

การตรวจวัดระดับ total antioxidant capacity นิยมใช้วิธี trolox equivalent antioxidant capacity assay (TEAC) โดยอาศัยหลักการที่สาร 2, 2 - azinobis (3-

ethylbenzothiazoline - 6 - sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) ทำปฏิกิริยากับ potassium persulfate ($K_2S_2O_4$) เกิดเป็น $ABTS^+$ ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระ มีสีเขียวเข้ม (ภาพที่ 22) ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับได้เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระ โดยจะเปลี่ยนจากสารสีเขียวเข้มเป็นสารไม่มีสี จากนั้นนำค่าที่อ่านได้มาหาค่าจากกราฟมาตรฐานของ trolox เพื่อหาค่า trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) [72]

1. เตรียมสารละลาย 7 mM ABTS

2. เตรียมสารละลาย 2.45 mM $K_2S_2O_4$

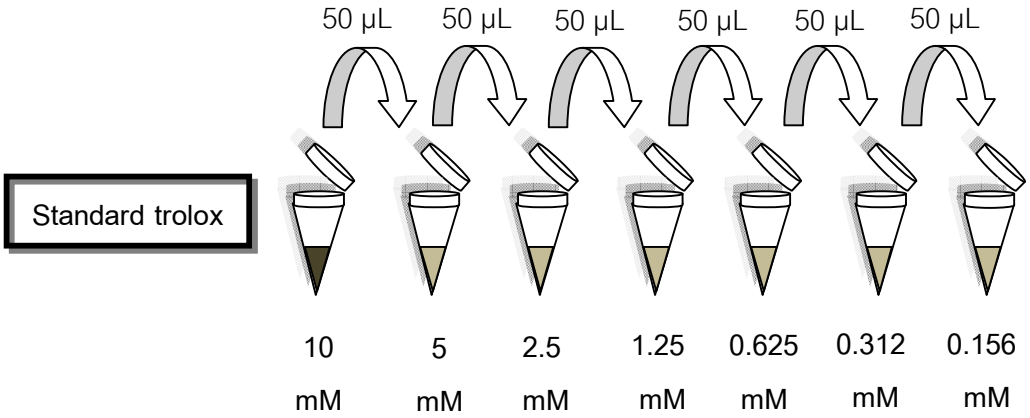
3. เตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox ที่ผ่านการทำ serial dilution ตามความเข้มข้นจากมากไปน้อย (10 mM – 0.156 mM) ดังแสดงในภาพที่ 23 ปริมาตร 50 µl เติมลง microtube

4. ผสมสารละลาย 7 mM ABTS และ $K_2S_2O_4$ ด้วยอัตราส่วน 1:1 จากนั้นเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อให้ ABTS เปลี่ยนเป็น $ABTS^+$

5. เติมสารละลายมาตรฐาน trolox ในแต่ละความเข้มข้นหรือสิ่งตัวอย่าง ปริมาตร 5 µl ลงใน 96-well plates (กำหนด control คือ สารละลาย $ABTS^+$ + PBS)

6. เติมสารทดสอบ $ABTS^+$ ปริมาณ 95 µl

7. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยปราศจากแสงแดด เป็นเวลา 6 นาที

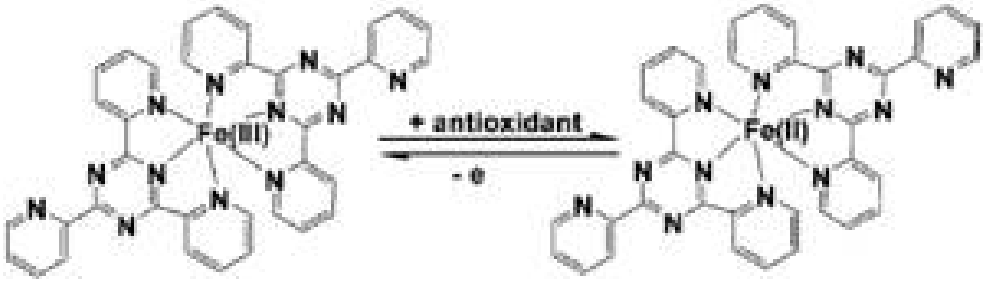


ภาพที่ 23 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน trolox

8. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

9. นำค่าการดูดกลืนแสงของสิ่งตัวอย่างที่วัดได้มาคำนวณความเข้มข้นของ TEAC โดยเปรียบเทียบจากสมการของกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย trolox ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับค่าการดูดกลืนแสง

การตรวจวัดระดับ Ferric reducing antioxidant power (FRAP)



ภาพที่ 24 หลักการการตรวจวัด ferric reducing antioxidant power (FRAP) [73]

หลักการ ferric reducing antioxidant power (FRAP) อาศัยการวัดความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในสิ่งตัวอย่าง กล่าวคือเมื่อ ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+}-TPTZ) complex ซึ่งเป็นสารละลายไม่มีสี เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระในสิ่งตัวอย่างจะเปลี่ยนแปลงเป็น ferrous tripyridyl-s-triazine (Fe^{2+}-TPTZ) complex ซึ่งเป็นสารละลายสีม่วงน้ำเงิน ดังนั้นถ้าสารตัวอย่างมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง ทำให้เกิด Fe^{2+}-TPTZ มาก ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรจึงมีค่ามากด้วย เมื่อวัดการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นแล้วนำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน ferrous sulfate ($FeSO_4$) [74] (ภาพที่ 24)

1. เตรียมสารละลาย FRAP

1.1 เตรียม sodium acetate buffer solution (0.3 M, pH 3.6)

ชั่งสาร sodium acetate trihydrate 0.15 g ละลายใน acetic acid ปริมาตร 800 µl แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 50 ml

1.2 เตรียม 10 mM 2, 4, 6-tripyridyl-S-triazine (TPTZ)

ชั่งสาร 2, 4, 6-tripyridyl-S-triazine (TPTZ) 31.2 mg ละลายใน 40 mM HCl (37% HCl 123 µl ในน้ำกลั่น 100 ml) 10 ml

1.3 เตรียม 20 mM $FeCl_3$

ชั่งสาร $FeCl_3$ 54 mg เติมน้ำกลั่น 10 ml

1.4 ผสมสารข้อ 1.1-1.3 โดยใช้อัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ

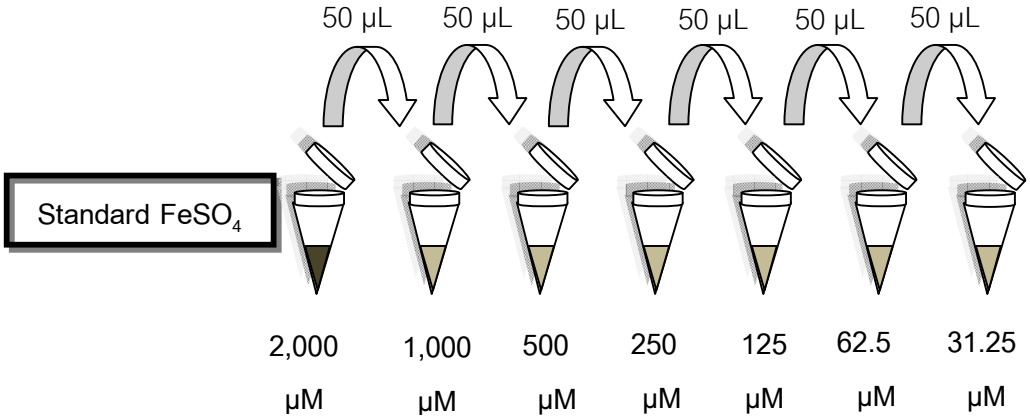
2. เตรียมสารมาตรฐาน $FeSO_4$ ที่ผ่านการทำ serial dilution ตามความเข้มข้นจากมากไปน้อย (2,000 µM – 31.25 µM) ดังแสดงในภาพที่ 25 ปริมาตร 50 µl ใส่ลง microtube

3. เติมสารละลายมาตรฐาน $FeSO_4$ ในแต่ละความเข้มข้น หรือสิ่งตัวอย่าง ปริมาตร 10 µl ลงใน 96-well plates

4. เติมสารละลาย FRAP ในข้อ 1.4 ปริมาตร 190 µl ลงใน 96-well plates

5. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยปราศจากแสงแดด เป็นเวลา 30 นาที

6. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร



ภาพที่ 25 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน $FeSO_4$

7. นำค่าการดูดกลืนแสงของสิ่งตัวอย่างที่วัดได้มาคำนวณความเข้มข้นของ FRAP โดยเปรียบเทียบจากสมการของกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย $FeSO_4$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับค่าการดูดกลืนแสง

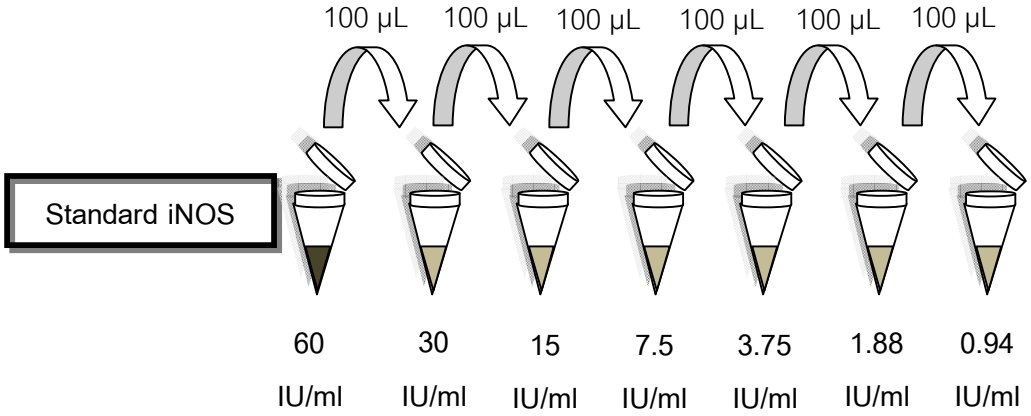
การตรวจวัดระดับ iNOS (ELISA)

การตรวจวัดระดับ iNOS ในเลือดและน้ำไขข้อของกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดใช้ human inducible nitric oxide synthase (iNOS) ELISA kit (Cusabio, USA) โดยใช้หลักการ avidin-biotin ELISA

1. นำ Human inducible nitric oxide synthase (iNOS) ELISA kit ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15-30 นาที

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานของ iNOS ที่ผ่านการทำ serial dilution ตามความเข้มข้นจากมากไปน้อย (60 IU/ml - 0.94 IU/ml) ดังแสดงในภาพที่ 26 ปริมาตร 100 µl ใส่ลง microtube

3. เติมสารตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน iNOS แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 100 µl ลงใน coated plates นำไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง



ภาพที่ 26 การทำ serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน iNOS

4. เทส่วนของเหลวใน coated plates ออก โดยไม่ล้าง coated plates

5. เติมสารละลาย biotin-antibody ปริมาตร 100 µl ลงใน coated plates นำไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6. เทของเหลวใน coated plates ออก และเติมสารละลาย wash buffer ปริมาตร 200 µl ลงใน coated plated ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทสารละลายทิ้ง โดยเทสารละลายออกให้หมดและซับลงในกระดาษชำระที่สะอาด ล้าง coated plates จำนวน 3 รอบ รอบสุดท้ายต้องเทสารละลายให้หมด เนื่องจากสารละลายที่เหลือค้างอยู่อาจไปรบกวนการตรวจวัดได้

7. เติมสารละลาย HRP-avidin ปริมาตร 100 µl ลงใน coated plates นำไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

8. เทของเหลวใน coated plates ออก และเติมสารละลาย wash buffer ปริมาตร 200 µl ลงใน coated plated ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทสารละลายทิ้ง โดยเทสารละลายออกให้หมดและซับลงในกระดาษชำระที่สะอาด ล้าง coated plates จำนวน 5 รอบ รอบสุดท้ายต้องเทสารละลายให้หมด เนื่องจากสารละลายที่เหลือค้างอยู่อาจไปรบกวนการตรวจวัดได้

9. เติมสารละลาย TMB substrate ปริมาตร 90 µl ลงใน coated plates นำไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 10-30 นาที

10. เติมสารละลาย stop solution ปริมาตร 50 µl ลงใน coated plates เพื่อหยุดปฏิกิริยา

11. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ภายใน 30 นาที

12. นำค่าการดูดกลืนแสงของสิ่งตัวอย่างที่วัดได้มาคำนวณความเข้มข้นของ iNOS โดยเปรียบเทียบจากสมการของกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย iNOS ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับค่าการดูดกลืนแสง

การย้อมชิ้นเนื้อด้วยแอนติบอดีต่อไนโตรไทโรซีน (3-nitrotyrosine)

สามารถตรวจวัด 3-nitrotyrosine ในเยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมโดยอาศัยหลักการ immunohistochemistry โดยใช้ anti-nitrotyrosine antibody เป็น primary antibody และใช้ goat anti-mouse/anti-rabbit immunoglobulins ซึ่ง conjugate กับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) เป็น secondary antibody แล้วจึงตรวจวัด immunolabelling โดยใช้ diaminobenzidine (DAB, 0.02%) และ H_2O_2 (0.006%)

1. นำชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มข้อใส fix ในฟอร์มาลีน

2. นำชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มข้อใส่ใน molds โดยเลือก molds ให้มีขนาดเหมาะสมกับชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มข้อ หลังจากนั้นหยด paraffin ลงใน molds พอให้ท่วมชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มข้อ

3. เมื่อบล็อกเย็น จึงแกะบล็อกที่มีชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มข้อออกจาก molds

4. เตรียมเครื่องตัดชิ้นเนื้อให้พร้อมใช้งาน โดยตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มข้อให้มีขนาด 4 µm

5. นำ paraffin section ของเนื้อเยื่อหุ้มข้อที่สมบูรณ์มาไว้บนสไลด์

6. กำจัด paraffin ออกจากเนื้อเยื่อหุ้มข้อ โดยอาศัย toluene แล้วจึงทำการ rehydrated ในเอทานอลและน้ำ

7. เติม rabbit polyclonal anti-nitrotyrosine antibody 0.5 µg/ml ลงบน section ของเนื้อเยื่อหุ้มข้อ แล้วนำไป incubate ที่ 4°C เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง

8. ล้าง section ของเนื้อเยื่อหุ้มข้อด้วย PBS จากนั้นเติม Dako envision peroxidase ซึ่ง conjugate กับ anti-rabbit immunoglobulins ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 30 นาที

9. เติม diaminobenzidine (DAB) 0.02% และ H_2O_2 0.006% ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 10 นาที

10. ล้าง section ของเนื้อเยื่อหุ้มข้อด้วย PBS แล้วจึงทำการตรวจวัดการย้อมติดสีของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์

การย้อมชิ้นเนื้อด้วยฮีมาทอกไซลีนและอีโอซิน (hematoxylin and eosin, H&E)

การย้อมสี hematoxylin and eosin อาศัยฤทธิ์ ความเป็นกรดด่างของเซลล์ โดยที่สี hematoxylin มีฤทธิ์ เป็นด่าง เรียกว่าbasophilic staining และ eosin มีฤทธิ์ เป็นกรด เรียกว่า acidophilic staining โดยนิวเคลียสของเซลล์จะติดสีน้ำเงิน ในขณะที่ไซโทพลาซึมติดสีแดง

1. ละลาย paraffin ในสไลด์เนื้อเยื่อ โดยนำสไลด์ไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลาประมาณ 30 นาที

2. นำสไลด์ไปแช่ xylene และทำการ rehydration โดยแช่ในเอทานอลตั้งแต่ความเข้มข้นเอนทานอล 100 % จนถึงเอทานอล 95 %

3. ล้างสไลด์โดยให้น้ำไหลผ่าน เป็นเวลาประมาณ 5 นาที

4. ย้อมสไลด์ด้วยสี hematoxylin เป็นเวลาประมาณ 5 นาที

5. ล้างสไลด์โดยให้น้ำไหลผ่าน เป็นเวลาประมาณ 15 นาที

6. ย้อมสไลด์ด้วยสี eosin เป็นเวลาประมาณ 1 นาที

7. นำสไลด์มาทำการ dehydration โดยแช่ในเอทานอลตั้งแต่ความเข้มข้นเอนทานอล 95% จนถึงเอทานอล 100%

8. แช่สไลด์ใน xylene เป็นเวลาประมาณ 8 นาที เพื่อกำจัดเอทานอล

9. ปิดสไลด์ด้วย coverslip แล้วจึงทำการตรวจวัดการย้อมติดสี H&E ของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยสถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistic) โดยนำเสนอข้อมูลด้วยค่าเฉลี่ย (mean) ± standard error of the mean (S.E.M) ในรูปแบบตารางและแผนภูมิแท่ง การเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลโดยใช้สถิติทดสอบดังต่อไปนี้

- Student's *t*-test ใช้สำหรับเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ 2 กลุ่มตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกัน
- Paired *t*-test ใช้สำหรับเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างก่อนและหลังได้รับการเสริมวิตามินอี
- One way ANOVA test ใช้สำหรับเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่มีมากกว่า 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน แล้วทดสอบด้วย post hoc range test โดยใช้ tukey's HSD

โปรแกรมทางสถิติที่ใช้ คือ IBM SPSS Statistics version 19 และกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$)

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษานี้มีกลุ่มประชากรตัวอย่าง 3 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มควบคุมซึ่งเป็นคนปกติที่มีสุขภาพดี (healthy controls) 35 ราย
2. กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี (OA without VE) 35 ราย
3. กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี (OA with VE) 31 ราย

ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างได้แสดงและเปรียบเทียบไว้ในตารางที่ 3

1. เพศ
   - กลุ่มควบคุมซึ่งเป็นคนปกติที่มีสุขภาพดี สัดส่วนเพศชายคิดเป็น 31.43% และเพศหญิงคิดเป็น 68.57% หรืออัตราส่วนระเหว่างเพศชายต่อเพศหญิงเท่ากับ 11/24
   - กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี สัดส่วนเพศชายคิดเป็น 25.72% และเพศหญิงคิดเป็น 74.28% หรืออัตราส่วนระหว่างเพศชายต่อเพศหญิงเท่ากับ 9/26
   - กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี สัดส่วนเพศชายคิดเป็น 6.45% และเพศหญิงคิดเป็น 93.55% หรืออัตราส่วนระหว่างเพศชายต่อเพศหญิงเท่ากับ 2/29

   เมื่อทำการเปรียบเทียบทางสถิติระหว่าง 3 กลุ่ม พบว่าอัตราส่วนระหว่างเพศชายต่อเพศหญิงในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีต่ำกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีและผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (2/29 กับ 11/24, $P = 0.011$ และ 2/29 กับ 9/26, $P = 0.036$ ตามลำดับ)

2. อายุ

- กลุ่มควบคุมซึ่งเป็นคนปกติที่มีสุขภาพดี มีอายุเฉลี่ย 62.6 ± 1.2 ปี
- กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี มีอายุเฉลี่ย 69.2 ± 1.3 ปี
- กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี มีอายุเฉลี่ย 69.5 ± 1.3 ปี

เมื่อทำการเปรียบเทียบทางสถิติระหว่าง 3 กลุ่ม พบว่าอายุเฉลี่ยของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีและกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีสูงกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (69.2 ± 1.3 ปี กับ 62.6 ± 1.2 ปี, $P < 0.001$ และ 69.5 ± 1.3 ปี กับ 62.6 ± 1.2 ปี, $P < 0.001$ ตามลำดับ)

3. น้ำหนัก

- กลุ่มควบคุมซึ่งเป็นคนปกติที่มีสุขภาพดี มีน้ำหนักเฉลี่ย 59.2 ± 1.7 กิโลกรัม
- กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี มีน้ำหนักเฉลี่ย 63.9 ± 1.6 กิโลกรัม
- กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี มีน้ำหนักเฉลี่ย 60.1 ± 2.0 กิโลกรัม

เมื่อทำการเปรียบเทียบทางสถิติระหว่าง 3 กลุ่ม พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีและกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีสูงกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (63.9 ± 1.6 กิโลกรัม กับ 59.2 ± 1.7 กิโลกรัม, $P = 0.120$ และ 60.1 ± 2.0 กิโลกรัม กับ 59.2 ± 1.7 กิโลกรัม, $P = 0.936$ ตามลำดับ)

4. ส่วนสูง
   - กลุ่มควบคุมซึ่งเป็นคนปกติที่มีสุขภาพดี มีส่วนสูงเฉลี่ย 158.5 ± 1.3 เซนติเมตร
   - กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี มีส่วนสูงเฉลี่ย 155.1 ± 1.3 เซนติเมตร
   - กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี มีส่วนสูงเฉลี่ย 154.8 ± 1.2 เซนติเมตร

   เมื่อทำการเปรียบเทียบทางสถิติระหว่าง 3 กลุ่ม พบว่าส่วนสูงเฉลี่ยของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีและกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีต่ำกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (155.1 ± 1.3 เซนติเมตร กับ 158.5 ± 1.3 เซนติเมตร, P = 0.127 และ 154.8 ± 1.2เซนติเมตร กับ 158.5 ± 1.3 เซนติเมตร, P = 0.113 ตามลำดับ)

5. ดัชนีมวลกาย (Body mass index; BMI)
   - กลุ่มควบคุมซึ่งเป็นคนปกติที่มีสุขภาพดี มีดัชนีมวลกายเฉลี่ย 23.5 ± 0.5 กิโลกรัมต่อเมตร^2 (kg/m^2)
   - กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี มีดัชนีมวลกายเฉลี่ย 26.6 ± 0.6 กิโลกรัมต่อเมตร^2 (kg/m^2)
   - กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี มีดัชนีมวลกายเฉลี่ย 25.0 ± 0.4 กิโลกรัมต่อเมตร^2 (kg/m^2)

   เมื่อทำการเปรียบเทียบทางสถิติระหว่าง 3 กลุ่ม พบว่าดัชนีมวลกายเฉลี่ยของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีสูงกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (26.6 ± 0.6 กิโลกรัมต่อเมตร^2 กับ 23.5 ± 0.5 กิโลกรัมต่อเมตร^2, P < 0.001)

ตารางที่ 3 ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่าง (mean ± S.E.M.)

Parameters	Healthy controls (n = 35)	OA patients without vitamin E supplementation (n = 35)	OA patients with vitamin E supplementation (n = 31)
Age (years)	62.6 ± 1.2	69.2 ± 1.3*	69.5 ± 1.3*
Weight (kg)	59.2 ± 1.7	63.9 ± 1.6	60.1 ± 2.0
Height (cm)	158.5 ± 1.3	155.1 ± 1.3	154.8 ± 1.2
BMI (kg/m^2)	23.5 ± 0.5	26.6 ± 0.6*	25.0 ± 0.4
Male/Female	11/24	9/26	2/29*†

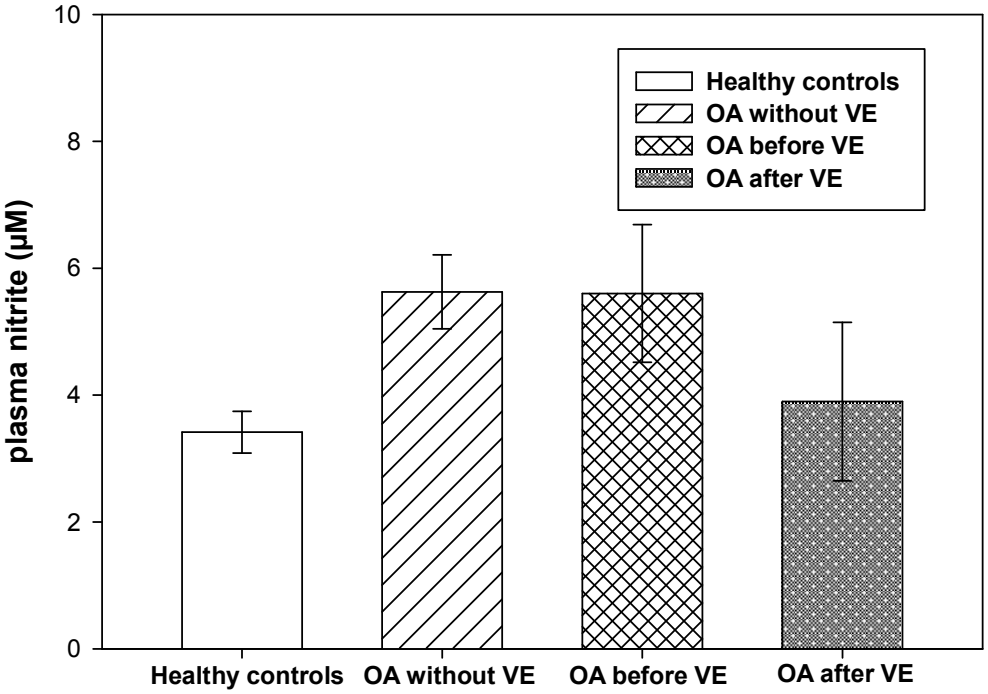
* $P < 0.05$ ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี

† $P < 0.05$ ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี

ผลการวิเคราะห์ระดับไนไตรต์ในเลือด

ผลการวิเคราะห์ระดับไนไตรต์ในเลือดพบว่าระดับไนไตรต์ในเลือดของกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีจำนวน 35 ราย มีค่าเท่ากับ 3.415 ± 0.330 μM ระดับไนไตรต์ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีจำนวน 35 ราย มีค่าเท่ากับ 5.628 ± 0.584 μM และระดับไนไตรต์ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีก่อนและหลังได้รับการเสริมวิตามินอีเป็นระยะเวลา 2 เดือน จำนวน 31 ราย มีค่าเท่ากับ 5.602 ± 1.085 μM และ 3.898 ± 1.248 μM ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบทางสถิติระหว่าง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพ กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนได้รับการเสริมวิตามินอี พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับวิตามินอีและกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนได้รับวิตามินอีมีระดับไนไตรต์สูงกว่ากลุ่มคนปกติแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (5.628 ± 0.584 μM กับ 3.415 ± 0.330 μM, P = 0.065 และ 5.602 ± 1.085 μM กับ 3.415 ± 0.330 μM, P = 0.081 ตามลำดับ) โดยมีระดับเพิ่มขึ้นร้อยละ 64.8 และ 64.0 ตามลำดับ

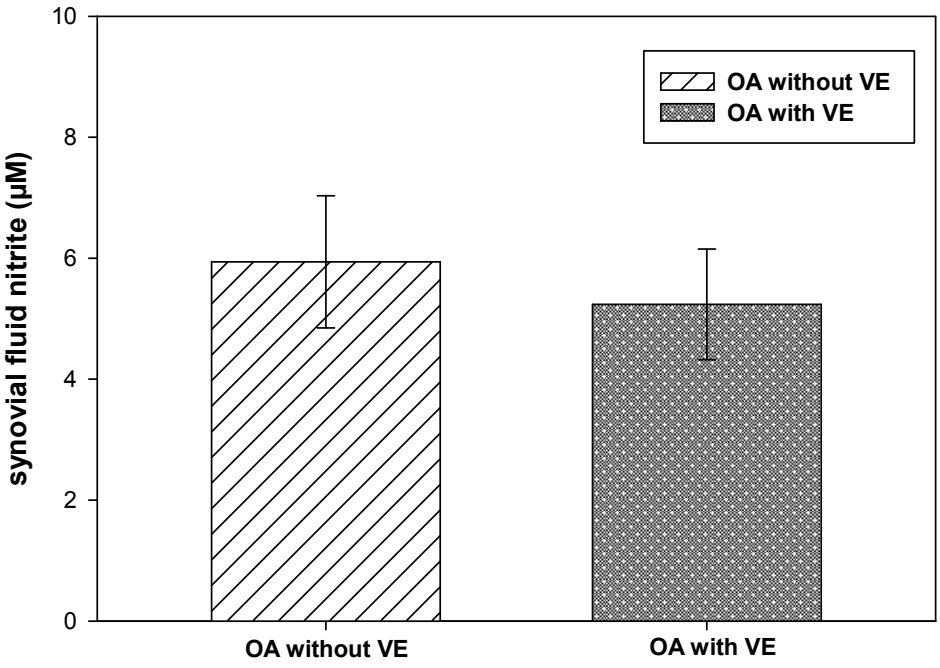
เมื่อเปรียบเทียบระดับไนไตรต์ในเลือดระหว่างก่อนและหลังการเสริมวิตามินอีเป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่าหลังการเสริมวิตามินอีผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีระดับไนไตรต์ลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (3.898 ± 1.248 μM กับ 5.602 ± 1.085 μM, P = 0.171) โดยมีระดับลดลงร้อยละ 30.4 และผลการวิเคราะห์ทางสถิติของระดับไนไตรต์ในเลือดหลังการเสริมวิตามินอีครบระยะเวลา 2 เดือน เปรียบเทียบกับระดับไนไตรต์ในเลือดของคนปกติที่มีสุขภาพดี พบว่าระดับไนไตรต์ในเลือดหลังการเสริมวิตามินอีสูงกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (3.898 ± 1.248 μM กับ 3.415 ± 0.330 μM, P = 0.695) (ภาพที่ 27)



ภาพที่ 27 แผนภูมิแท่งแสดงระดับไนไตรต์ในเลือดของกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี (healthy controls) กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patient without vitamin E supplementation, OA without VE) และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีก่อนและหลังได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patients before and after vitamin E supplementation, OA before VE and OA after VE)

ผลการวิเคราะห์ระดับไนไตรต์ในน้ำไขข้อ

ผลการวิเคราะห์ระดับไนไตรต์ในน้ำไขข้อพบว่าระดับไนไตรต์ในน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีจำนวน 35 ราย มีค่าเท่ากับ 5.941 ± 1.091 μM และระดับไนไตรต์ในน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีจำนวน 31 ราย มีค่าเท่ากับ 5.237 ± 0.914 μM เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่าง 2 กลุ่ม พบว่าในผู้ป่วยที่ได้รับการเสริมวิตามินอีเป็นระยะเวลา 2 เดือน มีระดับไนไตรต์ต่ำกว่าผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (5.941 ± 1.091 μM กับ 5.237 ± 0.914 μM, P = 0.623) (ภาพที่ 28) โดยมีระดับลดลงร้อยละ 11.8

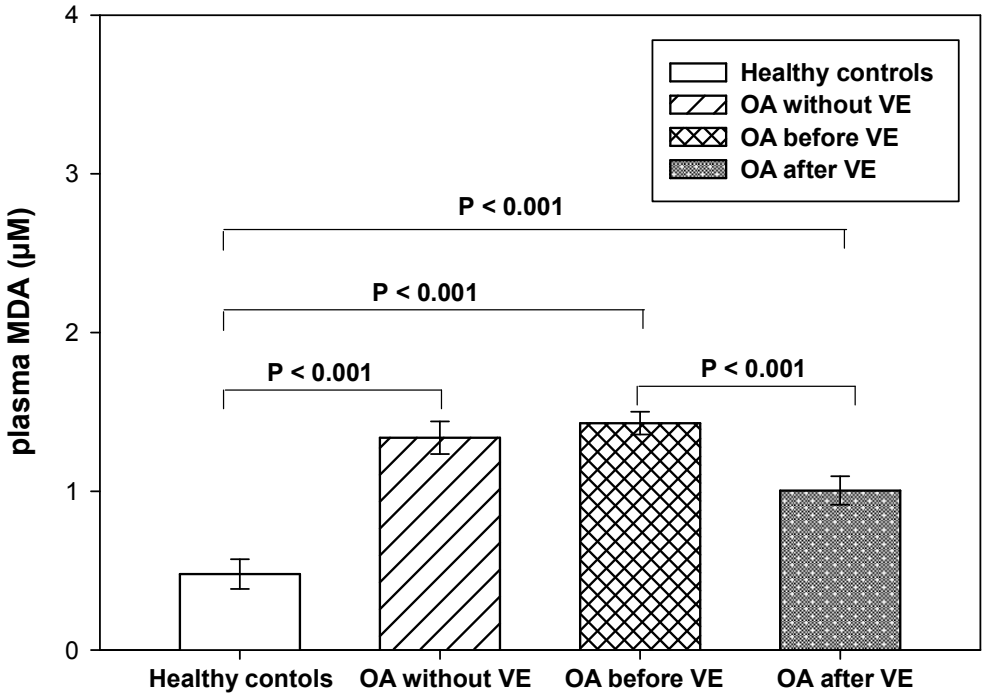


ภาพที่ 28 แผนภูมิแท่งแสดงระดับไนไตรต์ในน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patient without vitamin E supplementation, OA without VE) และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patients with vitamin E supplementation, OA with VE)

ผลการวิเคราะห์ระดับ malondialdehyde (MDA) ในเลือด

ผลการวิเคราะห์ระดับ malondialdehyde ในเลือดพบว่าระดับ malondialdehyde ในเลือดของกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีจำนวน 35 ราย มีค่าเท่ากับ 0.478 ± 0.094 μM ระดับ malondialdehyde ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีจำนวน 35 ราย มีค่าเท่ากับ 1.334 ± 0.103 μM และระดับ malondialdehyde ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีก่อนและหลังได้รับการเสริมวิตามินอีเป็นระยะเวลา 2 เดือน จำนวน 31 รายมีค่าเท่ากับ 1.429 ± 0.072 μM และ 1.004 ± 0.090 μM ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่าง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพ กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนได้รับการเสริมวิตามินอี พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีและกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนได้รับการเสริมวิตามินอีมีระดับ malondialdehyde สูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (1.334 ± 0.103 μM กับ 0.478 ± 0.094 μM, $P < 0.001$ และ 1.429 ± 0. 072 μM กับ 0.478 ± 0.094 μM, $P < 0.001$ ตามลำดับ) โดยมีระดับเพิ่มขึ้นร้อยละ 179.8 และ 198.9 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบระดับ malondialdehyde ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีกับกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนได้รับการเสริมวิตามินอีพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (1.334 ± 0.103 μM กับ 1.429 ± 0. 072 μM, $P = 0.767$)

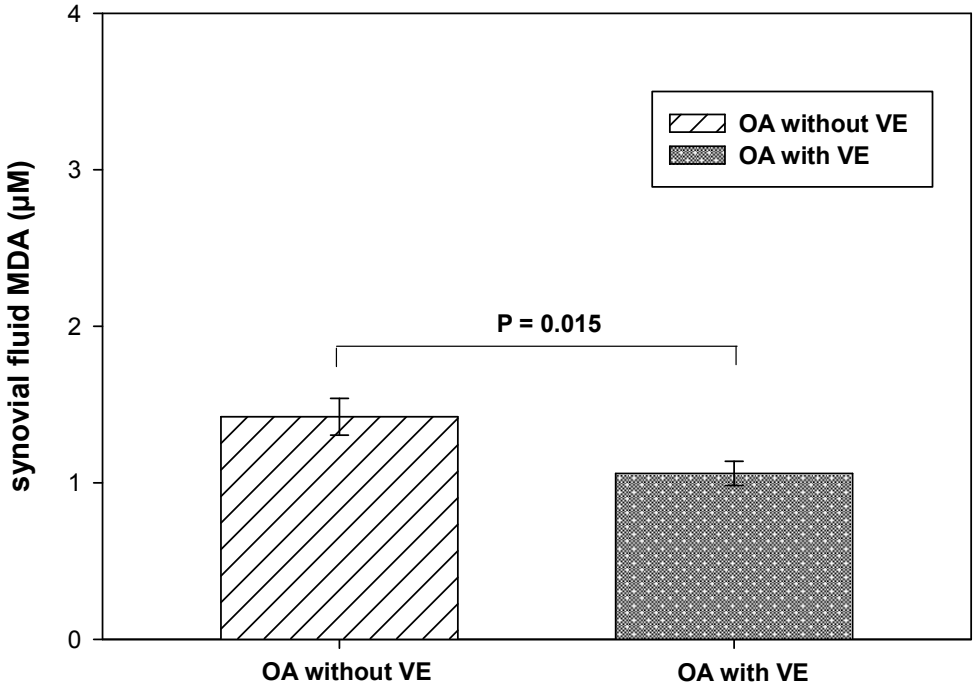
ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของระดับ malondialdehyde ในเลือดระหว่างก่อนและหลังการเสริมวิตามินอีเป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่าหลังการเสริมวิตามินอีผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีระดับ malondialdehyde ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับระดับ malondialdehyde ในเลือดก่อนการเสริมวิตามินอี จาก 1.429 ± 0. 072 μM เมื่อก่อนได้รับการเสริมวิตามินอี ลดลงเป็น 1.004 ± 0.090 μM เมื่อครบระยะเวลา 2 เดือน ภายหลังการเสริมวิตามินอี โดยมีระดับลดลงร้อยละ 29.7 และผลการเปรียบเทียบข้อมูลทางสถิติของระดับ malondialdehyde ในเลือดหลังการเสริมวิตามินอีครบระยะเวลา 2 เดือนกับระดับ malondialdehyde ในเลือดของคนปกติที่มีสุขภาพดี พบว่าระดับ malondialdehyde ในเลือดหลังการเสริมวิตามินอีสูงกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (1.004 ± 0.090 μM กับ 0.478 ± 0.094 μM, $P < 0.001$) (ภาพที่ 29)



ภาพที่ 29 แผนภูมิแท่งแสดงระดับ malondialdehyde (MDA) ในเลือดของกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี (healthy controls) กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patient without vitamin E supplementation, OA without VE) และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีก่อนและหลังได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patients before and after vitamin E supplementation, OA before VE and OA after VE)

ผลการวิเคราะห์ระดับ malondialdehyde (MDA) ในน้ำไขข้อ

ผลการวิเคราะห์ระดับ malondialdehyde ในน้ำไขข้อพบว่าระดับ malondialdehyde ในน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีจำนวน 35 ราย มีค่าเท่ากับ 1.422 ± 0.117 μM และระดับ malondialdehyde ในน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีจำนวน 31 ราย มีค่าเท่ากับ 1.060 ± 0.077 μM เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่าง 2 กลุ่ม พบว่าในผู้ป่วยที่ได้รับการเสริมวิตามินอีเป็นระยะเวลา 2 เดือน มีระดับ malondialdehyde ต่ำกว่าผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (1.422 ± 0.117 μM กับ 1.060 ± 0. 077 μM, P = 0.015) (ภาพที่ 30) โดยมีระดับลดลงร้อยละ 25.5

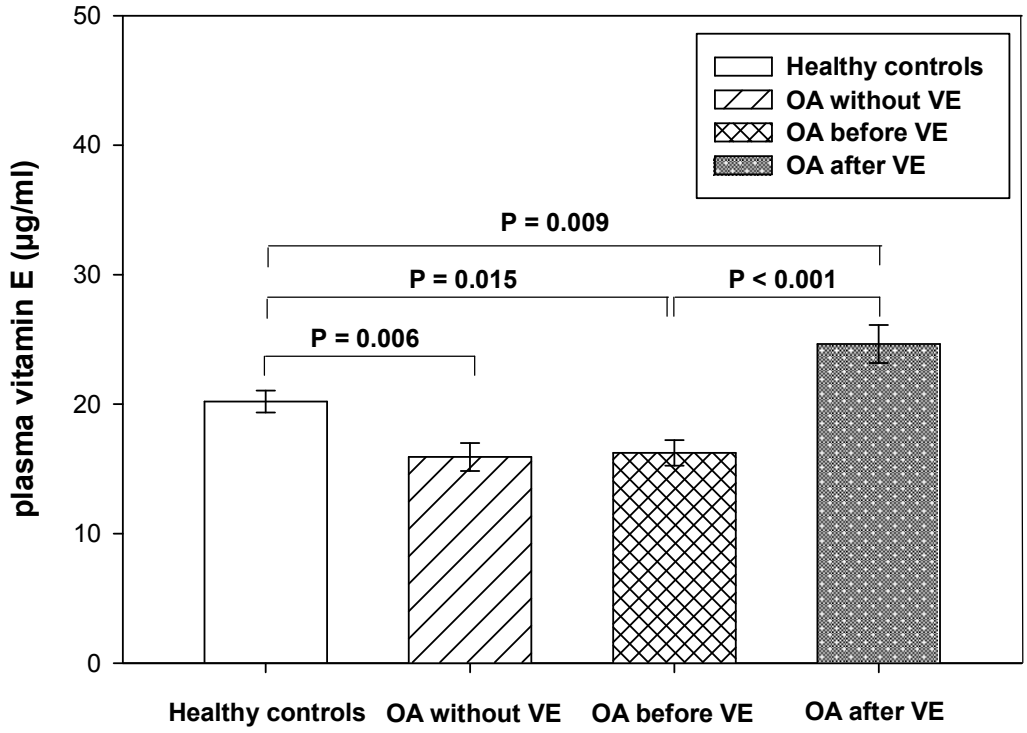


ภาพที่ 30 แผนภูมิแท่งแสดงระดับ malondialdehyde (MDA) ในน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patient without vitamin E supplementation, OA without VE) และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patients with vitamin E supplementation, OA with VE)

ผลการวิเคราะห์ระดับของวิตามินอีในเลือด

ผลการวิเคราะห์ระดับวิตามินอีในเลือดพบว่าระดับวิตามินอีในเลือดของกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีจำนวน 35 ราย มีค่าเท่ากับ 20.206 ± 0.845 µg/ml ระดับวิตามินอีในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีจำนวน 35 ราย มีค่าเท่ากับ 15.921 ± 1.077 µg/ml และระดับวิตามินอีในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีก่อนและหลังได้รับการเสริมวิตามินอีเป็นระยะเวลา 2 เดือน จำนวน 31 ราย มีค่าเท่ากับ 16.236 ± 0.995 µg/ml และ 24.646 ± 1.468 µg/ml ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่าง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนได้รับการเสริมวิตามินอี พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีและกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนได้รับการเสริมวิตามินอีมีระดับวิตามินอีต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (15.921 ± 1.077 µg/ml กับ 20.206 ± 0.845 µg/ml, P = 0.006 และ 16.236 ± 0.995 µg/ml กับ 20.206 ± 0.845 µg/ml, P = 0.015 ตามลำดับ) โดยมีระดับลดลงร้อยละ 21.2 และ 19.6 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบระดับวิตามินอีระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีกับกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนได้รับการเสริมวิตามินอีพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (15.921 ± 1.077 µg/ml กับ 16.236 ± 0.995 µg/ml, P = 0.972)

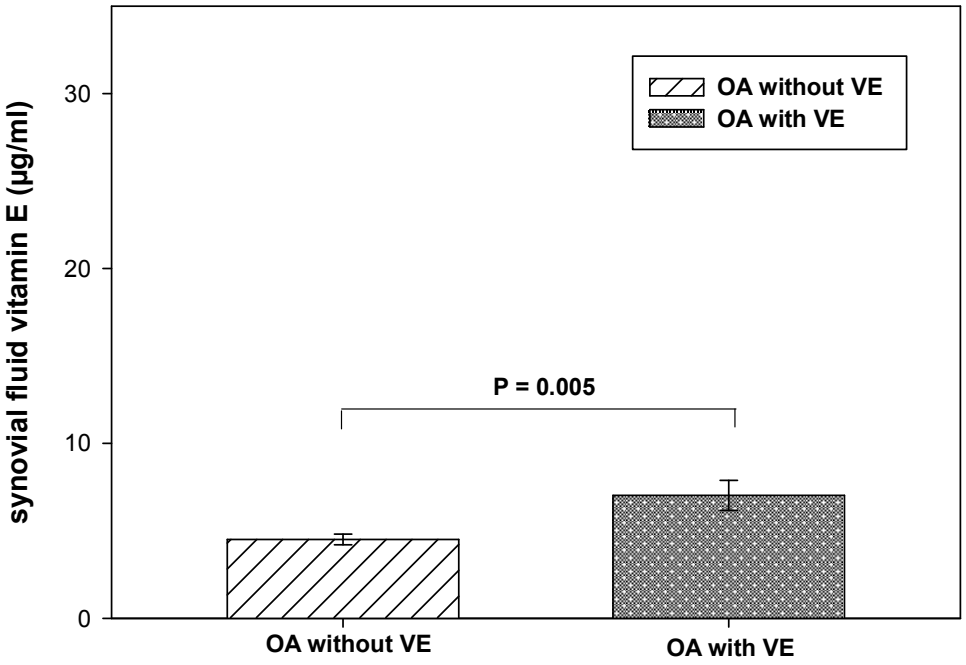
ผลการเปรียบเทียบทางสถิติของระดับวิตามินอีในเลือดระหว่างก่อนและหลังการเสริมวิตามินอีเป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่าหลังการเสริมวิตามินอีผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีระดับวิตามินอีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P < 0.001) เมื่อเปรียบเทียบกับระดับวิตามินอีในเลือดก่อนการเสริมวิตามินอี จาก 16.236 ± 0.995 µg/ml เมื่อก่อนได้รับการเสริมวิตามินอี เพิ่มขึ้นเป็น 24.646 ± 1.468 µg/ml เมื่อครบระยะเวลา 2 เดือน ภายหลังการเสริมวิตามินอี โดยมีระดับเพิ่มขึ้นร้อยละ 51.8 และผลการวิเคราะห์ทางสถิติของระดับวิตามินอีในเลือดหลังการเสริมวิตามินอีครบระยะเวลา 2 เดือน เปรียบเทียบกับระดับวิตามินอีในเลือดของคนปกติที่มีสุขภาพดี พบว่าระดับวิตามินอีในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมหลังการเสริมวิตามินอีมีค่าสูงกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (24.646 ± 1.468 µg/ml กับ 20.206 ± 0.845 µg/ml, P = 0.009) (ภาพที่ 31)



ภาพที่ 31 แผนภูมิแท่งแสดงระดับวิตามินอีในเลือดของกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี (healthy controls) กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patient without vitamin E supplementation, OA without VE) และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีก่อนและหลังได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patients before and after vitamin E supplementation, OA before VE and OA after VE)

ผลการวิเคราะห์ระดับของวิตามินอีในน้ำไขข้อ

ผลการวิเคราะห์ระดับวิตามินอีในน้ำไขข้อพบว่าระดับวิตามินอีในน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีจำนวน 35 ราย มีค่าเท่ากับ 4.511 ± 0.308 µg/ml และระดับวิตามินอีในน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีจำนวน 31 ราย มีค่าเท่ากับ 7.027± 0.857 µg/ml เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่าง 2 กลุ่ม พบว่าในผู้ป่วยที่ได้รับการเสริมวิตามินอีเป็นระยะเวลา 2 เดือนมีระดับวิตามินอีสูงกว่าผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (4.511 ± 0.308 µg/ml กับ 7.027± 0.857 µg/ml, P = 0.005) (ภาพที่ 32) โดยมีระดับเพิ่มขึ้นร้อยละ 55.8

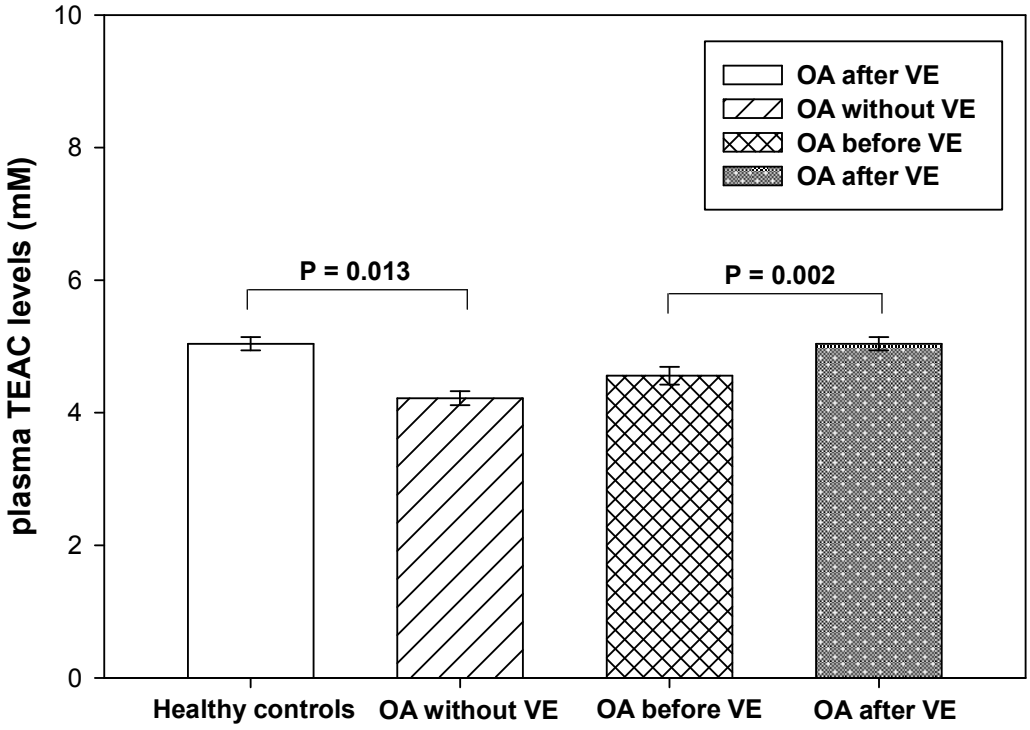


ภาพที่ 32 แผนภูมิแท่งแสดงระดับวิตามินอีในน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patient without vitamin E supplementation, OA without VE) และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patients with vitamin E supplementation, OA with VE)

ผลการวิเคราะห์ระดับ Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) **ในเลือด**

ผลการวิเคราะห์ระดับ TEAC ในเลือดพบว่าระดับ TEAC ในเลือดของกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีจำนวน 35 ราย มีค่าเท่ากับ 4.921 ± 0.244 mM ระดับ TEAC ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีจำนวน 35 ราย มีค่าเท่ากับ 4.220 ± 0.105 mM และระดับ TEAC ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีก่อนและหลังได้รับการเสริมวิตามินอีเป็นระยะเวลา 2 เดือน จำนวน 31 ราย มีค่าเท่ากับ 4.559 ± 0.135 mM และ 5.041 ± 0.100 mM ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่าง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพ กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนได้รับการเสริมวิตามินอี พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีมีระดับ TEAC ต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (4.220 ± 0.105 mM กับ 4.921 ± 0.244 mM, P = 0.013) โดยมีระดับลดลงร้อยละ 14.3 และเมื่อเปรียบเทียบระดับ TEAC ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีกับกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนได้รับการเสริมวิตามินอีพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (4.220 ± 0.105 mM กับ 4.559 ± 0.135 mM, P = 0.368)

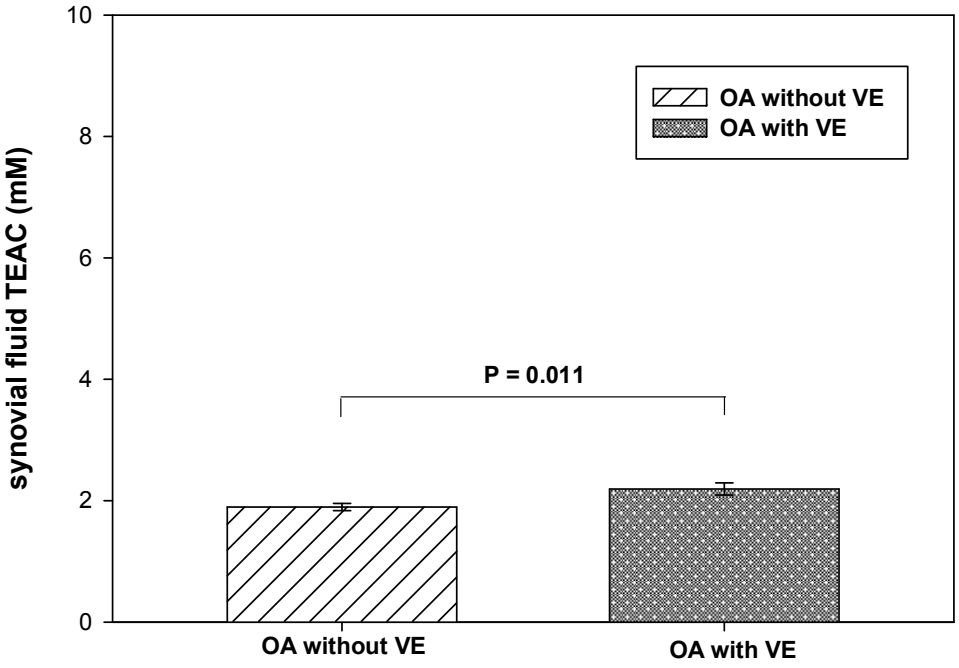
ผลการเปรียบเทียบทางสถิติของระดับ TEAC ในเลือดระหว่างก่อนและหลังการเสริมวิตามินอีเป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่าหลังการเสริมวิตามินอีผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีระดับ TEAC เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P = 0.002) เมื่อเปรียบเทียบกับระดับ TEAC ในเลือดก่อนการเสริมวิตามินอี จาก 4.559 ± 0.135 mM เมื่อก่อนได้รับการเสริมวิตามินอี เพิ่มขึ้นเป็น 5.041 ± 0.100 mM เมื่อครบระยะเวลา 2 เดือน ภายหลังการเสริมวิตามินอี โดยมีระดับเพิ่มขึ้นร้อยละ 10.6 และผลการวิเคราะห์ทางสถิติของระดับ TEAC ในเลือดหลังการเสริมวิตามินอีครบระยะเวลา 2 เดือน เปรียบเทียบกับระดับ TEAC ในเลือดของคนปกติที่มีสุขภาพดี พบว่าระดับ TEAC ในเลือดหลังการเสริมวิตามินอีมีค่าสูงกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (5.041 ± 0.100 mM กับ 4.921 ± 0.244 mM, P = 0.665) (ภาพที่ 33)



ภาพที่ 33 แผนภูมิแท่งแสดงระดับ trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) ในเลือดของกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี (healthy controls) กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patient without vitamin E supplementation, OA without VE) และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีก่อนและหลังได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patients before and after vitamin E supplementation, OA before VE and OA after VE)

ผลการวิเคราะห์ระดับ Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) **ในน้ำไขข้อ**

ผลการวิเคราะห์ระดับ TEAC ในน้ำไขข้อพบว่าระดับ TEAC ในน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีจำนวน 35 ราย มีค่าเท่ากับ 1.860 ± 0.060 mM และระดับ TEAC ในน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีจำนวน 31 ราย มีค่าเท่ากับ 2.193 ± 0.100 mM เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่าง 2 กลุ่ม พบว่าในผู้ป่วยที่ได้รับการเสริมวิตามินอีเป็นระยะเวลา 2 เดือน มีระดับ TEAC สูงกว่าผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (2.193 ± 0.100 mM กับ 1.860 ± 0.060 mM, P = 0.011) (ภาพที่ 34) โดยมีระดับเพิ่มขึ้นร้อยละ 15.7

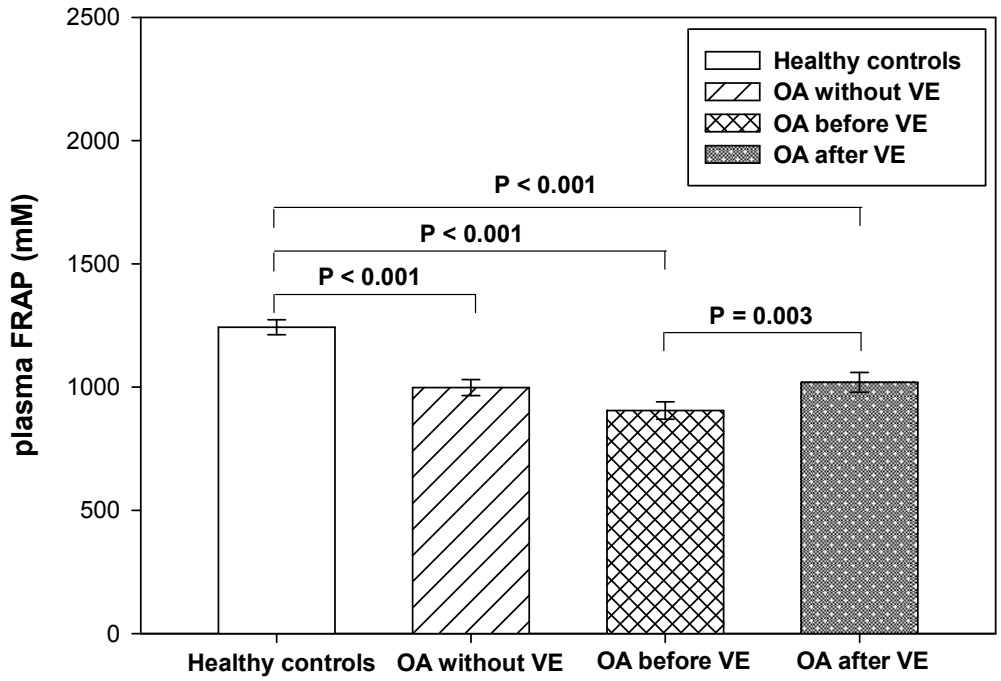


ภาพที่ 34 แผนภูมิแท่งแสดงระดับ trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) ในน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patient without vitamin E supplementation, OA without VE) และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีก่อน (Osteoarthritis patients with vitamin E supplementation, OA with VE)

ผลการวิเคราะห์ระดับ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) **ในเลือด**

ผลการวิเคราะห์ระดับ FRAP ในเลือดพบว่าระดับ FRAP ในเลือดของกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีจำนวน 35 ราย มีค่าเท่ากับ 1242.781 ± 30.286 mM ระดับ FRAP ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีจำนวน 35 ราย มีค่าเท่ากับ 998.150 ± 32.317 mM และระดับ FRAP ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีก่อนและหลังได้รับการเสริมวิตามินอีเป็นระยะเวลา 2 เดือน จำนวน 31 ราย มีค่าเท่ากับ 905.157 ± 35.165 mM และ 1019.544 ± 40.218 mM ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่าง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนได้รับการเสริมวิตามินอี พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีและกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนได้รับการเสริมวิตามินอีมีระดับ FRAP ต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (998.150 ± 32.317 mM กับ 1242.781 ± 30.286 mM, $P < 0.001$ และ 905.157 ± 35.165 mM กับ 1242.781 ± 30.286 mM, $P < 0.001$ ตามลำดับ) โดยมีระดับลดลงร้อยละ 19.7 และ 27.2 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบระดับ FRAP ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีกับกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนได้รับการเสริมวิตามินอีพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (998.150 ± 32.317 mM กับ 905.157 ± 35.165 mM, $P = 0.118$)

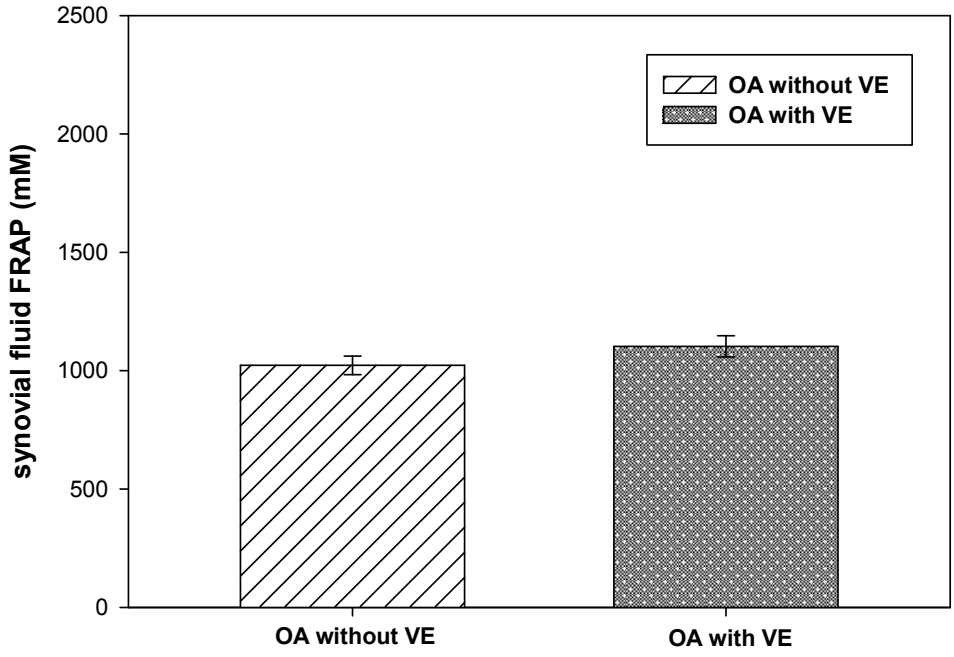
ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของระดับ FRAP ในเลือดระหว่างก่อนและหลังการเสริมวิตามินอีเป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่าหลังการเสริมวิตามินอีผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีระดับ FRAP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P = 0.003$) เมื่อเปรียบเทียบกับระดับ FRAP ในเลือดก่อนการเสริมวิตามินอี จาก 905.157 ± 35.165 mM เมื่อก่อนได้รับการเสริมวิตามินอี เพิ่มขึ้นเป็น 1019.544 ± 40.218 mM เมื่อครบระยะเวลา 2 เดือน ภายหลังการเสริมวิตามินอี โดยมีระดับเพิ่มขึ้นร้อยละ 12.6 และผลการเปรียบเทียบทางสถิติของระดับ FRAP ในเลือดหลังการเสริมวิตามินอีครบระยะเวลา 2 เดือน เปรียบเทียบกับระดับ FRAP ในเลือดของคนปกติที่มีสุขภาพดี พบว่าระดับ FRAP ในเลือดหลังการเสริมวิตามินอีมีค่าต่ำกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (1019.544 ± 40.218 mM กับ 1242.781 ± 30.286 mM, $P < 0.001$) (ภาพที่ 35)



ภาพที่ 35 แผนภูมิแท่งแสดงระดับ ferric reducing antioxidant power (FRAP) ในเลือดของกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี (healthy controls) กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patient without vitamin E supplementation, OA without VE) และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีก่อนและหลังได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patients before and after vitamin E supplementation, OA before VE and OA after VE)

ผลการวิเคราะห์ระดับ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) **ในน้ำไขข้อ**

ผลการวิเคราะห์ระดับ FRAP ในน้ำไขข้อพบว่าระดับ FRAP ในน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีจำนวน 35 ราย มีค่าเท่ากับ 1022.482 ± 39.337 mM และระดับ FRAP ในน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีจำนวน 31 ราย มีค่าเท่ากับ 1102.673 ± 44.766 mM เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่าง 2 กลุ่ม พบว่าในผู้ป่วยที่ได้รับการเสริมวิตามินอีเป็นระยะเวลา 2 เดือน มีระดับ FRAP สูงกว่าผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (1102.673 ± 44.766 mM กับ 1022.482 ± 39.337 mM, P = 0.183) (ภาพที่ 36) โดยมีระดับเพิ่มขึ้นร้อยละ 7.8

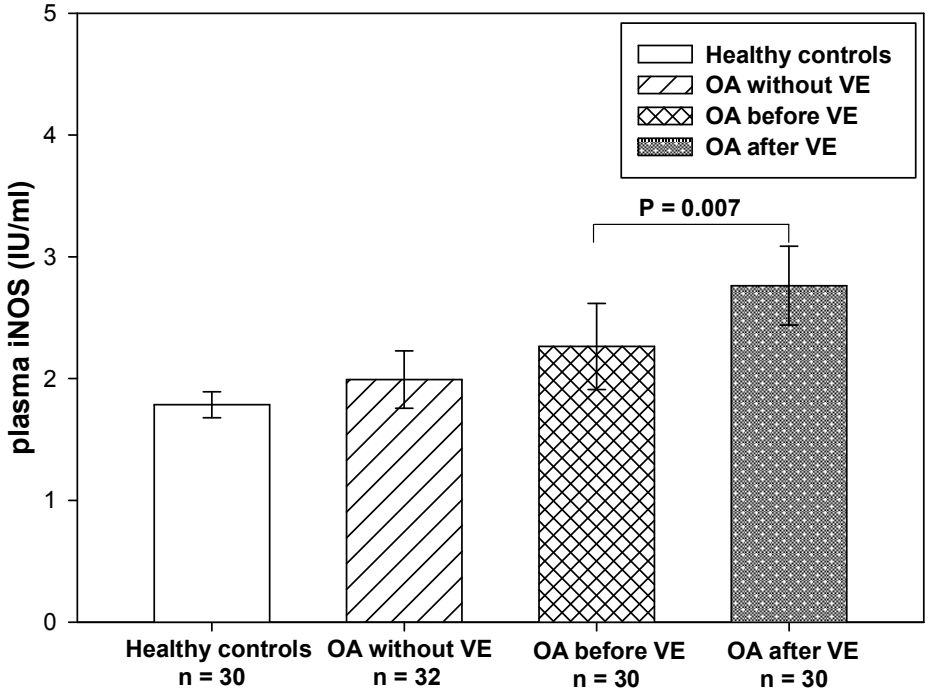


ภาพที่ 36 แผนภูมิแท่งแสดงระดับ ferric reducing antioxidant power (FRAP) ในน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patient without vitamin E supplementation, OA without VE) และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patients with vitamin E supplementation, OA with VE)

ผลการวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ในเลือด

ผลการวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase ในเลือดพบว่า ระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase ในเลือดของกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีจำนวน 30 ราย มีค่าเท่ากับ 1.855 ± 0.110 IU/ml ระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีจำนวน 32 ราย มีค่าเท่ากับ 2.035 ± 0.237 IU/ml และระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีก่อนและหลังได้รับการเสริมวิตามินอีเป็นระยะเวลา 2 เดือน จำนวน 30 ราย มีค่าเท่ากับ 2.314 ± 0.362 IU/ml และ 2.815 ± 0.328 IU/ml ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่าง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนได้รับการเสริมวิตามินอี พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับวิตามินอีและกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนได้รับวิตามินอีมีระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase สูงกว่ากลุ่มคนปกติแต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (2.035 ± 0.237 IU/ml กับ 1.855 ± 0.110 IU/ml, P = 0.872 และ 2.314 ± 0.362 IU/ml กับ 1.855 ± 0.110 IU/ml, P = 0.426 ตามลำดับ) โดยมีระดับเพิ่มขึ้นร้อยละ 9.7 และ 24.7 ตามลำดับ

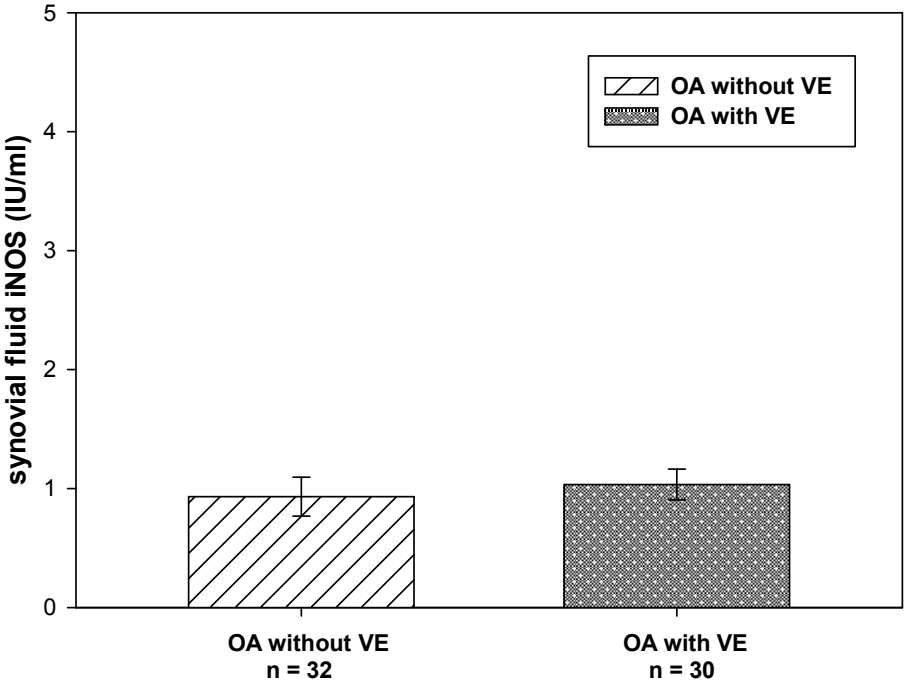
เมื่อเปรียบเทียบระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase ในเลือดระหว่างก่อนและหลังการเสริมวิตามินอีเป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่าหลังการเสริมวิตามินอีผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase สูงขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (2.815 ± 0.328 IU/ml กับ 2.314 ± 0.362 IU/ml, P = 0.285) โดยมีระดับเพิ่มขึ้นร้อยละ 21.7 และผลการวิเคราะห์ทางสถิติของระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase ในเลือดหลังการเสริมวิตามินอีครบระยะเวลา 2 เดือน เปรียบเทียบกับระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase ในเลือดของคนปกติที่มีสุขภาพดี พบว่าระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase ในเลือดหลังการเสริมวิตามินอีมีค่าสูงกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (2.815 ± 0.328 IU/ml กับ 1.855 ± 0.110 IU/ml, P = 0.007) (ภาพที่ 37)



ภาพที่ 37 แผนภูมิแท่งแสดงระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ในเลือดของกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี (healthy controls) กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patient without vitamin E supplementation, OA without VE) และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีก่อนและหลังได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patients before and after vitamin E supplementation, OA before VE and OA after VE)

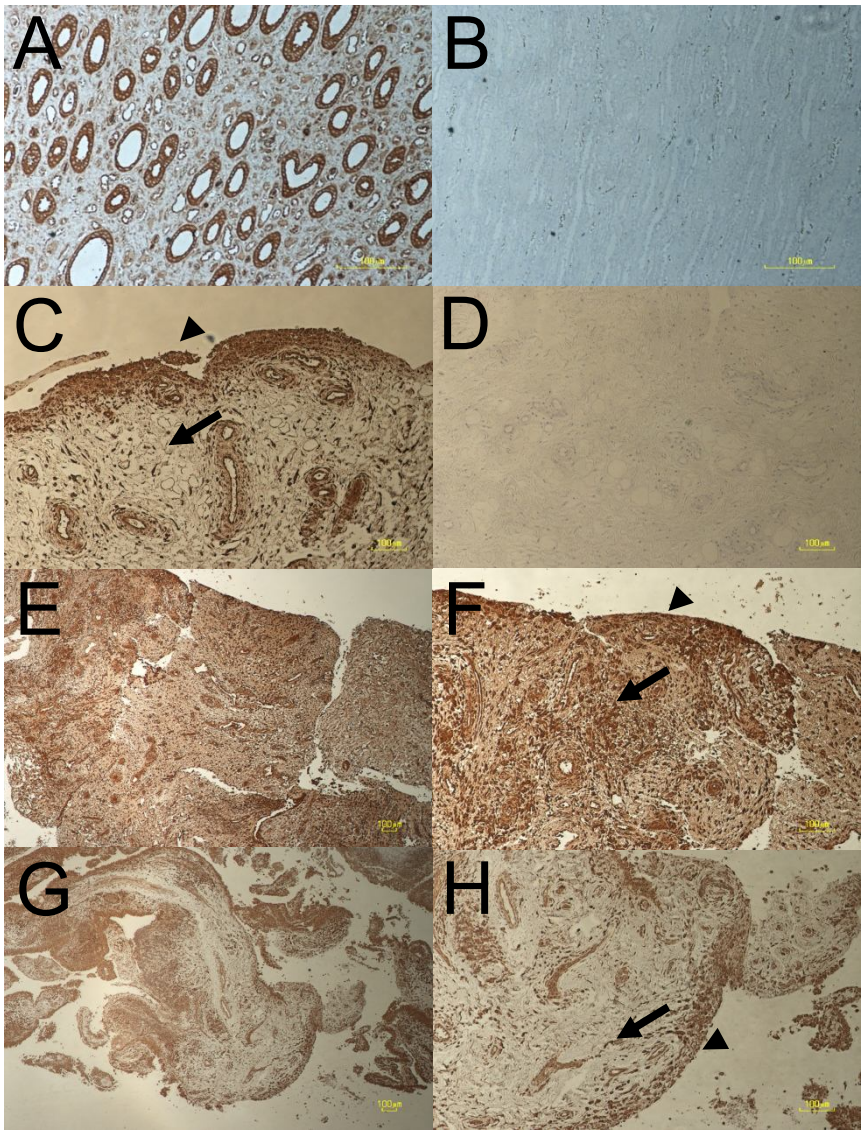
ผลการวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) **ในน้ำไขข้อ**

ผลการวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase ในน้ำไขข้อ พบว่าระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase ในน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีจำนวน 32 ราย มีค่าเท่ากับ 0.972 ± 0.166 IU/ml และระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase ในน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีจำนวน 30 ราย มีค่าเท่ากับ 1.026 ± 0.132 IU/ml เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่าง 2 กลุ่ม พบว่าในผู้ป่วยที่ได้รับการเสริมวิตามินอีเป็นระยะเวลา 2 เดือน มีระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase สูงกว่าผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (0.972 ± 0.166 IU/ml กับ 1.026 ± 0.132 IU/ml, P = 0.800) (ภาพที่ 38) โดยมีระดับเพิ่มขึ้นร้อยละ 7.9



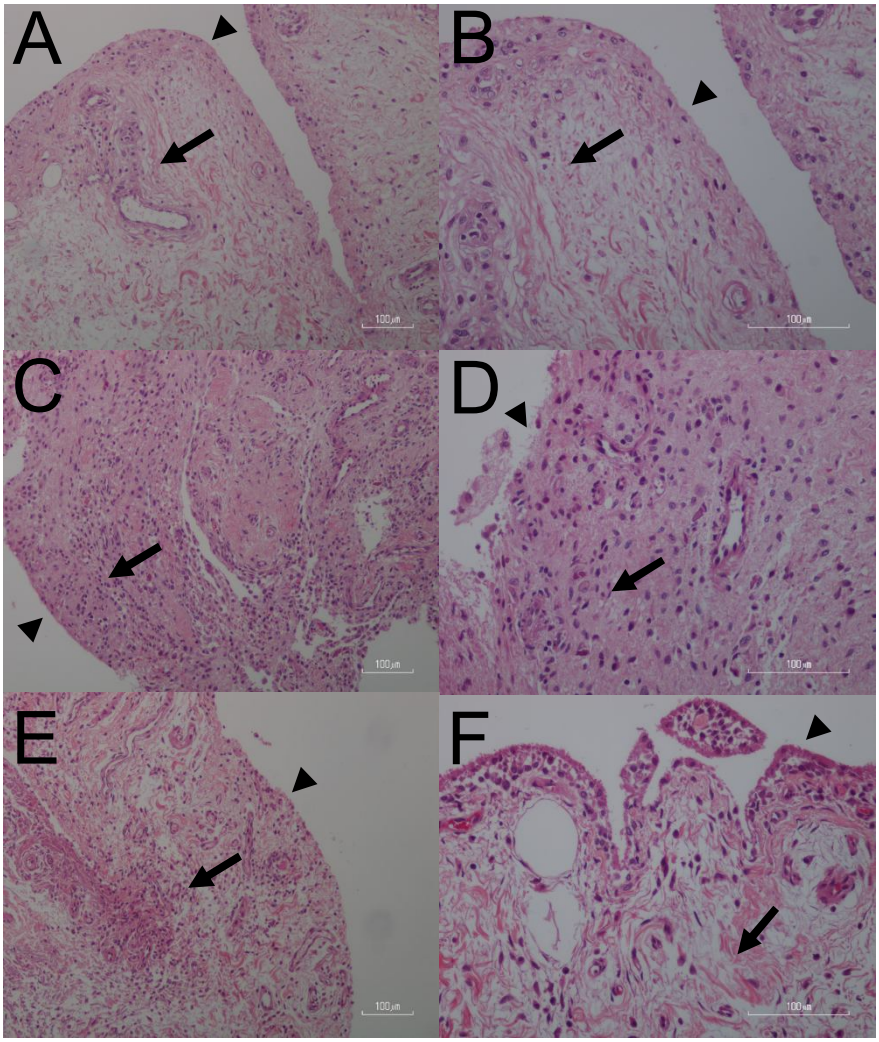
ภาพที่ 38 แผนภูมิแท่งแสดงระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ในน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patient without vitamin E supplementation, OA without VE) และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patients with vitamin E supplementation, OA with VE)

การตรวจทางฮิสโตวิทยาจากการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไนโตรไทโรซีน (3-nitrotyrosine)



ภาพที่ 39 ภาพการย้อม 3-nitrotyrosine ในเยื่อหุ้มข้อ (A) positive control โดยใช้เนื้อเยื่อไต (10X), (B) isotypic control โดยใช้เนื้อเยื่อไต (10X), (C) เยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วย anterior cruciate ligament (ACL) (10X), (D) isotypic control โดยใช้เยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วย anterior cruciate ligament (10X), (E) เยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี (4X), (F) เยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี (10X), (G) เยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี (4X), (H) เยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี (10X) (⬅ แสดงบริเวณ subsynovium, ◀ แสดงบริเวณ synovial lining cells)

การตรวจทางฮิสโตวิทยาจากการย้อมด้วยฮีมาทอกไซลีนและอีโอซิน (hematoxylin and eosin)

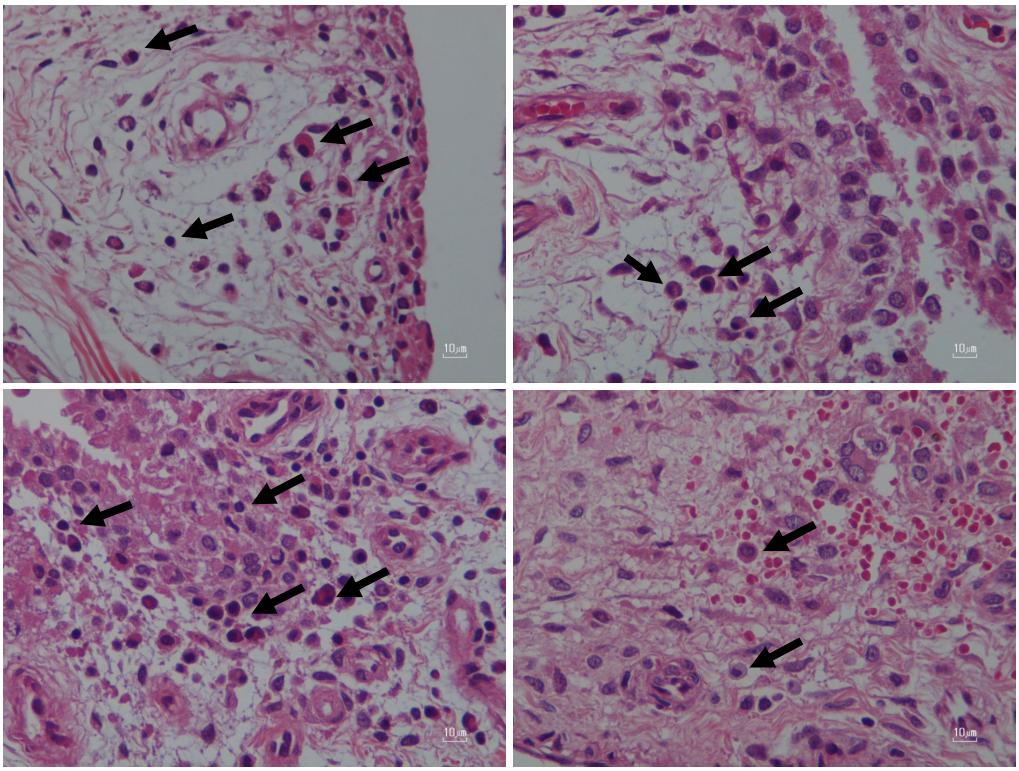


ภาพที่ 40 ภาพการย้อม hematoxylin and eosin (H&E) ในเยื่อหุ้มข้อ (A) เยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วย anterior cruciate ligament (ACL) (10X), (B) เยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วย anterior cruciate ligament (20X), (C) เยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี (10X), (D) เยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี (20X), (E) เยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี (10X), (F) เยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี (20X) (⬅ แสดงบริเวณ subsynovium, ◀ แสดงบริเวณ synovial lining cells)

จากการย้อม immunohistochemistry ของ 3-nitrotyrosine (ภาพที่ 39) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์อนุมูลอิสระที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาทางเคมีของ peroxynitrite กับโปรตีนภายในเซลล์ และการย้อม haematoxylin and eosin (H&E) (ภาพที่ 40) ในเยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม พบการย้อมติดสีของ 3-nitrotyrosine ที่ stroma cells บริเวณ subsynovium และ synovial lining cells อย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังพบการย้อมติดสีของ 3-nitrotyrosine บริเวณ fibroblast like synoviocytes ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายกระสวย (spindle shape) เซลล์ macrophages ซึ่งเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่ภายในมีหลายนิวเคลียส (large multinucleated cells) เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น plasma cells และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocytes นอกจากนี้ยังพบการย้อมติดสีของ 3-nitrotyrosine บริเวณ endothelial cells ของหลอดเลือดด้วย เมื่อเปรียบเทียบการย้อมติดสีของ 3-nitrotyrosine ระหว่างเยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีและผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีด้วยตาเปล่า พบว่าเยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วยที่ได้รับการเสริมวิตามินอีมีการติดสีที่จางกว่า โดยการย้อม immunohistochemistry ของ 3-nitrotyrosine ได้ใช้เนื้อเยื่อไตเป็น positive control

ผลการวิเคราะห์จำนวน inflammatory cells ต่อ high power field

ผลการวิเคราะห์จำนวน inflammatory cells ต่อ high power field ที่กำลังขยาย 40 เท่า โดยทำการนับจำนวน inflammatory cells ได้แก่ plasma cells ซึ่งย้อมติดสีม่วงอมน้ำเงิน นิวเคลียสมีลักษณะกลมอยู่ชิดขอบเซลล์ เรียกว่า eccentric nucleus และพบลักษณะคล้ายล้อเกวียน (cart wheel) และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocytes โดยนิวเคลียสมีลักษณะคล้ายรูปเกือกม้า ย้อมติดสีม่วง รวมทั้งเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocytes จากสไลด์ที่ย้อมด้วย H&E (ภาพที่ 41) ในเยื่อหุ้มข้อของกลุ่มผู้ป่วย anterior cruciate ligament (ACL) จำนวน 3 ราย กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี จำนวน 10 ราย และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี จำนวน 10 ราย พบว่าจำนวน inflammatory cells ต่อ high power field ในกลุ่มผู้ป่วย anterior cruciate ligament มีค่าเท่ากับ 0.9 ± 0.2 inflammatory cells ต่อ high power field กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี มีค่าเท่ากับ 15.3 ± 3.5 inflammatory cells ต่อ high power field และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี มีค่าเท่ากับ 9.5 ± 1.4 inflammatory cells ต่อ high power field โดยค่าเฉลี่ยในผู้ป่วยแต่ละรายแสดงในตารางที่ 4

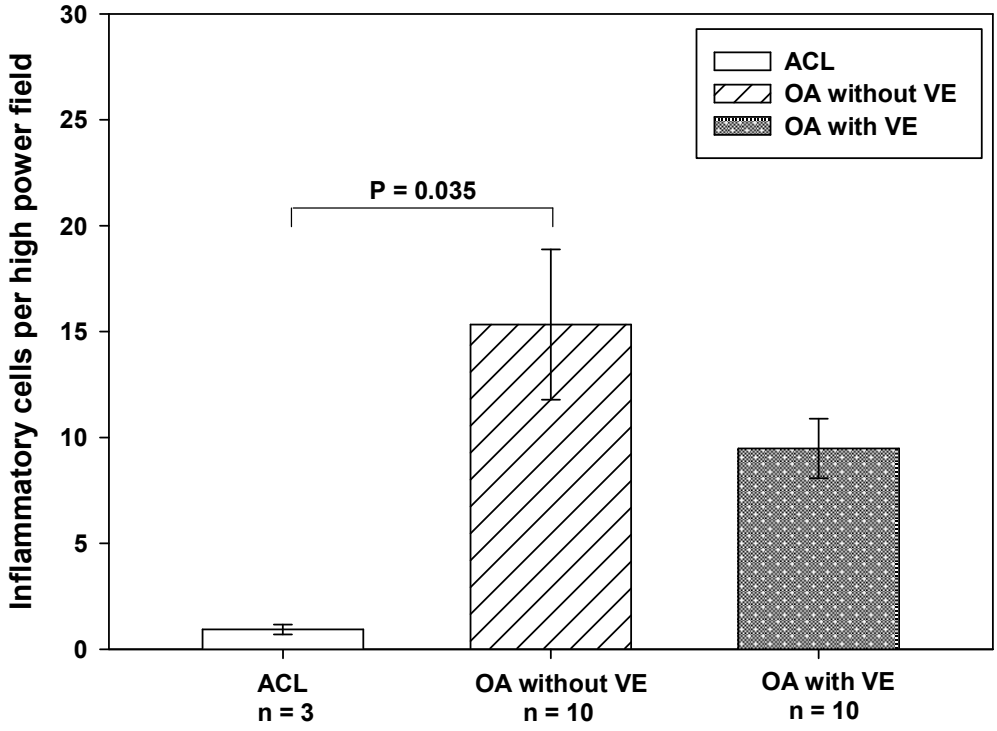


ภาพที่ 41 ภาพแสดงลักษณะ inflammatory cells ในเยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ที่กำลังขยาย 40X (← แสดง inflammatory cells)

เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่าง 3 กลุ่ม พบว่าจำนวน inflammatory cells ต่อ high power field ในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วย anterior cruciate ligament อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (15.3 ± 3.6 inflammatory cells ต่อ high power field กับ 0.9 ± 0.2 inflammatory cells ต่อ high power field, P = 0.035) และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบจำนวน inflammatory cells ต่อ high power field ระหว่างกลุ่มผู้ป่วย anterior cruciate ligament และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี (0.9 ± 0.2 inflammatory cells ต่อ high power field กับ 9.5 ± 1.4 inflammatory cells ต่อ high power field, P = 0.268) (ภาพที่ 42)

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์จำนวน inflammatory cells ต่อ high power field (mean ± S.E.M.)

NO.	Anterior cruciate ligament (ACL) patients	OA patients without vitamin E supplementation	OA patients with vitamin E supplementation
1	0.5 ± 1.7	11.3 ± 1.7	1.7 ± 0.3
2	1.2 ± 0.3	3.4 ± 0.3	6.9 ± 0.8
3	1.5 ± 0.4	15.8 ± 1.9	16.5 ± 1.2
4	-	42.5 ± 3.1	9.2 ± 1.0
5	-	21.9 ± 1.2	14.4 ± 1.2
6	-	13.8 ± 1.1	13.5 ± 1.3
7	-	7.2 ± 0.8	6.9 ± 0.8
8	-	15.7 ± 1.4	7.2 ± 0.8
9	-	17.4 ± 2.7	7.2 ± 1.5
10	-	4.3 ± 0.8	11.3 ± 1.6
Mean	0.9 ± 0.2	15.3 ± 3.6	9.5 ± 1.4



ภาพที่ 42 แผนภูมิแท่งแสดง inflammatory cells ต่อ high power field ในเยื่อหุ้มข้อของกลุ่มผู้ป่วย anterior cruciate ligament (ACL) กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patient without vitamin E supplementation, OA without VE) และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี (Osteoarthritis patients with vitamin E supplementation, OA with VE)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

โรคข้อเข่าเสื่อมเป็นโรคที่เกิดจากความเสื่อมสภาพของข้อเข่าซึ่งพบได้บ่อยในผู้สูงอายุ ทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการเจ็บปวดอย่างเรื้อรังและอาจสูญเสียการใช้งานข้อเข่า ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยด้อยลงจนไม่สามารถดำเนินชีวิตได้ตามปกติ [75] ในปัจจุบันพยาธิกำเนิดและกลไกของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด จากการศึกษาพบว่าสาเหตุของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน [5] การเกิดความไม่สมดุลระหว่างสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระทำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ซึ่งส่งผลเสียต่อโครงสร้างและการทำหน้าที่ของเซลล์กระดูกอ่อน จึงได้มีแนวคิดในการเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายเพื่อลดความรุนแรงของภาวะเครียดจากออกซิเดชัน จากการศึกษาในสัตว์ทดลองและการศึกษาทางคลินิกในมนุษย์สนับสนุนบทบาทของวิตามินอีในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยในการเจริญของเซลล์กระดูกอ่อนและสามารถลดความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมได้ [9, 46] คณะผู้วิจัยจึงทำการเสริมวิตามินอี ขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิตทุกวัน เป็นระยะเวลา 2 เดือน ให้กับผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม เพื่อศึกษาผลของวิตามินอีต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

การศึกษาครั้งนี้แบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี โดยในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมนั้นเป็นผู้ป่วยที่มาเตรียมเข้ารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม จากฝ่ายออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย การศึกษาครั้งนี้มีกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีจำนวนทั้งสิ้น 35 ราย เป็นชาย 11 ราย (ร้อยละ 31.43) และเป็นหญิง 24 ราย (ร้อยละ 68.57) กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีจำนวนทั้งสิ้น 35 ราย เป็นชาย 9 ราย (ร้อยละ 25.72) และเป็นหญิง 26 ราย (ร้อยละ 74.28) และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีจำนวนทั้งสิ้น 31 ราย เป็นชาย 2 ราย (ร้อยละ 6.45) และเป็นหญิง 29 ราย (ร้อยละ 93.55) จากการเปรียบเทียบทางสถิติพบว่าอัตราส่วนระหว่างเพศชายต่อเพศหญิงในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีต่ำกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ นอกจากนี้อายุเฉลี่ยของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการ

เสริมวิตามินอีและกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีสูงกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำหนักและส่วนสูงเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 3 กลุ่ม ยกเว้นดัชนีมวลกายเฉลี่ย ซึ่งพบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีมีดัชนีมวลกายเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีของระดับสารอนุมูลอิสระ ซึ่งได้แก่ การตรวจวัดระดับไนไตรต์ และการตรวจวัดระดับ malondialdehyde ในเลือดและน้ำไขข้อของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม

ผลจากการวิเคราะห์ทางสถิติของระดับไนไตรต์ในเลือดของทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่าง พบว่าระดับไนไตรต์ในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีและกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีสูงกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้ได้แสดงให้เห็นว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันมากกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี ผลการเปรียบเทียบทางสถิติของระดับไนไตรต์ในเลือดระหว่างก่อนและหลังได้รับวิตามินอีในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีพบว่าหลังจากผู้ป่วยได้รับการเสริมวิตามินอีระดับไนไตรต์ในเลือดลดลง แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผลการวิเคราะห์ทางสถิติของระดับไนไตรต์ในน้ำไขข้อพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีมีระดับไนไตรต์ในน้ำไขข้อต่ำกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าระดับ malondialdehyde ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีและกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีก่อนได้รับการเสริมวิตามินอีมีค่าสูงกว่าระดับ malondialdehyde ในเลือดของกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ผลการเปรียบเทียบทางสถิติของระดับ malondialdehyde ในเลือดระหว่างก่อนและหลังได้รับวิตามินอีในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี พบว่าหลังจากผู้ป่วยได้รับการเสริมวิตามินอีเป็นระยะเวลา 2 เดือน ระดับ malondialdehyde ในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของระดับ malondialdehyde ในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่าระดับ malondialdehyde ในน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีมีค่าต่ำกว่าระดับ

malondialdehyde ในน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

หลังจากนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีของระดับสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งได้แก่ ระดับวิตามินอี ระดับ trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) และระดับ ferric reducing antioxidant power (FRAP) ในเลือดและน้ำไขข้อของกลุ่มตัวอย่าง

ผลจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าระดับวิตามินอีในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีและกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีมีค่าต่ำกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำการเปรียบเทียบทางสถิติของระดับวิตามินอีในเลือดระหว่างก่อนและหลังการเสริมวิตามินอี พบว่าหลังการเสริมวิตามินอีผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีระดับวิตามินอีเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของระดับวิตามินอีในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่าการเสริมวิตามินอีขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิตทุกวัน เป็นระยะเวลา 2 เดือน ทำให้ระดับวิตามินอีในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีมีค่าสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติของระดับ TEAC พบว่าระดับ TEAC ในเลือดในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีมีระดับ TEAC ต่ำกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นถึงภาวะเครียดจากออกซิเดชันในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ผลการเปรียบเทียบทางสถิติของระดับ TEAC ในเลือดระหว่างก่อนและหลังการเสริมวิตามินอี นั้นแสดงให้เห็นว่าการเสริมวิตามินอีช่วยให้ระดับ TEAC ในเลือดเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของระดับ TEAC ในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่าในน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีนั้นมีระดับ TEAC สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลจากการวิเคราะห์ทางสถิติของระดับ FRAP พบว่าระดับ FRAP ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีและกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีต่ำกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการเปรียบเทียบข้อมูลทางสถิติของระดับ FRAP ในเลือดระหว่างก่อนและหลังการเสริมวิตามินอีในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี พบว่าการเสริมวิตามินอีช่วยให้ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีระดับ FRAP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผลการวิเคราะห์ทางสถิติของระดับ FRAP

ในน้ำไขข้อพบว่าระดับ FRAP ของกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการเสริมวิตามินอีสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีแต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ในเลือดและน้ำไขข้อของกลุ่มตัวอย่าง กลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีจำนวน 30 ราย กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีจำนวน 32 ราย และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีจำนวน 30 ราย โดยใช้เทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีและกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีก่อนได้รับการเสริมวิตามินอีมีระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase สูงกว่ากลุ่มคนปกติ แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการเปรียบเทียบข้อมูลทางสถิติของระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase ในเลือดระหว่างก่อนและหลังการเสริมวิตามินอี เป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่าหลังการเสริมวิตามินอีเป็นระยะเวลา 2 เดือน ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase ลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผลการวิเคราะห์ทางสถิติของระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase ในน้ำไขข้อ พบว่าระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase ของกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการเสริมวิตามินอี ขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิตทุกวัน เป็นระยะเวลา 2 เดือน มีค่าสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจวัด 3-nitrotyrosine ในเยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมด้วยเทคนิค immunohistochemistry และย้อม haematoxylin and eosin (H&E) เพื่อดูลักษณะทั่วไปของเซลล์ ทำให้พบการแสดงออกของ 3-nitrotyrosine บริเวณ subsynovium และ synovial lining cells อย่างชัดเจน โดยเฉพาะที่ stroma cells คณะผู้วิจัยยังพบการย้อมติดสีของ 3-nitrotyrosine บริเวณ fibroblast like synoviocytes, macrophages และเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น plasma cells เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocytes เป็นต้น และผลจากการเสริมวิตามินอีขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิต เป็นระยะเวลา 2 เดือน ทำให้การย้อมติดสีของ 3-nitrotyrosine ในเยื่อหุ้มข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีจางกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้วิเคราะห์จำนวน inflammatory cells ต่อ high power field ที่กำลังขยาย 40 เท่า โดยทำการนับ inflammatory cells จากสไลด์เนื้อเยื่อหุ้มข้อที่ย้อมด้วย H&E ของกลุ่มผู้ป่วย anterior cruciate ligament (ACL) จำนวน 3 ราย กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี จำนวน 10 ราย และกลุ่มผู้ป่วย

โรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี จำนวน 10 ราย พบว่าจำนวน inflammatory cells ต่อ high power field ในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วย anterior cruciate ligament อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบจำนวน inflammatory cells ต่อ high power field ระหว่างกลุ่มผู้ป่วย anterior cruciate ligament และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี

อภิปรายผลการวิจัย

โรคข้อเข่าเสื่อมเป็นโรคที่เกิดจากความเสื่อมของข้อเข่าทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการเจ็บปวดอย่างเรื้อรังและอาจรุนแรงจนทำให้สูญเสียการทำงานของข้อเข่า จากรายงานการศึกษาพบว่าอุบัติการณ์ของโรคข้อเข่าเสื่อมในประเทศไทยนั้นสูงถึงร้อยละ 35-46 ในคนไทยที่อายุมากกว่า 60 ปี จึงส่งผลถึงคุณภาพชีวิตของประชากรเมื่ออายุเพิ่งสูงขึ้น โดยพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในข้อเข่าของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมนั้นได้แก่ การเสื่อมสภาพของกระดูกผิวข้อ (articular cartilage) การหนาตัวของเนื้อกระดูกที่อยู่ใต้ผิวข้อ (subchondral bone sclerosis) การเกิดกระดูกงอกขอบข้อ (osteophytes) การสูญเสียคุณสมบัติของน้ำไขข้อ เป็นต้น จากการศึกษาพบว่าสาเหตุที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมมาจากหลายปัจจัย เช่น อายุ พันธุกรรม ประวัติการได้รับการบาดเจ็บที่บริเวณข้อเข่า ความอ้วน และภาวะเครียดจากออกซิเดชัน เป็นต้น

ภาวะเครียดจากออกซิเดชันภายในร่างกายเกิดจากความไม่สมดุลระหว่างสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ สารอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันที่สำคัญ คือ สารอนุมูลอิสระที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) เช่น superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2) เป็นต้น และสารอนุมูลอิสระที่เป็นอนุพันธ์ของไนโตรเจน (reactive nitrogen species, RNS) เช่น เปอร์ออกซีไนไตรต์ (peroxynitrite, $ONOO^-$) ไนตริกออกไซด์ ($NO^{\cdot}$) เป็นต้น โดยสารทั้ง 2 กลุ่มนี้ก่อให้เกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation, LPO) โปรตีนคาร์บอนิล (protein carbonyl) และอื่นๆ ซึ่งส่งผลเสียต่อสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ทั้งคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก จึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคข้อเข่าเสื่อม สารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันภายในร่างกายได้ โดยผ่านสองกลไกสำคัญ คือ สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ (enzymatic systems) เช่น เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) เอนไซม์ catalase (CAT) และเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) เป็นต้น และสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์

(non-enzymatic systems) เช่น กลูตาไทโอน (glutathione) เบต้าแคโรทีน (beta carotene) วิตามินซี (vitamin C) วิตามินอี (vitamin E) เป็นต้น จากการศึกษาในสัตว์ทดลองและการศึกษาทางคลินิกในมนุษย์ได้สนับสนุนบทบาทของวิตามินอีในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถใช้เสริมรักษาผู้ป่วยโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น โรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) [53] โรคเอสแอลอี (systemic lupus erythematosus, SLE) [54] และโรคข้อเข่าเสื่อม [48, 49] เป็นต้น ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงทำการเสริมวิตามินอี ขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิต เป็นระยะเวลา 2 เดือน ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม เพื่อศึกษาตรวจวัดระดับผลิตภัณฑ์อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และศึกษาผลของวิตามินอีต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม เนื่องจากการศึกษานี้ใช้กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมซึ่งมีโอกาสพบโรคข้อเข่าเสื่อมในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย จึงทำให้สัดส่วนระหว่างเพศชายต่อเพศหญิงในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินต่ำกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งจัดเป็นข้อจำกัดในการศึกษาครั้งนี้ นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดในการเจาะเก็บน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนการเสริมวิตามินอี ทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบผลจากการเสริมวิตามินอีระหว่างก่อนและหลังการเสริมวิตามินอีในผู้ป่วยรายเดียวกันได้ จึงจำเป็นต้องใช้น้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีในการเปรียบเทียบผลจากการเสริมวิตามินอีแทน

จากผลการตรวจวิเคราะห์ระดับผลิตภัณฑ์สารอนุมูลอิสระในเลือดและน้ำไขข้อของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี แสดงให้เห็นว่าระดับไนไตรต์ในเลือดของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมสูงกว่ากลุ่มคนปกติที่สุขภาพดี ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Ersoy และคณะ ในปี ค.ศ.2002 ที่พบว่าระดับไนไตรต์ในเลือดของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมสูงกว่าในกลุ่มคนปกติ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [7] และเมื่อผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมได้รับวิตามินอี ขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิต เป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่าระดับไนไตรต์ในเลือดนั้นลดต่ำลงจนใกล้เคียงกับระดับไนไตรต์ในกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ผลจากการตรวจวิเคราะห์ระดับไนไตรต์ในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่าระดับไนไตรต์ในน้ำไขข้อของผู้ป่วยที่ได้รับการเสริมวิตามินอีมีค่าต่ำกว่าผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับผลิตภัณฑ์สารอนุมูลอิสระอีกหนึ่งชนิดที่คณะผู้วิจัยสนใจทำการ

ตรวจวัด คือ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันและมีบทบาทสำคัญในการบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันในร่างกาย พบว่าระดับ malondialdehyde ในเลือดของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมสูงกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาของ Surapaneni และคณะ ในปี ค.ศ.2007 ที่พบว่าในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีระดับ malondialdehyde สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) [19] จากผลการทดลองนี้จึงสนับสนุนว่ามีสารอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมทั้งในเลือดและน้ำไขข้อนั้นเกี่ยวข้องกับโรคข้อเข่าเสื่อม และเมื่อทำการเสริมวิตามินอี ขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิต เป็นระยะเวลา 2 เดือน ให้กับผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม จึงช่วยทำให้ระดับ malondialdehyde ในเลือดของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการตรวจวิเคราะห์ระดับ malondialdehyde ในน้ำไขข้อ ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมแสดงให้เห็นฤทธิ์ของวิตามินอีในการลดระดับ malondialdehyde ในน้ำไขข้อ เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติระหว่างระดับ malondialdehyde ในน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีและกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้ศึกษาระดับสารต้านอนุมูลอิสระในเลือดและน้ำไขข้อของกลุ่มตัวอย่าง โดยได้ทำการตรวจวิเคราะห์ระดับวิตามินอี ระดับ trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) และระดับ ferric reducing antioxidant power (FRAP)

ผลจากการศึกษาพบว่าการเสริมวิตามินอีในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเพิ่มระดับ TEAC และ FRAP ในเลือดของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังการเสริมวิตามินอีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการเสริมวิตามินอียังเพิ่มระดับ TEAC และ FRAP ในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมด้วยเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เฉพาะระดับ TEAC ในน้ำไขข้อเพียงอย่างเดียว การตรวจวัดระดับ TEAC และ FRAP ซึ่งใช้เพื่อบ่งชี้ total antioxidant status ในเลือดและน้ำไขข้อของกลุ่มตัวอย่าง โดยการตรวจวัดด้วยวิธี FRAP นั้น ในการตรวจวัดจะมีค่า pH ต่ำว่า 7.4 ซึ่งเป็นภาวะที่มีความเป็นกรดมากกว่าในร่างกายของมนุษย์ ทำให้ค่าที่ได้จากการตรวจวัดด้วยวิธี FRAP จึงไม่สะท้อนถึงภาวะที่เกิดขึ้นจริงในร่างกายต่างกับการตรวจวัด TEAC ซึ่งจำลองภาวะได้ใกล้เคียงกับภาวะที่เกิดขึ้นจริงในร่างกาย จึงทำให้การตรวจวัด total antioxidant status ด้วยวิธี TEAC มีความน่าเชื่อถือมากกว่าวิธี FRAP แต่อย่างไรก็ตาม ระดับ TEAC และ FRAP ในเลือดและน้ำไขข้อที่เพิ่มสูงขึ้นแสดงให้เห็นว่าการเสริมวิตามินอีในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมสามารถเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของผู้ป่วยได้

ผลจากการศึกษาตรวจวัดระดับวิตามินอีด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) แสดงให้เห็นอย่างเด่นชัดว่าการเสริมวิตามินอี ขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิต เป็นระยะเวลา 2 เดือน สามารถเพิ่มระดับวิตามินอีในเลือดของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังการเสริมวิตามินอี นอกจากนี้ยังพบว่าระดับวิตามินอีในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีนั้นสูงกว่าระดับวิตามินอีในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าการเสริมวิตามินอี ขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิต เป็นระยะเวลา 2 เดือน สามารถเพิ่มระดับวิตามินอีในร่างกายทั้งในระบบไหลเวียนโลหิต (systemic circulation) และน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Fairburn และคณะ ในปี ค.ศ.1992 และการศึกษาของ Sutipornpalangkul และคณะ ในปี ค.ศ. 2009 ซึ่งได้เสนอให้มีการเสริมวิตามินอีให้กับผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเนื่องจากว่าระดับวิตามินอีในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [46, 76] และจากการศึกษาของ Blakenhorn และคณะ ในปี ค.ศ.1986 ซึ่งศึกษาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี ขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิต เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์และกลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีนั้นมีอาการเจ็บปวดที่บริเวณข้อเข่าลดลง โดยพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) [49] จึงแสดงให้ทราบถึงฤทธิ์ของวิตามินอีในการช่วยเสริมรักษาผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Brand และคณะ ในปี ค.ศ. 2001 กลับไม่พบผลของวิตามินอีในการบรรเทาอาการปวดของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม แต่การศึกษาของ D'Adamo และคณะ ในปี ค.ศ. 2012 ได้รายงานว่าระดับวิตามินอีในเลือดของผู้ป่วยข้อสะโพกหักที่สูงสัมพันธ์กับการลดต่ำลงของระดับ interleukin 6 (IL-6) และ soluble receptor ของ tumor necrosis factor-alpha (sTNF-αR1) ซึ่งเป็น inflammatory marker อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) [77]

จากการศึกษาของ Cedergren และคณะ ในปี ค.ศ. 2002 ได้รายงานว่าพบการแสดงออกของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรครูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis, RA) [78] และการศึกษาของ Homma และคณะ ในปี ค.ศ. 2001 รายงานว่าพบการแสดงออกของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase บริเวณ synovial lining ของ human temporomandibular joints ส่วนที่เกิด internal derangement [79] นอกจากนี้การศึกษาของ

Abramson และคณะ ในปี ค.ศ. 2008 ได้แสดงให้เห็นความสำคัญในการป้องกันการเกิดไนตริกออกไซด์ภายในข้อเข่าซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่สนับสนุนให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยลดการแสดงออกของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase ภายในข้อเข่า แต่จากการศึกษาระดับเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase ด้วยเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่าวิตามินอีไม่มีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase ในเลือดโดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างก่อนและหลังการเสริมวิตามินอี รวมทั้งในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีและกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี

โปรตีน 3-nitrotyrosine เป็น secondary by-product ของการทำปฏิกิริยาระหว่างไนตริกออกไซด์หรือเปอร์ออกซิไนไตรต์และสารอนุมูลอิสระที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจน ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ผลจากการตรวจวัด 3-nitrotyrosine ในเยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ด้วยเทคนิค immunohistochemistry ทำให้พบการย้อมติดสีของ 3-nitrotyrosine บริเวณ subsynovium และ synovial lining cells อย่างชัดเจน สอดคล้องกับการศึกษาของ Sandhu และคณะ ในปี ค.ศ. 2003 ซึ่งรายงานว่าพบ 3-nitrotyrosine บริเวณเยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วยโครูมาตอยด์และผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม [80] นอกจากนี้ยังพบการย้อมติดสีของ 3-nitrotyrosine บริเวณ fibroblast like synoviocytes เซลล์ macrophages และเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น plasma cells เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocytes และ monocyte เป็นต้น การย้อมติดสีของ 3-nitrotyrosine แสดงให้เห็นถึงการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันบริเวณเยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และผลการจากเสริมวิตามินอีพบว่าการย้อมติดสีของ 3-nitrotyrosine ในเยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วยจางลง จึงสะท้อนถึงภาวะเครียดจากออกซิเดชันที่บริเวณเยื่อหุ้มข้อที่ลดลง และจากการวิเคราะห์จำนวน inflammatory cells ต่อ high power field พบว่าจำนวน inflammatory cells ต่อ high power field ในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วย anterior cruciate ligament อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงให้เห็นว่าภายในเยื่อหุ้มข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเกิดกระบวนการอักเสบร่วมกับภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และผลจากการเสริมวิตามินอีทำให้ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบจำนวน inflammatory cells ต่อ high power field ระหว่างกลุ่มผู้ป่วย anterior cruciate ligament และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี

ดังนั้นจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเสริมวิตามินอีขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิตทุกวัน เป็นระยะเวลา 2 เดือน ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมสามารถเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยการเพิ่มตัวบ่งชี้สารต้านอนุมูลอิสระและลดตัวบ่งชี้ของภาวะเครียดจากออกซิเดชัน สอดคล้องกับการศึกษาทั้งในเซลล์ทดลอง (*in vitro*) และสัตว์ทดลอง (*in vivo*) ซึ่งต่างสนับสนุนว่าวิตามินอีสามารถปกป้องเซลล์จากสารอนุมูลอิสระและมีฤทธิ์ ต้านการอักเสบ [49, 81] นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยทางคลินิกเกี่ยวกับการเสริมวิตามินอีในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่สนับสนุนว่าวิตามินอีมีฤทธิ์ บรรเทาอาการของโรคข้อเข่าเสื่อม เช่น ลดอาการปวดของข้อเข่า เพิ่มพิสัยการเคลื่อนไหวของข้อเข่า เป็นต้น [82] และสาเหตุที่ทำให้ตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันและสารต้านอนุมูลอิสระในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีมีค่าไม่เท่ากับกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีนั้น เนื่องมาจากความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมในผู้ป่วยตามเกณฑ์การคัดเข้าศึกษาของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม คือ ผู้ที่ป่วยเป็นโรคข้อเข่าเสื่อมตามเกณฑ์ของ Ahlback ที่ระดับความรุนแรง 3-5 ซึ่งจัดเป็นผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคสูง จึงทำให้เมื่อผู้ป่วยได้รับการเสริมวิตามินอีขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิต ทุกวัน เป็นระยะเวลา 2 เดือน ตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันและสารต้านอนุมูลอิสระในผู้ป่วยอยู่ในระดับที่ดีขึ้นแต่ยังคงไม่เท่ากับกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี

นอกจากนี้ตลอดระยะเวลาของการศึกษาไม่พบว่าผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีเกิดผลไม่พึงประสงค์ของวิตามินอี จึงสอดคล้องกับการศึกษาของ Meyers และคณะ ในปี ค.ศ. 1996 ที่รายงานว่าการเสริมวิตามินอีในระยะเวลาสั้นไม่พบผลไม่พึงประสงค์ของวิตามินอี [83] อย่างไรก็ตามการเสริมวิตามินอีควรอยู่ภายใต้การดูแลของแพทย์และนักโภชนาการอย่างใกล้ชิด

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้มีข้อจำกัดในเรื่องการเก็บตัวอย่างเลือดและน้ำไขข้อจากผู้ป่วย ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลที่ชัดเจนขึ้น ควรจัดเก็บตัวอย่างเลือดและน้ำไขข้อเพิ่มขึ้น เพื่อนำมาใช้ประเมินและศึกษาความสัมพันธ์ของภาวะเครียดจากออกซิเดชันและสารต้านอนุมูลอิสระในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

จากผลการศึกษาพบว่าการเสริมวิตามินอีในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีส่วนช่วยเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระและลดสารอนุมูลอิสระในเลือดและน้ำไขข้อได้ จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงบทบาทของวิตามินอี ในการควบคุมระดับสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระในระดับอณูชีววิทยา (molecular biology) เพื่อความเข้าใจถึงกลไกการออกฤทธิ์ ของวิตามินอีต่อรอยโรคของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมกระจ่างขึ้น

รายการอ้างอิง

[1] Elders MJ. The increasing impact of arthritis on public health. J Rheumatol Suppl. 60(2000): 6-8.

[2] Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. Bull World Health Organ. 81(2003): 646-56.

[3] Kuptniratsaikul V, Nilganuwong S, Tosayanonda O, Thamalikitkul V. The epidemiology of osteoarthritis of the knee in elderly patients living an urban area of Bangkok. J Med Assoc Thai. 85(2002): 154-61.

[4] Michael J, Schl ter-Brust K, Eysel P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. Deutsches rzteblatt international. 107(2010): 152-62.

[5] Henrotin Y, Kurz B, Aigner T. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? . Osteoarthritis Cartilage. 13(2005): 643-54.

[6] Karan A, Karan MA, Vural P, Erten N, Ta o lu C, Aksoy C, et al. Synovial fluid nitric oxide levels in patients with knee osteoarthritis. Clin Rheumatol. 22(2003): 397-9.

[7] Ersoy Y, zerol E, Baysal, Temel I, MacWalter RS, Meral, et al. Serum nitrate and nitrite levels in patients with rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and osteoarthritis. Ann Rheum Dis. 61(2002): 76-8.

[8] Sanghi D, Avasthi S, Srivastava R, Singh A. Nutritional Factors and Osteoarthritis: A review article. Internet Journal of Medical Update-EJOURNAL. 4(2009): 42-53.

[9] Wang Y, Prentice LF, Vitetta L, Wluka AE, Cicuttini FM. The effect of nutritional supplements on osteoarthritis. Altern Med Rev. 9(2004): 275-96.

[10] Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. Nat Rev Rheumatol. 6(2010): 625-35

[11] Martel-Pelletier J. Pathophysiology of osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage. 12(2004): Suppl A: S31-3.

[12] Kraemer J, Pathophysiology Of Osteoarthritis [Online]. 2012. Available from: http://www.ihaveosteoarthritis.com/what-causes-it.php. [2012, February 19]

[13] Honsawek S, Tanavalee A, Sakdinakiattikoon M, Chayanupatkul M, Yuktanandana P. Correlation of plasma and synovial fluid osteopontin with disease severity in knee osteoarthritis. Clin Biochem. 42(2009): 808-12.

[14] Honsawek S, Chayanupatkul M, Tanavalee A, Sakdinakiattikoon M, Deepaisarnsakul B, Yuktanandana P, et al. Relationship of plasma and synovial fluid BMP-7 with disease severity in knee osteoarthritis patients: a pilot study. Int Orthop. 33(2009): 1171-5.

[15] Honsawek S, Tanavalee A, Yuktanandana P. Elevated circulating and synovial fluid endoglin are associated with primary knee osteoarthritis severity. Arch Med Res. 40(2009): 590-4.

[16] Kellgren J, Lawrence J. Radiological assessment of osteo-arthrosis. Ann Rheum Dis. 16(1957): 494-502.

[17] Ahlback S. Osteoarthrosis of the knee. A radiographic investigation. Acta Radiol Diagn (Stockh). (1968): Suppl 277:7-72.

[18] Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. Am J Clin Nutr. 57(1993): 715-24.

[19] Surapaneni KM, Venkataramana G. Status of lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant enzymes in patients with osteoarthritis. Indian J Med Sci. 61(2007): 9-14.

[20] Ostalowska A, Birkner E, Wiecha M, Kasperczyk S, Kasperczyk A, Kapolka D, et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint. Osteoarthritis Cartilage. 14(2006): 139-45.

[21] Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. J Biol Chem. 266(1991): 2005-8.

[22] Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. Free Radic Res. 25(1996): 57-74.

[23] Jang D, Murrell GAC. Nitric oxide in arthritis. Free Radic Biol Med. 24(1998): 1511-9.

[24] Abramson SB. Osteoarthritis and nitric oxide. Osteoarthritis Cartilage. 16(2008): 15-20.

[25] Scher JU, Pillinger MH, Abramson SB. Nitric oxide synthases and osteoarthritis. Curr Rheumatoly Rep 9(2007): 9-15.

[26] Calvisi DF, Ladu S, Hironaka K, Factor VM, Thorgeirsson SS. Vitamin E down-modulates iNOS and NADPH oxidase in c-Myc/TGF-[alpha] transgenic mouse model of liver cancer. J Hepatol. 41(2004): 815-22.

[27] Cipollone F, Chiarelli F, Iezzi A, Fazia M, Cuccurullo C, Pini B, et al. Relationship between reduced BCL-2 expression in circulating mononuclear cells and early nephropathy in type 1 diabetes. Int J Immunopathol Pharmacol. 18(2005): 625-35.

[28] Melchiorri C, Meliconi R, Frizziero L, Silvestri T, Pulsatelli L, Mazzetti I, et al. Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. Arthritis Rheum. 41(1998): 2165-74.

[29] Pelletier JP, Lascau-Coman V, Jovanovic D, Fernandes J, Manning P, Connor J, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors. J Rheumatol. 26(1999): 2002-14.

[30] Saleron L, Sorrenti V, Giacomo C, Romeo G, Siracusa M. Progress in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors. Curr Pharm Des. 8(2002): 177-200.

[31] Nedelec E, Abid A, Cipolletta C, Presle N, Terlain B, Netter P, et al. Stimulation of cyclooxygenase-2-activity by nitric oxide-derived species in rat chondrocyte: lack of contribution to loss of cartilage anabolism1. Biochem Pharmacol. 61(2001): 965-78.

[32] Reynaert NL, Ckless K, Korn SH, Vos N, Guala AS, Wouters EF, et al. Nitric oxide represses inhibitory kappaB kinase through S-nitrosylation. Proc Natl Acad Sci U S A. 101(2004): 8945-50.

[33] Hauselmann H, Stefanovic-Racic M, Michel B, Evans C. Differences in nitric oxide production by superficial and deep human articular chondrocytes: implications for proteoglycan turnover in inflammatory joint diseases. J Immunol. 160(1998): 1444-8.

[34] Duncan M. A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine. Amino Acids. 25(2003): 351-61.

[35] Sandhu JK, Robertson S, Birnboim HC, Goldstein R. Distribution of protein nitrotyrosine in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. J Rheumatol. 30(2003): 1173-81.

[36] Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. Joint Bone Spine. 74(2007): 324-9.

[37] Maneesh M, Jayalekshmi H, Suma T, Chatterjee S, Chakrabarti A, Singh T. Evidence for oxidative stress in osteoarthritis. Indian J Clin Biochem. 20(2005): 129-30.

[38] Sanchez-Moreno C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. Food Sci and Technol Int. 8(2002): 121-37.

[39] Sarban S, Kocyigit A, Yazar M, Isikan UE. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Clin Biochem. 38(2005): 981-6.

[40] Regan E, Bowler R, Crapo J. Joint fluid antioxidants are decreased in osteoarthritic joints compared to joints with macroscopically intact cartilage and subacute injury. Osteoarthritis Cartilage. 16(2008): 515-21.

[41] Thakur V, Morley S, Manor D. Hepatic alpha-tocopherol transfer protein: ligand-induced protection from proteasomal degradation. Biochemistry (Mosc). 49(2010): 9339-44.

[42] McCarty CA, De Paola C, Livingston PM, Taylor HR. Reliability of a food frequency questionnaire to assess dietary antioxidant intake. Ophthalmic Epidemiol. 4(1997): 33-9.

[43] Brand C, Snaddon J, Bailey M, Cicuttini F. Vitamin E is ineffective for symptomatic relief of knee osteoarthritis: a six month double blind, randomised, placebo controlled study. Ann Rheum Dis. 60(2001): 946-9.

[44] Edmonds S, Winyard P, Guo R, Kidd B, Merry P, Langrish-Smith A, et al. Putative analgesic activity of repeated oral doses of vitamin E in the treatment of rheumatoid arthritis. Results of a prospective placebo controlled double blind trial. Br Med J. 56(1997): 649.

[45] Pattison D, Silman A, Goodson N, Lunt M, Bunn D, Luben R, et al. Vitamin C and the risk of developing inflammatory polyarthritis: prospective nested case-control study. Ann Rheum Dis. 63(2004): 843-7.

[46] Sutipornpalangkul W, Morales NP, Charoencholvanich K, Harnroongroj T. Lipid peroxidation, glutathione, vitamin E, and antioxidant enzymes in synovial fluid from patients with osteoarthritis. Int J Rheum Dis. 12(2009): 324-8.

[47] McAlindon TE, Jacques P, Zhang Y, Hannan MT, Aliabadi P, Weissman B, et al. Do antioxidant micronutrients protect against the development and progression of knee osteoarthritis? Arthritis Rheum. 39(1996): 648-56.

[48] Scherak O, Kolarz G, Sch dl C, Blankenhorn G. High dosage vitamin E therapy in patients with activated arthrosis. Z Rheumatol. 49(1990): 369-73.

[49] Blankenhorn G. Clinical effectiveness of Spondyvit (vitamin E) in activated arthroses. A multicenter placebo-controlled double-blind study. Z Orthop Ihre Grenzgeb. 124(1986): 340-3.

[50] Machtey I, Ouaknine L. Tocopherol in Osteoarthritis: a controlled pilot study. J Am Geriatr Soc. 26(1978): 328-30.

[51] Sylvester PW, Shah SJ. Mechanisms mediating the antiproliferative and apoptotic effects of vitamin E in mammary cancer cells. Front Biosci. 10(2005): 699-709.

[52] Chin SF, Ibahim J, Makpol S, Abdul Hamid NA, Abdul Latiff A, Zakaria Z, et al. Tocotrienol rich fraction supplementation improved lipid profile and oxidative status in healthy older adults: A randomized controlled study. Nutr Metab (Lond). 8(2011): 42-56.

[53] Nadeem A, Raj HG, Chhabra SK. Effect of vitamin E supplementation with standard treatment on oxidant-antioxidant status in chronic obstructive pulmonary disease. Indian J Med Res. 128(2008): 705-11.

[54] Tam LS, Li EK, Leung VY, Griffith JF, Benzie IF, Lim PL, et al. Effects of vitamins C and E on oxidative stress markers and endothelial function in patients with systemic lupus erythematosus: a double blind, placebo controlled pilot study. J Rheumatol. 32(2005): 275-82.

[55] Calvisi DF, Ladu S, Hironaka K, Factor VM, Thorgeirsson SS. Vitamin E down-modulates iNOS and NADPH oxidase in c-Myc/TGF-alpha transgenic mouse model of liver cancer. J Hepatol. 41(2004): 815-22.

[56] Vaziri ND, Ding Y, Ni Z. Nitric oxide synthase expression in the course of lead-induced hypertension. Hypertension. 34(1999): 558-62.

[57] Beharka AA, Wu D, Serafini M, Meydani SN. Mechanism of vitamin E inhibition of cyclooxygenase activity in macrophages from old mice: role of peroxynitrite. Free Radic Biol Med. 32(2002): 503-11.

[58] Kim JM, White RH. Effect of vitamin E on the anticoagulant response to warfarin. Am J Cardiol. 77(1996): 545-6.

[59] Ramos-Vara JA SJ, Duran CO. Diagnosing infectious porcine diseases using immunohistochemistry. Swine Health Prod. 7(1999): 85-91.

[60] Griffin K, Direct ELISA [Online]. 2012. Available from: http://openwetware.org/wiki/Image:DirectELISA.jpg. [2012,March 29]

[61] Griffin K, Sandwich ELISA [Online]. 2012. Available from: http://openwetware.org/wiki/Image:SandwichELISA.jpg. [2012, March 29]

[62] Griffin K, Competitive ELISA [Online]. 2012. Available from: http://openwetware.org/wiki/Image:CompetitiveELISA.jpg. [2012,March 29]

[63] Rashmin D, Analytical methods development and validation play important roles in the discovery, development, and manufacture of pharmaceuticals. [Online]. 2012. Available from: http://www.pharmainfo.net/reviews/introduction-analytical-method-development-pharmaceutical-formulations. [2012,March 29]

[64] Langley J, Structure of six achiral stationary phases [Online]. 2012. Available from: http://www.southampton.ac.uk/~gjl/Research/sfc.htm. [2012,Feburary 19]

[65] Bieri JG, Tolliver TJ, Catignani GL. Simultaneous determination of alpha-tocopherol and retinol in plasma or red cells by high pressure liquid chromatography. Am J Clin Nutr. 32(1979): 2143-9.

[66] Khan A, Khan MI, Iqbal Z, Shah Y, Ahmad L, Watson DG. An optimized and validated RP-HPLC/UV detection method for simultaneous determination of all-trans-retinol (vitamin A) and alpha-tocopherol (vitamin E) in human serum: comparison of different particulate reversed-phase HPLC columns. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 878(2010): 2339-47.

[67] Fiddler R. Collaborative study of modified AOAC method of analysis for nitrite in meat and meat products. J Assoc Off Anal Chem. 60(1977): 594-9.

[68] Bastos AS, Loureiro AP, Oliveira TF, Corbi SC, Caminaga RM, Junior CR, et al. Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography-based method. Anal Biochem. 423(2012): 141-6.

[69] Shen YC, Chen SL, Wang CK. Contribution of tomato phenolics to antioxidation and down-regulation of blood lipids. J Agric Food Chem. 55(2007): 6475-81.

[70] Merzouk S, Hichami A, Madani S, Merzouk H, Berrouiguet A, Prost J, et al. Antioxidant status and levels of different vitamins determined by high performance liquid chromatography in diabetic subjects with multiple complications. Gen Physiol Biophys. 22(2003): 15-27.

[71] Lien EJ, Ren S, Bui HH, Wang R. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. Free Radic Biol Med. 26(1999): 285-94.

[72] Madhujith T, Izydorczyk M, Shahidi F. Antioxidant properties of pearled barley fractions. J Agric Food Chem. 54(2006): 3283-9.

[73] Arama E, Michaud P, Rouffiac R, Rodriguez F. [Bioavailability of prolonged-liberation tablets of theophylline and paracetamol formulated in pulp from the fruit of baobab (Adansonia digitata L.)]. Pharm Acta Helv. 64(1989): 116-20.

[74] Benzie IFF, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of" antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem. 239(1996): 70-6.

[75] Wieland HA, Michaelis M, Kirschbaum BJ, Rudolphi KA. Osteoarthritis—an untreatable disease? Nat Rev Drug Discov. 4(2005): 331-44.

[76] Fairburn K, Grootveld M, Ward RJ, Abiuka C, Kus M, Williams RB, et al. Alpha-tocopherol, lipids and lipoproteins in knee-joint synovial fluid and serum from patients with inflammatory joint disease. Clin Sci (Lond). 83(1992): 657-64.

[77] D'Adamo CR, Miller RR, Shardell MD, Orwig DL, Hochberg MC, Ferrucci L, et al. Higher serum concentrations of dietary antioxidants are associated with lower levels of inflammatory biomarkers during the year after hip fracture. Clin Nutr. 32(2012): 1-7.

[78] Cedergren J, Forslund T, Sundqvist T, Skogh T. Inducible nitric oxide synthase is expressed in synovial fluid granulocytes. Clin Exp Immunol. 130(2002): 150-5.

[79] Homma H, Takahashi T, Seki H, Ohtani M, Kondoh T, Fukuda M. Immunohistochemical localization of inducible nitric oxide synthase in synovial tissue of human temporomandibular joints with internal derangement. Arch Oral Biol. 46(2001): 93-7.

[80] Sandhu JK, Robertson S, Birnboim HC, Goldstein R. Distribution of protein nitrotyrosine in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. J Rheumatol 30(2003): 1173-81.

[81] Stuyvesant VW, Jolley WB. Anti-inflammatory activity of d-alpha-tocopherol (vitamin E) and linoleic acid. Nature. 216(1967): 585-6.

[82] Machtey I, Ouaknine L. Tocopherol in Osteoarthritis: a controlled pilot study. J Am Geriatr Soc. 26(1978): 328-30.

[83] Meyers DG, Maloley PA, Weeks D. Safety of antioxidant vitamins. Arch Intern Med. 156(1996): 925-35.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

เอกสารข้อมูล และหนังสือแสดงความยินยอมในการเข้าร่วมโครงการวิจัย

1. เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม (Information sheet for patient)
2. เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้มีสุขภาพดี (Information sheer for healthy)
3. เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	**เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับ ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม** (Information sheet for patient)

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาผลของวิตามินอีต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

ผู้สนับสนุนการวิจัย .....

<u>แพทย์ผู้ทำวิจัย</u>

ชื่อ นพ.สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก

ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 02-2564510, 085-0425466 (ที่ทำงานและมือถือ)

<u>ผู้ร่วมในโครงการวิจัย</u>

1.ชื่อ นพ.อารี ตนาวลี

ที่อยู่ ภาควิชา ออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4510, 081-611-5086 (ที่ทำงานและมือถือ)

2.ชื่อ นางสาวธันยวัน สวนทวี

ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 083-9966088

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านเป็นผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่เตรียมเข้ารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ซึ่งตรงกับเงื่อนไขของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หาก

ท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย หรือแพทย์ผู้ร่วมทำวิจัย ซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

<u>เหตุผลความเป็นมา</u>

โรคข้อเข่าเสื่อมเป็นโรคที่เกิดจากความเสื่อมของข้อเข่าทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการเจ็บปวดอย่างเรื้อรังและอาจสูญเสียการทำงานของข้อเข่า ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการทำให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยด้อยลงจนไม่สามารถดำเนินชีวิตได้ตามปกติ โรคข้อเข่าเสื่อมนี้พบได้ในประชากรสูงอายุทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย ดังนั้นการรักษาโรคดังกล่าวจึงเป็นสิ่งจำเป็น ถึงแม้ว่าจะไม่สามารถทำให้ผู้ป่วยกลับสู่ภาวะปกติได้ แต่การรักษานั้นจะช่วยในการบรรเทาอาการเจ็บปวด ลดปัญหาเรื่องข้อติดหรือข้อโก่งงอได้ การรักษาผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมในปัจจุบันนั้น มักใช้ยาแก้ปวดเพื่อช่วยในการบรรเทาอาการ ทำให้ผู้ป่วยได้รับยาแก้ปวดเป็นระยะเวลานานซึ่งมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์หลายอย่างและหากผู้ป่วยมีอาการรุนแรงหรือข้อเข่าโก่งพิการมาก ทำให้จำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัด

ในปัจจุบันการเริ่มต้นการเกิดข้อเข่าเสื่อมนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด จากการศึกษาพบว่าเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายปัจจัย เช่น ปัจจัยทางพันธุกรรม ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม และปัจจัยเชิงกล เป็นต้น ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิด โรคข้อเข่าเสื่อมนั้นเกี่ยวกับการเกิดอนุมูลอิสระ รวมถึงสารที่เป็นอนุมูลอิสระที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ (reactive nitrogen spice) เช่น ไนตริกออกไซด์ซึ่งถูกสร้างจากเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส โดยสารที่เป็นอนุมูลอิสระมีบทบาทในการควบคุมการทำงานของเซลล์กระดูกอ่อน เช่น การกระตุ้นเซลล์ การเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ หากเกิดความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ หรือภาวะเครียดจากออกซิเดชันซึ่งเป็นภาวะที่สารอนุมูลอิสระมีมากว่าสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้เกิดผลเสียต่อโครงสร้างและการทำหน้าที่ของเซลล์กระดูกอ่อน ดังนั้นจึงได้มีความพยายามเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายเพื่อลดความรุนแรงของภาวะเครียดจากออกซิเดชันซึ่งสามารถก่อให้เกิดความเสียหายต่อสารชีวโมเลกุลทั้งต่อคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิกในร่างกายได้ โดยทำการเสริมสารอาหารจำพวกวิตามินที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินอี (alpha-tocopherol) และวิตามินซี (ascorbic acid) เป็นต้น

ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงศึกษาผลจากการเสริมวิตามินอี ขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิต เป็นระยะเวลา 2 เดือน ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม แล้วทำการตรวจวิเคราะห์ระดับผลิตภัณฑ์อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วย และการแสดงออกของยีนอินดิวซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทสในเยื่อหุ้มข้อ เพื่อศึกษาผลของการเสริมวิตามินอีในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

<u>วัตถุประสงค์ของการศึกษา</u>

วัตถุประสงค์หลักจากการศึกษาในครั้งนี้คือ เพื่อศึกษาผลของวิตามินอีต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และการแสดงออกของยีนอินดิวซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทสในเยื่อหุ้มข้อ โดยจำนวนผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย คือ 105 คน

<u>วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย</u>

หลังจากท่านให้ความยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะขอตรวจร่างกายและภาพถ่ายรังสีเอ็กซเรย์บริเวณข้อเข่าเพื่อคัดกรองว่าท่านมีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัย

หากท่านมีคุณสมบัติตามเกณฑ์คัดเข้า ท่านจะได้รับเชิญให้มาพบแพทย์ตามวันเวลาที่ผู้ทำวิจัยนัดหมาย เพื่อขอเจาะเลือดตรวจประเมินภาวะเครียดจากออกซิเดชันและผู้วิจัยจะทำการสุ่มเลือกว่าท่านจะอยู่ในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการเสริมวิตามินอี ขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิต เป็นประจำทุกวัน เป็นระยะเวลา 2 เดือนหรือกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี โดยระยะเวลาที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัย คือ 2 เดือน เมื่อครบกำหนดระยะเวลาที่ท่านต้องได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม ผู้วิจัยจะขอเจาะเลือดปริมาณ 5 ซีซี (1 ช้อนชา) เพื่อทำการตรวจประเมินภาวะเครียดจากออกซิเดชันได้แก่ มาลอนไดอัลดีไฮด์ โปรตีนคาร์บอนิล ไนไตรท์ แอลฟา-โทโคเฟอรอล และความสามารถรวมในการต้านการออกซิไดซ์ และขอเก็บน้ำไขข้อและเยื่อหุ้มข้อจากบริเวณข้อเข่าซึ่งได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์เฉพาะทางแล้วว่ามีพยาธิสภาพของโรคข้อเข่าเสื่อม โดยผู้ทำการวิจัยจะขอเก็บน้ำไขข้อและเยื่อหุ้มข้อในขณะที่ท่านเข้ารับการผ่าตัดซึ่งปกติถูกกำจัดทิ้งมาทำการวิจัยโดยจะทำการตรวจประเมินภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ได้แก่ มาลอนไดอัลดีไฮด์ โปรตีนคาร์บอนิล ไนไตรท์ แอลฟา-โทโคเฟอรอล ความสามารถรวมในการต้านการออกซิไดซ์ การแสดงออกของเอนไซม์อินดิวซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทส และ ไนโตรไทโรซีน ผู้วิจัยไม่ได้ทำการเจาะข้อเข่าผู้ป่วยเพิ่มเติมเพื่อเอาน้ำไขข้อและเยื่อหุ้มข้อ

ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

เพื่อให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ ผู้ทำวิจัยใคร่ขอความร่วมมือจากท่าน โดยจะขอให้ท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัยอย่างเคร่งครัด รวมทั้งแจ้งอาการผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับท่านระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัยให้ผู้ทำวิจัยได้รับทราบ

เพื่อความปลอดภัย ท่านไม่ควรใช้วัคซีน หรือรับประทานยาอื่น จากการจ่ายยาโดยแพทย์อื่นหรือซื้อยาจากร้านขายยา ขอให้ท่านปรึกษาผู้ทำวิจัย ทั้งนี้เนื่องจากยาดังกล่าวอาจมีผลเสริมฤทธิ์วิตามินอีที่ท่านได้รับจากผู้ทำวิจัย ในแง่การทำให้เลือดหยุดไหลยากได้ เช่น ยาที่มีผลต่อการแข็งตัวของเลือด ได้แก่ แอสไพริน (aspirin), วาฟาริน (wafarin), เคลกเซน (clexane) และเฮพาริน (heparin) เป็นต้น ดังนั้นขอให้ท่านแจ้งผู้ทำวิจัยเกี่ยวกับยาที่ท่านได้รับในระหว่างที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัย

ผู้เข้าร่วมการวิจัยไม่มีค่าใช้จ่ายใดๆเพิ่มเติมจากปกติทั้งสิ้น (ค่าอุปกรณ์ในการเจาะเลือด, ภาชนะเก็บเลือดและน้ำไขข้อ, การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการอยู่ในความรับผิดชอบของผู้วิจัย)

ความเสี่ยงที่อาจได้รับ

ความเสี่ยงจากการรับประทานยาทุกชนิดอาจทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ได้ทั้งสิ้นไม่มากก็น้อย แพทย์ผู้ทำการวิจัยขอชี้แจงถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่อาจสัมพันธ์กับยาที่ศึกษาทั้งหมดดังนี้

มีข้อมูลที่แสดงว่าวิตามินอีอาจมีผลกระทบต่อการแข็งตัวของเลือดเมื่อกินร่วมกับยาต้านการแข็งตัวของเลือดดังกล่าวข้างต้น และมีรายงานเรื่องการปวดหัว และคลื่นไส้เมื่อได้รับยาในปริมาณสูงว่า 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิต รวมถึงอาการข้างเคียงและความไม่สบายที่ยังไม่มีการรายงานด้วย ดังนั้นระหว่างที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัยจะมีการติดตามดูแลสุขภาพของท่านอย่างใกล้ชิด

กรุณาแจ้งผู้ทำวิจัยในกรณีที่พบอาการดังกล่าวข้างต้น หรืออาการอื่น ๆ ที่พบร่วมด้วยระหว่างที่อยู่ในโครงการวิจัย ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับสุขภาพของท่าน ขอให้ท่านรายงานให้ผู้ทำวิจัยทราบโดยเร็ว

ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเจาะเลือด

ท่านมีโอกาสที่จะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก ช้ำจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือดหรือหน้ามืด และโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดพบได้น้อยมาก

ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเก็บน้ำไขข้อและเยื่อหุ้มข้อ

ผู้วิจัยทำการเก็บน้ำไขข้อและเยื่อหุ้มข้อหลังจากศัลยแพทย์ทำการผ่าตัดเปิดข้อเข่าตามขั้นตอนปกติของการผ่าตัดใส่ข้อเข่าเทียม โดยปกตินั้นน้ำไขข้อและเยื่อหุ้มข้อที่ได้จากการผ่าตัดจะถูกทิ้งไปแต่ผู้วิจัยจะนำมาตรวจเพิ่มเติม ดังนั้นผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยจึงไม่มีความเสี่ยงเพิ่มเติมใดจากการเก็บน้ำไขข้อและเยื่อหุ้มข้อของผู้ทำการวิจัยนอกเหนือไปจากความเสี่ยงของการผ่าตัด

ความเสี่ยงที่อาจเพิ่มขึ้นระหว่างการผ่าตัด

หากท่านมีภาวะที่ทำให้เกิดเลือดออกง่าย หรือกินยาที่ทำให้เลือดออกง่าย อาจมีภาวะเลือดออกมากกว่าปกติในขณะผ่าตัดได้

ความเสี่ยงที่ไม่ทราบแน่นอน

ท่านอาจเกิดอาการข้างเคียง หรือความไม่สบาย นอกเหนือจากที่ได้แสดงในเอกสารฉบับนี้ ซึ่งอาการข้างเคียงเหล่านี้เป็นอาการที่ไม่เคยพบมาก่อน เพื่อความปลอดภัยของท่าน ควรแจ้งผู้ทำวิจัยให้ทราบทันทีเมื่อเกิดความผิดปกติใดๆ เกิดขึ้น

หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

หากมีการค้นพบข้อมูลใหม่ ๆ ที่อาจมีผลต่อความปลอดภัยของท่านในระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัย ผู้ทำวิจัยจะแจ้งให้ท่านทราบทันที เพื่อให้ท่านตัดสินใจว่าจะอยู่ในโครงการวิจัยต่อไปหรือจะขอถอนตัวออกจากการวิจัย

การพบแพทย์นอกตารางนัดหมายในกรณีที่เกิดอาการข้างเคียง

หากมีอาการข้างเคียงใด ๆ เกิดขึ้นกับท่าน ขอให้ท่านรีบมาพบแพทย์ที่สถานพยาบาลทันที ถึงแม้ว่าจะอยู่นอกตารางการนัดหมาย เพื่อแพทย์จะได้ประเมินอาการข้างเคียงของท่าน และให้การรักษาที่เหมาะสมทันที หากอาการดังกล่าวเป็นผลจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะไม่เสียค่าใช้จ่าย

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้อาจจะทำให้ท่านมีสุขภาพที่ดีขึ้น หรืออาจจะลดความรุนแรงของโรคได้ แต่ไม่ได้รับรองว่าสุขภาพของท่านจะต้องดีขึ้นหรือความรุนแรงของโรคจะลดลงอย่างแน่นอน โดยผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยที่ได้รับวิตามินอีอาจได้รับประโยชน์จากยาโดยมีรายงานว่าวิตามินอีสามารถลดอาการปวดได้

<u>วิธีการและรูปแบบการรักษาอื่น ๆ ซึ่งมีอยู่สำหรับอาสาสมัคร</u>

ท่านไม่จำเป็นต้องเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้เพื่อประโยชน์ในการรักษาโรคที่ท่านเป็นอยู่ เนื่องจากมีแนวทางการรักษาอื่น ๆ หลายแบบสำหรับรักษาโรคของท่านได้ ดังนั้นจึงควรปรึกษาแนวทางการรักษาวิธีอื่นๆ กับแพทย์ผู้ให้การรักษาท่านก่อนตัดสินใจเข้าร่วมในการวิจัย

<u>ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมในโครงการวิจัย</u>

ขอให้ท่านปฏิบัติดังนี้

- ขอให้ท่านให้ข้อมูลทางการแพทย์ของท่านทั้งในอดีต และปัจจุบัน แก่ผู้ทำวิจัยด้วยความสัตย์จริง
- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่ท่านร่วมในโครงการวิจัย
- ขอให้ท่านงดการใช้ยาอื่นนอกเหนือจากที่ผู้ทำวิจัยได้จัดให้ รวมถึงการรักษาอื่น ๆ เช่น การรักษาด้วยสมุนไพร การซื้อยาจากร้านขายยา
- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบทันที หากท่านได้รับยาอื่นนอกเหนือจากยาที่ใช้ในการศึกษาตลอดระยะเวลาที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัย
- ขอให้ท่านนำยาที่ใช้ในการศึกษาของท่านทั้งหมดที่เหลือจากการรับประทานมาให้ผู้ทำวิจัยทุกครั้งที่นัดหมายให้มาพบ

<u>อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยและความรับผิดชอบของผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัย</u>

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัย ท่านจะได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมทันที ผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัยยินดีจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของท่าน และการลงนามในเอกสารให้ความยินยอม ไม่ได้หมายความว่าท่านได้สละสิทธิ์ ทางกฎหมายตามปกติที่ท่านพึงมี

ในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใด ๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติม ขอให้ติดต่อ นพ.สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก

<u>ค่าใช้จ่ายของท่านในการเข้าร่วมการวิจัย</u>

ท่านจะได้รับวิตามินอี ขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิต ในโครงการวิจัยจากผู้สนับสนุนการวิจัยโดยไม่ต้องเสียค่าใช้จ่าย (ค่าใช้จ่ายอื่นที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย เช่น ค่าวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ผู้สนับสนุนการวิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบทั้งหมด)

ค่าตอบแทนสำหรับผู้เข้าร่วมวิจัย

ท่านจะไม่ได้รับค่าชดเชยการเสียเวลาและค่าเดินทางตอบแทนจากการเข้าร่วมในการวิจัยในครั้งนี้

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอถอนตัวออกจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาโรคของท่านแต่อย่างใด

ผู้ทำวิจัยอาจถอนท่านออกจากการเข้าร่วมการวิจัย เพื่อเหตุผลด้านความปลอดภัยของท่าน หรือเมื่อผู้สนับสนุนการวิจัยยุติการดำเนินงานวิจัย หรือ ในกรณีดังต่อไปนี้

- ท่านไม่สามารถปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัย
- ท่านรับประทานยาที่ไม่อนุญาตให้ใช้ในการศึกษา
- ท่านเกิดอาการข้างเคียง หรือความผิดปกติของผลทางห้องปฏิบัติการจากการได้รับยาที่ใช้ในการศึกษา
- ท่านแพ้ยาที่ใช้ในการศึกษา
- ท่านต้องการปรับเปลี่ยนการรักษาด้วยยาตัวที่ไม่ได้รับอนุญาตจากการวิจัยครั้งนี้

การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร

ข้อมูลที่อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

จากการลงนามยินยอมของท่านผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัยสามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของท่านได้แม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่านต้องการยกเลิกการให้สิทธิ์ ดังกล่าว ท่านสามารถแจ้ง หรือเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอม โดยส่งถึงนพ.สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกแพทยพัฒน์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

จากการลงนามยินยอมของท่านแพทย์ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของท่านที่เกี่ยวกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

<u>สิทธิ์ของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย</u>

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิ์ ดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ รวมทั้งยาและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่จะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
5. ท่านจะได้รับการเปิดเผยถึงทางเลือกในการรักษาด้วยวิธีอื่น ยา หรืออุปกรณ์ซึ่งมีผลดีต่อท่านรวมทั้งประโยชน์และความเสี่ยงที่ท่านอาจได้รับ
6. ท่านจะได้รับทราบแนวทางในการรักษา ในกรณีที่พบโรคแทรกซ้อนภายหลังการเข้าร่วมในโครงการวิจัย
7. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
8. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลกระทบใด ๆ ทั้งสิ้น
9. ท่านจะได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
10. ท่านมีสิทธิ์ ในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพล บังคับข่มขู่หรือหลอกลวง

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

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

.....

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	**เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้มีสุขภาพดี** (Information sheet for healthy)

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาผลของวิตามินอีต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

ผู้สนับสนุนการวิจัย .....

<u>แพทย์ผู้ทำวิจัย</u>

ชื่อ นพ.สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก

ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 02-2564510, 085-0425466 (ที่ทำงานและมือถือ)

<u>ผู้ร่วมในโครงการวิจัย</u>

1.ชื่อ นพ.อารี ตนาวลี

ที่อยู่ ภาควิชา ออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4510, 081-611-5086 (ที่ทำงานและมือถือ)

2.ชื่อ นางสาวธันยวัน สวนทวี

ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 083-9966088

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านเป็นคนปกติที่มีสุขภาพดีขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัยหรือแพทย์ผู้ร่วมทำวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

<u>เหตุผลความเป็นมา</u>

โรคข้อเข่าเสื่อมเป็นโรคที่เกิดจากความเสื่อมของข้อเข่าทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการเจ็บปวดอย่างเรื้อรังและอาจสูญเสียการทำงานของข้อเข่า ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการทำให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยด้อยลงจนไม่สามารถดำเนินชีวิตได้ตามปกติ โรคข้อเข่าเสื่อมนี้พบได้ในประชากรสูงอายุทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย ดังนั้นการรักษาโรคดังกล่าวจึงเป็นสิ่งจำเป็น ถึงแม้ว่าจะไม่สามารถทำให้ผู้ป่วยกลับสู่ภาวะปกติได้ แต่การรักษานั้นจะช่วยในการบรรเทาอาการเจ็บปวด ลดปัญหาเรื่องข้อติดหรือข้อโก่งงอได้ การรักษาผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมในปัจจุบันนั้น มักใช้ยาแก้ปวดเพื่อช่วยในการบรรเทาอาการ ทำให้ผู้ป่วยได้รับยาแก้ปวดเป็นระยะเวลานานซึ่งมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์หลายอย่างและหากผู้ป่วยมีอาการรุนแรงหรือข้อเข่าโก่งพิการมาก ทำให้จำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัด

ในปัจจุบันการเริ่มต้นการเกิดข้อเข่าเสื่อมนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด จากการศึกษาพบว่าเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายปัจจัย เช่น ปัจจัยทางพันธุกรรม ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม และปัจจัยเชิงกล เป็นต้น ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อมนั้นเกี่ยวกับการเกิดอนุมูลอิสระ รวมถึงสารที่เป็นอนุมูลอิสระที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ (reactive nitrogen spice) เช่น ไนตริกออกไซด์ซึ่งถูกสร้างจากเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส โดยสารที่เป็นอนุมูลอิสระมีบทบาทในการควบคุมการทำงานของเซลล์กระดูกอ่อน เช่น การกระตุ้นเซลล์ การเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ หากเกิดความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ หรือภาวะเครียดจากออกซิเดชันซึ่งเป็นภาวะที่สารอนุมูลอิสระมีมากว่าสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้เกิดผลเสียต่อโครงสร้างและการทำหน้าที่ของเซลล์กระดูกอ่อน ดังนั้นจึงได้มีความพยายามเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายเพื่อลดความรุนแรงของภาวะเครียดจากออกซิเดชันซึ่งสามารถก่อให้เกิดความเสียหายต่อสารชีวโมเลกุลทั้งต่อคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิกในร่างกายได้ โดยทำการเสริมสารอาหารจำพวกวิตามินที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินอี (alpha-tocopherol) และวิตามินซี (ascorbic acid) เป็นต้น

ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงศึกษาผลจากการเสริมวิตามินอี ขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิต เป็นระยะเวลา 2 เดือน ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม แล้วทำการตรวจวิเคราะห์ระดับผลิตภัณฑ์อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วย และการแสดงออก

ของยีนอินดิวซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทสในเยื่อหุ้มข้อเพื่อศึกษาผลของการเสริมวิตามินอีในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

<u>วัตถุประสงค์ของการศึกษา</u>

วัตถุประสงค์หลักจากการศึกษาในครั้งนี้คือ เพื่อศึกษาผลของวิตามินอีต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และการแสดงออกของยีนอินดิวซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทสในเยื่อหุ้มข้อ โดยจำนวนผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย คือ 105 คน

<u>วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย</u>

หลังจากท่านให้ความยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะขอตรวจร่างกายเพื่อคัดกรองว่าท่านมีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัย

หากท่านมีคุณสมบัติตามเกณฑ์คัดเข้า ท่านจะได้รับเชิญให้มาพบแพทย์ตามวันเวลาที่ผู้ทำวิจัยนัดหมาย เพื่อขอเจาะเลือดปริมาณ 5 ซีซี (1 ช้อนชา) เพื่อใช้ตรวจประเมินภาวะเครียดจากออกซิเดชันได้แก่ มาลอนไดอัลดีไฮด์ โปรตีนคาร์บอนิล ไนไตรท์ แอลฟา-โทโคเฟอรอล และความสามารถรวมในการต้านการออกซิไดซ์ โดยท่านจะเป็นกลุ่มควบคุมเพื่อเปรียบเทียบภาวะเครียดจากออกซิเดชันระหว่างกลุ่มคนปกติและกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

<u>ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย</u>

ผู้เข้าร่วมการวิจัยไม่มีค่าใช้จ่ายใดๆทั้งสิ้น (ค่าอุปกรณ์ในการเจาะเลือด, ภาชนะเก็บเลือด, การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการอยู่ในความรับผิดชอบของผู้วิจัย)

<u>ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเจาะเลือด</u>

ท่านมีโอกาสที่จะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก ช้ำจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือดหรือหน้ามืด และโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดพบได้น้อยมาก

<u>ความเสี่ยงที่ไม่ทราบแน่นอน</u>

ท่านอาจเกิดอาการข้างเคียง หรือความไม่สบาย นอกเหนือจากที่ได้แสดงในเอกสารฉบับนี้ ซึ่งอาการข้างเคียงเหล่านี้เป็นอาการที่ไม่เคยพบมาก่อน เพื่อความปลอดภัยของท่าน ควรแจ้งผู้ทำวิจัยให้ทราบทันทีเมื่อเกิดความผิดปกติใดๆ เกิดขึ้น

หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

หากมีการค้นพบข้อมูลใหม่ ๆ ที่อาจมีผลต่อความปลอดภัยของท่านในระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัย ผู้ทำวิจัยจะแจ้งให้ท่านทราบทันที

<u>การพบแพทย์นอกตารางนัดหมายในกรณีที่เกิดอาการข้างเคียง</u>

หากมีอาการข้างเคียงใด ๆ เกิดขึ้นกับท่าน ขอให้ท่านรีบมาพบแพทย์ที่สถานพยาบาลทันที ถึงแม้ว่าจะอยู่นอกตารางการนัดหมาย เพื่อแพทย์จะได้ประเมินอาการข้างเคียงของท่าน และให้การรักษาที่เหมาะสมทันที หากอาการดังกล่าวเป็นผลจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะไม่เสียค่าใช้จ่าย

<u>ประโยชน์ที่อาจได้รับ</u>

ท่านไม่ได้รับประโยชน์ใดจากงานวิจัยในครั้งนี้

<u>ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมในโครงการวิจัย</u>

ขอให้ท่านปฏิบัติดังนี้

- ขอให้ท่านให้ข้อมูลทางการแพทย์ของท่านทั้งในอดีต และปัจจุบัน แก่ผู้ทำวิจัยด้วยความสัตย์จริง
- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่ท่านร่วมในโครงการวิจัย

<u>อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยและความรับผิดชอบของผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัย</u>

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัย ท่านจะได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมทันที ผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัยยินดีจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของท่าน และการลงนามในเอกสารให้ความยินยอม ไม่ได้หมายความว่าท่านได้สละสิทธิ์ ทางกฎหมายตามปกติที่ท่านพึงมี

ในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใด ๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติม ขอให้ติดต่อ นพ.สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก

<u>ค่าใช้จ่ายของท่านในการเข้าร่วมการวิจัย</u>

ท่านจะไม่เสียค่าใช้จ่ายในการเข้าร่วมการวิจัยในครั้งนี้

ค่าตอบแทนสำหรับผู้เข้าร่วมวิจัย

ท่านจะไม่ได้รับค่าชดเชยการเสียเวลาและค่าเดินทางตอบแทนจากการเข้าร่วมการวิจัยในครั้งนี้

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา

การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร

ข้อมูลที่อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

จากการลงนามยินยอมของท่านผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัยสามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของท่านได้แม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่านต้องการยกเลิกการให้สิทธิ์ ดังกล่าว ท่านสามารถแจ้ง หรือเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอม โดยส่งถึงนพ.สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกแพทยพัฒน์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

สิทธิ์ของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิ์ ดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ รวมทั้งยาและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่จะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
5. ท่านจะได้รับทราบแนวทางในการรักษา ในกรณีที่พบโรคแทรกซ้อนภายหลังการเข้าร่วมในโครงการวิจัย

6. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
7. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลกระทบใด ๆ ทั้งสิ้น
8. ท่านจะได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
9. ท่านมีสิทธิ์ ในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพล บังคับข่มขู่หรือหลอกลวง

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

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

.....

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	**เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย**

การวิจัยเรื่อง การศึกษาผลของวิตามินอีต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

วันให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....

ที่อยู่.....

ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่ ..... และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนามพร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับข้าพเจ้า ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย และแนวทางรักษาโดยวิธีอื่นอย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว ข้าพเจ้าจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย แต่ไม่รวมถึงการชดเชยจากผู้สนับสนุนการวิจัย ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน ได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจและประมวลข้อมูลของข้าพเจ้า ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของข้าพเจ้าได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ ของข้าพเจ้า เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิ์ ที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถยกเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นและมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีเข้าร่วมในการวิจัยด้วยความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมนี้

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม

(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการไม่พึงประสงค์หรือความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย

(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน

(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

ภาคผนวก ข

การเตรียมบัฟเฟอร์ และสารละลาย

1.สารละลาย 1X Phosphate buffer saline (PBS)

NaCl	8.0	g
Na_2HPO_4	1.16	g
KH_2PO_4	0.2	g
KCl	0.2	g
Distilled water เป็น	1,000	ml

ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วปรับ pH ของสารละลาย 7.4 ฆ่าเชื้อสารละลายด้วยการ autoclave แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก ค

แสดงรายงานการตีพิมพ์บางส่วนของวิทยานิพนธ์ในการประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานทางวิชาการระดับชาติ The 4th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2012 “Pharmacy Profession in Harmony” ระหว่างวันที่ 11-12 กุมภาพันธ์ 2555 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ชื่อวารสาร Isan Journal of Pharmaceutical Science, IJPS Vol.8 No.1, January - April 2012

หัวข้อเรื่อง การศึกษาผลของวิตามินอีต่อระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันและสารต้านอนุมูลอิสระในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม
(THE EFFECT OF VITAMIN E ON OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDANT CAPACITY IN BLOOD AND SYNOVIAL FLUID OF PATIENTS WITH KNEE OSTEOARTHRITIS)

หน้า 144-149

ชื่อผู้นำเสนอ นางสาวธันยวัน สวนทวี

เผยแพร่ในสื่ออิเล็กทรอนิกส์

http://pharm.kku.ac.th/isan-journal/journal/volumn8-no1/4annual/018-CU_Pages_144-149.pdf

การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานระดับชาติ The 4th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2012 11 – 12 กุมภาพันธ์ 2555
"Pharmacy Profession in Harmony" ณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

PP-PP-019-CU

การศึกษาผลของวิตามินอีต่อระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และสารต้านอนุมูลอิสระในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

ธันยวัน สวนทวี*, สิริชัย อดิศักดิ์วัฒนา, อารี ตนาวลี, สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของวิตามินอีต่อระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และสารต้านอนุมูลอิสระในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

ธันยวัน สวนทวี*, สิริชัย อดิศักดิ์วัฒนา, อารี ตนาวลี, สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก

บทนำ : โรคข้อเข่าเสื่อม (knee osteoarthritis, KOA) เป็นโรคที่เกิดจากการเสื่อมสภาพของข้อเข่าซึ่งพบได้บ่อยในผู้สูงอายุ ทำให้เกิดอาการเจ็บปวดอย่างเรื้อรังและอาจสูญเสียการใช้งานของข้อเข่า ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ข้อพิการและ ทุพพลภาพ ปัจจุบันมีหลักฐานงานวิจัยพบว่าภาวะเครียดจากออกซิเดชันมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคข้อเข่าเสื่อม วิตามินอีเป็นสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและสามารถลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันได้ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อศึกษาผลของการเสริมวิตามินอีต่อระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันและระดับสารต้านอนุมูลอิสระในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม **วัสดุและวิธีการ :** การศึกษานี้ทำการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 25 ราย ทั้งก่อนและหลังได้รับการเสริมวิตามินอี โดยการรับประทานวิตามินอีขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิตทุกวัน เป็นระยะเวลา 2 เดือน โดยตรวจวัดระดับ lipid peroxidation ด้วยวิธี thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) ระดับไนไตรต์โดยวิธี Griess และระดับ total antioxidant capacity (TAC) โดยอาศัยหลักการ trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) และ ferric reducing antioxidant power (FRAP) **ผลการศึกษา :** หลังจากเสริมวิตามินอีให้กับผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเป็นระยะเวลา 2 เดือน ระดับ TBARs ในพลาสมาและน้ำไขข้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจาก 1.427 ± 0.075 μM เป็น 0.999 ± 0.110 μM (P = 0.001) ในพลาสมา และ 1.462 ± 0.123 μM เป็น 1.124 ± 0.084 μM ในน้ำไขข้อ (P = 0.029) ระดับไนไตรต์ในพลาสมาและน้ำไขข้อลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระดับ TEAC และ FRAP ในพลาสมาและน้ำไขข้อเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังได้รับการเสริมวิตามินอี **สรุปผล :** การเสริมวิตามินอีขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิต เป็นระยะเวลา 2 เดือน ส่งผลดีต่อระดับสารต้านอนุมูลอิสระ ในเลือดและน้ำไขข้อ โดยสามารถลดระดับ TBARs และเพิ่มระดับ TEAC และ FRAP ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมได้ การศึกษานี้จึงสนับสนุนประโยชน์ของวิตามินอีในการลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในโรคข้อเข่าเสื่อม อย่างไรก็ตามการเสริมวิตามินอีควรอยู่ภายใต้การดูแลของแพทย์และนักโภชนาการอย่างใกล้ชิด

คำสำคัญ : โรคข้อเข่าเสื่อม, วิตามินอี, ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน, สารต้านอนุมูลอิสระ, น้ำไขข้อ

Abstract

The effect of vitamin E on oxidative stress and antioxidant capacity in blood and synovial fluid of patients with knee osteoarthritis

Suantawee T*, Adisakwattana S, Tanavalee A, Honsawek S

Introduction : Knee osteoarthritis (KOA), one of the most common degenerative joint diseases, is a major cause of morbidity in the elderly. Increasing evidences in both experimental and clinical researches suggest that oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of osteoarthritis. Since vitamin E is one of the major dietary antioxidants, the objective of

*ติดต่อผู้นิพนธ์ : โทร 083-9966-088 E-mail : suantawee@gmail.com
*Corresponding author : Tel 083-9966-088 E-mail : suantawee@gmail.com

this study was to evaluate the effect of vitamin E supplementation on oxidative stress and antioxidant capacity in blood and synovial fluid from patients with knee osteoarthritis. **Material and method** : We measured lipid peroxidation products in 25 KOA patients by thiobarbituric acid reactive substances (TBARs), nitrite by Griess assay and total antioxidant capacity (TAC) by trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay before and after 2-month supplementation with vitamin E 400 IU/day in plasma and synovial fluid. **Results** : After 2 months of supplementation, TBARs levels in plasma and synovial fluid were decreased significantly from 1.427 ± 0.075 μM to 0.999 ± 0.110 μM (P = 0.001) and 1.462 ± 0.123 μM to 1.124 ± 0.084 μM (P = 0.029), respectively. Although nitrite levels in plasma and synovial fluid were decreased, the differences were not statistically significant. Plasma and synovial fluid TEAC and FRAP levels were significantly increased after supplementation with vitamin E. **Conclusion** : Our findings showed that 2 month supplementation of vitamin E 400 IU/day provide positive outcome of plasma and synovial fluid in antioxidant status by decreasing TBARs levels and increasing TEAC and FRAP levels in patients with knee osteoarthritis. This results support a beneficial effect of vitamin E in the degenerative process of osteoarthritis. However, management should be under the care of knowledgeable physicians and dietitians.

Keywords: Knee osteoarthritis, Vitamin E, Oxidative stress, Antioxidant, Synovial fluid

บทนำ

โรคข้อเข่าเสื่อม (knee osteoarthritis,KOA) เป็นโรคที่เกิดจากความเสื่อมสภาพของข้อเข่าซึ่งพบได้บ่อยในผู้สูงอายุ ทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการเจ็บปวดอย่างเรื้อรังและอาจสูญเสียการใช้งานของข้อเข่า ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยต้อยลงจนไม่สามารถดำเนินชีวิตได้ตามปกติ ถึงแม้ว่าการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมไม่สามารถทำให้ผู้ป่วยกลับสู่ภาวะปกติได้ แต่การรักษานั้นสามารถช่วยบรรเทาอาการเจ็บปวดและลดปัญหาเรื่องข้อติดหรือข้อโก่งงอ และช่วยให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นได้ (Wieland *et al.*, 2005)

การรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมในปัจจุบัน นิยมใช้ยาแก้ปวดเพื่อช่วยบรรเทาอาการเจ็บปวด ซึ่งถ้าผู้ป่วยได้รับยาแก้ปวดเป็นระยะเวลานานอาจส่งผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ต่อผู้ป่วยได้ และหากผู้ป่วยมีอาการรุนแรงหรือข้อเข่าโก่งพิการมาก จำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัด ซึ่งวิธีการรักษาที่ได้รับความนิยมในปัจจุบันคือ การผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม

ในปัจจุบันพยาธิกำเนิดและกลไกของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด จากการศึกษาพบว่าสาเหตุของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมมีส่วนเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ปัจจัยทางพันธุกรรม ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม และปัจจัยเชิงกล เป็นต้น ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อมนั้นเกี่ยวกับการเกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งสารอนุมูลอิสระมีบทบาทในการควบคุมการทำงานของเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocytes) เช่น การกระตุ้นเซลล์ การเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์และการปรับแต่งเนื้อพื้น (matrix) ของและกระดูกและกระดูกอ่อน (Henrotin *et al.*, 2005) หากเกิดความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระหรือภาวะเครียดจากออกซิเดชัน อาจทำให้เกิดผลเสียต่อโครงสร้างและการทำหน้าที่ของเซลล์กระดูกอ่อน เช่น การตายของเซลล์ การสลายตัวของเนื้อพื้นกระดูกและกระดูกอ่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) ซึ่งถูกสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส (nitric oxide synthase, NOS) ในเซลล์กระดูกอ่อน (Sarban *et al.*, 2005; Surapaneni *et al.*, 2007; Karan *et al.*, 2003)

การเกิดความไม่สมดุลระหว่างสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระทำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ดังนั้นจึงได้มีแนวคิดในการเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายเพื่อลดความรุนแรงของภาวะ เครียดจากออกซิเดชันซึ่งสามารถก่อให้เกิดความเสียหายต่อสารชีวโมเลกุลทั้งต่อคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิกในร่างกายได้ โดยทำการเสริมสารอาหารจำพวกวิตามินที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินอี (alpha-tocopherol) และวิตามินซี (ascorbic acid) เป็นต้น จากการศึกษาในสัตว์ทดลองและการศึกษาทางคลินิกในมนุษย์สนับสนุนบทบาทของวิตามินอีในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยในการเจริญของเซลล์กระดูกอ่อนและสามารถลดความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมได้ (Wang *et al.*, 2004; Sutipornpalangkul *et al.*, 2009) อย่างไรก็ตามยังไม่มีงานวิจัยที่ยืนยันแน่ชัดว่าการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันและชะลอการทำลายเซลล์กระดูกอ่อนในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงศึกษาผลจากการเสริมวิตามินอี ขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิตทุกวัน เป็นระยะเวลา 2 เดือน ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมต่อระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันและระดับสารต้านอนุมูลอิสระในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

วิธีดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการทดลอง

การศึกษานี้ได้รับการรับรองและผ่านการพิจารณาโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (30 สิงหาคม 2554, COA No.545/2011, IRB No. 274/54) ผู้เข้าร่วมงามวิจัยเป็นผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่มีความรุนแรงของโรคโดยอาศัยเกณฑ์ของนายแพทย์ Ahlback (Ahlback grade) (Ahlback, 1968) ตั้งแต่ระดับ 3, 4 และ 5 และเตรียมเข้ารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม ซึ่งมาตรวจรักษาที่แผนกออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย จำนวน 25 ราย ผู้เข้าร่วมงานวิจัยได้รับการชี้แจงอธิบายรายละเอียดของงานวิจัยและลงชื่อยินยอมเข้าร่วมงานวิจัย จากนั้นจึงทำการเก็บตัวอย่างเลือดของผู้เข้าร่วมงานวิจัยก่อนการรับประทานวิตามินอี ขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิตทุกวัน เป็นระยะเวลา 2 เดือน และเมื่อครบกำหนดระยะเวลาจึงทำการเก็บเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมขณะผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม แต่เนื่องด้วยข้อจำกัดในการเก็บน้ำไขข้อของผู้ป่วยก่อนการรับประทานวิตามินอี คณะผู้วิจัยจึงเลือกเก็บน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีในการเปรียบเทียบระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันและระดับสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี เลือดและน้ำไขข้อถูกเก็บไว้ในหลอดเลือดที่มีสารต้านการแข็งตัวของเลือด แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาที แยกส่วนใส ก่อนเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

การตรวจวัดระดับของ Lipid peroxidation

ตรวจวัดด้วยวิธี thiobarbiuric acid reactive substances (TBARs) method โดยการเติม thiobarbituric acid ลงในสิ่งตัวอย่างในสภาวะกรด ซึ่ง malondialdehyde (MDA) จะทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid (TBA) ได้สารสีชมพู เรียกว่า MDA-TBA adduct จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร (Shen *et al.*, 2007)

การตรวจวัดระดับของไนไตรต์

ตรวจวัดระดับไนไตรต์โดยวิธีของ Griess ด้วยเทคนิค spectrophotometry โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีของ sulfanilamide และ N-1-napthylenediamine dihydrochloride (NED) ในสภาวะกรด ทำให้เกิด azo compound หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร (Fiddler, 1977)

การตรวจวัดระดับของ Total antioxidant capacity (FRAP)

ตรวจวัดระดับ total antioxidant capacity ด้วยวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Benzie และคณะ อาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ Fe^{3+} ซึ่ง ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+}-TPTZ) complex เป็นสารละลายไม่มีสี เมื่อถูกรีดิวซ์ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระกลายเป็น ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+}-TPTZ) complex ซึ่งเป็นสารละลายสีม่วงน้ำเงิน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร (Benzie *et al.*, 1996)

การตรวจวัดระดับของ Total antioxidant capacity (TEAC)

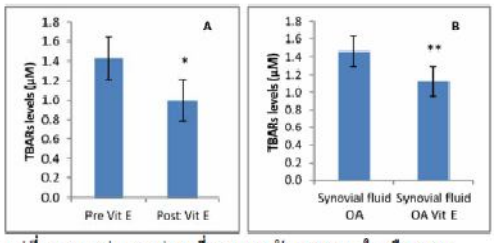
ตรวจวัดระดับ total antioxidant capacity ด้วยวิธี trolox equivalent antioxidant capacity โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงของ 2,2′-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical anion ($ABTS^{\cdot}$) เป็นสารไม่มีสีเมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระในสิ่งตัวอย่าง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร (Madhujith *et al.*, 2006)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยสถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) โดยนำเสนอในรูปของค่าเฉลี่ย (mean) และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error of mean, *SEM*) จากนั้นนำเสนอในรูปตารางและกราฟ และการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติเชิงอนุมาน ได้แก่ student *t*-test เพื่อใช้เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยถือว่าความแตกต่างโดยมีนัยสำคัญทางสถิติก็ต่อเมื่อ $P < 0.05$

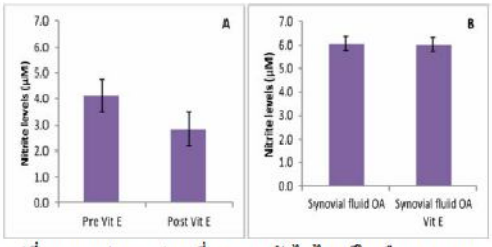
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการตรวจวัดระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันและสารต้านอนุมูลอิสระในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่าระดับ TBARs ในพลาสมาของผู้ป่วยภายหลังได้รับการเสริมวิตามินอีครบ 2 เดือนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.001$) (รูปที่ 1A) จาก 1.427 ± 0.075 μM เมื่อก่อนได้รับการเสริมวิตามินอี ลดลงเป็น 0.999 ± 0.110 μM เมื่อครบระยะเวลา 2 เดือนภายหลังการเสริมวิตามินอี สำหรับในน้ำไขข้อของผู้ป่วยภายหลังได้รับการเสริมวิตามินอีครบ 2 เดือนพบว่าระดับ TBARs ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.029$) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี (1.462 ± 0.123 μM และ 1.124 ± 0.084 μM ตามลำดับ) (รูปที่ 1B)



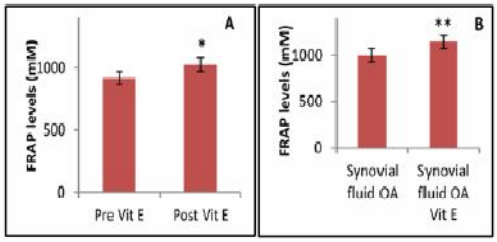
รูปที่ 1: กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของระดับ TBARs ในเลือด (A) และน้ำไขข้อ (B) ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม
*P < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังได้รับการเสริมวิตามินอี
**P < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบน้ำไขข้อกับกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี
OA แทนกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี, Vit E แทนกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี

ระดับไนไตรต์ในพลาสมาของผู้ป่วยเมื่อเปรียบเทียบก่อนและหลังได้รับการเสริมวิตามินอีครบ 2 เดือนพบว่าลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (4.120 ± 0.853 μM เป็น 2.834 ± 1.121 μM ตามลำดับ) (P = 0.347) (รูปที่ 2A) สำหรับน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีพบว่าระดับไนไตรต์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (6.088 ± 1.199 μM และ 6.036 ± 1.063 μM ตามลำดับ) (P = 0.974) (รูปที่ 2B)



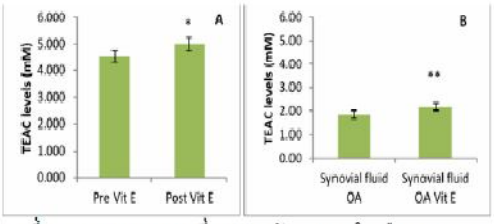
รูปที่ 2: กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของระดับไนไตรต์ในเลือด (A) และน้ำไขข้อ (B) ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม OA แทนกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี, Vit E แทนกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี

ระดับ FRAP ในพลาสมาของผู้ป่วยภายหลังได้รับการเสริมวิตามินอีครบ 2 เดือนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.015) (รูปที่ 3 A) จาก 918.433 ± 29.608 mM เมื่อก่อนได้รับการเสริมวิตามินอีเป็น 1024.278 ± 38.547 mM เมื่อครบระยะเวลา 2 เดือนภายหลังการเสริมวิตามินอี สำหรับน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมภายหลังได้รับการเสริมวิตามินอีพบว่าระดับ FRAP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.014) (รูปที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำไขข้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี (1004.108 ± 41.702 mM และ 1150.745 ± 39.589 mM ตามลำดับ) (รูปที่ 3B)



รูปที่ 3: กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของระดับ FRAP ในเลือด (A) และน้ำไขข้อ (B) ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม
*P < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังได้รับการเสริมวิตามินอี
**P < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบน้ำไขข้อกับกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี
OA แทนกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี, Vit E แทนกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี

ระดับ TEAC ในพลาสมาของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมภายหลังได้รับการเสริมวิตามินอีครบ 2 เดือนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.004) (รูปที่ 4A) จาก 4.528 ± 0.149 mM เมื่อก่อนได้รับการเสริมวิตามินอีเป็น 5.004 ± 0.108 mM เมื่อครบระยะเวลา 2 เดือนภายหลังการเสริมวิตามินอี สำหรับน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีครบ 2 เดือนพบว่าระดับ TEAC เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (1.831 ± 0.057 mM และ 2.174 ± 0.105 mM ตามลำดับ) (P = 0.006) (รูปที่ 4B)



รูปที่ 4: กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของระดับ TEAC ในเลือด (A) และน้ำไขข้อ (B) ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม
*P < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังได้รับการเสริมวิตามินอี
**P < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบน้ำไขข้อกับกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี
OA แทนกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี, Vit E แทนกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอี

ดังนั้นจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเสริมวิตามินอีขนาด 400 อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิตทุกวัน เป็นระยะเวลา 2 เดือนในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมสามารถเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยการเพิ่มตัวบ่งชี้สารต้านอนุมูลอิสระและลดตัวบ่งชี้ของภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเวลาเดียวกัน ในทางกลับกันผลจากการศึกษานี้แตกต่างจากการศึกษาของ Brand และคณะ (Brand *et al.*, 2001) ซึ่งการศึกษาดังกล่าวพบว่าทั้งวิตามินอีและยาหลอก (placebo) ต่างไม่สามารถลดอาการปวดหรือเพิ่มการใช้งานของข้อเข่าได้ แต่จากรายงานการวิจัยทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* ต่างสนับสนุนว่าวิตามินอีสามารถปกป้องเซลล์จากสารอนุมูลอิสระและมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Blankenhorn, 1986; Stuyvesant *et al.*, 1967) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยทางคลินิกเกี่ยวกับการเสริมวิตามินอีในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่สนับสนุนว่าวิตามินอีมีฤทธิ์บรรเทาอาการของโรคข้อเข่าเสื่อม เช่น ลดอาการปวดของข้อเข่า เพิ่มการเคลื่อนไหวของข้อเข่า เป็นต้น (Machtey,1978)

นอกจากนี้ตลอดระยะเวลาของการศึกษาไม่พบว่าผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการเสริมวิตามินอีเกิดผลไม่พึงประสงค์ของวิตามีนอี จึงสอดคล้องกับการศึกษาของ Meyers และคณะ (Meyers *et al.*, 1996) ที่ว่าการเสริมวิตามินอีในระยะเวลาสั้นไม่พบผลไม่พึงประสงค์ของวิตามินอีเช่นกัน

สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเสริมวิตามินอีให้กับผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมสามารถลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันและเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในเลือดและน้ำไขข้อได้ นอกจากนี้การศึกษานี้ยังสนับสนุนการเสริมวิตามินอีให้กับผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม อย่างไรก็ตามการเสริมวิตามินอีควรอยู่ภายใต้การดูแลของแพทย์และนักโภชนาการอย่างใกล้ชิด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์และภาควิชาโภชนาการและการกำหนดอาหาร คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

References

Ahlback S. Osteoarthrosis of the knee. A radiographic investigation. Acta Radiol Diagn (Stockh). 1968:Suppl 277:7-72.

Benzie IFF, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of" antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem. 1996;239(1):70-6.

Blankenhorn G. Clinical effectiveness of Spondyvit (vitamin E) in activated arthroses. A multicenter placebo-controlled double-blind study]. Z Orthop Ihre Grenzgeb. 1986;124(3):340-3.

Brand C, Snaddon J, Bailey M, *et al.* Vitamin E is ineffective for symptomatic relief of knee osteoarthritis: a six month double blind, randomised, placebo controlled study. Ann Rheum Dis. 2001;60(10):946-9.

Fiddler R. Collaborative study of modified AOAC method of analysis for nitrite in meat and meat products. J Assoc Off Anal Chem. 1977;60(3):594-9.

Henrotin Y, Kurz B, Aigner T, *et al.* Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? . Osteoarthritis Cartilage. 2005;13(8):643-54.

Karan A, Karan MA, Vural P, *et al.* Synovial fluid nitric oxide levels in patients with knee osteoarthritis. Clin Rheumatol. 2003;22(6):397-9.

Machtey I, Ouaknine L. Tocopherol in Osteoarthritis: a controlled pilot study. J Am Geriatr Soc. 1978;26(7):328-30.

Madhujith T, Izydorczyk M, Shahidi F, *et al.* Antioxidant properties of pearled barley fractions. J Agric Food Chem. 2006;54(9):3283-9.

Meyers DG, Maloley PA, Weeks D, *et al.* Safety of antioxidant vitamins. Arch Intern Med. 1996;156(9):925-35.

Sarban S, Kocyigit A, Yazar M, *et al.* Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Clin Biochem. 2005;38(11):981-6.

Shen YC, Chen SL, Wang CK, *et al.* Contribution of tomato phenolics to antioxidation and down-regulation of blood lipids. J Agric Food Chem. 2007;55(16):6475-81.

Stuyvesant VW, Jolley WB. Anti-inflammatory activity of d-α-tocopherol (vitamin E) and linoleic acid. Nature. 1967;216(5115):585-6

Surapaneni KM, Venkataramana G. Status of lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant enzymes in patients with osteoarthritis. Indian J Med Sci. 2007 Jan;61(1):9-14.

Sutipornpalangkul W, Morales NP, Charoencholvanich K, *et al.* Lipid peroxidation, glutathione, vitamin E, and antioxidant enzymes in synovial fluid from patients with osteoarthritis. Int J Rheum Dis. 2009;12(4):324-8.

Wang Y, Prentice LF, Vitetta L, *et al.* The effect of nutritional supplements on osteoarthritis. Altern Med Rev. 2004;9(3):275-96.

Wieland HA, Michaelis M, Kirschbaum BJ, *et al.* Osteoarthritis—an untreatable disease? Nat Rev Drug Discov. 2005;4(4):331-44

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ – นามสกุล นางสาวธันยวัน สวนทวี

วัน เดือน ปีเกิด 29 กันยายน พ.ศ. 2529

ประวัติการศึกษา วิทยาศาสตรบัณฑิต (โภชนาการและการกำหนดอาหาร)
เกียรตินิยมอันดับสอง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่อยู่ปัจจุบัน 291/63 ถนนสุทธิสารวินิจฉัย แขวงสามเสนนอก เขตห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร 10310

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

การศึกษาผลของวิตามินอีต่อระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันและสารต้านอนุมูลอิสระในเลือดและน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ในการประชุมวิชาการระดับชาติ The 4th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2012 “Pharmacy Profession in Harmony”