

การศึกษาความยาวเทโลเมียร์ จำนวนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ และภาวะเครียดออกซิเดชัน

ในโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ

นางสาวสินสุตา เดชสุภา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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 University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Relative telomere length, mitochondrial DNA copy number, and oxidative stress  
in lumbar spinal stenosis

Miss Sinsuda Dechsupa



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

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาความยาวเทโลเมียร์ จำนวนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ และภาวะเครียดออกซิเดชัน ในโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ
โดย	นางสาวสินสุตา เดชสุภา
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ วิชาญ ยิ่งศักดิ์มงคล รองศาสตราจารย์พิเศษ นายแพทย์ วรวรรธน์ ลิ้มทองกุล

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง วิไล ชินธเนศ)  
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก)  
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ วิชาญ ยิ่งศักดิ์มงคล)  
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(รองศาสตราจารย์พิเศษ นายแพทย์ วรวรรธน์ ลิ้มทองกุล)  
.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัชรวิทย์ ลิ้มปณสิทธิกุล)  
.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร. กอมธัม สติรกุล)

สินสุดา เดชสุภา : การศึกษาความยาวเทโลเมียร์ จำนวนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ และภาวะเครียดออกซิเดชัน ในโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ (Relative telomere length, mitochondrial DNA copy number, and oxidative stress in lumbar spinal stenosis) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. ดร. นพ. สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. นพ. วิชัญ ینگศักดิ์มงคล, รศ. นพ. วรวัชรณ์ ลิ้มทองกุล, 107 หน้า.

โรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบเป็นโรคที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการปวดหลังในผู้สูงอายุ ส่วนมากพบในกลุ่มผู้สูงอายุที่มีอายุตั้งแต่ 60 ปีขึ้นไป เนื่องจากอายุและความเสื่อม ส่งผลให้อัตราส่วนของอีลาสตินและคอลลาเจนในชั้นเอ็น ligamentum flavum (LF) ลดลง ชั้นเอ็น LF เกิดการแข็งตัวและหนาตัว นอกจากนี้ความชราของเซลล์อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของโรค ซึ่งการหดสั้นของเทโลเมียร์ การทำงานที่ผิดปกติของไมโทคอนเดรีย และภาวะเครียดออกซิเดชัน ถือเป็นวิถีระดับโมเลกุลที่มีความเกี่ยวข้องกับความชราของเซลล์ อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่างเทโลเมียร์ จำนวน mitochondrial DNA (mtDNA) copy number และภาวะเครียดออกซิเดชันต่อชั้นเอ็น LF ที่หนาตัวยังไม่ทราบแน่ชัด ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบ relative telomere length จำนวน mtDNA copy number และภาวะเครียดออกซิเดชัน ในชั้นเอ็นและเซลล์ของ LF ระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัว ในผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ จำนวน 48 ราย ด้วยเทคนิค real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) และเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และศึกษา cell senescence ของเซลล์จากชั้นเอ็น LF ด้วยเทคนิค senescence-associated beta-galactosidase staining (SA- beta-gal) จำนวน 30 ราย จากผลการศึกษาค่า relative telomere length ใน LF ระดับที่หนาตัวมีค่าสั้นกว่าใน LF ระดับที่ไม่หนาตัว ( $P = 0.04$ ) และระดับของ 8-OHdG ใน LF ระดับที่หนาตัวมีค่าสูงกว่าใน LF ระดับที่ไม่หนาตัว ( $P = 0.04$ ) อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่พบความแตกต่างของจำนวน mtDNA copy number ระหว่าง LF ระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัว เมื่อแบ่งกลุ่มวิเคราะห์ตามอายุและเพศ ค่า relative telomere length ใน LF ระดับที่หนาตัวของเพศชายต่ำกว่าในเพศหญิง ( $P = 0.04$ ) และใน LF ระดับที่หนาตัวของผู้ป่วยอายุน้อยกว่า 63 ปี มีค่า 8-OHdG สูงกว่า LF ระดับที่ไม่หนาตัว ( $P = 0.04$ ) อีกทั้งไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง relative telomere length จำนวน mtDNA copy number และระดับ 8-OHdG กับอายุของผู้ป่วย ทั้งนี้ผลการศึกษา relative telomere length และจำนวน mtDNA copy number ของเซลล์ชั้นเอ็น LF ระดับที่หนาตัว มีค่า relative telomere length และจำนวน mtDNA copy number ต่ำกว่า LF ระดับที่ไม่หนาตัวในช่วงต้นของการเลี้ยงเซลล์ และลดลงตามจำนวนรอบในแต่ละช่วงของการเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่ย้อมติดสี SA- beta-gal ของชั้นเอ็น LF ระดับที่หนาตัว มีการย้อมติดสี SA- beta-gal มากกว่าเซลล์จากชั้นเอ็น LF ระดับที่ไม่หนาตัวในรายเดียวกัน สรุปได้ว่า relative telomere length กับจำนวน mtDNA copy number ลดลง ทั้งระดับ 8-OHdG และจำนวน cell senescence เพิ่มขึ้น อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับชั้นเอ็นและเซลล์ของ LF ระดับที่หนาตัวในโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ ซึ่งมีส่วนช่วยให้เกิดความรู้ความเข้าใจต่อพยาธิสภาพกำเนิดของโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5774099430 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: LUMBAR SPINAL STENOSIS / LIGAMENTUM FLAVUM / RELATIVE TELOMERE LENGTH / MITOCHONDRIAL DNA COPY NUMBER / OXIDATIVE STRESS / 8-OHDG / CELL SENESENCE

SINSUDA DECHSUPA: Relative telomere length, mitochondrial DNA copy number, and oxidative stress in lumbar spinal stenosis. ADVISOR: PROF. SITTISAK HONSAWEK, M.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. WICHARN YINGSAKMONGKOL, M.D., ASSOC. PROF. WORAWAT LIMTHONGKUL, M.D., 107 pp.

Lumbar spinal stenosis (LSS) is the common cause of low back pain in the older adult spine. This condition is the most frequent indication for spinal in patients older than 60 years of age. With age and degeneration, the ratio of elastic and collagen was decreased and stiffness and fibrosis was increased in LF. In addition, the combination and cellular aging pathway sometimes results in LSS. Telomere shortening, mitochondrial abnormalities, and oxidative stress are the molecular pathways indicated in cellular aging. However, the association between the telomere length, mitochondria DNA (mtDNA) copy number, and oxidative stress in LF is unknown. The aim of this cross-sectional study were to compare the relative telomere length and mtDNA copy number between non-pathologic and pathologic LF from lumbar spinal stenosis patients by real-time polymerase chain (real-time PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay and investigate cell senescence by senescence-associated beta-galactosidase staining (SA- beta-gal). The pathologic LF tissue had significantly shorter relative telomere length than non-pathologic LF tissue ( $P = 0.04$ ). Relative telomere length in pathologic LF tissue of male subjects had significantly shorter than female subjects ( $P = 0.04$ ). The 8-OHdG concentration in tissue was significantly higher in pathologic LF tissue compared to non-pathologic tissue ( $P = 0.04$ ). A significantly increased 8-OHdG concentration could be found in pathologic LF tissue within less than 63 years as compared to non-pathologic LF tissue ( $P = 0.04$ ). There was no significant difference in mtDNA copy number between two groups. However, no association between relative telomere length, mtDNA copy number, 8-OHdG, and age was observed in non-pathologic and pathologic LF tissue. With advancing culture passages, there was a steady decline in the relative telomere length and mtDNA copy number of non-pathologic and pathologic LF cells. Moreover, all the senescent LF cells were occurred at the earlier passages in pathologic LF compared with non-pathologic LF cells in LSS patients. In conclusion, shorter relative telomere length, lower mtDNA copy number, and higher 8-OHdG concentration and senescent cell may associate with hypertrophic LF. These finding may provide a better understanding of pathogenesis of LSS.

Field of Study: Medical Science

Academic Year: 2016

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยของวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงและเสร็จสมบูรณ์ด้วยความอนุเคราะห์จากผู้มีพระคุณมากมายหลายท่าน ท่านแรกขอกราบพระคุณอย่างสูงสำหรับอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ศาสตราจารย์ นพ. สิทธิศักดิ์ ทรราชเวก ที่คอยอบรมสั่งสอน แนะนำวิธีคิดทั้งในเรื่องเรียนและการใช้ชีวิต ให้คำปรึกษางานวิจัยได้ในทุก ๆ เรื่อง ไม่ว่าจะเรื่องนั้นจะยากมากเท่าไร อาจารย์จะมีช่องทางให้สามารถแก้ไขได้ ทั้งยังดูแลเอาใจใส่ตรวจทาน แก้ไขจุดบกพร่องต่าง ๆ รวมถึงให้กำลังใจ เพื่อให้งานวิจัยรวมถึงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ออกมาดีที่สุด

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ นพ.วิชาญ ยิ่งศักดิ์มงคล และรองศาสตราจารย์ นพ. วรวรรธน์ ลิ้มทองกุล ที่กรุณามาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมในงานวิจัยนี้ ทั้งยังช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อจากการผ่าตัดที่เป็นส่วนสำคัญตลอดการทำวิจัย นอกจากนี้ยังให้คำปรึกษาและให้กำลังใจในการทำวิจัย อีกทั้งขอขอบพระคุณนพ. วีรศักดิ์ สิงหนัดกิจ ที่ได้ให้ความกรุณาเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อในงานวิจัยนี้เช่นเดียวกัน

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ พญ. วิไล ชินธเนศ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วชิร ลิ้มปณสิทธิกุล ที่ยินดีเป็นกรรมการสอบภายในมหาวิทยาลัย นอกจากนี้ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กอบธัม สติกรกุล จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ยินดีเป็นกรรมการสอบภายนอกมหาวิทยาลัย ขอขอบคุณสำหรับคำแนะนำ และคำถาม สำหรับวิทยานิพนธ์และในงานวิจัย เพื่อปรับปรุงให้ดียิ่งขึ้นต่อไป

ขอขอบคุณสมาชิกในห้องปฏิบัติการ bone lab 718 พี่เวิน พี่หนู พี่จีฟ พี่บู พี่แอม พี่อิง พี่ตง พี่บาว เดอร์ น้องจุ่ม น้องเง็ก ที่ให้คำแนะนำ และคอยช่วยเหลือให้กำลังใจมาตลอดการศึกษาในคณะแพทยศาสตร์ นอกจากนี้ขอขอบคุณทราย พี่เลี้ยงที่คอยให้ความรู้ เอื้อเฟื้อตัวอย่างในการศึกษา สอนเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ และให้คำปรึกษารวมถึงกำลังใจในงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณทุกคนมากจริง ๆ ค่ะ

ขอขอบพระคุณพี่ ๆ เจ้าหน้าที่ทุกท่านของหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพยาบาลศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำต่อการเรียน ให้ความช่วยเหลือในการเรียนตลอดที่ได้ศึกษาในหลักสูตรนี้

ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือส่วนกลาง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chula Medical Research Center- Chula MRC) ในการเอื้อเฟื้อเครื่องมือทุกอย่างตลอดการทำวิจัย

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา และทุน 90 ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนการศึกษาและทุนสำหรับการทำวิจัยตลอดที่ได้ศึกษาในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่สนับสนุน เป็นแรงใจ และแรงผลักดันตลอดการศึกษาในยามที่เจออุปสรรค ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ ทุกคนในครอบครัว และที่รู้จัก สำหรับกำลังใจที่ส่งมาให้

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	1
สารบัญตาราง.....	4
บทที่ 1 บทนำ.....	6
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	6
คำถามงานวิจัย.....	8
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	8
สมมติฐานงานวิจัย.....	8
ขอบเขตของการวิจัย.....	9
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	10
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	10
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	12
วิธีดำเนินการวิจัย.....	13
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	14
คำสำคัญ.....	14
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	15
ลักษณะทางกายวิภาคของกระดูกสันหลังส่วนเอว.....	15
โรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ (Lumbar spinal stenosis).....	17
สาเหตุของการเกิดโรคโพรงกระดูกตีบแคบ.....	18

อาการและการแสดง .....	18
การวินิจฉัยโรค .....	19
การรักษา.....	20
ชิ้นเอ็นช่องไขสันหลัง (Ligamentum flavum).....	22
ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress).....	25
เทโลเมียร์ (Telomere).....	28
จำนวนไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial DNA copy number).....	32
Cell senescence .....	35
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	38
ประชากร.....	38
ประชากร (target population).....	38
ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample size).....	39
เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย .....	40
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย .....	41
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	42
การเก็บรวบรวมข้อมูล .....	43
การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ .....	44
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	57
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล .....	57
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย .....	86
รายการอ้างอิง .....	95
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	107



## สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1	กายวิภาคศาสตร์ของกระดูกสันหลังส่วนเอวด้านข้าง (Lateral anatomy of the lumbar spine).....	16
รูปที่ 2	ภาพตัดขวางของช่องไขสันหลังที่ปกติ และช่องไขสันหลังตีบแคบ .....	17
รูปที่ 3	การเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ HO <sup>•</sup> เข้าไปในโมเลกุลของ deoxyguanosine ที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 8.....	26
รูปที่ 4	แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบค่า relative telomere length (T/S ratio) ระหว่างกลุ่มขึ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัว.....	58
รูปที่ 5	แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงค่า relative telomere length (T/S ratio) ระหว่างกลุ่มขึ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยอายุน้อยกว่า 64 ปี และกลุ่มผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 64 ปี.....	60
รูปที่ 6	แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบค่า relative telomere length (T/S ratio) ระหว่างกลุ่มขึ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มเพศชายและหญิง .....	62
รูปที่ 7	แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบจำนวน mtDNA copy number (ND1/HGB ratio) ระหว่างกลุ่มขึ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัว.....	64
รูปที่ 8	แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบจำนวน mtDNA copy number (ND1/HGB ratio) ระหว่างกลุ่มขึ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยอายุน้อยกว่า 64 ปี และกลุ่มผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 64 ปี ...	66
รูปที่ 9	แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบจำนวน mtDNA copy number (ND1/HGB ratio) ระหว่างกลุ่มขึ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มเพศชายและเพศหญิง .....	68
รูปที่ 10	แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบระดับ 8-OHdG ระหว่างกลุ่มขึ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัว .....	70

- รูปที่ 11** แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบระดับ 8-OHdG ระหว่างกลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัวในกลุ่มผู้ป่วยอายุน้อยกว่า 63 ปี และกลุ่มผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 63 ปี ..... 72
- รูปที่ 12** แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบระดับ 8-OHdG ระหว่างกลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัวในกลุ่มเพศชายและเพศหญิง ..... 74
- รูปที่ 13** กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง relative telomere length กับอายุผู้ป่วย (A และ B) จำนวน mtDNA copy number (C และ D) และระดับ 8-OHdG (E และ F) ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หนาตัวและหนาตัว ..... 77
- รูปที่ 14** กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน mtDNA copy number กับอายุผู้ป่วย (A และ B) และระดับ 8-OHdG (C และ D) ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หนาตัวและหนาตัว ..... 79
- รูปที่ 15** กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ 8-OHdG กับอายุผู้ป่วย (A และ B) ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum บริเวณที่ไม่หนาตัวและหนาตัว (A และ B) ..... 80
- รูปที่ 16** การแยกเซลล์จากชิ้นเอ็น ligamentum flavum โดยเซลล์อยู่โดยรอบของชิ้นเอ็น ..... 81
- รูปที่ 17** ค่า relative telomere length ในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ไฟโบบลาสจาก (A) ชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หนาตัวและ (B) ชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัว เปรียบเทียบในผู้ป่วยอายุ 61, 66, 77 และ 84 ปี ..... 82
- รูปที่ 18** จำนวน mtDNA copy number ในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ไฟโบบลาสจาก (A) ชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หนาตัวและ (B) ชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัว เปรียบเทียบในผู้ป่วยอายุ 61, 66, 77 และ 84 ปี ..... 83
- รูปที่ 19** ค่าร้อยละของเซลล์ที่ย้อมติดสี SA- $\beta$ -gal ในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ไฟโบบลาสจาก (A) ชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หนาตัวและ (B) ชิ้นเอ็นช่องไขสันหลังระดับที่หนาตัวจากผู้ป่วยที่มีอายุ 61, 66, 77 และ 84 ปี ..... 84
- รูปที่ 20** การย้อมติดสี SA- $\beta$ -gal (ลูกศร) ของเซลล์ไฟโบบลาสจากชิ้นเอ็นช่องไขสันหลังระดับที่หนาตัวเปรียบเทียบใน (A) passage 1 และ (B) passage 10 จากผู้ป่วยอายุ 61 กับ (C) passage 1 และ (D) passage 10 จากผู้ป่วยอายุ 84 ปี ..... 85

รูปที่ 21	แสดงภาพสมมติฐานความสัมพันธ์ของปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการหนาตัวของชั้นเอ็น ligamentum flavum (96).....	93
-----------	---	----



## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ลำดับเบส primers ที่ใช้ในการทำ real time PCR.....	46
ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณสารเคมีที่ใช้สำหรับ real time PCR .....	47
ตารางที่ 3 สภาวะที่ใช้ในการทำ real time PCR .....	47
ตารางที่ 4 ลำดับเบส primers ที่ใช้ในการทำ real time PCR.....	49
ตารางที่ 5 ชนิดและปริมาณสารเคมีที่ใช้สำหรับ real time PCR .....	49
ตารางที่ 6 สภาวะที่ใช้ในการทำ real time PCR .....	50
ตารางที่ 7 การเตรียม serial dilution ของสารละลาย 8-OHdG standard.....	51
ตารางที่ 8 ค่า relative telomere length (T/S ratio) ในชิ้นเอ็น ligementum flavum ระหว่างกลุ่มระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัว .....	58
ตารางที่ 9 ค่า relative telomere length (T/S ratio) ในชิ้นเอ็น ligementum flavum ระหว่างกลุ่มระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยอายุน้อยกว่า 64 ปี และกลุ่ม ผู้ป่วยที่อายุเท่ากับหรือมากกว่า 64 ปี .....	61
ตารางที่ 10 ค่า relative telomere length ในชิ้นเอ็น ligementum flavum ระดับที่หน้าตัว และไม่หน้าตัวในกลุ่มเพศชายและเพศหญิง.....	63
ตารางที่ 11 จำนวน mtDNA copy number (ND1/HGB ratio) ในชิ้นเอ็น ligementum flavum ระหว่างกลุ่มระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัว.....	65
ตารางที่ 12 จำนวน mtDNA copy number (ND1/HGB ratio) ในชิ้นเอ็น ligementum flavum ระหว่างกลุ่มระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัว ในกลุ่มผู้ป่วยอายุน้อยกว่า 64 ปี และกลุ่มผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 64 ปี .....	67
ตารางที่ 13 จำนวน mtDNA copy number (ND1/HGB ratio) ในชิ้นเอ็น ligementum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มเพศชายและเพศหญิง.....	69
ตารางที่ 14 ระดับ 8-OHdG ในชิ้นเอ็น ligementum flavum ระหว่างกลุ่มระดับที่หน้าตัวและ ไม่หน้าตัว.....	71

- ตารางที่ 15 ระดับ 8-OHdG ในชิ้นเอ็น ligementum flavum ระหว่างกลุ่มระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยอายุน้อยกว่า 63 ปี และกลุ่มผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 63 ปี..... 73
- ตารางที่ 16 ระดับ 8-OHdG ในชิ้นเอ็น ligementum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มเพศชายและเพศหญิง..... 75



## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนื่องในปัจจุบันอัตราการเจริญเติบโตของประชากรในประเทศอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้น การเคลื่อนไหวร่างกายจากการทำงานจึงเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะกระดูกสันหลังบริเวณส่วนเอวที่ต้องรับน้ำหนัก และมีการเคลื่อนไหวตลอดเวลา ทำให้กระดูกสันหลังเสื่อมสภาพ ส่งผลให้เกิดอาการปวดหลังเรื้อรัง อย่างมากในทุกช่วงอายุ โดยเฉพาะกลุ่มผู้สูงอายุ หนึ่งในภาวะเสื่อมของกระดูกสันหลังตามวัย คือ โรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ (lumbar spinal stenosis; LSS) ซึ่งพบได้ตั้งแต่อายุ 50 ปีขึ้นไป สาเหตุเกิดจากการเสื่อมของกระดูกสันหลังส่วนเอว ข้อต่อฟาเซีย มีการเสื่อมของหมอนรองกระดูกสันหลัง และเกิดการหนาตัวของแผ่นเอ็นที่หุ้มไขสันหลัง (ligamentum flavum) ผิดปกติ (1) ส่งผลให้มีอาการปวดบริเวณหลังอย่างรุนแรง ไม่สามารถดำเนินชีวิตประจำวันได้อย่างปกติและคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยลดลง

นอกจากการเคลื่อนไหวบริเวณกระดูกสันหลังส่วนเอวเป็นเวลานาน ทำให้ร่างกายเกิดภาวะเสื่อม (degenerative condition) ปัจจัยที่ทำให้เกิดการเสื่อมและปวดหลังคือ การสะสมของสารอนุมูลอิสระ (free radical) จากสิ่งแวดล้อม ทำให้ DNA ของเซลล์บริเวณกระดูกสันหลังส่วนเอวได้รับสารอนุมูลอิสระ เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) และ DNA เกิดการเสียหาย สามารถนำมาอธิบายการเกิดโรคกระดูกสันหลังเสื่อม เช่น ในภาวะเครียดออกซิเดชันของเซลล์กระดูก เซลล์กระดูกมีการทำงานที่ผิดปกติ กระบวนการซ่อมแซม DNA บกพร่อง ส่งผลให้มีจำนวนเซลล์ผิดปกติ รวมถึงมีเซลล์ชราเพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้เร่งกระบวนการเกิดโรคกระดูกสันหลังเสื่อมมากขึ้น (2)

การที่เซลล์สะสมภาวะเครียดออกซิเดชันจากสิ่งแวดล้อมภายนอกเป็นเวลานาน ไมโทคอนเดรียภายในเซลล์มีการสร้างและสะสม reactive oxygen species (ROS) ประมาณร้อยละ 85 เพื่อให้เซลล์มีการพัฒนาและอยู่รอด ซึ่งการสะสม ROS ภายในไมโทคอนเดรีย เกิดการทำลาย mitochondrial DNA (mtDNA) เมื่อเซลล์เข้าสู่กระบวนการเพิ่มจำนวน ไมโทคอนเดรียที่ถูกทำลาย เปลี่ยนสภาพเป็นไมโทคอนเดรียกลายพันธุ์ (mitochondrial mutation) ทำให้เซลล์มีจำนวนไมโท

คอนเดรียที่กลายพันธุ์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้การทำงานในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ และการสังเคราะห์ ATP ผิดปกติ นอกจากนี้จำนวนไมโทคอนเดรียสามารถอธิบายถึงภาวะเครียดออกซิเดชัน ROS ที่เซลล์ได้รับ และการเกิดพยาธิสภาพของโรคต่าง ๆ (3) เมื่อ mtDNA และ DNA ภายในเซลล์ถูกทำลายมากขึ้น เทโลเมียร์ (telomere) ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบส TTAGGG อยู่บริเวณปลายของโครโมโซมเกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ และปกป้องส่วนปลายของโครโมโซมเกิดการหดสั้นลงหรือมีการทำงานผิดปกติ (4) ถ้าเทโลเมียร์มีการทำงานผิดปกติ เซลล์เข้าสู่กระบวนการเซลล์ชรา (cell senescence) โดยเซลล์ปกติถูกกระตุ้นให้ตอบสนองต่อปัจจัยความเครียดหลากหลายชนิดที่มีต่อเซลล์ และเกิดกระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) เร็วกว่าเซลล์อื่น ๆ (5)

ดังนั้นจึงมีความสนใจศึกษาปัจจัยที่อาจเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพในโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม ได้แก่ การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน จำนวน mtDNA copy number ความยาวของเทโลเมียร์ และกระบวนการเกิดเซลล์ชรา เป็นต้น เนื่องจากงานวิจัยต่างๆ ที่ผ่านมา เมื่อเกิดภาวะเสื่อมภายในเซลล์ จากอายุที่เพิ่มขึ้นหรือการสะสมสารอนุมูลอิสระต่างๆ ส่งผลให้จำนวน mtDNA copy number และ DNA ภายในเซลล์ถูกทำลาย เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ DNA กลายพันธุ์ ค่า relative telomere length (RTL) หดสั้นลงตลอดเวลาในแต่ละครั้งของการแบ่งตัว เกิดการสะสมของเซลล์ชรามากขึ้น (6)

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการวัดระดับ 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) ในโรคกระดูกพรุน(7) และการศึกษาในเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อ(8) ที่มีการสะสมของเซลล์ชราที่ส่งผลให้ความยาวของเทโลเมียร์เกิดการหดสั้นลง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับโรคข้อเสื่อม (osteoarthritis) แต่ทั้งนี้ยังไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะเครียดออกซิเดชัน จำนวน mtDNA copy number ค่า relative telomere length และกระบวนการเกิดเซลล์ชราในเนื้อเยื่อและเซลล์ ligamentum flavum จากโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ ซึ่งปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเสื่อมที่เกิดขึ้นถือเป็นส่วนสำคัญที่อาจก่อให้เกิดความเสื่อมในผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบได้เช่นกัน ปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบเกี่ยวข้องกับปัจจัยใดบ้าง ซึ่งการศึกษาดังกล่าวนี้อาจเป็นความรู้ใหม่ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ เช่น relative telomere length จำนวน mtDNA copy number และภาวะความเครียดออกซิเดชันที่มีต่อโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ

## คำถามงานวิจัย

ความยาวของเทโลเมียร์ (relative telomere length) จำนวน mtDNA copy number ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) และการเกิด cell senescence ในชิ้นเนื้อและเซลล์ของ *ligamentum flavum* ระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัว ในผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ มีความแตกต่างกันหรือไม่

## วัตถุประสงค์ของการวิจัย

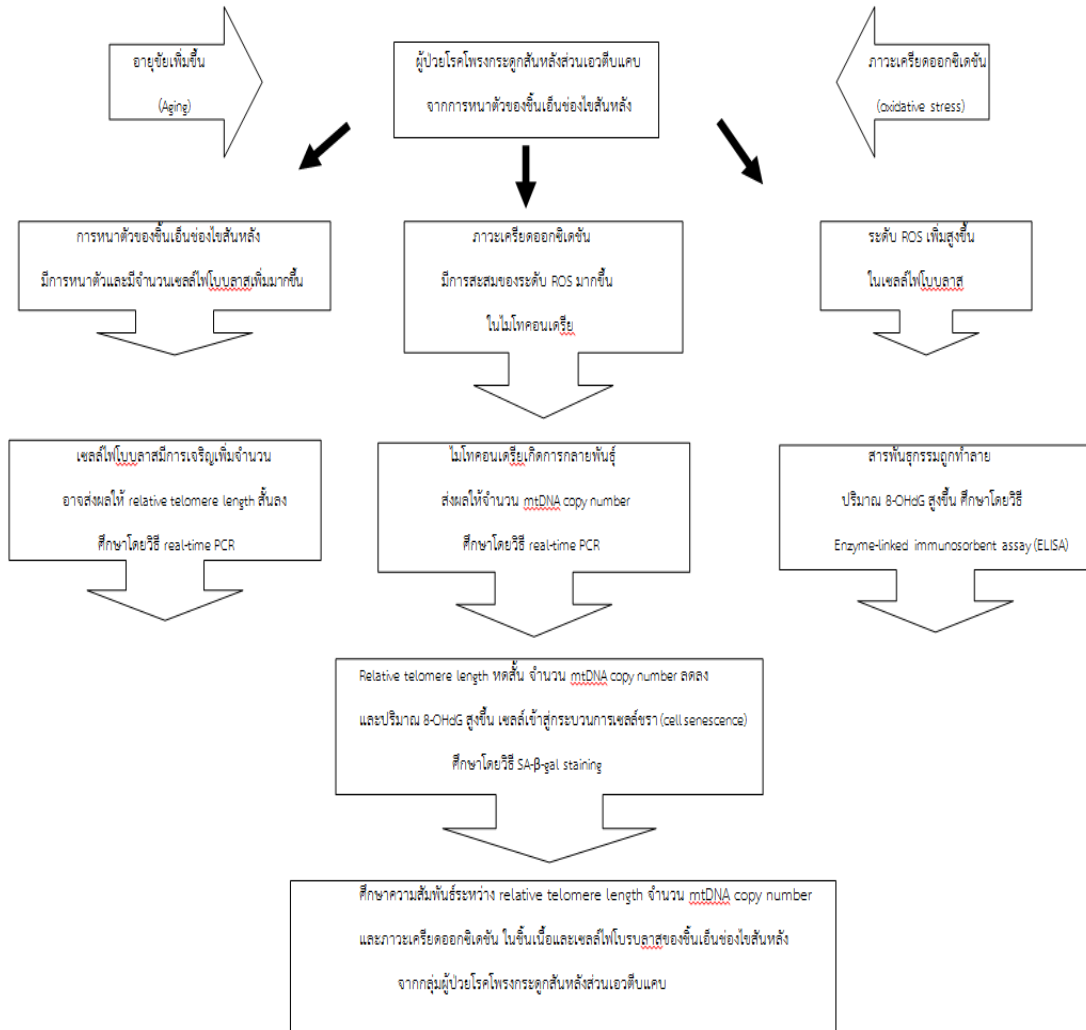
1. เพื่อศึกษาความแตกต่างระหว่าง relative telomere length จำนวน mtDNA copy number และภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ในชิ้นเนื้อและเซลล์ของชิ้นเนื้อ *ligamentum flavum* ระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัว ในผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ
2. เพื่อศึกษาการเกิด cell senescence ของเซลล์จากชิ้นเนื้อ *ligamentum flavum* ที่มีการหนาตัวและไม่หนาตัว ในผู้ป่วยโรคสันหลังส่วนเอวตีบแคบ

## สมมติฐานงานวิจัย

ชิ้นเนื้อและเซลล์ของชิ้นเนื้อ *ligamentum flavum* ระดับที่หนาตัวจากผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ มี relative telomere length สั้นกว่า จำนวน mtDNA copy number ต่ำกว่า และมีการแสดงออกของ oxidative stress มากกว่าชิ้นเนื้อและเซลล์ *ligamentum flavum* ระดับที่ไม่หนาตัว นอกจากนี้เซลล์จากชิ้นเนื้อ *ligamentum flavum* ระดับที่หนาตัว มีแนวโน้มเกิด cell senescence ของเซลล์มากกว่าเซลล์จากชิ้นเนื้อ *ligamentum flavum* ระดับที่ไม่หนาตัว



### ขอบเขตของการวิจัย



### ข้อตกลงเบื้องต้น

1. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยเป็นผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย
2. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยให้ความร่วมมือด้วยความเต็มใจตลอดการศึกษาวิจัย โดยมีการลงลายมือชื่อในเอกสารยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (Consent form) ด้วยความสมัครใจภายหลังจากได้รับการชี้แจงให้ทราบในทุกด้าน ซึ่งรวมถึงความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น
3. เครื่องมือและชุดการทดสอบต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำตามมาตรฐานของการทดสอบเครื่องมือและชุดการทดสอบนั้น ๆ

### คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

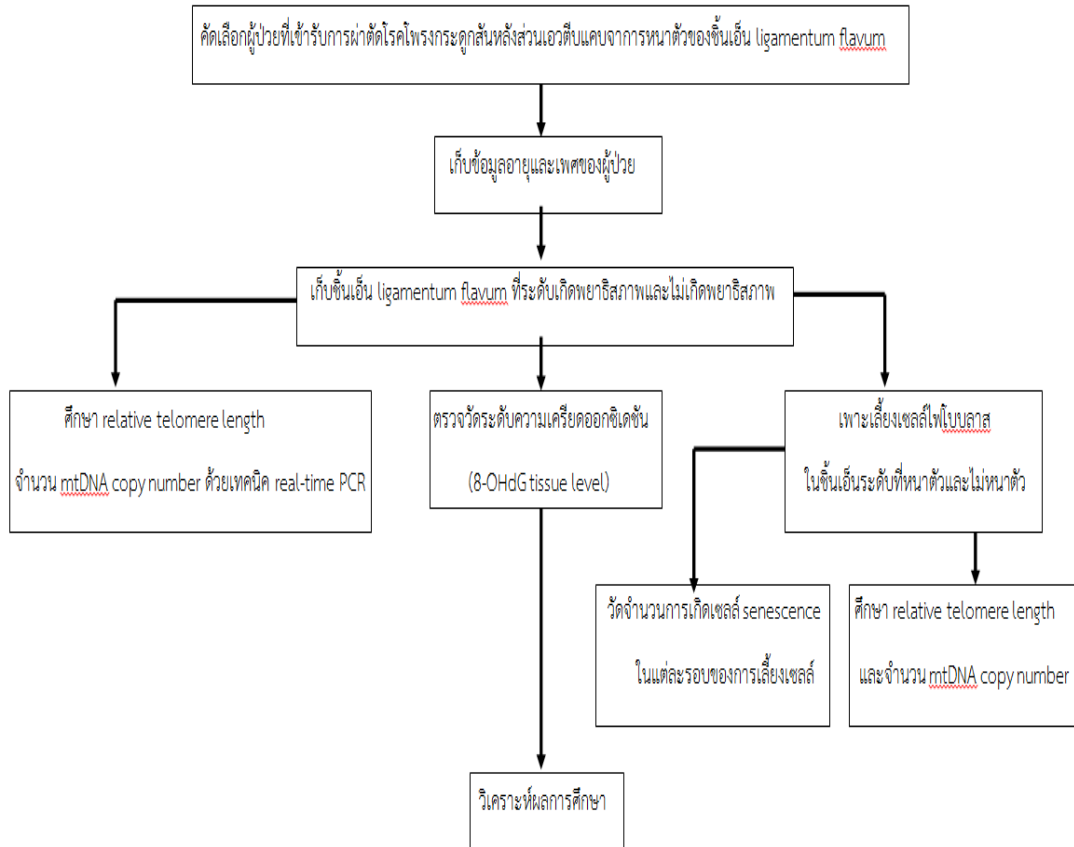
- Lumbar spinal stenosis คือ โรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ สาเหตุเกิดจากการข้อต่อฟาเซตและชิ้นเอ็นช่องไขสันหลังหนาตัว หมอนรองกระดูกสันหลังโป่ง และเกิดการสร้างกระดูกงอก
- Ligamentum flavum คือ ชิ้นเอ็นช่องไขสันหลังสี่เหลี่ยม ประกอบด้วยเส้นใยอีลาสตินและเส้นใยคอลลาเจน โดยเส้นใยอีลาสตินทำหน้าที่เพิ่มความยืดหยุ่น ส่วนเส้นใยคอลลาเจนทำหน้าที่เพิ่มความแข็งแรง
- Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจากการทำ PCR โดยสามารถตรวจวัดปริมาณของ DNA หรือ RNA ที่เพิ่มขึ้นหรือ PCR product ได้ในช่วงเวลานั้นๆ ตามอุณหภูมิที่กำหนดไว้ รวมถึงการวัดปริมาณของ PCR product โดยใช้สารเรืองแสง (fluorescence reporters) เพื่อให้เกิดสัญญาณการเรืองแสงได้ เช่น SYBR Green dye, fluorescence resonance energy transfer (FRET), hybridization probe และ Taqman probe เป็นต้น

- Gel electrophoresis เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์และแยกโมเลกุลของ DNA RNA และโปรตีน โดยแยกตามน้ำหนักโมเลกุลและประจุไฟฟ้าของชิ้นส่วนโมเลกุลที่สนใจให้บริสุทธิ์ ประจุไฟฟ้าโมเลกุลของกรดนิวคลีอิกที่มีประจุลบมีการเคลื่อนที่ไปยังขั้วประจุตรงข้ามคือประจุบวก โดยผ่านวัสดุชั้นเจล (agarose) หรือวัสดุอื่น ๆ ซึ่งโมเลกุลที่มีขนาดเล็กมีการเคลื่อนที่ผ่านรูวัสดุได้ง่าย ทำให้มีการเคลื่อนที่ได้เร็ว ในขณะที่โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ ผ่านรูของวัสดุได้ยาก จะเคลื่อนที่ได้ช้า
- Primer หรือ oligonucleotides คือโมเลกุลของ DNA หรือ RNA เส้นสั้น ๆ ประกอบด้วย 2'-deoxyribonucleotides ส่วนมากใช้เป็นต้นแบบในการทำ PCR เพิ่มจำนวนของ DNA ที่มีปริมาณน้อยร่วมกับการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase เพิ่มจำนวนของ oligonucleotide และใช้จำลองเส้น DNA
- Telomere length คือ ลำดับของนิวคลีโอไทด์ TTAGGG ที่ซ้ำกันของบริเวณปลายโครโมโซม มีหน้าที่ปกป้องปลายโครโมโซมไม่ให้หดสั้น และช่วยให้โครโมโซมมีความเสถียร ถ้าบนเส้น DNA ไม่มีหมู่ 3'-OH เกิดเป็นช่องว่างบนเส้น DNA ส่งผลให้โครโมโซมเกิดการหดสั้นลง เซลล์เข้าสู่โปรแกรม senescence และเกิดกระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) ที่เร็วกว่าเซลล์อื่น ๆ
- Mitochondrial DNA copy number คือ สารพันธุกรรมภายในไมโทคอนเดรีย มีโมเลกุลลักษณะเป็นวงกลมขนาด 16,569 bp ประกอบด้วย โปรตีนมากกว่า 100 ชนิด และมีโปรตีน 13 ชนิด ไมโทคอนเดรียไม่ได้มีหน้าที่เฉพาะในการสังเคราะห์ ATP ผ่านวัฏจักรเครบส์ และกระบวนการหายใจระดับเซลล์ ไมโทคอนเดรียมีหน้าที่ให้เซลล์มีชีวิต ทั้งยังมีส่วนสำคัญต่อการสร้างสารอนุมูลอิสระในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน เพื่อให้เซลล์มีชีวิตหรือเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่กระบวนการตายของเซลล์
- Oxidative stress หรือภาวะเครียดออกซิเดชัน เป็นภาวะเกิดความไม่สมดุลกันระหว่างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์กับความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ เกิดผลเสียต่อโปรตีน ไขมัน และ DNA ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การศึกษานี้สามารถบอกความแตกต่างระหว่าง relative telomere length จำนวน mtDNA copy number ภาวะเครียดออกซิเดชัน และการเกิด cell senescence รวมถึงการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของ ligamentum flavum ในผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบที่มีขึ้นเนื่อระดับที่ไม่หนาตัวและหนาตัว ซึ่งอาจใช้ความสัมพันธ์ดังกล่าวในการทำนายสาเหตุการเกิดโรค รวมถึงการเกิดกระบวนการเกิด cell senescence ที่ส่งผลให้ relative telomere length หดสั้นลง จำนวน mtDNA copy number ลดลง ถือเป็นส่วนสำคัญที่ก่อให้เกิดความเสื่อมในผู้ป่วย เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริงของการเกิดโรคที่ทำให้เกิดอาการทางคลินิก ซึ่งถ้ามีการศึกษาในส่วนนี้ อาจทำให้เข้าใจกระบวนการการเกิด cell senescence ในชิ้นเนื้อและเซลล์จาก ligamentum flavum และรวมถึงการพัฒนาวิธีการป้องกันหรือรักษาโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบในอนาคตได้ แต่ทั้งนี้การวินิจฉัยโรคยังคงอาศัยวิธีการประเมินจากอาการทางคลินิกเป็นหลัก อาจมีการศึกษาต่อไปภายภาคหน้าเพื่อนำความรู้จากการวิจัยไปประยุกต์และพัฒนาให้เกิดองค์ความรู้ขึ้นใหม่

## วิธีดำเนินการวิจัย



### ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. ยื่นเสนอโครงร่างวิทยานิพนธ์ต่อคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์
2. แสดงเอกสารโครงการวิจัยและเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยให้แก่  
อาสาสมัครโครงการวิจัย
3. เก็บข้อมูลและเพศจากอาสาสมัครโครงการวิจัยที่ลงชื่อยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย
4. เก็บตัวอย่างชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัว
5. เพาะเลี้ยงเซลล์จากชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัว
6. สกัด total DNA จากชิ้นเอ็นและเซลล์จาก ligamentum flavum
7. เปรียบเทียบ relative telomere length จำนวน mtDNA copy number ในชิ้นเอ็นและ  
เซลล์จากชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัว ด้วยเทคนิค quantitative  
real-time PCR
8. เปรียบเทียบ oxidative stress ตรวจวัด 8-OHdG ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่  
หน้าตัวและไม่หน้าตัว โดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
9. ศึกษาการเกิด cell senescence ย้อมด้วย senescence associated- $\beta$ -galactosidase  
staining (SA- $\beta$ -gal)
10. สรุปผลการวิจัย เขียนรายงานผลการวิจัย และนำเสนอผลงานวิจัย

### คำสำคัญ

Lumbar spinal stenosis, ligamentum flavum, relative telomere length, mitochondria  
DNA copy number, oxidative stress, cell senescence

## บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### ลักษณะทางกายวิภาคของกระดูกสันหลังส่วนเอว

กระดูกสันหลัง (vertebrae, spine) ในผู้ใหญ่มีกระดูกทั้งหมดจำนวน 33 ชิ้น กระดูกสันหลังบางชิ้นเชื่อมติดกัน และแต่ละชิ้นจะเรียงตัวกันต่อกันเป็นแท่ง (vertebral column) คล้ายเป็นแกนให้กับลำตัวของร่างกาย ซึ่งกระดูกสันหลังถูกแบ่งออกเป็นส่วนต่าง ๆ ได้แก่ กระดูกสันหลังส่วนคอ (cervical vertebrae) จำนวน 7 ชิ้น กระดูกสันหลังส่วนอก (thoracic vertebrae) จำนวน 12 ชิ้น กระดูกสันหลังส่วนเอว (lumbar vertebrae) L1-L5 จำนวน 5 ชิ้น กระดูกสันหลังส่วนกระเบนเหน็บ (sacral vertebrae) S1-S5 จำนวน 5 ชิ้น และกระดูกสันหลังส่วนก้นกบ (coccygeal vertebrae) จำนวน 4 ชิ้น(9)

กระดูกสันหลังส่วนเอว (lumbar vertebra) ประกอบด้วย(10)

1. Vertebral body ขนาดใหญ่สามารถรองรับน้ำหนักร้อยละ 80 ของร่างกายส่วนบน ทำหน้าที่เป็นจุดเกาะของกล้ามเนื้อและเอ็นและป้องกันรากประสาทไม่ให้เป็นอันตราย เนื่องจากไขสันหลังสิ้นสุดที่ระดับ L1-L2 ดังนั้นโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวที่ต่ำกว่ามีรากประสาทอยู่ภายในเท่านั้น (cauda equina) โดยโครงสร้างทางด้านหลังต่อโพรงกระดูกสันหลัง (neural arch) ประกอบด้วย pedicles, lamina, superior และ inferior articular process, spinous process, transverse process และ mammillary process

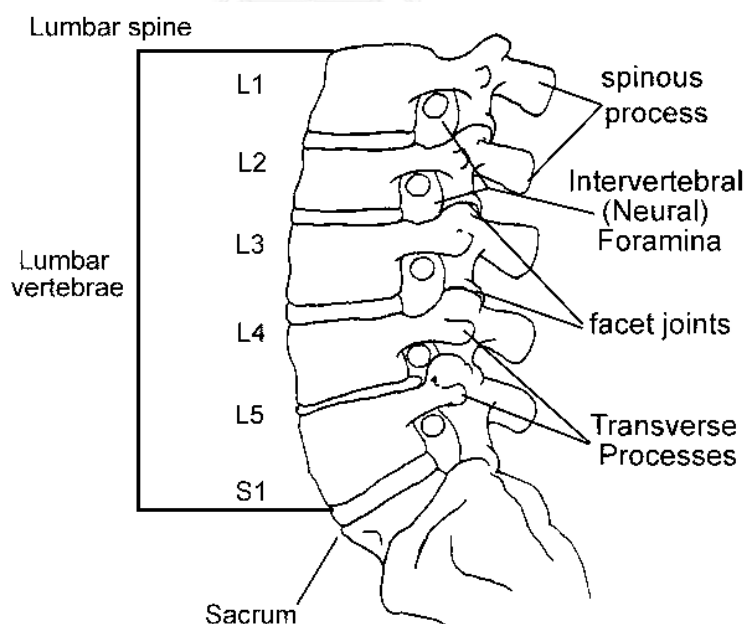
2. Lumbar vertebral body เป็นส่วนกระดูกสันหลังส่วนคอและส่วนอก มีขนาดใหญ่ vertebral body ทำหน้าที่ในการแบกรับน้ำหนักมากกว่าบริเวณอื่น ๆ รองรับน้ำหนักร้อยละ 80 ของร่างกายส่วนบน มีรูปร่างความกว้างทางด้านเส้นผ่านศูนย์กลางซ้ายขวามากกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางหน้าหลัง โดยขอบบนและขอบล่างจะเว้าเล็กน้อยและมีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆ จาก L1 ถึง L5 ซึ่งปล้องกระดูกสันหลังในแต่ละระดับสัมผัสกันด้วยหมอนรองกระดูกสันหลัง

3. ช่องกระดูกสันหลัง (spinal canal) เป็นช่องที่ต่อลงมาจาก foramen magnum บริเวณฐานกะโหลกศีรษะทอดยาวลงมาถึงกระดูก sacrum ที่บริเวณเอว โดยสามารถแบ่งช่องกระดูกสันหลังออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ central spinal canal เป็นที่อยู่ของ cauda equina และ meninges) และ lateral spinal canal เป็นบริเวณช่องกระดูกสันหลัง นับตั้งแต่รากประสาทและ dural sleeve นอกจากนี้ lateral canal สามารถแบ่งได้เป็น 3 บริเวณ ได้แก่

3.1. Entrance zone หรือ lateral recess เป็นส่วนของช่องนับตั้งแต่ nerve root แยกออกจาก dural sac ก่อนเข้าสู่ intervertebral foramens

3.2. Mid zone เป็นช่องที่อยู่ระหว่าง pedicles ระดับบนและล่าง อาจเรียกว่า pedicle zone หรือ intervertebral foramen

3.3. Exit zone เป็นส่วนของช่องที่ nerve root ออกจาก intervertebral foramen ไปแล้ว อาจเรียกว่า extraforaminal zone



**รูปที่ 1** กายวิภาคศาสตร์ของกระดูกสันหลังส่วนเอวด้านข้าง (Lateral anatomy of the lumbar spine) ซึ่งกระดูกสันหลังส่วนเอวตั้งแต่มุมระดับ L1 ถึง L5 โดยมี spinous processes และ facet joints ในแต่ละปล้องของกระดูกสันหลัง

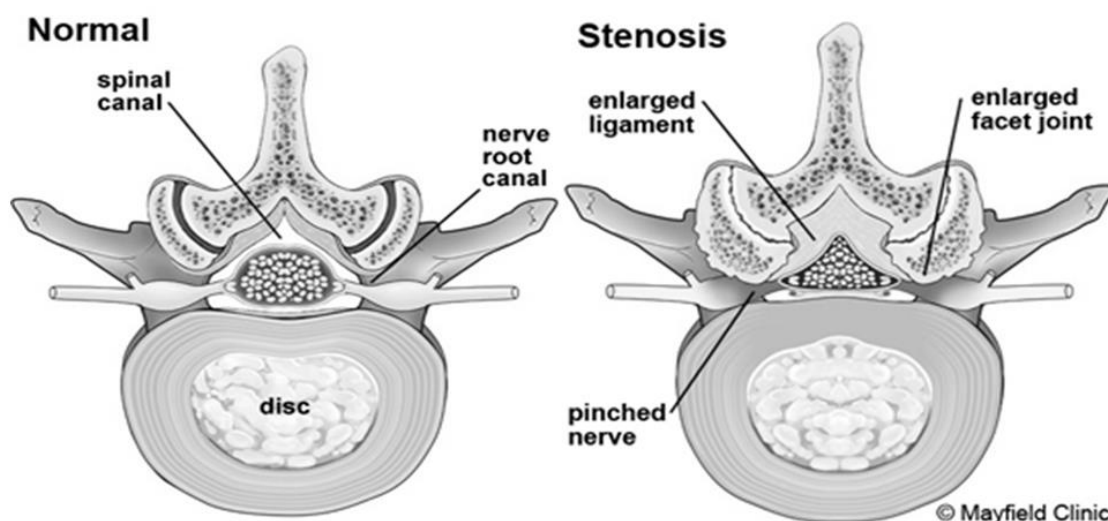
(ดัดแปลงจาก <http://emedicine.medscape.com>)



## โรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ (Lumbar spinal stenosis)

โรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ (lumbar spinal stenosis; LSS) คือ โรคกระดูกสันหลังเสื่อมที่มีการตีบแคบบริเวณกระดูกสันหลังระดับเอว พบในช่วงกลางของไขสันหลัง ใต้ข้อหลัง ปล้องกระดูกสันหลัง หรือช่องทางผ่านของเส้นประสาท (neural foramina) เมื่อช่องโพรงสันหลังตีบแคบลง ส่งผลให้เกิดการกดทับเส้นประสาท เกิดอาการชา ปวดขา และกล้ามเนื้อขาอ่อนแรง เมื่ออายุมากขึ้นเกิดการเสื่อมของกระดูกสันหลังส่วนเอว ข้อต่อฟาเซต (facet joint) การเสื่อมของหมอนรองกระดูกสันหลัง และเกิดการหนาตัวของชิ้นเอ็นหุ้มไขสันหลัง (ligamentum flavum) (11, 12)

ในการศึกษาทางกายวิภาคศาสตร์ การตีบแคบของโพรงกระดูกสันหลังสามารถแบ่งเป็น ช่องตรงกลาง (central) ช่องด้านข้าง (lateral) และช่องบริเวณ foraminal ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระดับของความเสื่อมของปล้องกระดูกสันหลัง สามารถเกิดขึ้นในบริเวณใดบริเวณหนึ่ง หรือเกิดขึ้นพร้อมกันหลายบริเวณ โดยโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวระดับ L4-L5 เป็นบริเวณที่พบการตีบแคบมากที่สุด ตามด้วยระดับ L3-L4, L5-S1 และ L1-L2 (13)



**รูปที่ 2** ภาพตัดขวางของช่องไขสันหลังที่ปกติ (ซ้าย) และช่องไขสันหลังตีบแคบ (ขวา) ซึ่งมีการเสื่อมของปล้องกระดูกสันหลังส่วนเอว ข้อต่อฟาเซต การเสื่อมของหมอนรองกระดูกสันหลัง และเกิดการหนาตัวของแผ่นเอ็นหุ้มไขสันหลัง

(ดัดแปลงจาก <http://www.mayfieldclinic.com/PE-STEN.htm>)

สาเหตุของการเกิดโรคโพรงกระดูกตีบแคบ

โรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ สาเหตุอาจเกิดขึ้นได้ 2 ประการ ดังนี้ (14, 15)

1. สาเหตุเป็นมาตั้งแต่กำเนิด (congenital spinal stenosis) พบได้ในคนที่มี pedicles สั้น ซึ่งไปลดพื้นที่ของโพรงกระดูกสันหลัง พบมากในคนแคระ (achondroplasia) ซึ่งบางครั้งพบในคนสูงปกติเช่นกัน

2. สาเหตุเนื่องจากเป็นภายหลัง (acquired spinal stenosis) โพรงกระดูกสันหลังส่วนแคบประเภทนี้พบได้มากที่สุดคือ บริเวณช่องตรงกลางและช่องด้านข้างของโพรงกระดูกสันหลัง ซึ่งสาเหตุของการตีบแคบเกิดจากการหนาตัวของข้อต่อฟาเซตและชิ้นเอ็นไขสันหลัง บริเวณ foraminal ตีบแคบ กระดูกสันหลังคดผิดรูป หมอนรองกระดูกเคลื่อนทับเส้นประสาท (disc herniation) หรือโป่งพอง (bulging) และเกิดการงอกของกระดูก (osteophyte formation) เป็นต้น

อาการและการแสดง (16)

อาการของโรคโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบ แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

1. Neurogenic claudication มีอาการขา ปวดที่ขา หรือเสียวที่ด้านหลังของต้นขาหรือด้านหลังค่อนมาด้านข้างของต้นขา หลังจากเดินสักพักจะต้องหยุดพัก เมื่ออาการทุเลาจึงสามารถเดินต่อได้ เรียกว่า intermittent claudication

2. Radicular pain มีอาการปวดจากเอวหรือสะโพกร้าวลงไปที่ขาตามเส้นประสาท อาการปวดร้าวนี้อยู่บริเวณเลยข้อพับหัวเข่าถึงตาตุ่ม หรือบางครั้งถึงปลายนิ้วเท้า พบมากในผู้ป่วยที่มีการตีบแคบที่ lateral canal

3. Atypical leg pain มีอาการปวดขา แต่ไม่เป็นการกระจายของเส้นประสาท โดยมีตำแหน่งปวดไม่คงที่ และไม่แน่นอน

4. Chronic cauda equine syndrome เกิดจากการกดรัดเส้นประสาท cauda equine โดยมีอาการปวดที่ขาหนีบ หรือบริเวณอวัยวะเพศร่วมด้วย อาจทำให้กลั้นปัสสาวะอุจจาระไม่ได้

## การวินิจฉัยโรค (16)

อาการที่พบบ่อยในโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ คือ อาการปวดขาจากเส้นประสาทถูกกดทับ (neurogenic claudication) ทั้งนี้ควรวินิจฉัยแยกโรคที่มีอาการคล้ายคลึงกัน

- Vascular claudication อาการปวดขาที่เกิดจากโรคหลอดเลือด
- Lumbar spondylosis โรคกระดูกสันหลังเสื่อม
- Peripheral neuropathy โรคพยาธิสภาพของเส้นประสาทส่วนปลาย

แพทย์สามารถวินิจฉัยแยกโรคโดยดูจาก อาการปวด ตำแหน่งที่ปวดและลักษณะอาการปวด สิ่งกระตุ้นให้ปวดมากขึ้น และสิ่งช่วยบรรเทาอาการ ระยะเวลาที่ใช้เพื่อลดอาการ เป็นต้น ซึ่งแพทย์สามารถวินิจฉัยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบจากการซักประวัติ และการตรวจร่างกายที่ละเอียด การส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถช่วยในการวินิจฉัยแยกโรคอื่น ได้แก่

1. การถ่ายภาพรังสี X-ray กระดูกสันหลังในท่าหน้าหลัง ท่าข้าง ก้มหลัง หรือแอ่นหลัง ช่วยการตรวจขอบเขตการเสื่อมของกระดูกสันหลัง สามารถตรวจพบการหนาตัวของช่องหมอนรองกระดูกสันหลังและข้อฟาเซ็ต และการงอกของกระดูก (17)
2. การตรวจทางรังสีหลังจากฉีดสารทึบแสงเข้าช่องไขสันหลัง (myelography) ใช้ในการตรวจโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบอย่างจำเพาะ มีความแม่นยำสูงในการวินิจฉัยโรค
3. การตรวจด้วยเครื่องคลื่นสะท้อนสนามแม่เหล็ก (magnetic resonance imaging; MRI) เพื่อทราบความรุนแรงของโรค และใช้พิจารณาเพื่อรักษาโดยการผ่าตัด ซึ่ง MRI สามารถบอกถึงการกดทับเส้นประสาทโดยตรวจสอบจากภาพตัดขวางของโพรงสันหลัง
4. การตรวจด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์สแกนหลังการฉีดสารทึบแสงในช่องไขสันหลัง ใช้ประโยชน์ในกรณีผู้ป่วยกระดูกสันหลังคด (scoliosis)

## การรักษา (16)

โรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่

1. การรักษาแบบอนุรักษ์นิยม ควรได้รับการรักษาอย่างน้อย 6-8 สัปดาห์ เป็นการลดการอักเสบของเส้นประสาท ประกอบด้วย

1.1 การนอนพักและลดกิจกรรม (controlled physical activities) แนะนำให้ผู้ป่วยหยุดพักเต็มที่ หรือลดกิจกรรมบางอย่าง เมื่ออาการทุเลาลง ควรให้ผู้ป่วยเริ่มกิจกรรมทีละน้อย แต่อย่าให้มากขึ้นไปจนอาการปวดกลับมา

1.2 การรักษาด้วยยา (drug therapy) กลุ่มยาที่ใช้รักษาโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบส่วนใหญ่ คือ ยากลุ่ม nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) สามารถช่วยลดอาการปวดในระยะแรก เนื่องจากเป็นช่วงที่มีภาวะอักเสบร่วมด้วย แต่ในระยะยาวได้ผลคล้ายกับกลุ่มที่ไม่ได้รับยา ควรใช้เป็นยาเสริมในการรักษา ไม่ควรใช้สำหรับเป็นยาหลัก และควรระมัดระวังในการใช้ยา เพราะยากลุ่มนี้ใช้แล้วมีผลข้างเคียง นอกจากนี้ในกลุ่มยาแก้ปวด ช่วยลดอาการปวด ให้ผู้ป่วยรู้สึกสบายขึ้นขณะพัก แต่ไม่ควรใช้ยากลุ่มนี้รักษาผู้ป่วยที่มีอาการปวดหลังแบบเรื้อรัง

1.3 การฉีดยาสเตอรอยด์ในช่อง epidural (epidural steroid injection) เป็นการฉีดยาสเตอรอยด์ในบริเวณโพรงกระดูกสันหลังแคบ จากการศึกษาของ Kreiner และคณะ ในปี 2558 พบว่าการฉีดสเตอรอยด์เข้าช่อง epidural ร่วมกับการใช้ยา NSAIDs และการออกกำลังกาย รักษาผู้ป่วยได้ดี (18)

1.4 การรักษาจุดกดเจ็บ (trigger point therapy) เป็นการรักษาสำหรับผู้ป่วยที่ไม่มีอาการปวดร้าวตามเส้นประสาท โดยการฉีดยาสเตอรอยด์ในตำแหน่งที่เจ็บ

1.5 การใส่เสื้อพยุงเอว (brace and corset) ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบในระยะแรก เมื่อดีขึ้นแล้วควรบริหารกล้ามเนื้อท้องและหลังให้แข็งแรง เพื่อช่วยพยุงกระดูกสันหลัง และช่วยลดแรงดันของหมอนรองกระดูกสันหลัง

- 1.6 กายภาพบำบัด (physical therapy) เป็นการบริหารกล้ามเนื้อให้แข็งแรง ลดความรุนแรงและความถี่ของอาการปวดหลัง โดยการบริหารกล้ามเนื้อที่นิยม คือ การบริหารแบบ isometric flexion เป็นการเพิ่มความแข็งแรงของกล้ามเนื้อท้องและการบริหารแบบ hyperextension เป็นการเพิ่มความแข็งแรงของกล้ามเนื้อกระดูกสันหลัง
- 1.7 การรักษาอื่น ๆ (modalities) การรักษาแบบอื่น ๆ สามารถช่วยลดอาการปวดของโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวได้แก่ การดึงถ่วงน้ำหนัก (traction) การกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (TENS) การตรวจด้วยอัลตราซาวด์ การประคบด้วยความร้อนหรือความเย็น และการนวด เป็นต้น
2. การรักษาโดยการผ่าตัด เป็นการรักษาในกรณีที่รักษาผู้ป่วยด้วยวิธีอนุรักษนิยมแล้วไม่ได้ผล ซึ่งแพทย์ต้องประเมินสภาพร่างกายผู้ป่วย ว่าการผ่าตัดชนิดใดเหมาะสมมากที่สุด ซึ่งการผ่าตัดรักษา ประกอบด้วย
- 2.1 การผ่าตัดขยายโพรงกระดูกสันหลัง (decompressive laminectomy; DCL) เริ่มต้นด้วยการตรวจด้วยคลื่นสะท้อนแม่เหล็กเพื่อหาตำแหน่งบริเวณตีบแคบ และทำการผ่าตัดขยายโพรงกระดูกสันหลังในส่วน central และ lateral ได้แก่ facet joint, pars interarticularis, pedicle และ ligament เป็นต้น
- 2.2 การเชื่อมปล้องกระดูกสันหลัง (spinal fusion) เป็นการเชื่อมระหว่าง transverse process ของกระดูกสันหลังหรืออาจเชื่อมระหว่างปล้องกระดูกสันหลัง (interbody fusion) โดยยึดข้อต่อด้วยโลหะ เพื่อเพิ่มความแข็งแรง (18)
- 2.3 การผ่าตัด DCL ร่วมกับการใส่ interspinous spacer การรักษาแบบ interspinous spacer สามารถลดแรงกดทับที่ข้อฟาเซ็ต ช่วยป้องกันข้อกระดูกเสื่อม และเพิ่มความมั่นคงของกระดูกในระดับที่ทำการผ่าตัด ช่วยเพิ่มพื้นที่ของโพรงกระดูกสันหลัง

## ชั้นเอ็นช่องไขสันหลัง (Ligamentum flavum)

Ligamentum flavum (LF) คือเอ็นยึดปล้องกระดูกสันหลังสีเหลืองอยู่บริเวณกระดูกสันหลังระดับ C2 ถึง S1 เอ็นยึดกระดูกสันหลังนี้ประกอบขึ้นจากเส้นใยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue fibers) ได้แก่ เส้นใยคอลลาเจนกับเส้นใยอีลาสติน (elastin fiber) ในอัตรา 2:1 ซึ่งเส้นใยอีลาสตินมีโครงสร้างและลักษณะเป็นสีเหลืองช่วยให้มีความยืดหยุ่น ในขณะที่คอลลาเจนช่วยเพิ่มความแข็งแรงและช่วยพยุงกระดูกสันหลัง (19) และช่วยปกป้องชั้นเนื้อไขมันเพื่อช่วยให้เยื่อหุ้มไขสันหลัง (dural sac) ให้ปกติและช่วยให้ไขสันหลังมีความเสถียร ทั้งยังให้เส้นประสาทอยู่ในระดับปกติ (20, 21)

ในภาวะที่ไขสันหลังมีการเสื่อมจากอายุที่มากขึ้น ส่งผลให้อัตราส่วนของอีลาสตินและคอลลาเจนลดลง เกิดความยืดหยุ่นน้อยลง แต่มีการแข็งตัว และเกิดการหนาตัว (hypertrophy) มากขึ้น ซึ่งลดช่องว่างของโพรงไขสันหลัง ทำให้เกิดอาการปวดหลัง และเกิดโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ (22) ซึ่งการหนาตัวของชั้นเอ็น ligamentum flavum มีความหนาตัวหลายระดับ ได้แก่ L2-L3, L3-L4, L4-L5 และ L5-S1 เป็นต้น แต่ในระดับ L4-L5 พบว่าเป็นระดับที่มีการหนาตัวของชั้นเอ็น ligamentum flavum มากที่สุด (23) ซึ่งในปีพ.ศ. 2548 Park และคณะ (24) ทำการศึกษาการหนาตัวของชั้นเอ็นช่องไขสันหลัง (LF) โดยการดูจากภาพถ่ายรังสี magnetic resonance imaging (MRI) ในผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบ (spinal stenosis) เปรียบเทียบในกลุ่มควบคุมโรคหมอนรองกระดูกเคลื่อนกดทับเส้นประสาท (disc herniation) กลุ่มละ 30 ราย พบว่าผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบ มีการหนาตัวของชั้นเอ็นช่องไขสันหลังมากกว่าผู้ป่วยโรคหมอนรองกระดูกเคลื่อนกดทับเส้นประสาทอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการศึกษาของ Altinkaya และคณะในปีพ.ศ. 2554 (25) ทำการศึกษาค้นคว้าความหนาของชั้นเอ็น ligamentum flavum ระดับ L2-L3, L3-L4, L4-L5 และ L5-S1 วิเคราะห์ความสัมพันธ์กับอายุ เพศ ดัชนีมวลกาย (body mass index) ระดับความเจ็บปวดจากการศึกษาพบว่าในระดับความเสื่อมที่มาก มีความหนาตัวของชั้นเอ็น ligamentum flavum มากกว่าระดับความเสื่อมน้อย ซึ่งความหนาของชั้นเอ็นของ ligamentum flavum ทุกระดับมีค่าเพิ่มสูงขึ้นตามอายุและค่าดัชนีมวลกาย biomass index (BMI) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่กลับพบว่าเพศและระดับความเจ็บปวดไม่มีความสัมพันธ์กับความหนาของชั้นเอ็น

การเคลื่อนไหวที่ผิดปกติ อาจเป็นสาเหตุหนึ่งทำให้เกิดแรงเค้นเชิงกล (mechanical stress) เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ ชันเนื้อถูกทำลาย เกิดแผลเป็น และสุดท้ายเกิดพังผืดหนาตัว (fibrosis) อย่างไรก็ตามการเกิดพยาธิสภาพของปฏิกิริยาการอักเสบต่อชิ้นเอ็น ligamentum flavum สามารถเกิดได้จากหลายปัจจัย (23, 26) เช่น อายุ และจากการแสดงออกของโปรตีนต่าง ๆ เช่น transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1), cyclooxygenase-2, tissue inhibitors of matrix metalloproteinase และ matrix metalloproteinase เป็นต้น

ดั่งการศึกษาในปีพ.ศ. 2544 Park และคณะ (27) ศึกษาปริมาณโปรตีน TGF- $\beta$ 1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่หลั่งออกมาเมื่อเกิดภาวะอักเสบในชิ้นเอ็น ligamentum flavum จากผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบ และผู้ป่วยโรคหมอนรองกระดูกเคลื่อนทับเส้นประสาท โดยใช้เทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และเทคนิค immunohistochemistry ซึ่งความหนาของชิ้นเอ็น ligamentum flavum โดยผลจาก MRI พบว่าปริมาณของโปรตีน TGF- $\beta$ 1 และความหนาของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ของผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบ มีค่าสูงกว่าในผู้ป่วยโรคหมอนรองกระดูกเคลื่อนทับเส้นประสาทอย่างมีนัยสำคัญ และผลจากการย้อมชิ้นเอ็นเพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TGF- $\beta$ 1 พบว่าในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ของผู้ป่วยทั้งสองโรค มีการแสดงออกของโปรตีน TGF- $\beta$ 1 ซึ่งทำให้ทราบว่า การแสดงออกของโปรตีน TGF- $\beta$ 1 เกี่ยวข้องกับการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ในผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบ ซึ่งมีผลจากกระบวนการเกิดการอักเสบ นอกจากนี้มีการศึกษาปริมาณของโปรตีน tissue of matrix metalloproteinase (TIMP-1 และ TIMP-2) ของ Park และคณะในปีพ.ศ. 2556 (24) ซึ่งเป็นโปรตีนทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีน ไม่ให้มีการทำลายเนื้อพื้นนอกเซลล์ (extracellular matrix) โดยใช้เทคนิค ELISA พบว่าระดับความเข้มข้นของ TIMP-2 ในเอ็นยึดปล้องกระดูกสันหลังของผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบมากกว่าผู้ป่วยโรคหมอนรองกระดูกเคลื่อนกดทับเส้นประสาทอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ TIMP-1 และ TIMP-2 ถูกตรวจพบในชิ้นเอ็นช่องไขสันหลัง ซึ่งระดับความเข้มข้นของ TIMP-1 และ TIMP-2 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการหนาตัวของชิ้นเอ็นช่องไขสันหลังอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของ TIMP-2 ที่เพิ่มขึ้นในชิ้นเอ็นช่องไขสันหลังเกี่ยวข้องกับการหนาตัวของชิ้นเอ็นช่องไขสันหลังในผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังตีบแคบ

นอกจากนี้รายงานวิจัยในปีพ.ศ. 2559 ของ Jirathanathornnukul และคณะ ศึกษาปริมาณ การแสดงออกของยีนและโปรตีน vascular endothelial growth factor (VEGF) ซึ่งเกี่ยวข้องกับ การสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัวและไม่ หนาตัวของผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบในรายเดียวกัน พบว่าการแสดงออกของยีน และโปรตีน VEGF สัมพันธ์กับการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum อย่างมีนัยสำคัญ อธิบาย ได้ว่าการแสดงออกของ VEGF มีความสัมพันธ์กับการหนาตัวของชิ้นเอ็น ซึ่งการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ต้องอาศัยการเจริญของเซลล์ในบริเวณที่หนาตัว ทำให้โปรตีน VEGF อาจ เกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดในการขนส่งออกซิเจนเพื่อไปเลี้ยงเซลล์มากขึ้น (28) และการศึกษา ของ Nakamura และคณะ ในปีพ.ศ. 2558 พบว่าชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัวจาก ผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ มีการแสดงออกของยีนและโปรตีน interleukin-6 (IL-6) มากกว่าในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หนาตัวอย่างมีนัยทางสถิติ ทั้งยังมี ความสัมพันธ์กับความหนาของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ซึ่งอาจเป็นเพราะกลไกการอักเสบได้ กระตุ้นการแสดงออกของยีน IL-6 ที่นำไปสู่การความเสื่อมและการหนาตัวของชิ้นเอ็น (29)

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการศึกษาในระดับเซลล์ (*in vitro* study) ของชิ้นเอ็น ligamentum flavum เพื่อศึกษาความสัมพันธ์กับการเกิดโรคโพรงกระดูกตีบแคบ ซึ่งในการศึกษา ของ Chen และคณะในปีพ.ศ. 2557 (30) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ชิ้นเอ็นช่องไขสันหลังของผู้ป่วยที่ทำ การผ่าตัดโรคโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบบริเวณเอว จำนวน 14 ราย เพื่อศึกษาผลของสาร estradiol ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ และการแสดงออกของคอลลาเจน อีลาสติน และเอนไซม์ matrix metalloproteinase (MMP) พบว่าสาร  $17\beta$ -estradiol ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน สามารถ เพิ่มการเจริญเติบโตของชิ้นเอ็นช่องไขสันหลังใน 24 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้พบว่า ระดับความเข้มข้นของ estradiol ที่  $10^{-9}$  โมลาร์ มีการลดระดับของคอลลาเจน และเพิ่มการ แสดงออกของ MMP-13 และในปีพ.ศ. 2560 Hur และคณะทำการศึกษาเซลล์จากชิ้นเอ็น ligamentum flavum จากผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัดรักษาโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ จากการใส่สาร TGF- $\beta$ 1 ลงในเซลล์ myofibroblast และย้อมเซลล์ด้วย  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) เพื่อศึกษาวิถีกลไกของ TGF- $\beta$ 1 พบว่าการแสดงออกของโปรตีน  $\alpha$ -SMA มีความสัมพันธ์กับ TGF- $\beta$ 1 นอกจากนี้เมื่อมีการใส่สาร TGF- $\beta$ 1 พบว่ามีการแสดงออกของยีน  $\alpha$ -SMA และ collagen-1



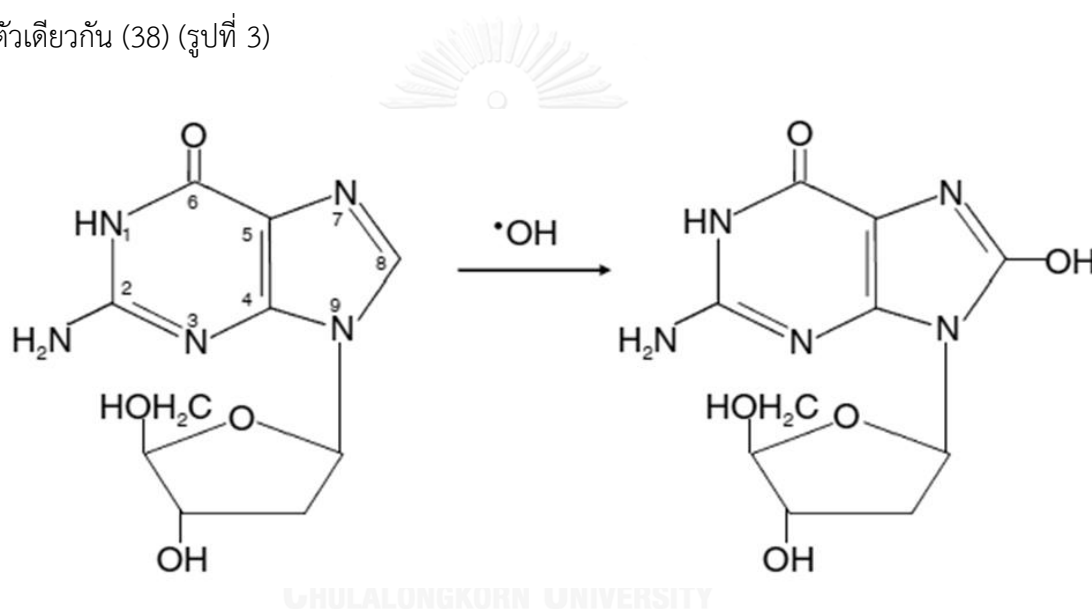
เพิ่มขึ้น สามารถอธิบายได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จาก fibroblast เป็น myoblasts จากวิถี กลไก TGF- $\beta$ 1 เป็นตัวเชื่อมโยงระหว่างการอักเสบและการหนาตัวของชั้นเอ็น ligamentum flavum (31)

### ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress)

ในเซลล์สิ่งมีชีวิตมีการสร้างสารอนุมูลอิสระภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ถือเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการเจริญ และการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ (cell differentiation) กระบวนการเมแทบอลิซึม และ ปฏิกิริยาทางชีวเคมี (32) แต่เนื่องจากในธรรมชาติสามารถเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันที่ทำร้ายต่อ เซลล์ตั้งแต่อนุภาคไขมัน โปรตีน และ DNA ของเซลล์ (33) ซึ่งสารอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารประกอบที่มี ออกซิเจนไนโมเลกุล เช่น ปฏิกิริยา Haber-Weiss การปลดปล่อย hydroxyl radicals ( $\text{OH}^\cdot$ ) จากการ ทำปฏิกิริยาระหว่าง hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) และ superoxide radicals ( $\text{O}_2^\cdot$ ) และปฏิกิริยา Fenton-type reaction จากการทำปฏิกิริยาระหว่างไอออนโลหะทรานซิชันและ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ซึ่งในร่างกาย มาจากเหล็ก  $\text{Fe}^{2+}$  ได้  $\text{OH}^\cdot$  (34) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยจากภายนอก เช่น รังสียูวี ควันบุหรี่ แร่ใยหิน (asbestos) และสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง เป็นต้น สิ่งเหล่านี้สามารถสร้างสารอนุมูลอิสระภายใต้สภาวะที่ แตกต่างกันได้ (35)

การเกิดความสมดุลระหว่างอนุมูลอิสระกับสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณพอเหมาะ ส่งผลให้ สิ่งมีชีวิตอยู่ในสภาวะที่ปกติ แต่เมื่อเกิดภาวะไม่สมดุลกันระหว่างสารอนุมูลอิสระกับสารต้านอนุมูล อิสระ สิ่งที่มาคือเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันทำลาย DNA ส่งผลให้เซลล์มีอายุมากขึ้น หรือ กลายเป็นเซลล์มะเร็ง และอาจเกิดโรคที่เกิดจากความเสื่อมตามมา (34, 36) ซึ่งในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เมื่อ DNA ถูกทำลายมากขึ้น กระบวนการซ่อมแซม DNA เกิดขึ้นโดยอัตโนมัติเพื่อให้เซลล์กลับคืนสู่ สภาวะปกติ แต่ถ้าไม่สามารถซ่อมแซม DNA ที่เสียหาย อาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ จากการแทนที่ เบส การหายไปของเบส รวมถึงการจับกันของ DNA เส้นใหม่ นำไปสู่การเกิดเซลล์มะเร็ง (37)

สารพันธุกรรม DNA ในสิ่งมีชีวิต สามารถถูกทำลายจากกระบวนการทางเคมี และกระบวนการทางกายภาพ เมื่อภาวะเครียดออกซิเดชันส่งผลให้ DNA เกิดการเสียหาย สามารถเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม เช่น สารอนุมูลอิสระ  $\text{HO}^\bullet$  สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการทำปฏิกิริยากับนิวคลีโอเบส โดยเฉพาะเบสกวานีน (Guanine; G) สาเหตุเกิดจากเบสกวานีนมีค่าไอออไนเซชันต่ำที่สุด ทำให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระกับตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 8 ของเบสกวานีนที่เป็นพันธะคู่ โดยเริ่มแรกเกิดการสร้าง 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) จากนั้น 8-OHdG กลายเป็น keto-enol tautomerism ซึ่งไปออกซิไดซ์ 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) ในทางวิทยาศาสตร์ 8-OHdG และ 7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) คือสารประกอบตัวเดียวกัน (38) (รูปที่ 3)



**รูปที่ 3** การเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่  $\text{HO}^\bullet$  (hydroxylation) เข้าไปในโมเลกุลของ deoxyguanosine ที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 8 ทำให้เกิดการสร้าง 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) (38)

ซึ่งการเกิด 8-OHdG หรือ 8-oxodG เป็นรูปแบบหนึ่งของสารอนุมูลอิสระที่เหนี่ยวนำให้ DNA เปลี่ยนแปลงไป ใช้งบอกระดับของ DNA ถูกทำลายด้วยสารออกซิแดนท์ ระดับของ 8-OHdG ที่สูงขึ้นถูกพบมากในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดหรือผู้ป่วยได้รับรังสี ทั้งนี้ 8-OHdG ถูกสร้างขึ้นในกระบวนการซ่อมแซม DNA ถือเป็นตัวชี้วัดบ่งบอกถึงการถูกทำลายด้วยออกซิเดชันในระดับ DNA ซึ่งการวัดและวิเคราะห์ 8-OHdG มีการตรวจด้วยเทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC), gas-chromatography-mass spectrometry (GC-MS), liquid

chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry (LC-MS-MS) และเทคนิค immunohistochemistry ซึ่งการตรวจวัดและวิเคราะห์ 8-OHdG สามารถตรวจทั้งในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ รวมถึงตัวอย่างจากคน เช่น ปัสสาวะ ชี้นเนื้อ และ DNA จากเม็ดเลือดขาว ทำให้ 8-OHdG สามารถเป็นตัวตรวจวัดทางชีวภาพของภาวะเครียดออกซิเดชัน การแก่ชรา (aging) และตรวจการเกิดมะเร็ง (39)

การศึกษาของ Lin และคณะในปีพ.ศ. 2546 (40) ทำการศึกษา mtDNA lesion จากการถูกทำลายด้วยภาวะเครียดออกซิเดชัน ในกลุ่มผู้ป่วยโรคหัวใจเต้นผิดจังหวะ (atrial fibrillation) 13 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่หัวใจเต้นจังหวะปกติ 26 ราย (sinus rhythm) โดยใช้เทคนิค quantitative PCR พบว่าระดับของ mtDNA ที่ถูกทำลายในกลุ่มผู้ป่วยโรคหัวใจเต้นผิดจังหวะ มีค่าสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยหัวใจเต้นจังหวะปกติ และเมื่อศึกษาวัด 8-OHdG หนึ่งในตัวชี้วัด (biomarker) ของสารอนุมูลอิสระทำลาย DNA พบว่าระดับ 8-OHdG ใน mtDNA ของผู้ป่วยโรคหัวใจเต้นผิดจังหวะมีค่าสูงกว่าในกลุ่มปกติ บ่งบอกได้ว่าภาวะเครียดออกซิเดชันมีการสะสมใน mtDNA ของกล้ามเนื้อหัวใจที่เต้นผิดจังหวะ นอกจากนี้ในปีพ.ศ. 2553 Tsai และคณะ (41) ทำการศึกษาภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยการวัดระดับ 8-OHdG ในชี้นเนื้อ orbital fibroadipose tissue และเซลล์ไฟโบบลาส orbital tissue ของผู้ป่วยโรคต่อมไทรอยด์เป็นพิษและตาโปน (Graves' ophthalmopathy) จำนวน 10 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่อายุเท่ากัน พบว่าไม่มีความแตกต่างของระดับ 8-OHdG ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม ในเซลล์ไฟโบบลาส orbital tissue ค่าของระดับ 8-OHdG ในกลุ่มผู้ป่วยสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และการศึกษาของ Udomsinprasert ในปีพ.ศ. 2559 ศึกษา ระดับ 8-OHdG ในพลาสมาของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน (biliary atresia) โดยเทคนิค quantitative real-time PCR จำนวน 114 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยมีระดับของ 8-OHdG มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อแบ่งกลุ่มตามความรุนแรงของพังพืดตับ (liver stiffness) พบว่าในกลุ่มที่มีความรุนแรงของพังพืดตับมากมีระดับ 8-OHdG มากกว่าในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีความรุนแรงของพังพืดตับน้อย สามารถอธิบายได้ว่าการเกิดพยาธิสภาพของโรค มีความสัมพันธ์กับระดับ 8-OHdG (42) ซึ่งตัวอย่างจากการศึกษาทั้งในชี้นเนื้อ เซลล์ และเลือด บ่งบอกได้ว่าสามารถใช้ 8-OHdG เป็นตัวตรวจวัดชีวภาพในโรคต่าง ๆ

บทบาทของ ROS เกี่ยวข้องกับโรคต่างๆ มากมาย โดยเฉพาะในโรคระดุกและข้อเสื่อม เช่น โรคระดุกพรุน และโรคข้อเสื่อม ซึ่งในปีพ.ศ. 2541 Zhu และคณะ (8) ทำการศึกษา DNA ถูกทำลาย จากสารอนุมูลอิสระ โดยการวัดปริมาณ 8-OHdG ในตัวอย่างกระดูกอ่อน 10 ตัวอย่าง จากผู้ป่วยเข้ารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อสะโพกเทียม 5 ราย กระดูกอ่อนเสื่อมจากโรคข้อเข่าเสื่อม 4 ราย และข้อเข่าปกติ 1 ราย โดยใช้เทคนิค high-performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-EC) พบว่าระดับของ 8-OHdG ในกลุ่มผู้ป่วยข้อเสื่อมมีค่าสูงกว่าในกลุ่มควบคุม ทำให้ทราบว่าระดับของ 8-OHdG ที่เพิ่มขึ้น นำไปสู่การจับคู่เบสที่ผิดพลาด สามารถบ่งบอกถึง DNA ถูกทำลายจากสารอนุมูลอิสระหรือสารเคมีทำลาย DNA ซึ่งสามารถใช้อธิบายกลไกการเกิดโรคข้อเสื่อมในอนาคต นอกจากนี้การศึกษาของ Baek และคณะ (7) ในปีพ.ศ. 2553 ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างมวลกระดูก (bone mineral density, BMD) และภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยการวัดระดับ 8-OHdG ในเลือดของผู้ป่วยโรคระดุกพรุนจำนวน 135 ราย พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างระดับและความหนาแน่นของมวลกระดูกในปล้องกระดูกสันหลังส่วนเอว คอกระดูกสะโพก มีความสัมพันธ์แปรผกผันกัน อธิบายได้ว่าภาวะเครียดออกซิเดชันเกี่ยวข้องกับการเพิ่มกระบวนการสลายกระดูกและมวลกระดูกลดลง ซึ่งเป็นไปในทิศทางตรงกันข้ามกับกลุ่มควบคุมผู้หญิงปกติ

### เทโลเมียร์ (Telomere)

เทโลเมียร์ (telomere) คือ กลุ่มนิวคลีโอไทด์โปรตีนอยู่บริเวณปลายของโครโมโซม เกี่ยวข้องในการแบ่งตัว และปกป้องส่วนปลายของโครโมโซม เทโลเมียร์ประกอบด้วยลำดับเบส TTAGGG บนสายคู่ของ DNA ซ้ำกันอยู่ประมาณ 2-20 กิโลเบส (kb) และพบบน DNA สายเดี่ยวประมาณ 50-500 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งความยาวของเทโลเมียร์มีความหลากหลายสูง (43) เช่น ความยาวของเทโลเมียร์เซลล์ต้นกำเนิดของมนุษย์อยู่ในช่วง 8-10 kb ขณะที่ความยาวของเทโลเมียร์ในเม็ดเลือดขาว (lymphocyte) ประมาณ 6-8 kb ความยาวของเทโลเมียร์ที่วัดจากเลือด (whole blood) อยู่ในช่วง 7-8 kb และความยาวของเทโลเมียร์วัดจากเนื้อเยื่อทารกในครรภ์ประมาณ 13 kb (44) เป็นต้น

หน้าที่สำคัญของเทโลเมียร์ คือ ป้องกันลำดับของ DNA ที่ปลายโครโมโซม ไม่ให้เกิดการหดสั้นหรือถูกทำลาย ที่เรียกว่า end-replication problem จากการแบ่งตัวของเซลล์ ซึ่งกระบวนการเกิด end-replication problem เริ่มจาก RNA primer จับบนเส้น DNA เพื่อทำการต่อเส้น DNA สายใหม่ เมื่อสิ้นสุดการต่อเส้น DNA ซึ่ง RNA primer ตัวสุดท้าย ถูกกำจัดด้วยเอนไซม์ 5'-3' exonuclease แต่เนื่องจาก DNA polymerase ไม่สามารถเติมลำดับเบสบนเส้น เพราะบนเส้น DNA ไม่มีหมู่ 3'-OH ทำให้เกิดการขาดหายไป เกิดเป็นช่องว่างบนเส้น DNA ทำให้โครโมโซมเกิดการหดสั้นลง ส่งผลให้เซลล์เข้าสู่โปรแกรม senescence และเกิดกระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) ที่เร็วกว่าเซลล์อื่นๆ (4)

ในการป้องกันการหดสั้นของเทโลเมียร์ คือ การเพิ่มการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส (telomerase) เอนไซม์ telomerase อยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ telomerase nucleoprotein มีโครงสร้างคล้ายเอนไซม์ reverse transcriptase ทำหน้าที่ reverse transcription ของสาย DNA ต้นแบบที่อยู่ภายใน RNA component subunit (TER component) ทำหน้าที่ในการเติมลำดับเบสที่ปลายโครโมโซมบริเวณ 3' ของเส้น DNA สายเดี่ยว (45) ซึ่งถ้ามีการทำงานของเอนไซม์ telomerase เพิ่มขึ้น ความยาวของเทโลเมียร์ที่ปลายโครโมโซมมากขึ้นเช่นกัน

ในการศึกษาความยาวของเทโลเมียร์ มีการศึกษาในโรคทางการแพทย์ต่างๆ มากมาย ซึ่งการศึกษาในแต่ละโรค พบการศึกษาเปรียบเทียบกันในระหว่างกลุ่มที่เป็นโรคเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เพื่อตรวจวิเคราะห์ความยาวของเทโลเมียร์ที่เปลี่ยนแปลงไป ในปีพ.ศ. 2552 Felice และคณะ (46) ทำการศึกษาความยาวของเทโลเมียร์ในเนื้อเยื่อไฟโบบลาส (fibroblast tissue) ในกลุ่มผู้ป่วยเนื้อเยื่อแผลเป็น (keloid skin) 20 ราย เปรียบเทียบในกลุ่มควบคุม 20 ราย โดยใช้เทคนิค quantitative real-time PCR พบอัตราความยาวของเทโลเมียร์ในกลุ่มผู้ป่วยเนื้อเยื่อแผลเป็นสั้นกว่าอย่างมีนัยสำคัญอยู่ที่ 3.92 kb และ 4.32 kb เมื่อเปรียบเทียบความยาวเทโลเมียร์ในกลุ่มควบคุมมีความยาว 5.47kb และ 6.67 kb สอดคล้องกับการศึกษาของ Takahashi และคณะในปีพ.ศ. 2557 (47) ซึ่งได้ศึกษาความยาวเทโลเมียร์ของ DNA จากเม็ดเลือดขาว และจากเซลล์เหงือกในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดลุกลาม (aggressive Periodontitis) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จำนวน 21 ราย จากงานวิจัยพบว่าความยาวของเทโลเมียร์ในเม็ดเลือดขาว ไม่พบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของเทโลเมียร์ในทั้งสองกลุ่ม ทั้งนี้เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของเทโลเมียร์กับอายุของผู้ป่วยทั้ง

สองกลุ่ม พบว่าความยาวของเทโลเมียร์ในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทนต์อีกเสบชนิดลูกกลมลดลงตามอายุของผู้ป่วยอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีอัตราการลดลงประมาณ 112 bp ต่อปี แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มผู้ป่วยกับกลุ่มควบคุม และในส่วนของความยาวของเทโลเมียร์จากการเลี้ยงเซลล์เหงือกของกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยในระยะเวลาแตกต่างกัน พบว่าความยาวของเทโลเมียร์ทั้งสองกลุ่มมีค่าลดลง แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในปีพ.ศ. 2558 Udomsinprasert และคณะ (48) ทำการศึกษา relative telomere length ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน (biliary atresia) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมจำนวน 114 ราย โดยใช้เทคนิค quantitative real-time PCR พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมี relative telomere length สั้นกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้มีการศึกษา relative telomere length ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการตีชานกับไม่มีตีชาน พบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีตีชานมี relative telomere length สั้นกว่าในกลุ่มที่ไม่มีตีชาน นอกจากนี้มีการศึกษาเปรียบเทียบกับระดับความรุนแรงของพังผืดตับ (liver stiffness) พบว่า relative telomere length กลุ่มผู้ป่วยที่มีค่าพังผืดตับรุนแรงมาก มีค่า relative telomere length สั้นกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่มีค่าพังผืดตับน้อยอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของ relative telomere length และค่าพังผืดตับ ยังมีระดับความรุนแรงของพังผืดตับมาก ค่า relative telomere length มีการหดสั้นลงมากเช่นกัน

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความยาวของเทโลเมียร์ในโรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อมของกระดูก ซึ่งโรคเหล่านี้อาจมีส่วนสัมพันธ์กับการหดสั้นลงของเทโลเมียร์ โดยการศึกษาความยาวของเทโลเมียร์ในกระดูก ส่วนมากทำการศึกษาในเซลล์กระดูกหรือเซลล์หมอนรองกระดูกสันหลัง เช่น Kveiborg และคณะในปีพ.ศ. 2542 (49) ทำการศึกษาในเซลล์ trabecular osteoblast ของผู้หญิงอายุ 73 ปี พบว่าความยาวของเทโลเมียร์หดสั้นลงตามจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้ศึกษาเปรียบเทียบความยาวของเทโลเมียร์จากเม็ดเลือดขาวในกลุ่มตัวอย่าง 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มวัยรุ่น กลุ่มผู้สูงอายุ และกลุ่มโรคกระดูกพรุน โดยเทคนิค Southern blot พบว่าความยาวเฉลี่ยของเทโลเมียร์ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มโรคกระดูกพรุนกับกลุ่มวัยรุ่นและกลุ่มผู้สูงอายุ อาจเนื่องมาจากจำนวนตัวอย่างมีขนาดเล็ก ทำให้พบความแตกต่างกันน้อย โดยมีการลดลงของความยาวของเทโลเมียร์อยู่ที่ 100 bp ในช่วงระยะเวลา 10 ปี ต่อมาในปีพ.ศ. 2550 Le Maitre และคณะ (50) ศึกษาความยาวของเทโลเมียร์ที่เปลี่ยนแปลงไปในผู้ป่วยโรคหมอนรองกระดูกสันหลังเสื่อม จากการเลี้ยงเซลล์หมอน

รองกระดูกสันหลัง ซึ่งในการศึกษานี้ทำการแบ่งผู้ป่วยโรคหมอนรองกระดูกสันหลังเสื่อมออกเป็น 3 เกรด ได้แก่ เกรด 0-3 (non-degenerate grades) เกรด 4-7 (intermediate grades) และเกรด 8-12 (severe grades) เปรียบเทียบกับอายุของผู้ป่วย พบว่าค่าเฉลี่ยของความยาวเทโลเมียร์ลดลงตามอายุที่เพิ่มมากขึ้น และในกลุ่มเกรด 4-7 แสดงความยาวของเทโลเมียร์สั้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเกรด 0-3 ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาของ Martin และคณะ ในปีพ.ศ. 2546 (51) ทำการวัดเทโลเมียร์ในเซลล์กระดูกอ่อน (cartilage chondrocytes) จากผู้ป่วย 27 ราย อายุ 1-87 ปี พบว่าความยาวของเทโลเมียร์ลดลงตามช่วงอายุที่เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น ความยาวของเทโลเมียร์ในเซลล์หดสั้นลง

นอกจากนี้ในการศึกษาของ Jeong และคณะในปีพ.ศ. 2557 (52) ทำการศึกษาความยาวของเทโลเมียร์ และการทำงานของเอนไซม์ telomerase ในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์หมอนรองกระดูกสันหลังชั้นใน (nucleus pulposus) ในผู้ป่วย 5 ราย อายุ 35, 42, 55, 66 และ 76 ปี ที่เข้ารับการผ่าตัดจากโรคหมอนรองกระดูกสันหลังเคลื่อน จากการศึกษาพบความยาวของเทโลเมียร์มีการหดสั้นลงในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ ทั้งนี้ในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ telomerase ของเซลล์ nucleus pulposus จากผู้ป่วยอายุ 55, 66 และ 76 ปี มีระดับการทำงานของเอนไซม์ telomerase ลดลงในรอบแรก ของการเลี้ยงเซลล์ (passage 6, 5 และ 4 ตามลำดับ) ในขณะที่ผู้ป่วยอายุ 35 และ 42 ปี มีระดับการทำงานของเอนไซม์ telomerase ลดลงในรอบหลัง ของการเลี้ยงเซลล์ (passage 11 และ 9 ตามลำดับ) ผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้นอาจเป็นผลเนื่องมาจากความยาวของเทโลเมียร์มีความสัมพันธ์กับการเกิดเซลล์ชรา เมื่อเซลล์มีการแบ่งตัวมากขึ้น การสะสมของเซลล์ชรามากขึ้นตาม และความยาวของเทโลเมียร์ในเซลล์หดสั้นลง เป็นไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาในปีพ.ศ. 2558 ของ Lee และคณะ (53) ทำการศึกษาวัดเทโลเมียร์โดยเทคนิค southern blot และการทำงานของเอนไซม์ telomerase โดยเทคนิค PCR และ ELISA ในเซลล์ nucleus pulposus chondrocytes ของผู้ป่วยโรคหมอนรองกระดูกสันหลังเสื่อม ในผู้ป่วย 14 ราย อายุตั้งแต่ 32-72 ปี พบว่าความยาวของเทโลเมียร์ในเซลล์ nucleus pulposus ลดลงเรื่อย ๆ ตามจำนวนรอบของการเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการทำงานของเอนไซม์ telomerase มีการทำงานลดลงเมื่อมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ นอกจากนี้การทำงานของเอนไซม์ telomerase มีความสัมพันธ์กับอายุ ทำให้สามารถอธิบายได้ว่าเมื่อเซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้น ความยาวของเทโลเมียร์อาจมีการหดสั้นลง รวมถึงการทำงานของ

เอนไซม์เทโลเมอเรสลดลงในแต่ละครั้งของการแบ่งเซลล์ และเมื่อมีอายุเพิ่มมากขึ้นการทำงานของเอนไซม์ telomerase ลดลงเช่นเดียวกัน

ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ทำให้เทโลเมียร์หดสั้นคือ ภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งภาวะเครียดออกซิเดชันถือเป็นสาเหตุที่ทำให้ DNA ถูกทำลาย เช่น การทำให้เบสเปลี่ยนแปลงไป และการขาดของเส้น DNA ในความเป็นจริงแล้วการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันเป็นตัวการช่วยเพิ่มการขาดของเส้นคู่ของ DNA มากยิ่งขึ้น (54) โดยเฉพาะบริเวณเทโลเมียร์ ซึ่งเป็นบริเวณที่ง่ายต่อการถูกทำลายจากภาวะออกซิเดชัน ทั้งนี้เป็นเพราะบริเวณนั้นมีเบสกวานีนเป็นองค์ประกอบอยู่มาก จึงเกิดปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระได้ง่ายที่สุด (55) ดั้งการศึกษาของ Ma และคณะในปีพ.ศ. 2556 ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า relative telomere length กับภาวะเครียดออกซิเดชัน ในผู้ป่วยโรคเบาหวานประเภทที่ 1 และประเภทที่ 2 (56) จำนวน 62 และ 34 รายตามลำดับ พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยเบาหวานประเภทที่ 1 ระดับ 8-OHdG มีความสัมพันธ์กับค่า relative telomere length ในทิศทางแปรผกผันกัน สามารถอธิบายได้ว่ายิ่งได้รับภาวะเครียดออกซิเดชันยิ่งมากขึ้น ค่า relative telomere length ยิ่งหดสั้นลง และในกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานประเภทที่ 2 พบว่าอายุและระดับ 8-OHdG มีความสัมพันธ์กับค่า relative telomere length ในทิศทางแปรผกผันกัน ซึ่งหมายความว่าผู้ป่วยเบาหวานประเภทที่ 2 ที่อายุมากขึ้นและมีระดับของภาวะเครียดออกซิเดชันมาก อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ค่า relative telomere length ลดลง

### จำนวนไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial DNA copy number)

ไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์ที่พบมากในสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอต โดยมีเยื่อหุ้มชั้นนอกและชั้นในรวม 2 ชั้น โดยไมโทคอนเดรียเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น กระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) และกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์ (57) นอกจากนี้ไมโทคอนเดรียยังมีหน้าที่สำคัญ คือ การเปลี่ยนสารอาหารที่เซลล์ได้รับอยู่ในรูปของพลังงานหรือ adenosine-5'-triphosphate (ATP) ผ่านกระบวนการ oxidative phosphorylation (58)

โปรตีนภายในไมโทคอนเดรียถูกเปลี่ยนโดยสารพันธุกรรมภายในนิวเคลียส ไมโทคอนเดรียมีสารพันธุกรรมเป็นของตัวเองหลายชุด ที่เรียกว่า mitochondrial DNA (mtDNA) ซึ่ง mtDNA ของมนุษย์ ที่ได้จากการถ่ายทอดทางพันธุกรรม มีโมเลกุลลักษณะเป็นวงกลมขนาด 16,569 bp



ประกอบด้วย โปรตีนมากกว่า 100 ชนิด และมีโปรตีน 13 ชนิดที่ใช้ในกระบวนการหายใจ นอกจากนี้ ยังมี ribosomal RNAs (rRNAs) และ transfer RNAs (tRNAs) ช่วยในการสังเคราะห์โปรตีนภายใน ไมโทคอนเดรีย (3) ไมโทคอนเดรียไม่ได้มีหน้าที่เฉพาะในการสังเคราะห์ ATP ผ่านวัฏจักรเครบส์ และกระบวนการหายใจระดับเซลล์ ไมโทคอนเดรียมีหน้าที่ให้เซลล์มีชีวิต ทั้งยังมีส่วนสำคัญต่อการสร้างสารอนุมูลอิสระในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน เพื่อให้เซลล์มีชีวิตหรือเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่กระบวนการตายของเซลล์

เมื่อไมโทคอนเดรียมีการสะสมของระดับสารอนุมูลอิสระมากขึ้น หน้าที่การทำงานของไมโทคอนเดรียผิดปกติ ส่งผลให้ mtDNA เกิดการกลายพันธุ์ เช่น การเกิด deletion และ point mutation ส่งผลให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคอัลไซเมอร์ (alzheimers) โรคพาร์กินสัน (parkinson) และโรคจากความเสื่อม (degenerative disease) เป็นต้น ทั้งนี้การทำงานของไมโทคอนเดรียที่ผิดปกติสามารถตรวจวัดได้จากจำนวน mtDNA copy number ซึ่งจำนวน mtDNA copy number ไม่ได้แสดงถึงความสามารถในการสังเคราะห์ ATP เท่านั้น แต่ยังแสดงถึงการที่เซลล์เผชิญกับสารอนุมูลอิสระทำลายเซลล์ ดังการศึกษาในปีพ.ศ. 2546 Lin และคณะ (40) ทำการศึกษาจำนวนไมโทคอนเดรียในผู้ป่วยโรคหัวใจเต้นผิดจังหวะ (atrial fibrillation) 13 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 26 ราย (sinus rhythm) โดยใช้เทคนิค slot blot พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคหัวใจเต้นผิดจังหวะมีค่าเฉลี่ยของจำนวน mtDNA copy number สูงกว่าในกลุ่มหัวใจเต้นจังหวะปกติอยู่อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าระดับของ mtDNA lesion มีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันกับปริมาณของ mtDNA ในผู้ป่วยโรคหัวใจเต้นผิดจังหวะ และในปีพ.ศ. 2551 Lin และคณะ (59) ได้ศึกษาจำนวน mtDNA copy number เปรียบเทียบในผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดก่อนและหลังจากการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด (chemotherapy) พบว่าหลังจากการได้รับยาเคมีบำบัด จำนวน mtDNA copy number ในกลุ่มผู้ป่วยมีจำนวนลดลง แสดงว่าการลดลงของจำนวน mtDNA copy number อาจส่งผลให้ลดความหนาแน่นของไมโทคอนเดรียในเซลล์มะเร็ง ซึ่งนำไปสู่การลดลงระดับสารอนุมูลอิสระในเซลล์

นอกจากนี้มีการศึกษาจำนวน mtDNA copy number ว่ามีความเกี่ยวข้องกับโรคกระดูกและข้อเสื่อม โดยเฉพาะโรคข้อเสื่อม ซึ่งพบเฉพาะในเซลล์ chondrocytes ของกระดูกอ่อน จากการที่เซลล์มีการสร้างโปรตีนย่อยสลายภายนอกเซลล์ เช่น matrix metalloproteinase (MMPs) และสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ ได้แก่ interleukin (IL)-1 และ tumor necrosis factor (TNF) (60) รวมถึง

nitric oxide (NO) และสารอนุมูลอิสระอื่นๆ ซึ่งมีส่วนสำคัญต่อการเกิดโรคข้อเสื่อม ซึ่งในการศึกษาของ Fang และคณะ ในปีพ.ศ. 2557 (61) ทำการศึกษาจำนวน mtDNA copy number ในเลือดของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 187 ราย โดยใช้เทคนิค quantitative PCR เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยกลุ่มผู้ป่วยมีการแบ่งระดับเกรด 2-4 Kellgren/Lawrence ตามความรุนแรงของโรค พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยมีจำนวน mtDNA copy number มากกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยกับระดับความรุนแรงของโรค ไม่พบความแตกต่างระหว่างสองกลุ่ม จากการศึกษานี้อธิบายได้ว่า การที่ผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมมีการทำงานของเซลล์มากขึ้น อาจส่งผลให้เซลล์มีจำนวน mtDNA copy number เพิ่มขึ้น ถือเป็นกลไกในการชดเชยความผิดปกติที่เกิดขึ้นในไมโทคอนเดรีย

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีการศึกษาทั้งเทโลเมียร์และไมโทคอนเดรีย การหดสั้นของเทโลเมียร์และการทำงานของไมโทคอนเดรียที่ผิดปกติ เป็นที่ทราบกันดีถึงกลไกทางโมเลกุลที่สำคัญต่อเซลล์ เมื่อเทโลเมียร์มีการทำงานผิดปกติจะมีการกระตุ้นวิถีที่เกี่ยวข้องกับโปรตีน p53 ซึ่งไปยับยั้งการแสดงออกของยีน peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha and beta (PGC-1 $\alpha$  และ PGC-1) ซึ่งการยับยั้งทั้งสอง coactivators นี้ นำไปสู่การเพิ่มระดับของสารอนุมูลอิสระเข้ามาทำลายเทโลเมียร์และ mtDNA มากขึ้น (62) ในการศึกษาของ Kim และคณะปีพ.ศ. 2013 พบว่าค่า relative telomere length กับจำนวน mtDNA copy number มีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกันในกลุ่มผู้สูงอายุ community-dwelling อธิบายได้ว่าเทโลเมียร์อาจมีความสัมพันธ์ต่อจำนวน mtDNA copy number ในมนุษย์ (63) สอดคล้องกับการศึกษาในปีพ.ศ. 2555 ของ Monickaraj และคณะ (64) พบว่าจำนวน mtDNA copy number มีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกับเทโลเมียร์ในผู้ป่วยโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ทั้งนี้ในปีพ.ศ. 2559 การศึกษาของ Alegria-Torres และคณะ ทำการศึกษาจำนวน mtDNA copy number และเทโลเมียร์ในกลุ่มเด็กจำนวน 98 ราย จากประเทศเม็กซิโก พบว่าจำนวน mtDNA copy number มีความสัมพันธ์กับเทโลเมียร์ในทิศทางเดียวกัน ซึ่งจำนวน mtDNA copy number เพิ่มมากขึ้น ความยาวของเทโลเมียร์เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน (65)

## Cell senescence

Cell senescence เป็นกระบวนการเซลล์ชราที่เซลล์ปกติมีถูกกระตุ้นให้มีการตอบสนองต่อปัจจัยความเครียดหลากหลายชนิดที่มีต่อเซลล์ (5) โดยเฉพาะเซลล์ร่างกายของมนุษย์ส่วนใหญ่มีระดับการทำงานของเอนไซม์ telomerase ต่ำ และมีการแบ่งตัวที่จำกัด รวมถึงการหดสั้นลงของเทโลเมียร์ ซึ่งตรงกันข้ามกับเซลล์สืบพันธุ์ (germ cells) สเต็มเซลล์ (stem cells) และเซลล์มะเร็ง (65, 66) ทำให้เซลล์หยุดสร้างเซลล์ใหม่ขึ้นมาทดแทนเซลล์ที่ถูกทำลาย กลไกสำคัญที่กระตุ้นให้เซลล์เข้าสู่กระบวนการเซลล์ชรา ได้แก่ การหดสั้นของเทโลเมียร์ ซึ่งพบได้จากการจำลอง DNA (DNA replication) ที่ไม่สมบูรณ์บริเวณเทโลเมียร์ หรือกรณีที่เอนไซม์ telomerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการเติมสาย DNA บริเวณปลายเทโลเมียร์ไม่ทำงาน หรือมีการทำงานต่ำกว่าปกติ ส่งผลให้เทโลเมียร์ของเส้น DNA หดสั้นลงเรื่อยๆ ในแต่ละรอบของการแบ่งเซลล์ และหยุดอยู่ในระยะ G1 ของวัฏจักรเซลล์ ทำให้ DNA ภายในเซลล์มีกลายเป็น DNA senescence และมีการแบ่งตัวต่อทำให้เกิดเป็นเซลล์ชรา (67, 68) นอกจากนี้ตัวกระตุ้นที่ก่อให้เกิดความเครียดต่างๆ (stress stimuli) เช่น สารอนุมูลอิสระ (oxidative stress) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง (oncogenes) และรังสีไอออน (ionizing radiation) เป็นต้น (69) ปัจจัยเหล่านี้ส่งผลให้ DNA ถูกทำลาย และเกิดการหดสั้นของเทโลเมียร์ (telomere erosion) ทำให้มีเซลล์เข้าสู่เซลล์ชราเพิ่มมากขึ้น (70)

กระบวนการเซลล์ชราในเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte senescence) ส่วนใหญ่เกิดจากการสะสมของสารประกอบที่มีออกซิเจนในโมเลกุล หรือ reactive oxygen species (ROS) และการเกิดสาร advanced glycation end products ทำให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) เพิ่มขึ้น ซึ่ง SA- $\beta$ -gal ถือเป็นตัววัดทางชีวภาพที่แสดงออกเฉพาะในเซลล์ชรา แต่ไม่มีการแสดงออกใน pre-senescent หรือ quiescent senescence โดยพบว่าเซลล์ชรามีการทำงานของเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase สามารถตรวจพบที่ pH 6.0 ซึ่งแตกต่างจากการทำงานของเอนไซม์ acidic  $\beta$ -galactosidase ที่พบได้ในทุกเซลล์และตรวจพบที่ pH 4.0 ขั้นตอนในการตรวจเซลล์ชราเป็นการตรวจการย้อมสีเซลล์โดยใช้สารตั้งต้นที่ทำให้เกิดสี คือ 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal) เมื่อทำปฏิกิริยาถูกย่อยด้วยเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase จึงเกิดสีน้ำเงินภายในเซลล์ (71)

ในปีพ.ศ. 2549 Lee และคณะ พบว่าเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase เกิดจากแสดงออกของยีน galactosidase beta 1 (*GLB1*) เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไลโซไซม ซึ่งเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase ย่อย ปลายของ  $\beta$ -galactose จากสารตั้งต้นของ ganglioside (72) นอกจากนี้เมื่อสารพันธุกรรมใน นิวเคลียสและไมโทคอนเดรียถูกทำลาย และการทำงานของไมโทคอนเดรียลดลง (73) วิธีทดสอบ กระบวนการเซลล์ชราสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การศึกษาความยาวของเทโลเมียร์ในเม็ดเลือดขาว ชี้นเนื้อ การเพาะเลี้ยงเซลล์ เทคนิค immunohistochemistry รวมถึงการศึกษาโปรตีน p53-pRB ใน วิธี p53-p21-pRB และโปรตีน p16 ในวิธี p16-pRB เป็นต้น

การเกิดกระบวนการเซลล์ชราเกี่ยวข้องกับโรคต่างๆ ในปีพ.ศ. 2549 Müller (74) ทำการศึกษาเซลล์ชราในเซลล์ไฟโบบลาสต์ของปอด ในผู้ป่วยโรคถุงลมโป่งพอง (emphysema) จำนวน 13 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ทำการศึกษาผ่าตัดโรคมะเร็งปอด 15 ราย พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคถุง ลมโป่งพอง มีการติดสี  $\beta$ -galactosidase จากเทคนิค SA- $\beta$ -gal มากกว่าในกลุ่มควบคุม แสดงว่าการ เกิดพยาธิสภาพก่อให้เกิดการสะสมของเซลล์ชรามากกว่าปกติ และในการศึกษาของ Takahashi และ คณะในปีพ.ศ. 2557 (47) ศึกษาการแสดงออกของ เอนไซม์ SA- $\beta$ -gal ของเซลล์เหงือก ในผู้ป่วยโรค ปริทันต์ชนิดลุกลาม (aggressive periodontitis) จำนวน 21 ราย พบว่าในระยะแรกของการเลี้ยง เซลล์ จำนวนของเซลล์เหงือกที่ย้อมติดสีของเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase จำนวนน้อยกว่า ในขณะที่ เลี้ยงเซลล์ในระยะหลังย้อมติดสีมากกว่า นอกจากนี้ร้อยละของเซลล์เหงือกที่ย้อมติดสีมีความสัมพันธ์ ผกผันกับความยาวของเทโลเมียร์ แสดงว่าเซลล์เมื่อมีการแบ่งตัว มีการสะสมของเซลล์ชราเพิ่มขึ้น ความยาวของเทโลเมียร์จึงหดสั้นลงตาม

นอกจากนี้เซลล์ชราเกี่ยวข้องกับโรคกระดูก โดยเฉพาะโรคกระดูกสันหลังสภาพเสื่อม เช่น โรคกระดูกพรุน โรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม โรคโพรงกระดูกสันหลังตีบแคบ และโรคหมอนรอง กระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม เป็นต้น ซึ่งโรคเหล่านี้ส่วนใหญ่พบในผู้ป่วยสูงอายุ เมื่ออายุเพิ่มขึ้น เซลล์ ในร่างกายมีการแบ่งตัวมาตลอด เกิดการสะสมของจำนวนเซลล์ชราที่เพิ่มมากขึ้น ในปีพ.ศ. 2542 Kveiborg และคณะ (49) ทำการเลี้ยงเซลล์ trabecular osteoblast เมื่อทำการศึกษาการติดสีของ SA- $\beta$ -gal ในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ พบว่าในรอบต้นๆของการเลี้ยงเซลล์มีจำนวนเซลล์ที่ติดสี จากการย้อมเซลล์น้อยกว่าการเลี้ยงเซลล์ในรอบหลัง ดังเช่นในการศึกษาเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อของ Martin และคณะในปีพ.ศ. 2546 (51) ทำการวิเคราะห์เซลล์ชราจากเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อจากผู้ป่วย

27 ราย พบว่ามีการแสดงออกของ  $\beta$ -galactosidase เพิ่มขึ้นตามอายุอย่างมีนัยสำคัญ งานวิจัยนี้สามารถชี้ให้เห็นว่าเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อที่อยู่ในระยะชรา มีความสัมพันธ์กับอายุ ยิ่งอายุเพิ่มมากขึ้น จำนวนเซลล์ชราเกิดการสะสมและอาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการฟื้นฟูซ่อมแซมกระดูกอ่อนผิวข้อมากขึ้น อาจมีการส่งผลต่อการเป็นโรคข้อเสื่อมได้

ในการศึกษาเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อต่างๆ มีอยู่มากมาย โดยเฉพาะในโรคกระดูกสันหลังมีการศึกษาเช่นกัน งานวิจัยในปีพ.ศ. 2551 ของ Kim และคณะ (75) ได้ศึกษาเซลล์ชราจากการตรวจการทำงานของ SA- $\beta$ -gal ของเซลล์หมอนรองกระดูกสันหลังชั้นใน (nucleus pulposus) ในผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัดโรคหมอนรองกระดูกสันหลังเสื่อมและแตกจำนวน 25 ราย พบว่าเซลล์หมอนรองกระดูกสันหลังชั้นในมีการติดสีของเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase และมีค่าเฉลี่ยของเซลล์ย้อมติดสีอยู่ร้อยละ 41.82 นอกจากนี้พบว่ามีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับอายุของผู้ป่วย แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยที่มีอายุเพิ่มมากขึ้น ร้อยละการติดสีของเซลล์เพิ่มมากขึ้นไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่ง Joeng (52) และคณะในปีพ.ศ. 2557 ทำการศึกษาเซลล์ชราในเซลล์ nucleus pulposus ของผู้ป่วยโรคหมอนรองกระดูกสันหลังเคลื่อน (herniated nucleus pulposus) ในผู้ป่วย 5 ราย อายุ 35, 42, 55, 66 และ 76 ปี ศึกษาในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์จากผู้ป่วยที่มีอายุ 35 และ 42 ปี ที่ย้อมติดสีของเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase มีค่าร้อยละ 8.2 และ 10.5 ตามลำดับ ในขณะที่ผู้ป่วยอายุ 55, 66 และ 76 ปี ค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่ติดสี มีค่าร้อยละ 54, 94.3 และ 90.8 ตามลำดับ นอกจากนี้การศึกษาในปีพ.ศ. 2560 ของ Li และคณะ พบว่าเซลล์ bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) จากหนูมีร้อยละของการติดสีจากการย้อมด้วย SA- $\beta$ -gal เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ (passage 2, 4, 8 และ 16) และค่า relative telomere length หดสั้นลงมากที่สุดในการ passage 16 แสดงให้เห็นว่าทุกครั้งที่มีการแบ่งตัวของเซลล์ เทโลเมียร์หดสั้นลงเรื่อย ๆ ซึ่งถือเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้มีจำนวนเซลล์ชราเพิ่มมากขึ้น (76)

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### ประชากร

##### ประชากร (target population)

- ผู้ป่วยอายุระหว่าง 50-80 ปี
- ผู้ป่วยเข้ารับการผ่าตัดโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบจากการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum จากฝ่ายออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

##### เกณฑ์การคัดเลือก (Inclusion criteria)

- ผู้ป่วยอายุ 50-80 ปี
- กลุ่มผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบจากการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เข้ารับการผ่าตัดรักษาขยายช่องไขสันหลังตีบแคบบริเวณเอว จากฝ่ายออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

##### เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria)

- กลุ่มผู้ป่วยอายุ 80 ปีขึ้นไป
- เคยเข้ารับการผ่าตัดโรคกระดูกสันหลังอื่นๆมาก่อน เช่น โรคหมอนรองกระดูกกดทับเส้นประสาท โรคหมอนรองกระดูกสันหลังเสื่อม และภาวะปวดหลังอื่นๆ ที่ไม่ใช่จากโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังตีบแคบบริเวณเอวจากการหนาตัวของ ligamentum flavum ที่เข้ารับการผ่าตัดรักษา จากฝ่ายออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย
- ผู้ป่วยมีโรคอื่นร่วม เช่น โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง หรือโรคติดเชื้ออื่น ๆ เป็นต้น

### ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample size)

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการคำนวณกลุ่มประชากรตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบจากการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum โดยเก็บชิ้นเนื้อ 2 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มชิ้นเอ็นที่มีการหนาตัว และกลุ่มชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียงจากผู้ป่วยผ่าตัดโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบรายเดียวกันที่เข้ารับการผ่าตัดรักษา จากฝ่ายออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งสามารถคำนวณกลุ่มตัวอย่าง โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

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

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

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

n = ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

Z = ค่า Z score ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

$P_1$  = อัตราการเกิดการแสดงออกของยีนในชิ้นเนื้อปกติ

$P_2$  = อัตราการเกิดการแสดงออกของยีนในชิ้นเนื้อที่มีการหนาตัวของชิ้นเอ็น

ligamentum flavum มหาวิทยาลัย

Q = (1-อัตราการเกิดการแสดงออกของยีนในชิ้นเนื้อ)

ดังนั้น

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

ดังนั้นต้องใช้ตัวอย่างชิ้นเอ็นช่องไขสันหลังที่มีการหนาตัว และชิ้นเนื้อปกติระดับข้างเคียงจากผู้ป่วยรายเดียวกัน อย่างน้อยจำนวนกลุ่มละ 18 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวได้มาเมื่อผู้ป่วยที่มีโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่ามีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบจำเป็นต้องรักษาโดยการผ่าตัด โดยเลือกเก็บตัวอย่างเฉพาะชิ้นเอ็น ligamentum flavum ในระดับกระดูกสันหลังส่วนเอว ในกลุ่มที่เป็นโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบ

## เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

- 1.1 Autoclave (Hydroclave, USA)
- 1.2 Automatic adjustable micropipette (Eppendorf, Germany)
- 1.3 Pipette rack (Autopack, USA)
- 1.4 Centrifuge, refrigerated centrifuge (Eppendorf, USA)
- 1.5 Centrifuge, microcentrifuge high speed (Eppendorf, USA)
- 1.6 Combs (BIO-RAD, Hercules, California, USA)
- 1.7 NanoDrop<sup>®</sup> ND-100 Spectrophotometer (Scientific, USA)
- 1.8 StepOnePlus<sup>™</sup> Real-time PCR system (Applied Biosystems, USA)
- 1.9 Electrophoresis chamber set (BIO-RAD, USA)
- 1.10 Freezer -80°C (Forma Scientific, USA)
- 1.11 Gel Doc 1000 (BIO-RAD, USA)
- 1.12 Multi-block heater (Techne DRI Block, USA)
- 1.13 Refrigerator (Sanyo, Japan)
- 1.14 Vortex mixer (Scientific Industry, USA)
- 1.15 Water purification equipment (Water pro Ps, Labconco, USA)
- 1.16 Water bath: Memmert WB45 (Memmert, German)
- 1.17 Mastercycler personal (Eppendorf, USA)
- 1.18 Multi – channel pipettor (Biohit, Finland)
- 1.19 Enzyme – linked Immunosorbent Assay Plate Reader (BIO-RAD, USA)
- 1.20 Pipette controller (Eppendorf, Germany)



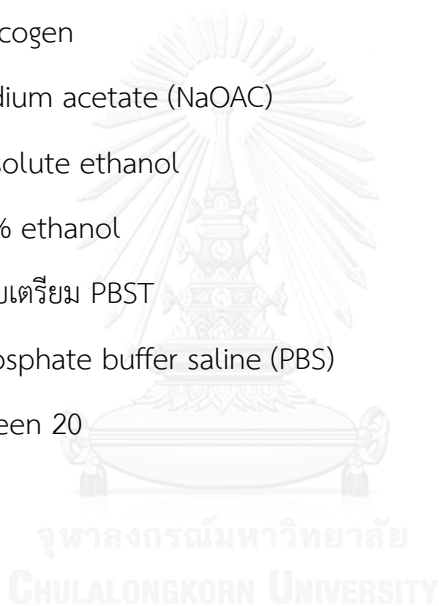
## วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- 1.1 Blade (Parabolar, Germany)
- 1.2 Motar and pestle
- 1.3 Cylinder: 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml (Pyrex, USA)
- 1.4 Microcentrifuge tube rack
- 1.5 Reagent bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Duran, USA)
- 1.6 Centrifuge tube sterile (Elkay, USA)
- 1.7 Disposable gloves (Proglove, Thailand)
- 1.8 Microcentrifuge tube 1.5 ml (BIO-RAD, USA)
- 1.9 Needle No.20 sterile (Nipro, Japan)
- 1.10 Syringe disposable (Nipro, Japan)
- 1.11 Sero pipette 1, 5, 10 ml (Henneberg – Sander GmbH (HBG), Germany)
- 1.12 Pipette tip (AxyGen, USA)
- 1.13 Tissue DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia)
- 1.14 RNA later TM (Qiagen, Germany)
- 1.15 Real time polymerase chain reaction tube
- 1.16 RBC ThermOne TM Real-time Premix (With SYBR Green) (RBCBioscience, Taiwan)
- 1.17 QPCR Green Master Mix HRox (Biotechrabbit, Germany)
- 1.18 Senescence  $\beta$ -galactosidase staining kit (Cell signaling technology, USA)
- 1.19 HT 8-OHdG ELISA kit II (Trevigen<sup>®</sup>, USA)

## สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารเคมีทั่วไป
  - 1.1 70% ethanol
2. สารเคมีสำหรับการสกัด DNA
  - 2.1 Liquid nitrogen
  - 2.2 Buffer TL
  - 2.3 Proteinase K
  - 2.4 Lysis enhancer
  - 2.5 Buffer TB
  - 2.6 Absolute ethanol
  - 2.7 Wash buffer
  - 2.8 Elution buffer
3. สารเคมีสำหรับการศึกษา telomere โดยเทคนิค quantitative real-time PCR (real-time qPCR)
  - 3.1 Distilled water
  - 3.2 10  $\mu$ M primer forward (telomere, 36B4)
  - 3.3 10  $\mu$ M primer reverse (telomere, 36B4)
  - 3.4 2X ThermOne Premix with SYBR Green (RBCBioscience, Taiwan)
4. สารเคมีสำหรับการศึกษาจำนวน mtDNA copy number โดยเทคนิค real-time qPCR
  - 4.1 Distilled water
  - 4.2 10  $\mu$ M primer forward (ND1, Human globulin)
  - 4.3 10  $\mu$ M primer reverse (ND1, Human globulin)
  - 4.4 QPCR Green Master Mix HRox (Biotechrabbit, Germany)
5. สารเคมีสำหรับทำ agarose gel electrophoresis
  - 5.1 Agarose molecular biology grade
  - 5.2 100 bp DNA ladder

- 5.3 Loading dye
- 5.4 1X Tris-acetate Ethylenediaminetetraacetic acid (TAE) buffer
- 5.5 Ethidium bromide
- 6. สารเคมีสำหรับการสกัด DNA ด้วยวิธี phenol-choloform
  - 6.1 Proteinase K
  - 6.2 Lysis buffer
  - 6.3 Phenol
  - 6.4 Chloroform : Indole-3-acetic acid (CHCl<sub>3</sub> : IAA) (49:1)
  - 6.5 Glycogen
  - 6.6 Sodium acetate (NaOAC)
  - 6.7 Absolute ethanol
  - 6.8 70% ethanol
- 7. สารเคมีสำหรับเตรียม PBST
  - 7.1 Phosphate buffer saline (PBS)
  - 7.2 Tween 20



### การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. อายุและเพศของผู้ป่วย
2. ปริมาณ DNA
3. ค่า cycle threshold (CT) จากการทำ real-time PCR
4. ภาพถ่าย gel electrophoresis
5. ระดับ 8-OHdG
6. จำนวนและภาพถ่ายเซลล์ที่ย้อมติดสี SA-β-gal
7. ข้อมูลทั้งหมดที่ได้ทำการจัดเก็บข้อมูลบันทึกในคอมพิวเตอร์

## การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

### 1. การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัดโดยเก็บชิ้นเอ็น ligamentum flavum ขนาด  $0.2 \times 0.2$  เซนติเมตร จากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ (lumbar spinal stenosis) จากระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัว

### 2. การเก็บชิ้นเนื้อ

- 2.1 ทำการเก็บชิ้นเนื้อบริเวณชิ้นเอ็นช่องไขสันหลัง (ligamentum flavum) ที่ผ่าตัดออกมาตามแผนการรักษาปกติของผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังตีบแคบบริเวณเอว ขนาด  $0.2 \times 0.2$  ซม.
- 2.2 นำชิ้นเอ็นช่องไขสันหลังที่ได้จากผู้ป่วยมาตัดแบ่งและชั่งน้ำหนักให้แต่ละชิ้นหนักประมาณ 20-30 mg
- 2.3 นำชิ้นเอ็นช่องไขสันหลังที่ตัดแบ่งจากข้อ 2 ใส่ลงใน microcentrifuge tube และเติมน้ำยารักษาสภาพ RNA ลงไปประมาณ 200-300  $\mu$ l
- 2.4 นำชิ้นเนื้อเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$  เพื่อทำการสกัด DNA

### 3. ศึกษาความยาวของเทโลเมียร์ในชิ้นเอ็นช่องไขสันหลัง

- 3.1. การสกัดแยก DNA จากชิ้นเนื้อ (Vivantis Technologies, Selangor Darul Ehsan, Malaysia)
  - 3.1.1 นำชิ้นเนื้อจากหลอด microcentrifuge แช่น้ำยา RNA later มาชั่งให้ได้น้ำหนักประมาณ 20 mg ใส่ในครกบด
  - 3.1.2 ทำ homogenization โดยเท liquid nitrogen ลงในครก และใช้สากบดชิ้นเนื้อจนเป็นผง นำผงที่ได้ใส่ในหลอด microcentrifuge ที่เตรียมเอาไว้
  - 3.1.3 เติม Buffer TL 250  $\mu$ l และเติม proteinase K 20  $\mu$ l ลงในตัวอย่างผสมให้เข้ากันทันทีให้เป็นเนื้อเดียวกัน
  - 3.1.4 เมื่อผสมให้เข้ากันแล้ว เติม lysis Enhancer 12  $\mu$ l นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ  $65^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง (หรือทิ้งไว้ข้ามคืนในกรณีที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน)

- 3.1.5 เติม Buffer TB 560  $\mu\text{l}$  ผสมให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียวกัน และนำไปปั่นอีกครั้งที่ อุณหภูมิ  $65^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10 นาที
- 3.1.6 เติม absolute ethanol 200  $\mu\text{l}$  ผสมให้เข้ากันทันที เพื่อป้องกันไม่ให้นิวเคลียส ตกตะกอน
- 3.1.7 ย้ายสารละลายประมาณ 650  $\mu\text{l}$  ลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ นำไปปั่นตกตะกอนที่ ความเร็ว 5,000 g เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ย้ายสารละลายอีกครั้งปั่น ตกตะกอน และเทส่วนใสทิ้งทั้งหมด
- 3.1.8 เติม wash buffer 650  $\mu\text{l}$  ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 g เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำอีกครั้ง
- 3.1.9 ทำคอลัมน์ให้แห้งด้วยการปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที เพื่อแยกส่วนที่ผสมกับ ethanol ออก
- 3.1.10 ย้ายคอลัมน์ลงใน microcentrifuge หลอดใหม่ เติม elution buffer หรือน้ำ 200  $\mu\text{l}$  ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 g เป็น เวลา 1 นาที เพื่อทำการชะ DNA ให้ตกลงในหลอด เก็บ DNA ไว้ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  หรือ  $-20^{\circ}\text{C}$
- 3.2. วัดปริมาณ DNA ที่ได้ทั้งหมดด้วยเครื่อง Nanodrop โดยอาศัยคุณสมบัติการดูดกลืนแสง ของ DNA ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร
- 3.2.1 วัดค่าการดูดกลืนแสงของ DNA ด้วยเครื่อง nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร
- 3.2.2 วัดความเข้มข้น และวัดคุณภาพของ DNA โดยดูจากสัดส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาว 260/280 นาโนเมตร ซึ่ง DNA ที่มีคุณภาพมีค่าอยู่ระหว่าง 1.8-2.0

3.3. ศึกษา relative telomere length ในชิ้นเอ็นช่องไขสันหลังด้วยเทคนิค real time PCR (77)

3.3.1 เจือจางความเข้มข้นของ DNA ในตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 1.56 ng/  $\mu$ l

3.3.2 ความเข้มข้นของ primer (ตารางที่ 1) ทั้งหมดที่ใช้ในการวัด relative telomere length มีความเข้มข้นที่ 10  $\mu$ M โดยการเจือจาง stock primers ที่มีความเข้มข้น 100  $\mu$ M จากการดูดแบ่งสารละลายจาก stock primer ออกมา 2  $\mu$ l เติมน้ำ 18  $\mu$ l จึงได้ primers ที่ความเข้มข้น 10  $\mu$ M

ตารางที่ 1 ลำดับเบส primers ที่ใช้ในการทำ real time PCR

Primer's name	Sequence (5' $\rightarrow$ 3')
Telomere (Forward)	CGGTTTGTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT
Telomere (Reverse)	GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT
36B4 (Forward)	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC
36B4 (Reverse)	CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA

3.3.3 ตัวอย่าง DNA ที่ชื่อ C239D STD ใช้เป็น reference sample ให้มีความเข้มข้น 1.56 ng/  $\mu$ l ปริมาตร 100  $\mu$ l (ดูดจาก stock C239 STD 1.4  $\mu$ l ผสมน้ำ 98.6  $\mu$ l)

3.3.4 เตรียม master mix สำหรับ real time PCR ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณสารเคมีที่ใช้สำหรับ real time PCR

Chemical reagent	Volume ( $\mu$ l)
SYBR master mix (2X)	5 $\mu$ l
Forward-primers (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
Reverse primers (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
Distilled water	2.6 $\mu$ l
DNA template (1.56 ng/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l

3.3.5 ในการทำ real time PCR ตูต master mix ที่ผสมจากข้อ 3.3.4 ใส่ใน microcentrifuge tube โดยใส่ DNA template ในขั้นตอนสุดท้าย ส่วน negative ไม่ต้องใส่ DNA template เพียงแต่ใส่น้ำกลั่น

3.3.6 วัด relative telomere length โดยเครื่อง real time PCR โดยใช้สภาวะ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สภาวะที่ใช้ในการทำ real time PCR

PCR cycle	อุณหภูมิ ( $^{\circ}$ C)	เวลา (นาที)	Cycles
Holding stage	95	0.10	1
Cycling stage			
Denature	95	0.15	} 40
Annealing	54	1.00	

3.3.7 จากนั้นทำ real time ของ single copy gene (36B4) forward และ reverse ของ internal control เพื่อใช้เป็นยีนควบคุมการแสดงออก ซึ่งเหตุผลที่ใช้ single copy gene นั้นเป็นเพราะมีลำดับ repetitive sequence ที่ซ้ำกันไปมาจำนวนมาก และมีอยู่ในจีโนมมนุษย์ ทำให้ใช้เป็นตัวควบคุมกับเทโลเมียร์

3.3.8 เสร็จกระบวนการครบ 40 รอบ ทำการปรับ threshold ในแต่ละตัวอย่างที่ใส่ reference 1 สำหรับเทโลเมียร์ปรับค่า Ct อยู่ที่ 13.07 และใน single copy gene ปรับ Ct ที่ 22.49

3.3.9 เมื่อได้ค่า Ct แล้วคำนวณโดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\Delta Ct_{ref} = Ct_{Tel_{ref}} - Ct_{Single_{ref}}$$

$$\Delta Ct_{sam} = Ct_{Tel_{sam}} - Ct_{Single_{sam}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{sam} - \Delta Ct_{ref}$$

$$\text{Relative telomere length} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

#### 4. ศึกษาจำนวน mtDNA copy number ในชิ้นเอ็นของไขสันหลังด้วยเทคนิค real time PCR

(78)

4.1 เจือจางความเข้มข้นของ DNA ในตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 1.56 ng/  $\mu$ l

4.2 ความเข้มข้นของ primer (ตารางที่ 4) ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาจำนวน mtDNA copy number มีความเข้มข้นที่ 10  $\mu$ M โดยการเจือจาง stock primers ที่มีความเข้มข้น 100  $\mu$ M จากการดูดแบ่งสารละลายจาก stock primer ออกมา 2  $\mu$ l เติมน้ำ 18  $\mu$ l จึงได้ primers ที่ความเข้มข้น 10  $\mu$ M



**ตารางที่ 4** ลำดับเบส primers ที่ใช้ในการทำ real time PCR

Primer's name	Sequence (5' → 3')
MT-ND1 (Forward)	CCCTAAAACCCGCCACATCT
MT-ND1 (Reverse)	GAGCGATGGTGAGAGCTAAGGT
Human Globulin (Forward)	GTGCACCTGACTCCTGAGGAGA
Human Globulin (Reverse)	CCTTGATACCAACCTGCCAG

4.3 ตัวอย่าง DNA ที่ชื่อ C239D STD ใช้เป็น reference sample ให้มีความเข้มข้น 1.56 ng/  $\mu$ l ปริมาตร 100  $\mu$ l (ดูจาก stock C239 STD 1.4  $\mu$ l ผสมน้ำ 98.6  $\mu$ l)

4.4 เตรียม master mix สำหรับ real time PCR ดังตารางที่ 5

**ตารางที่ 5** ชนิดและปริมาณสารเคมีที่ใช้สำหรับ real time PCR

Chemical reagents	Volume ( $\mu$ l)
SYBR master mix (2X)	5 $\mu$ l
Forward-primers (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
Reverse primers (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
Distilled water	2.6 $\mu$ l
DNA template (1,56 ng/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l

4.5 ในการทำ real time PCR ดูด master mix ที่ผสมจากข้อ 4) ใส่ใน microcentrifuge tube โดยใส่ DNA template ในขั้นตอนสุดท้าย ส่วน negative ไม่ต้องใส่ DNA template เพียงแต่ใส่น้ำกลั่น

4.6) วัดการแสดงออกของจำนวน mtDNA copy number โดยเครื่อง real time PCR โดยใช้สภาวะ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 สภาวะที่ใช้ในการทำ real time PCR

PCR cycle	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	Cycles
Holding stage	95	0.30	1
Cycling stage			
Denature	94	0.30	} 35
Annealing	58	0.30	
Extension	72	0.50	

4.7 จากนั้นทำ real time PCR ของยีน human globulin โดยอาศัย primers forward และ reverse ของ internal control เพื่อใช้เป็นยีนควบคุมการแสดงออก

4.8 เสร็จกระบวนการครบ 35 รอบ เมื่อได้ค่า Ct แล้วคำนวณโดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\Delta Ct_{ref} = Ct_{Tel_{ref}} - Ct_{Single_{ref}}$$

$$\Delta Ct_{sam} = Ct_{Tel_{sam}} - Ct_{Single_{sam}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{sam} - \Delta Ct_{ref}$$

$$\text{จำนวน mtDNA copy number} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$



- 5.8 เติม 8-OHdG standard 25  $\mu$ l และ assay diluent 25  $\mu$ l ใช้เป็นสารละลาย blank ลงในหลุม wells
- 5.9 เติมสารละลาย anti 8-OHdG monoclonal 25  $\mu$ l ลงทุกหลุม wells ยกเว้น blank wells ที่เติม assay diluent 25  $\mu$ l ทำการปิดหลุม wells ด้วยแผ่นฟิล์มและบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 5.10 เมื่อครบเวลาลอกแผ่นฟิล์มออก และล้างหลุม wells ด้วยสารละลาย PBST (phosphate buffer/tween 20) 300  $\mu$ l /wells จำนวน 4 รอบ
- 5.11 เติม goat anti-mouse IgG-HRP conjugate 50  $\mu$ l ลงทุกหลุม wells ยกเว้น blank wells ที่เติม assay diluent 25  $\mu$ l ปิดหลุม wells ด้วยฟิล์มและบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำ TACS-Sapphire<sup>TM</sup> ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25°C ให้ละลาย
- 5.12 เมื่อครบเวลาลอกแผ่นฟิล์มออก และล้างหลุม wells ด้วยสารละลาย PBST (phosphate buffer/tween 20) 300  $\mu$ l /wells จำนวน 4 รอบ
- 5.13 เติมสารละลายสับสเตรท TACS- Sapphire<sup>TM</sup> 50  $\mu$ l และบ่มไว้ที่มีดเป็นเวลา 15 นาที ที่ อุณหภูมิ 25°C
- 5.14 หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.2M hydrochloric acid (HCl) หรือ 5% phosphoric acid 50  $\mu$ l ลงในทุกหลุม wells และอ่านผลโดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader
- 5.15 นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณหา 8-OHdG standard ตัวอย่าง และ blank
- 5.16 หักค่าดูดกลืนแสงของ blank ในค่าดูดกลืนแสงของ 8-OHdG standard และตัวอย่าง
- 5.17 วาดกราฟโดยให้แกน X เป็น 8-OHdG standard concentration (nM) และแกน Y คือค่าดูดกลืนแสงจากตัวอย่างที่ได้
- 5.18 เส้นมาตรฐาน (standard curve) ของ 8-OHdG แทนด้วยสมการ  $y = a + bx + cx^2$   
โดย y คือค่า relative absorbance  
x คือค่า log ของ 8-OHdG concentration (nM)  
a, b, และ c คือค่าสัมประสิทธิ์ (coefficients)

## 6. ศึกษา relative telomere length และจำนวน mtDNA copy number ในเซลล์ของชิ้นเอ็น ligamentum flavum

### 6.1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ชิ้นเอ็นช่องไขสันหลัง (primary cell culture)

6.1.1 ชิ้นเอ็นช่องไขสันหลังได้มาจากผู้ป่วยเข้ารับการผ่าตัดโรคกระดูกสันหลังส่วนเอว ตีบแคบ ถูกนำมาล้างด้วยน้ำเกลือ (normal saline) และตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดเป็นชิ้นเล็กๆ

6.1.2 นำชิ้นเนื้อแปะลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (T25 flask) ให้มีระยะห่างที่เท่ากัน เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ alpha-minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM) ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS) และ 200 IU/ml penicillin/streptomycin เพื่อเลี้ยงเซลล์และชิ้นเนื้อ

6.1.3 เลี้ยงเซลล์ชิ้นเอ็นช่องไขสันหลังเจริญที่อุณหภูมิ 37°C โดยมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ซึ่งเซลล์จากชิ้นเอ็นช่องไขสันหลังที่ได้มีการเจริญเติบโตภายใน 1-2 สัปดาห์

6.1.4 เมื่อเซลล์เจริญเติบโตเต็มที่มีจำนวนเซลล์มากพอ ทำการหยิบชิ้นเนื้อออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์ ทำการดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออกและนำเซลล์ออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยเอนไซม์ทริปซินผสมกับ ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) ปริมาตร 2 ml

6.1.5 นำเข้าตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C โดยมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 5-10 นาที เมื่อครบเวลา นำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ใส่เอนไซม์ทริปซิน สังเกตผ่านกล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบให้เซลล์หลุดออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งหมด

6.1.6 เมื่อเซลล์หลุดจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ ทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งผสม 10% FBS ปริมาตรเท่ากับเอนไซม์ทริปซิน 2 ml เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน (trypsin)

6.1.7 ดูดเซลล์ปริมาตรทั้งหมดจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 ml และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน

- 6.1.8 เซลล์เมื่อถูกปั่นเหวี่ยงจะตกตะกอนข้างล่างหลอด เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปต
- 6.1.9 จากนั้นดูดเซลล์ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ ซึ่งเซลล์ที่ย้ายจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์เดิมไปยังขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ในแต่ละรอบจะเรียกว่า พาสเสจ (passage) ในที่นี้เซลล์ที่ได้จากชิ้นเนื้อที่ถูกย้ายไปยังขวดใหม่จะถูกเรียกว่า passage 0 และในการ trypsinization เซลล์ครั้งต่อไปจะกลายเป็น passage 1
- 6.1.10 ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2 วัน เพื่อให้เซลล์ได้รับอาหารในการเจริญเติบโต
- 6.1.11 ในกรณีที่เก็บเซลล์ไว้ในการศึกษา relative telomere length เมื่อเทอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลอดปั่นเหวี่ยง ทำการเติม freezing media ที่ประกอบด้วย 10% FBS และ dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 800  $\mu$ l ในหลอด cryotube เก็บในอุณหภูมิต่ำ  $-80^{\circ}\text{C}$  เพื่อสกัด DNA จากเซลล์ และนำมาศึกษา relative telomere length และจำนวน mtDNA copy number
- 6.2. การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ชั้นเอ็นซอจไซส์หลัง
- 6.2.1 นำ cryotube ที่บรรจุเซลล์ใน passage ต่างๆ ออกมาวางข้างนอกเพื่อให้น้ำแข็งที่อยู่ในหลอดละลายเท่ากับอุณหภูมิห้อง
- 6.2.2 ดูดเซลล์จาก cryotube ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 ml ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน
- 6.2.3 เซลล์เมื่อถูกปั่นเหวี่ยงจะตกตะกอนข้างล่างหลอด เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และเติม phosphate buffer saline ปริมาตร 200  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปต
- 6.2.4 ดูดเซลล์ทั้งหมดปริมาตร 200  $\mu$ l ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก เติม proteinase K 20  $\mu$ l และ lysis enhancer 2  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex
- 6.2.5 เติม buffer TB ปริมาตร 200  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $65^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10 นาที

- 6.2.6 เติม absolute ethanol ปริมาตร 200  $\mu$ l ผสมสารในหลอดทันทีให้เป็นเนื้อเดียวกัน
- 6.2.7 ดูดสารในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็กปริมาตรประมาณ 650  $\mu$ l ลงในคอลัมน์ที่ได้จัดเตรียมไว้ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 g เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ถ้ามีสารเหลืออยู่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก ให้ทำการดูดใสในคอลัมน์ให้หมด และทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง
- 6.2.8 เติม wash buffer ปริมาตร 650  $\mu$ l เพื่อทำการล้างคอลัมน์ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 g เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง และทำขั้นตอนนี้ซ้ำอีกครั้ง
- 6.2.9 นำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้เอทานอลระเหยออกจากตัวอย่างให้หมด
- 6.2.10 วางส่วนของคอลัมน์ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก เติม elution Buffer ปริมาตร 200  $\mu$ l โดยใส่ลงตรงกลางแผ่นเมมเบรนของคอลัมน์ และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
- 6.2.11 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000g เป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะ DNA และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C หรือ -20°C เพื่อนำไปศึกษา relative telomere length และจำนวน mtDNA copy number ตามหัวข้อ 3 และ 4

## 7. การศึกษากระบวนการเกิดเซลล์ชรา (cell senescence) ของเซลล์จีนเอ็นช่องไขสันหลัง

- 7.1 ทำการเลี้ยงเซลล์จากจีนเอ็นช่องไขสันหลังตามหัวข้อ 6.1 เมื่อเซลล์จาก passage 0 มีการเจริญเติบโตเต็มขวดเพาะเลี้ยงเซลล์แล้ว ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และนำเซลล์ออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยเอนไซม์ทริปซินผสมกับ EDTA ปริมาตร 2 ml
- 7.2 นำเข้าตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C โดยมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 5-10 นาที เมื่อครบเวลา นำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ใส่เอนไซม์ทริปซินมาสังเกตผ่านกล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบและช่วยให้เซลล์หลุดออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งหมด
- 7.3 เมื่อเซลล์หลุดจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ ทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม 10% FBS ปริมาตรเท่ากับเอนไซม์ทริปซิน 2 ml เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน

- 7.4 ดูดเซลล์ปริมาตรทั้งหมดจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 ml และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน
- 7.5 เซลล์เมื่อถูกปั่นเหวี่ยงจะตกตะกอนข้างล่างหลอด เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปต
- 7.6 นับจำนวนเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์เริ่มต้นเท่าๆ กันที่ ในทุกๆ ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ นับจำนวนเซลล์โดยใช้ hemocytometer เริ่มจากดูดเซลล์ 20  $\mu$ l ผสมกับสี tryphan blue 20  $\mu$ l หยอดลงในช่องของ hemocytometer เพื่อนับจำนวนเซลล์
- 7.7 เริ่มนับจำนวนเซลล์ และคำนวณหาจำนวนเซลล์ทั้งหมดโดยใช้สูตร

$$\text{จำนวนเซลล์} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้} \times \text{ค่าการเจือจาง} \times \text{ปริมาตรตั้งต้น} \times 10^4}{\text{ช่องทั้งหมดที่นับ}}$$

- 7.8 เมื่อทราบจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่อยู่ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ ทำการเจือจางเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ 1,000 เซลล์ เพื่อเป็นจำนวนเซลล์เริ่มต้นเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์
- 7.9 นำงานเพาะเลี้ยงเซลล์ใส่ในตู้บัพที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง
- 7.10 ครบเวลาล้างเซลล์ด้วย PBS และการตรึงเซลล์ด้วย 2% formaldehyde และ 0.2% glutaraldehyde เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 7.11 ล้างด้วย PBS และใส่สารละลาย SA- $\beta$ -gal staining ลงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ นำไปบัพที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
- 7.12 หลังครบเวลาแล้ว นำงานเพาะเลี้ยงเซลล์ส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อนับจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสีน้ำเงิน ในจำนวนเซลล์ทั้งหมด 300 เซลล์ นับทั้งหมดสองครั้งหาค่าเฉลี่ย คิดจำนวนร้อยละของการติดสี SA- $\beta$ -gal คำนวณโดยใช้สูตร

$$\text{ร้อยละการติดสี SA-}\beta\text{-gal} = (\text{จำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี SA-}\beta\text{-gal} / \text{จำนวนเซลล์ 300 เซลล์}) \times 100$$

- 7.13 นำค่าที่ได้มาวาดกราฟเส้นตรง แกน X แสดงถึงช่วงเวลาในการเลี้ยงเซลล์แต่ละ passage และแกน Y แสดงถึงร้อยละการติดสี SA- $\beta$ -gal เพื่อดูแนวโน้มการติดสีของเซลล์ในแต่ละ passage ของการเลี้ยงเซลล์ขึ้นเอ็นชองไขสันหลัง



## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

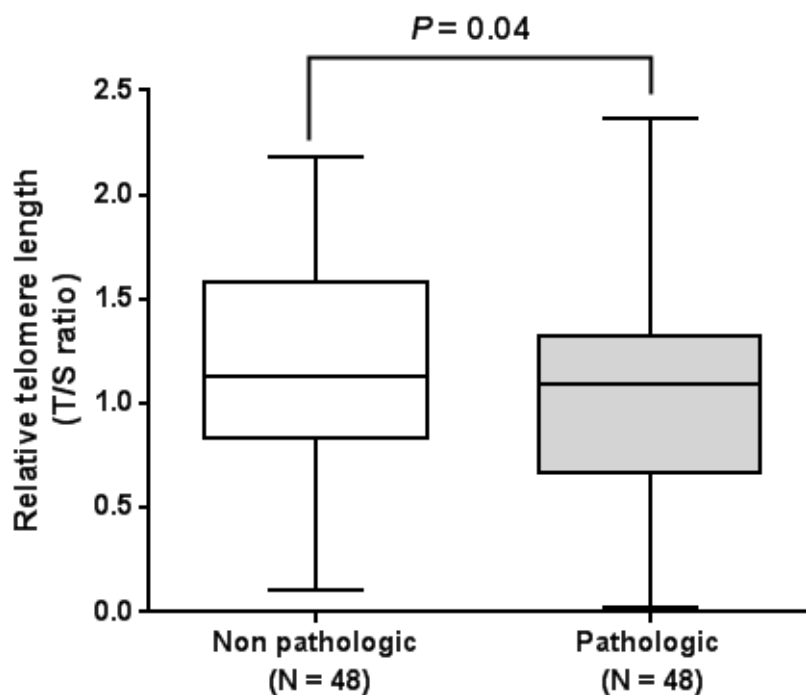
#### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### 1. ผลการเปรียบเทียบ relative telomere length จากชิ้นเอ็น ligamentum flavum โดยวิธี real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

##### 1.1 ผลเปรียบเทียบค่า relative telomere length จากชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัว

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่า relative telomere length จากชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในผู้ป่วยรายเดียวกัน โดยการทำให้ real-time PCR และมี single copy gene (36B4) ที่เป็น reference gene โดยใช้ค่า threshold cycle (Ct) ของแต่ละยีน จากวิธี real-time PCR คำนวณหา relative telomere length และ single copy gene (T/S ratio) ที่แสดงออกในแต่ละตัวอย่าง (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก)

ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบค่า relative telomere length ระหว่างชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในผู้ป่วย 48 ราย พบว่าชิ้นเอ็นระดับที่หน้าตัวมีค่า relative telomere length ต่ำกว่าชิ้นเอ็นระดับที่ไม่หน้าตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P=0.04$ ) ดังแสดงในรูปที่ 1 และ ตารางที่ 1 นอกจากนี้พบว่าค่ามัธยฐานหรือเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 50 ของค่า relative telomere length จากกลุ่มชิ้นเอ็นระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวมีค่าเท่ากับ 1.11 และ 1.17 ตามลำดับ (ดังแสดงในเส้นสีดำตรงกลางภายในกราฟ box plot รูปที่ 4) ขอบล่างของ box plot (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25) ของชิ้นเอ็นทั้งสองกลุ่มมีค่าเท่ากับ 0.81 และ 0.90 ตามลำดับ ขอบบนของ box plot (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 75) มีค่าเท่ากับ 1.36 และ 1.65 ตามลำดับ (ตารางที่ 8)



รูปที่ 4 แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบค่า relative telomere length (T/S ratio) ระหว่างกลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัว

ตารางที่ 8 ค่า relative telomere length (T/S ratio) ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัว

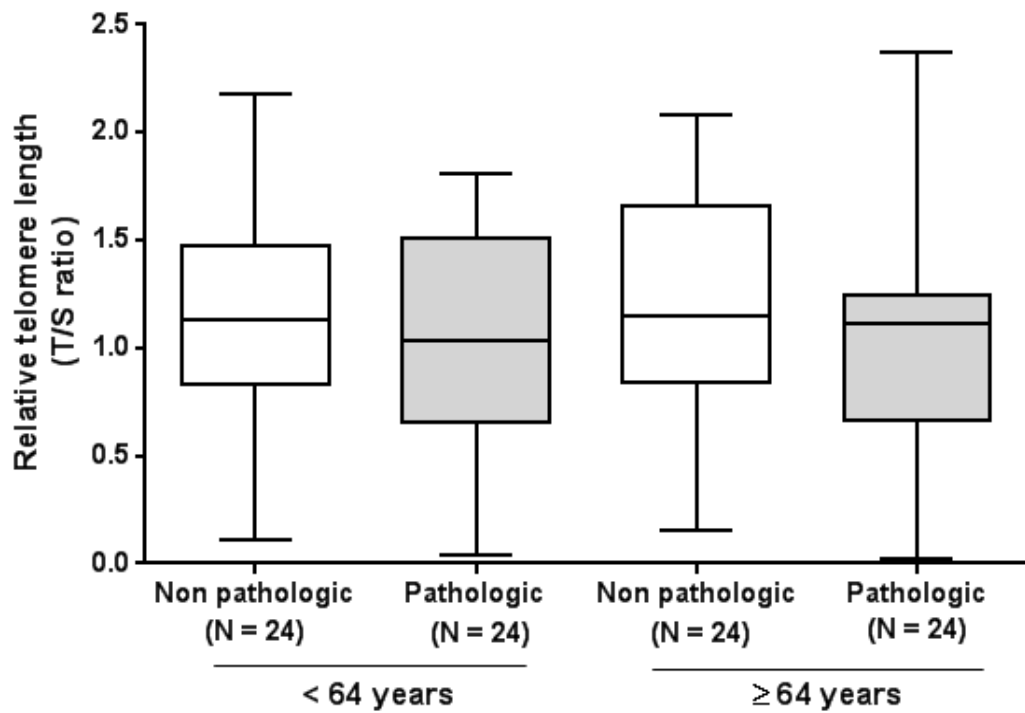
	Median	Percentile 25	Percentile 75	Mean
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัว (n=48)	1.09	0.81	1.36	1.09
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หน้าตัว (n=48)	1.17	0.90	1.65	1.21
<i>p</i> *				0.04

\* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการทดสอบโดยใช้ Paired t-test,  $P < 0.05$  ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

## 1.2 ผลเปรียบเทียบค่า relative telomere length ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัว และอายุของผู้ป่วย

จากการวิเคราะห์อายุของผู้ป่วย 48 ราย พบว่ามีอายุเฉลี่ย  $63.27 \pm 9.7$  ปี เมื่อนำค่า relative telomere length ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวแบ่งกลุ่มตามอายุ จากค่า median อายุของผู้ป่วย ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มอายุได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วยที่อายุน้อยกว่า 64 ปี จำนวน 24 ราย และกลุ่มผู้ป่วยที่อายุเท่ากับหรือมากกว่า 64 ปี จำนวน 24 ราย พบว่าชั้นเอ็นระดับที่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มอายุ มีแนวโน้มค่า relative telomere length สั้นกว่ากลุ่มชั้นเอ็นที่ไม่หน้าตัว แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 5 และตารางที่ 9

นอกจากนี้พบว่าค่ามัธยฐานหรือเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 50 ของค่า relative telomere length (T/S ratio) ของกลุ่มชั้นเอ็นระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุน้อยกว่า 64 ปี มีค่าเท่ากับ 1.03 และ 1.13 ตามลำดับ และในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุเท่ากับหรือมากกว่า 64 ปี มีค่าเท่ากับ 1.11 และ 1.15 ตามลำดับ (ดังแสดงในเส้นสีดำตรงกลางภายในกราฟ box plot รูปที่ 5) ขอบล่างของ box plot (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25) ของกลุ่มชั้นเอ็นระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุน้อยกว่า 64 ปี มีค่าเท่ากับ 0.65 และ 0.84 ตามลำดับ และในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุมากกว่า 64 ปี มีค่าเท่ากับ 0.67 และ 0.84 ตามลำดับ ขอบบนของ box plot (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 75) ของกลุ่มชั้นเอ็นระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุน้อยกว่า 64 ปี มีค่าเท่ากับ 1.51 และ 1.47 ตามลำดับ และในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 64 ปี มีค่าเท่ากับ 1.02 และ 1.18 (ตารางที่ 9)



รูปที่ 5 แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงค่า relative telomere length (T/S ratio) ระหว่างกลุ่ม  
 ชั้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัวในกลุ่มผู้ป่วยอายุน้อยกว่า 64  
 ปี และกลุ่มผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 64 ปี

**ตารางที่ 9** ค่า relative telomere length (T/S ratio) ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระหว่าง  
กลุ่มระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยอายุน้อยกว่า 64 ปี และกลุ่มผู้ป่วยที่อายุ  
เท่ากับหรือมากกว่า 64 ปี

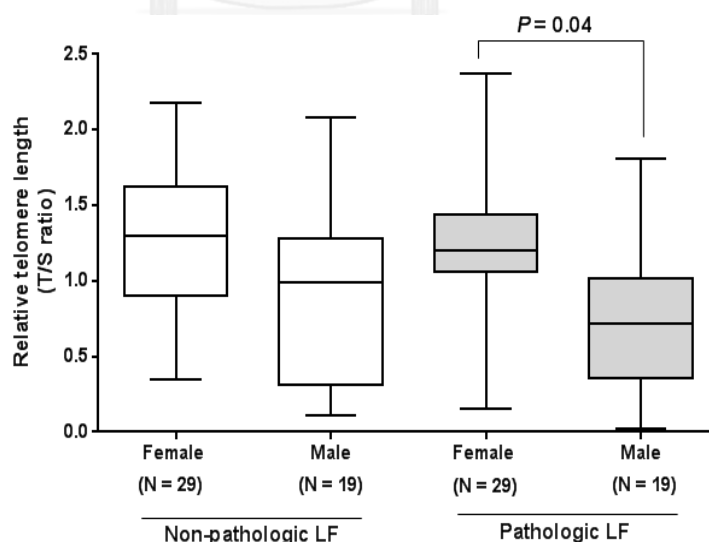
	Median	Percentile 25	Percentile 75	Mean
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัว อายุน้อยกว่า 64 ปี (n=23)	1.03	0.65	1.51	1.01
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หน้าตัว อายุน้อยกว่า 64 ปี (n=23)	1.13	0.84	1.47	1.12
<i>P</i>				0.13
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัว อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 64 ปี (n=25)	1.11	0.67	1.25	1.02
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หน้าตัว อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 64 ปี (n=25)	1.15	0.84	1.66	1.18
<i>P</i>				0.17

ทดสอบสถิติโดยใช้ Paired *t*-test และ Wilcoxon sign-rank test  
*P*<0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

### 1.3 ผลเปรียบเทียบค่า relative telomere length ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวระหว่างเพศชายและหญิง

เมื่อนำค่า relative telomere length ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวแบ่งกลุ่มระหว่างเพศชายและหญิง โดยมีเพศชาย 19 ราย และเพศหญิง 29 ราย พบว่าชั้นเอ็นระดับที่ไม่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยเพศชายมีค่า relative telomere length สั้นกว่ากลุ่มผู้ป่วยเพศหญิงแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และพบว่าค่า relative telomere length ในชั้นเอ็นระดับที่หน้าตัวของกลุ่มผู้ป่วยเพศชายสั้นกว่ากลุ่มผู้ป่วยเพศหญิง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P=0.04$ ) ดังแสดงในรูปที่ 6 และตารางที่ 10

นอกจากนี้พบว่าค่ามัธยฐานหรือเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 50 ของค่า relative telomere length (T/S ratio) ของกลุ่มชั้นเอ็นระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยเพศชายและหญิงมีค่าเท่ากับ 0.82, 1.20, 0.99 และ 1.30 ตามลำดับ (ดังแสดงในเส้นสีดำตรงกลางภายในกราฟ box plot รูปที่ 6) ขอบล่างของ box plot (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25) ของชั้นเอ็นทั้งสองกลุ่มมีค่าเท่ากับ 0.38, 1.06, 0.31 และ 0.91 ตามลำดับ ขอบบนของ box plot (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 75) ของทั้งสองกลุ่มมีค่าเท่ากับ 1.12, 1.44, 1.63 และ 1.66 ตามลำดับ และสำหรับค่า outlier ที่สูงกว่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 95 พบในกลุ่มชั้นเอ็นที่มีการหน้าตัวของกลุ่มผู้ป่วยเพศหญิงมีค่าเท่ากับ 0.15 และ 2.15 ตามลำดับ (ตารางที่ 10)



รูปที่ 6 แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบค่า relative telomere length (T/S ratio) ระหว่างกลุ่มชั้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มเพศชายและหญิง

ตารางที่ 10 ค่า relative telomere length ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มเพศชายและเพศหญิง

	Median	Percentile 25	Percentile 75	Mean
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัว เพศชาย (n=19)	0.82	0.38	1.12	0.82
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัว เพศหญิง(n=29)	1.20	1.06	1.44	1.19
<i>p</i> *				0.04
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หน้าตัว เพศชาย (n=19)	0.99	0.31	1.63	1.05
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หน้าตัว เพศหญิง (n=29)	1.30	0.91	1.66	1.27
<i>P</i>				0.25

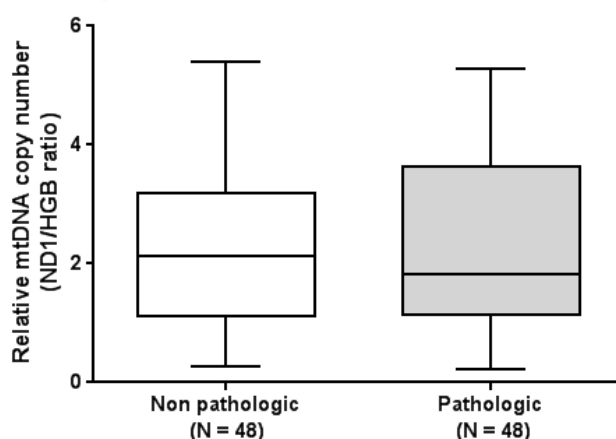
\*มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการทดสอบโดยใช้ Paired *t*-test, Wilcoxon sign-rank test,  $P < 0.05$  ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

## 2. ผลการเปรียบเทียบ จำนวน mtDNA copy number ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum โดยวิธี real-time polymerase chain reaction

### 2.1 ผลเปรียบเทียบจำนวน mtDNA copy number ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัว

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบจำนวน mtDNA copy number จากชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในผู้ป่วยรายเดียวกัน โดยการศึกษาผล real-time PCR ของจำนวน mtDNA copy number (*ND1*) และ human globin gene (*HGB*) เป็น internal control gene โดยใช้ค่า threshold cycle (Ct) จากวิธี real-time PCR

ซึ่งการเปรียบเทียบจำนวน mtDNA copy number ในแต่ละตัวอย่าง ระหว่างชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในผู้ป่วย 48 ราย พบว่าชิ้นเอ็นบริเวณที่หน้าตัวมีจำนวน mtDNA copy number ต่ำกว่าชิ้นเอ็นที่หน้าตัว แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P=0.41$ ) ดังแสดงในรูปที่ 7 และตารางที่ 11 นอกจากนี้พบว่าค่ามัธยฐานหรือเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 50 ของจำนวน mtDNA copy number จากกลุ่มชิ้นเอ็นที่หน้าตัวและไม่หน้าตัว มีค่าเท่ากับ 1.70 และ 1.77 ตามลำดับ (ดังแสดงในเส้นสีดำตรงกลางภายในกราฟ box plot รูปที่ 7) ขอบล่างของ box plot (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25) ของชิ้นเอ็นทั้งสองกลุ่มมีค่าเท่ากับ 1.09 และ 1.09 ตามลำดับ ขอบบนของ box plot (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 75) มีค่าเท่ากับ 3.39 และ 3.07 ตามลำดับ (ตารางที่ 11)



รูปที่ 7 แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบจำนวน mtDNA copy number (ND1/HGB ratio) ระหว่างกลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัว



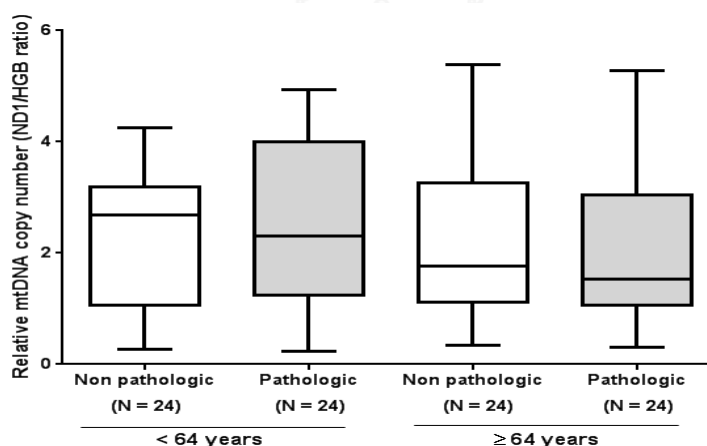
**ตารางที่ 11** จำนวน mtDNA copy number (ND1/HGB ratio) ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัว

	Median	Percentile 25	Percentile 75	Mean
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัว (n=48)	1.70	1.09	3.39	2.21
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หน้าตัว (n=48)	1.77	1.09	3.07	2.11
<i>P</i>				0.41
ทดสอบสถิติโดยใช้ Wilcoxon sign-rank test, <i>P</i> <0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ				

## 2.2 ผลเปรียบเทียบจำนวน mtDNA copy number ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวและอายุของผู้ป่วย

เมื่อนำจำนวน mtDNA copy number ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวแบ่งกลุ่มตามอายุ พบว่าชิ้นเอ็นบริเวณที่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า และผู้ป่วยอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 64 ปี มีจำนวน mtDNA copy number น้อยกว่ากลุ่มชิ้นเอ็นบริเวณที่ไม่หน้าตัวในผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 8 และตารางที่ 12

นอกจากนี้พบว่าค่ามัธยฐานหรือเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 50 ของจำนวน mtDNA copy number (ND1/HGB ratio) ของกลุ่มชิ้นเอ็นระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุน้อยกว่า 64 ปี มีค่าเท่ากับ 2.23 และ 2.68 ตามลำดับ และในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 64 ปี มีค่าเท่ากับ 1.42 และ 1.51 ตามลำดับ (ดังแสดงในเส้นสีดำตรงกลางภายในกราฟ box plot รูปที่ 8) ขอบล่างของ box plot (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25) ของกลุ่มชิ้นเอ็นบริเวณที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุน้อยกว่า 64 ปี มีค่าเท่ากับ 1.19 และ 1.04 ตามลำดับ และในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 64 ปี มีค่าเท่ากับ 1.06 และ 1.10 ตามลำดับ ขอบบนของ box plot (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 75) ของกลุ่มชิ้นเอ็นระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุน้อยกว่า 64 ปี มีค่าเท่ากับ 3.81 และ 3.13 ตามลำดับ และในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 64 ปี มีค่าเท่ากับ 3.05 และ 2.86 (ตารางที่ 12)



**รูปที่ 8** แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบจำนวน mtDNA copy number (ND1/HGB ratio) ระหว่างกลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยอายุน้อยกว่า 64 ปี และกลุ่มผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 64 ปี

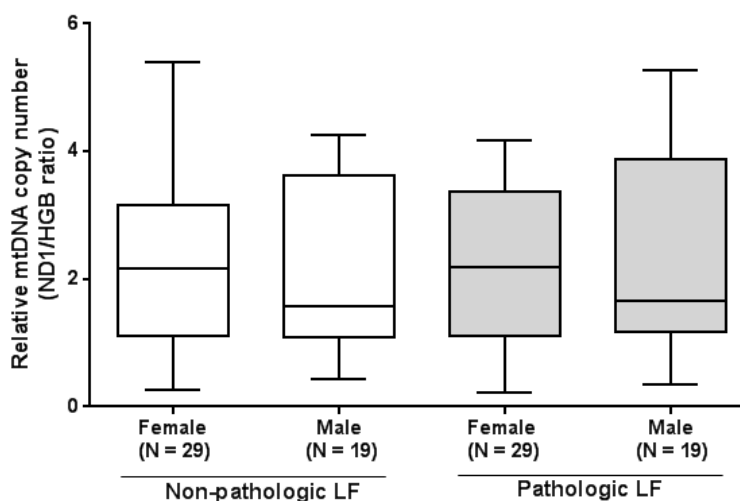
**ตารางที่ 12** จำนวน mtDNA copy number (ND1/HGB ratio) ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัว ในกลุ่มผู้ป่วยอายุน้อยกว่า 64 ปี และกลุ่มผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 64 ปี

	Median	Percentile 25	Percentile 75	Mean
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัว อายุน้อยกว่า 64 ปี (n=23)	2.23	1.19	3.81	2.42
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หนาตัว อายุน้อยกว่า 64 ปี (n=23)	2.68	1.04	3.13	2.18
<i>P</i>				0.08
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัว อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 64 ปี (n=25)	1.42	1.06	3.05	2.01
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หนาตัว อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 64 ปี (n=25)	1.51	1.10	2.86	2.05
<i>P</i>				0.57
ทดสอบสถิติโดยใช้ Paired <i>t</i> -test, Wilcoxon sign-rank test, <i>P</i> <0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ				

### 2.3 ผลเปรียบเทียบจำนวน mtDNA copy number ในชั้นเอ็น ligamentum flavum บริเวณที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวระหว่างเพศชายและหญิง

เมื่อนำค่าจำนวน mtDNA copy number ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวแบ่งกลุ่มระหว่างเพศชายและเพศหญิง พบว่าชั้นเอ็นทั้งในระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยเพศชายมีแนวโน้มของจำนวน mtDNA copy number ต่ำกว่ากลุ่มผู้ป่วยเพศหญิง แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 9 และตารางที่ 13

นอกจากนี้พบว่าค่ามัธยฐานหรือเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 50 ของจำนวน mtDNA copy number (ND1/HGB ratio) ของกลุ่มชั้นเอ็นระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยเพศชายและเพศหญิงมีค่าเท่ากับ 1.65, 2.19, 1.56 และ 2.10 ตามลำดับ (ดังแสดงในเส้นสีดำตรงกลางภายในกราฟ box plot รูปที่ 9) ขอบล่างของ box plot (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25) ของชั้นเอ็นทั้งสองกลุ่มมีค่าเท่ากับ 1.06, 1.12, 1.04 และ 1.12 ตามลำดับ และขอบบนของ box plot (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 75) ของกลุ่มชั้นเอ็นระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยที่เพศชายและเพศหญิงมีค่าเท่ากับ 3.71, 3.38, 3.13 และ 3.05 ตามลำดับ (ตารางที่ 13)



รูปที่ 9 แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบจำนวน mtDNA copy number (ND1/HGB ratio) ระหว่างกลุ่มชั้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มเพศชายและเพศหญิง

**ตารางที่ 13** จำนวน mtDNA copy number (ND1/HGB ratio) ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัวในกลุ่มเพศชายและเพศหญิง

	Median	Percentile 25	Percentile 75	Mean
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัว เพศชาย (n=19)	1.65	1.06	3.71	2.19
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัวเพศหญิง(n=29)	2.19	1.12	3.38	2.22
<i>P</i>				0.75
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หนาตัว เพศชาย (n=19)	1.56	1.04	3.13	2.03
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หนาตัว เพศหญิง (n=29)	2.10	1.12	3.05	2.17
<i>P</i>				0.92
ทดสอบสถิติโดยใช้ Wilcoxon sign-rank test, <i>P</i> <0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ				

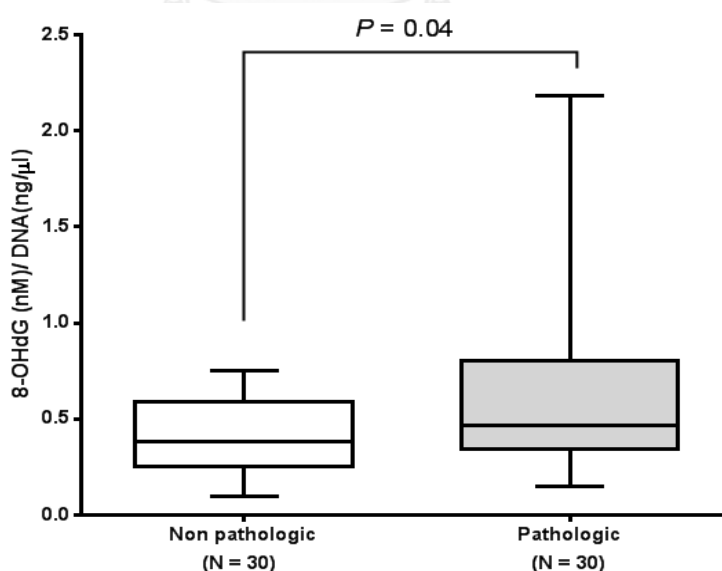
### 3. ผลการเปรียบเทียบระดับ 8-OHdG ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum โดยวิธี enzyme immunosorbent assay (ELISA)

#### 3.1 ผลเปรียบเทียบระดับ 8-OHdG ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัว ในผู้ป่วยรายเดียวกัน

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบระดับ 8-OHdG ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในผู้ป่วยรายเดียวกัน โดยศึกษาผลจากเทคนิค ELISA ที่แสดงออกในแต่ละตัวอย่าง โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ 8-OHdG (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก)

ซึ่งระดับ 8-OHdG ในแต่ละตัวอย่าง ระหว่างชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระหว่างที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในผู้ป่วย 30 ราย พบว่าชิ้นเอ็นระดับที่หน้าตัวมีระดับ 8-OHdG สูงกว่าชิ้นเอ็นระดับที่ไม่หน้าตัวและมีความแตกต่างทางสถิติ ( $P=0.04$ ) ดังแสดงในรูปที่ 10 และตารางที่ 14

นอกจากนี้พบว่าค่ามัธยฐานหรือเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 50 ของระดับ 8-OHdG จากกลุ่มชิ้นเอ็นระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัว มีค่าเท่ากับ 0.46 และ 0.38 ตามลำดับ (ดังแสดงในเส้นสีดำตรงกลางภายในกราฟ box plot รูปที่ 10) ขอบล่างของ box plot (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25) ของชิ้นเอ็นทั้งสองกลุ่มมีค่าเท่ากับ 0.34 และ ตามลำดับ 0.26 ขอบบนของ box plot (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 75) มีค่าเท่ากับ 0.81 และ 0.59 ตามลำดับ (ตารางที่ 14)



รูปที่ 10 แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบระดับ 8-OHdG ระหว่างกลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัว

**ตารางที่ 14** ระดับ 8-OHdG ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัว

	Median	Percentile 25	Percentile 75	Mean
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัว (n=30)	0.46	0.34	0.81	0.64
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หน้าตัว (n=30)	0.38	0.25	0.59	0.42
<i>p</i> *				0.04

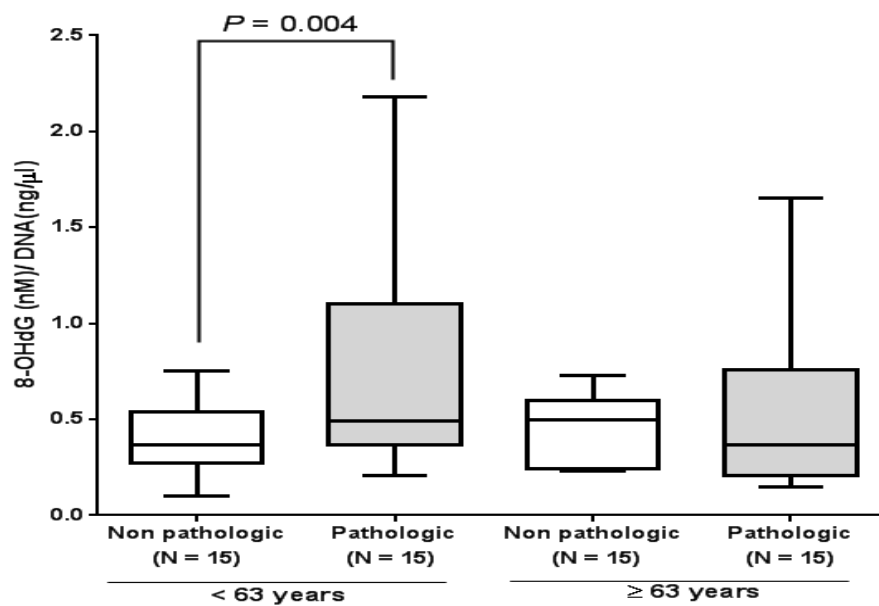
\* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการทดสอบสถิติโดยใช้ Wilcoxon sign-rank test,  $P < 0.05$  ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

### 3.2 ผลเปรียบเทียบระดับ 8-OHdG ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวและอายุของผู้ป่วย

จากการวิเคราะห์อายุของผู้ป่วย 30 ราย พบว่ามีอายุเฉลี่ย  $63.70 \pm 9.4$  ปี เมื่อนำค่าของระดับ 8-OHdG ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวแบ่งกลุ่มตามอายุสามารถแบ่งกลุ่มอายุได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วยที่อายุน้อยกว่า 63 ปี และกลุ่มผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 63 ปี กลุ่มละจำนวน 15 ราย พบว่าชิ้นเอ็นระดับที่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 63 ปี มีระดับ 8-OHdG สูงกว่ากลุ่มชิ้นเอ็นระดับที่ไม่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุน้อยกว่า 63 ปี ดังแสดงในรูปที่ 11 และตารางที่ 15

นอกจากนี้พบว่าค่ามัธยฐานหรือเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 50 ของระดับ 8-OHdG ของกลุ่มชิ้นเอ็นระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุน้อยกว่า 63 ปี มีค่าเท่ากับ 0.49 และ 0.37 ตามลำดับ และในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 63 ปี มีค่าเท่ากับ 0.37 และ 0.5 ตามลำดับ (ดังแสดงในเส้นสีดำตรงกลางภายในกราฟ box plot รูปที่ 11) ขอบล่างของ box plot (เปอร์เซ็นต์

ไทม์ที่ 25) ของกลุ่มชั้นเอ็นระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัวในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุน้อยกว่า 63 ปี มีค่าเท่ากับ 0.37 และ 0.27 ตามลำดับ และในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 63 ปี มีค่าเท่ากับ 0.21 และ 0.24 ตามลำดับ ขอบบนของ box plot (เปอร์เซ็นต์ไทม์ที่ 75) ของกลุ่มชั้นเอ็นระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัวในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุน้อยกว่า 63 ปี มีค่าเท่ากับ 1.1 และ 0.54 ตามลำดับ และในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 63 ปี มีค่าเท่ากับ 0.76 และ 0.6 (ตารางที่ 15)



รูปที่ 11 แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบระดับ 8-OHdG ระหว่างกลุ่มชั้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัวในกลุ่มผู้ป่วยอายุน้อยกว่า 63 ปี และกลุ่มผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 63 ปี



**ตารางที่ 15** ระดับ 8-OHdG ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยอายุน้อยกว่า 63 ปี และกลุ่มผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 63 ปี

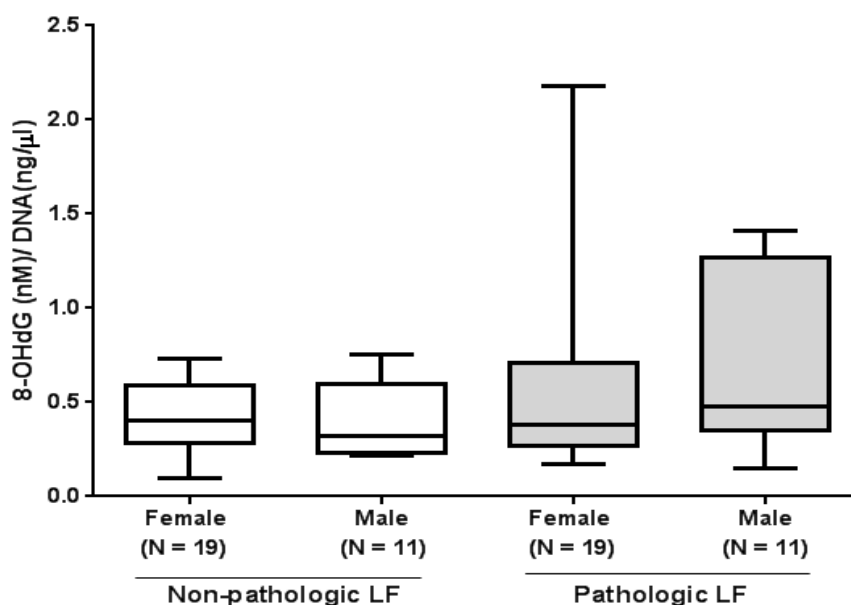
	Median	Percentile 25	Percentile 75	Mean
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัว อายุน้อยกว่า 63 ปี (n=15)	0.49	0.37	1.1	0.72
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หน้าตัว อายุน้อยกว่า 63 ปี (n=15)	0.37	0.27	0.54	0.39
<i>p</i> *				0.004
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัว อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 63 ปี (n=15)	0.37	0.21	0.76	0.55
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หน้าตัว อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 63 ปี (n=15)	0.50	0.24	0.60	0.46
<i>P</i>				>0.99

\* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการทดสอบโดยใช้ Wilcoxon sign-rank test,  $P < 0.05$  ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

### 3.3 ผลเปรียบเทียบระดับ 8-OHdG ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัว ระหว่างเพศชายและหญิง

เมื่อนำระดับ 8-OHdG ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัว แบ่งกลุ่มระหว่างเพศชายและเพศหญิง พบว่าชิ้นเอ็นระดับที่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยเพศชายมีแนวโน้มของระดับ 8-OHdG สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยเพศหญิง แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 12 และตารางที่ 16

นอกจากนี้พบว่าค่ามัธยฐานหรือเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 50 ของระดับ 8-OHdG ของกลุ่มชิ้นเอ็นระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยเพศชายและเพศหญิงมีค่าเท่ากับ 0.48, 0.38, 0.32 และ 0.40 ตามลำดับ (ดังแสดงในเส้นสีดำตรงกลางภายในกราฟ box plot รูปที่ 12) ขอบล่างของ box plot (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25) ของชิ้นเอ็นทั้งสองกลุ่มมีค่าเท่ากับ 0.35, 0.27, 0.23 และ 0.28 ตามลำดับ และขอบบนของ box plot (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 75) ของกลุ่มชิ้นเอ็นระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยที่เพศชายและเพศหญิงมีค่าเท่ากับ 1.27, 0.71, 0.60 และ 0.59 ตามลำดับ (ตารางที่ 16)



รูปที่ 12 แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบระดับ 8-OHdG ระหว่างกลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มเพศชายและเพศหญิง

ตารางที่ 16 ระดับ 8-OHdG ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในกลุ่มเพศชายและเพศหญิง

	Median	Percentile 25	Percentile 75	Mean
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัว เพศชาย (n=11)	0.48	0.35	1.27	0.68
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวเพศหญิง(n=19)	0.38	0.27	0.71	0.61
<i>P</i>				0.70
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หน้าตัว เพศชาย (n=11)	0.32	0.23	0.60	0.40
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หน้าตัว เพศหญิง (n=19)	0.40	0.28	0.59	0.44
<i>P</i>				0.52

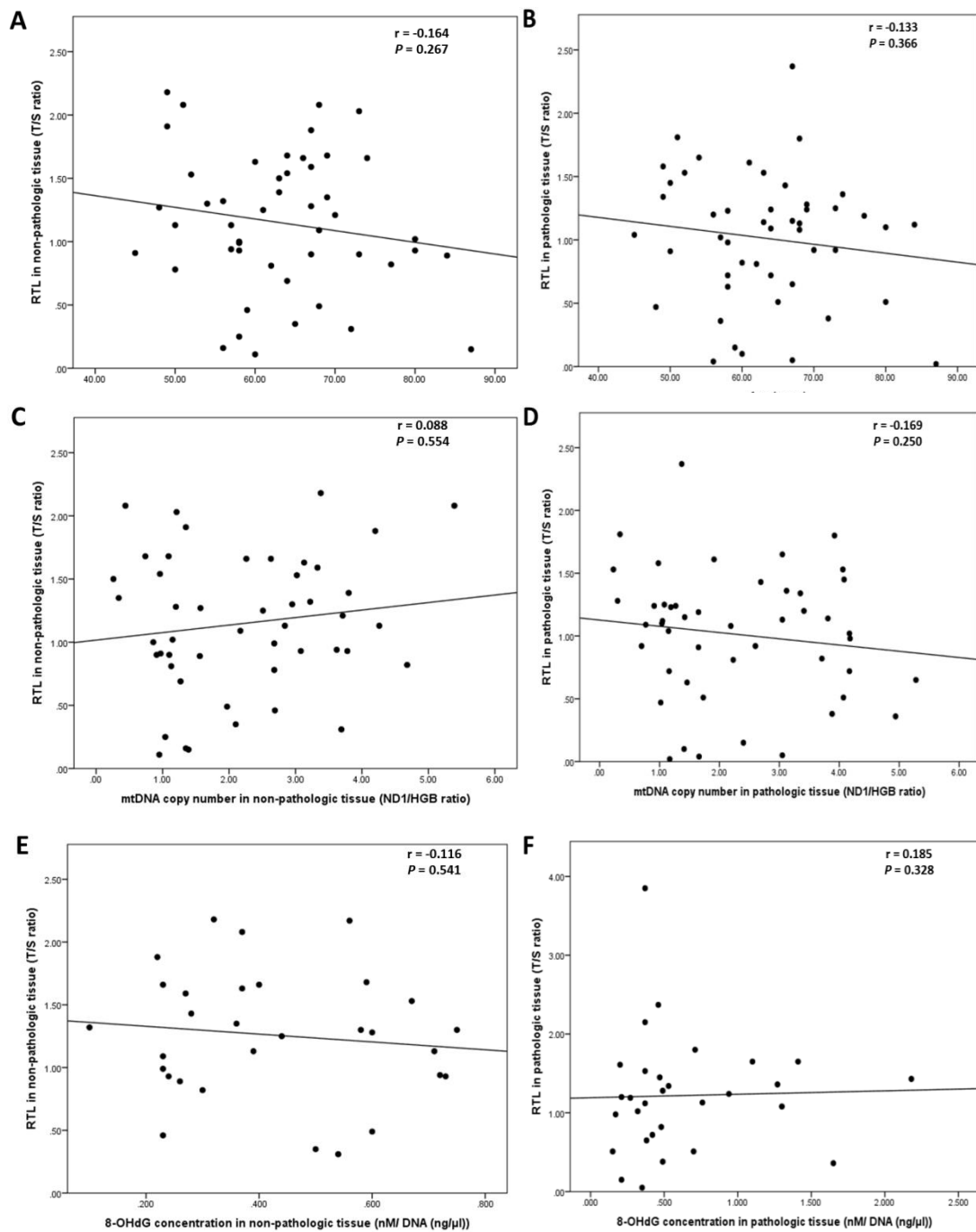
ทดสอบสถิติโดยใช้ Wilcoxon sign-rank test,  
 $P < 0.05$  ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

#### 4. ความสัมพันธ์ระหว่าง relative telomere length ในชั้นเอ็น ligamentum flavum กับ อายุผู้ป่วย จำนวน mtDNA copy number และระดับ 8-OHdG

จากผลการศึกษา relative telomere length ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ หนาตัวและไม่หนาตัวจากผู้ป่วยรายเดียวกัน โดยการวัดค่าจากการทำ real-time PCR และนำมา คำนวณหาความสัมพันธ์กับอายุผู้ป่วย จำนวน mtDNA copy number และระดับ 8-OHdG เพื่อ ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า relative telomere length กับอายุผู้ป่วย จำนวน mtDNA copy number และระดับ 8-OHdG

ซึ่งค่า  $r$  จากการคำนวณสามารถแปลผลได้ดังนี้ ค่า  $r$  น้อยกว่า 0.2 แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์ กัน ค่า  $r$  ระหว่าง 0.2-0.5 แสดงถึงความสัมพันธ์กันเล็กน้อย ค่า  $r$  อยู่ระหว่าง 0.5-0.8 แสดงว่ามี ความสัมพันธ์ปานกลาง และค่า  $r$  ระหว่าง 0.8-1.0 แสดงว่ามีความสัมพันธ์อย่างมาก ซึ่งค่า สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS 22.0 โดยการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ สหสัมพันธ์ (Pearson's correlation coefficient และ Spearman correlation หรือ  $r$ )

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง relative telomere length ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัวกับอายุของผู้ป่วย และระดับ 8-OHdG ใช้สถิติ Pearson correlation และจำนวน mtDNA copy number ใช้สถิติ Spearman correlation (ในข้อมูลที่มีการกระจายตัวไม่ปกติ) พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $r$ ) ระหว่าง relative telomere length ของชั้นเอ็นระดับที่ไม่หนาตัวและหนาตัวกับอายุของผู้ป่วย มีค่าเท่ากับ -0.164 และ -0.133 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 13A และ 1-B ค่า  $r$  ระหว่าง relative telomere length ของชั้นเอ็น ระดับที่ไม่หนาตัวและหนาตัวกับจำนวน mtDNA copy number มีค่าเท่ากับ 0.088 และ -0.169 ดัง แสดงในรูป 13C และ 13D รวมถึงค่า  $r$  ระหว่าง relative telomere length ของชั้นเอ็นระดับที่ไม่ หนาตัวและหนาตัวกับปริมาณ 8-OHdG มีค่าเท่ากับ -0.116 และ 0.185 ดังแสดงในรูป 13E และ 13F แสดงให้เห็นถึง relative telomere length ของชั้นเอ็นระดับที่ไม่หนาตัวและหนาตัวไม่มี ความสัมพันธ์กับอายุผู้ป่วย จำนวน mtDNA copy number และระดับ 8-OHdG เนื่องจากค่า  $r$  น้อยกว่า 0.2

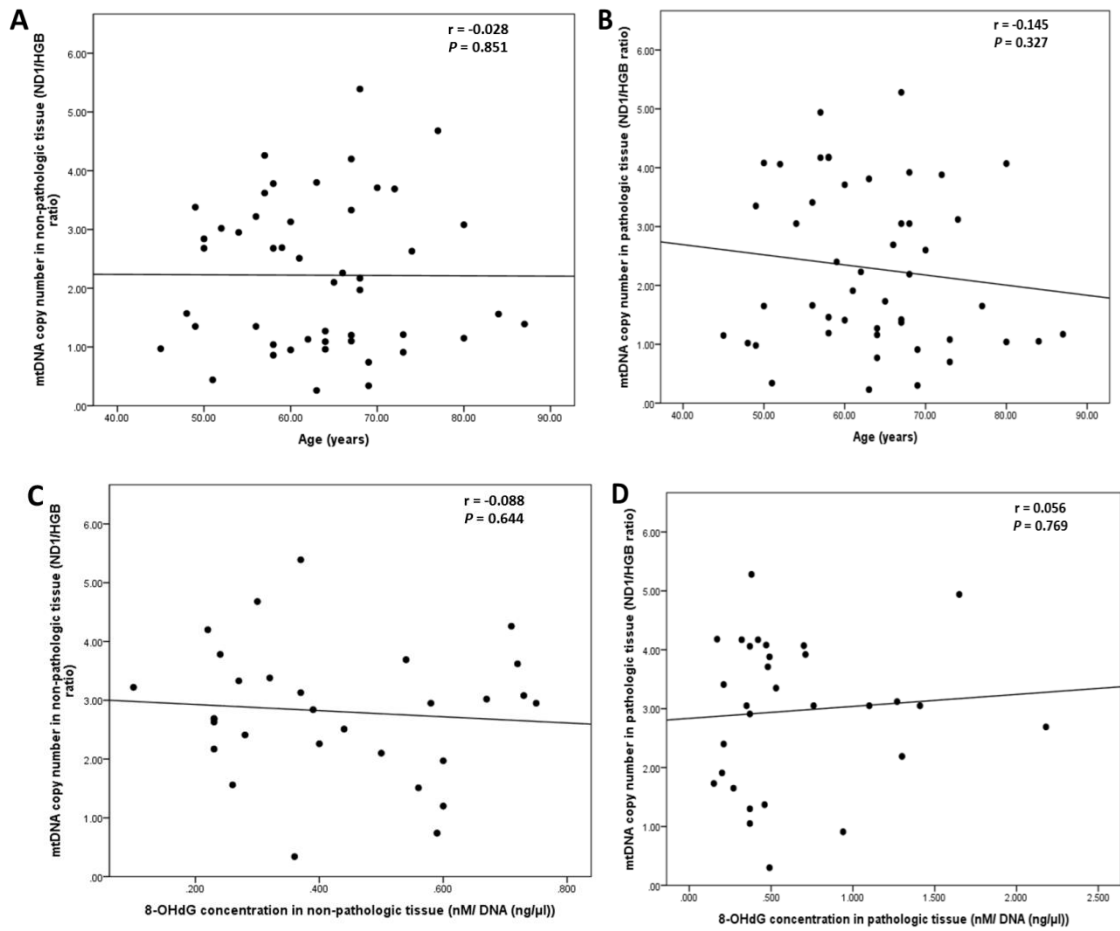


รูปที่ 13 กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง relative telomere length กับอายุผู้ป่วย (A และ B) จำนวน mtDNA copy number (C และ D) และระดับ 8-OHdG (E และ F) ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หนาตัวและหนาตัว

## 5. ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน mtDNA copy number ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum กับอายุผู้ป่วย และระดับ 8-OHdG

ผลวิเคราะห์จำนวน mtDNA copy number โดยเทคนิค real-time PCR ของแต่ละกลุ่มของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัวเปรียบเทียบในผู้ป่วยรายเดียวกัน ซึ่งจำนวน mtDNA copy number ในแต่ละกลุ่มนำมาศึกษาความสัมพันธ์กับอายุของผู้ป่วย และระดับ 8-OHdG โดยดูจากค่า  $r$

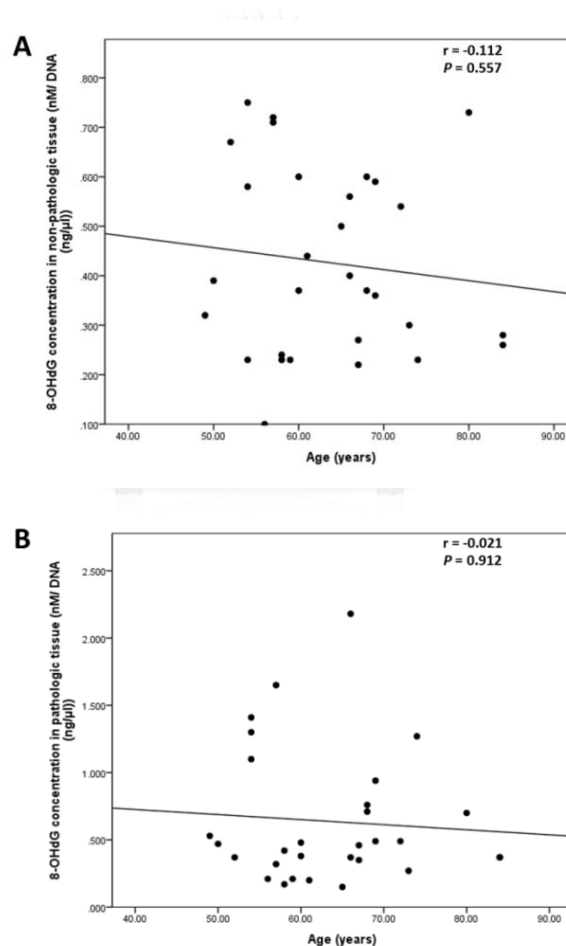
ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน mtDNA copy number ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัวกับอายุของผู้ป่วย และระดับ 8-OHdG โดยใช้สถิติ Spearman correlation (ในข้อมูลที่มีการกระจายตัวไม่ปกติ) พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $r$ ) ระหว่างจำนวน mtDNA copy number ของชิ้นเอ็นระดับที่ไม่หนาตัวและหนาตัวกับอายุของผู้ป่วย มีค่าเท่ากับ -0.028 และ -0.145 ตามลำดับ ดังแสดงในรูป 14A และ 14B นอกจากนี้ค่า  $r$  ระหว่างจำนวน mtDNA copy number ของชิ้นเอ็นระดับที่ไม่หนาตัวและหนาตัวกับระดับ 8-OHdG มีค่าเท่ากับ -0.088 และ 0.056 ดังแสดงในรูป 14C และ 14D แสดงให้เห็นถึงจำนวน mtDNA copy number ของชิ้นเอ็นระดับที่ไม่หนาตัวและหนาตัวไม่มีความสัมพันธ์กับอายุผู้ป่วย และระดับ 8-OHdG เนื่องจากค่า  $r$  น้อยกว่า 0.2



รูปที่ 14 กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน mtDNA copy number กับอายุผู้ป่วย (A และ B) และระดับ 8-OHdG (C และ D) ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หนาตัวและหนาตัว

## 6. ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ 8-OHdG ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum กับอายุผู้ป่วย

ผลวิเคราะห์ปริมาณ 8-OHdG โดยเทคนิค ELISA ในแต่ละกลุ่มของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวเปรียบเทียบในผู้ป่วยรายเดียวกัน โดยแต่ละกลุ่มนำมาศึกษาความสัมพันธ์กับอายุของผู้ป่วย โดยดูจากค่า  $r$  โดยใช้สถิติ Pearson correlation พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $r$ ) ระหว่างระดับ 8-OHdG ในชิ้นเอ็นระดับที่ไม่หน้าตัวและหน้าตัวกับอายุของผู้ป่วย มีค่าเท่ากับ  $-0.112$  และ  $-0.021$  ตามลำดับ ดังแสดงในรูป 15A และ 15B แสดงให้เห็นถึงระดับ 8-OHdG ของชิ้นเอ็นระดับที่ไม่หน้าตัวและหน้าตัวไม่มีความสัมพันธ์กับอายุผู้ป่วย เนื่องจากค่า  $r$  น้อยกว่า 0.2



รูปที่ 15 กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ 8-OHdG กับอายุผู้ป่วย (A และ B) ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum บริเวณที่ไม่หน้าตัวและหน้าตัว (A และ B)



## 7. ผลการแยกเซลล์ไฟโบบลาสจากชิ้นเอ็น ligamentum flavum ในผู้ป่วยโรคโพรงสันหลังส่วนเอวตีบแคบ

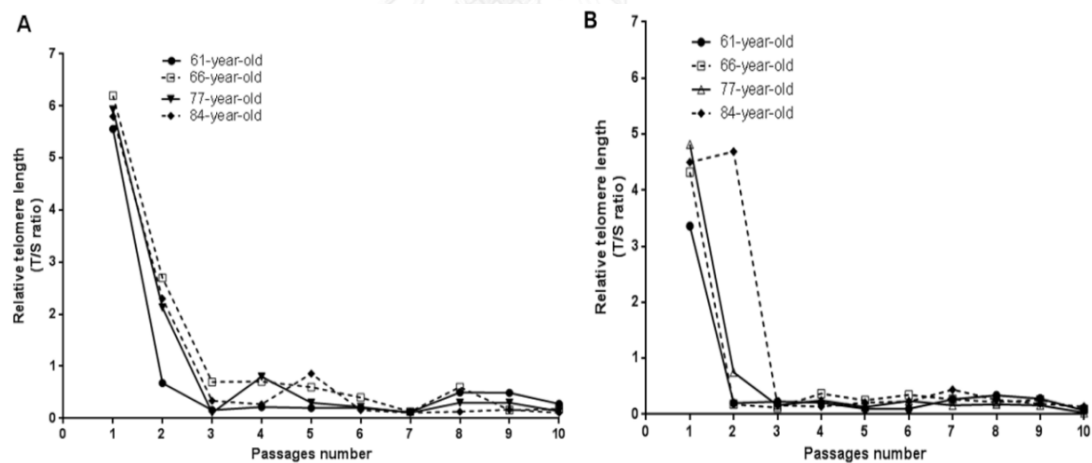
เซลล์ไฟโบบลาส (fibroblasts) ในการศึกษานี้ได้จากการแยกเซลล์จากชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวโดยตรงจากจำนวนผู้ป่วย 4 รายที่มีช่วงอายุแตกต่างกัน ได้แก่ อายุ 61, 67, 77 และ 84 ปี โดยเซลล์ไฟโบบลาสจากชิ้นเอ็นที่ได้แยกเซลล์จากชิ้นเอ็นโดยตรงนั้น ใช้เวลาในการเจริญเติบโตประมาณ 7-10 วัน ซึ่งเซลล์ที่ได้จะมีรูปร่างเรียวยาว (spindle-shaped) และมีการเกาะของเซลล์กับภาชนะที่ใช้เลี้ยง สามารถมองเห็นเซลล์ที่แยกออกจากชิ้นเอ็นได้จากบริเวณโดยรอบของชิ้นเอ็น (รูปที่ 16) ซึ่งเซลล์ไฟโบบลาสที่แยกได้จากชิ้นเอ็นโดยตรงเรียกว่า primary culture เมื่อเซลล์ primary culture มีการเจริญเติบโตหนาแน่นประมาณร้อยละ 70-80 ทำการย้ายเซลล์จากภาชนะเก่าไปยังภาชนะใหม่ ที่เรียกว่า subculture และเรียกจำนวนครั้งของการย้ายเซลล์ว่า passage 0 ซึ่งเมื่อเซลล์ใน passage 0 หนาแน่น ทำการ subculture ครั้งต่อไป ส่งผลให้ passage ของเซลล์มีการเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์



**รูปที่ 16** การแยกเซลล์จากชิ้นเอ็น ligamentum flavum โดยเซลล์อยู่โดยรอบของชิ้นเอ็น มีลักษณะเรียวยาว (spindle-shaped) และเกาะติดบนภาชนะเลี้ยงเซลล์ (กำลังขยาย 100 เท่า)

## 8. การศึกษาการเปลี่ยนแปลง relative telomere length ของเซลล์ไฟโบบลาสจากชิ้นเอ็น ligamentum flavum

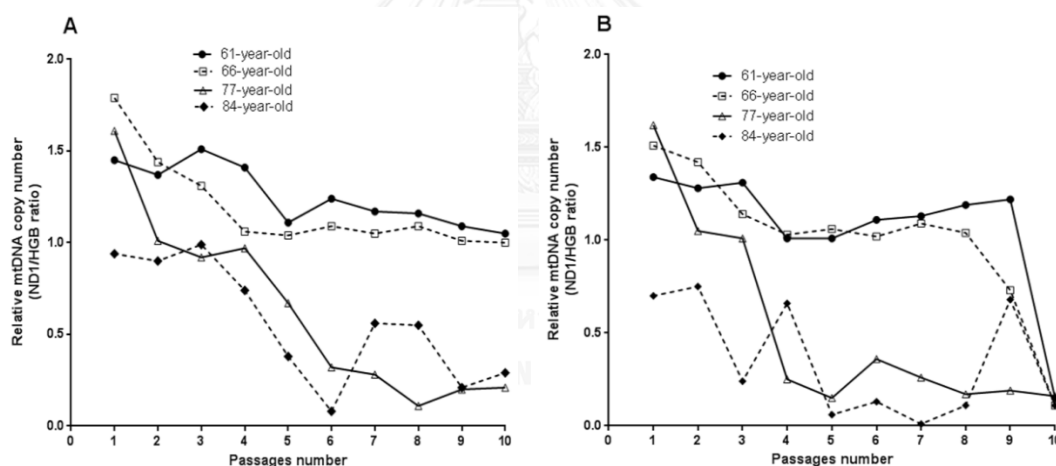
เซลล์ไฟโบบลาสจากการแยกเซลล์จากชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวโดยตรงจากจำนวนผู้ป่วย 4 รายที่มีช่วงอายุแตกต่างกัน ได้แก่ อายุ 61, 67, 77 และ 84 ปี เริ่มการเก็บ DNA ในแต่ละ passage เพื่อทำการสกัด DNA และศึกษาเปรียบเทียบ relative telomere length จากชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หน้าตัวและหน้าตัวในผู้ป่วยรายเดียวกัน โดยเทคนิค real-time PCR ที่แสดงออกในตัวอย่างแต่ละ passage พบว่าเซลล์จากชิ้นเอ็นระดับที่หน้าตัว มีค่า relative telomere length สั้นกว่าเซลล์จากชิ้นเอ็นระดับที่ไม่หน้าตัว ซึ่งในช่วงต้นของการเลี้ยงเซลล์จากผู้ป่วยอายุ 61, 66, 77 และ 84 ปี เซลล์ไฟโบบลาสชิ้นเอ็นระดับที่ไม่หน้าตัวมีค่า relative telomere length สูงกว่าเซลล์ชิ้นเอ็นระดับที่หน้าตัว แต่เมื่อเลี้ยงเซลล์ผ่านไปในแต่ละรอบ แนวโน้มของค่า relative telomere length ลดลงตามจำนวนรอบในแต่ละช่วงของการเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 17



รูปที่ 17 ค่า relative telomere length ในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ไฟโบบลาสจาก (A) ชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หน้าตัวและ (B) ชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัว เปรียบเทียบในผู้ป่วยอายุ 61, 66, 77 และ 84 ปี

## 9. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวน mtDNA copy number ของเซลล์ไฟโบบลาสจากชิ้นเอ็น ligamentum flavum

เซลล์ไฟโบบลาสจากการแยกเซลล์จากชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวโดยตรงจากจำนวนผู้ป่วย 4 รายที่มีช่วงอายุแตกต่างกัน โดยศึกษาเปรียบเทียบจำนวน mtDNA copy number จากเซลล์ชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หน้าตัวและหน้าตัวในผู้ป่วยรายเดียวกัน ที่แสดงออกในตัวอย่างแต่ละ passage พบว่าเซลล์จากชิ้นเอ็นระดับที่หน้าตัวมีค่าจำนวน mtDNA copy number น้อยกว่าเซลล์จากชิ้นเอ็นระดับที่ไม่หน้าตัว ซึ่งในช่วงต้นของการเลี้ยงเซลล์จากผู้ป่วยอายุ 61, 66, 77 และ 84 ปี เซลล์ไฟโบบลาสชิ้นเอ็นระดับที่ไม่หน้าตัวมีจำนวน mtDNA copy number สูงกว่าเซลล์ชิ้นเอ็นระดับที่หน้าตัว ทั้งนี้เมื่อเลี้ยงเซลล์ผ่านไปแต่ละรอบ แนวโน้มของจำนวน mtDNA copy number ลดลงตามจำนวนรอบในแต่ละช่วงของการเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 18

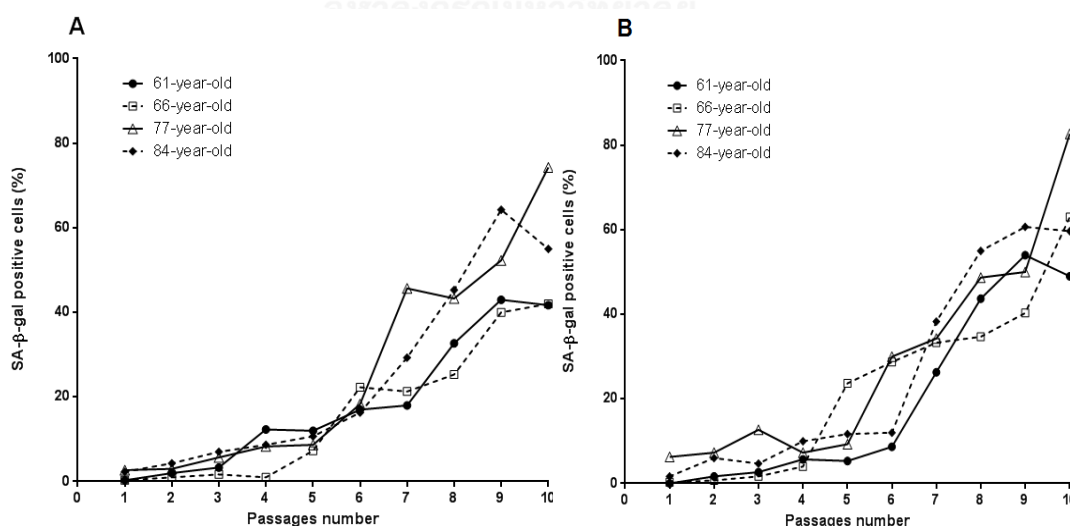


รูปที่ 18 จำนวน mtDNA copy number ในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ไฟโบบลาสจาก (A) ชิ้นเอ็นligamentum flavum ระดับที่ไม่หน้าตัวและ (B) ชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัว เปรียบเทียบในผู้ป่วยอายุ 61, 66, 77 และ 84 ปี

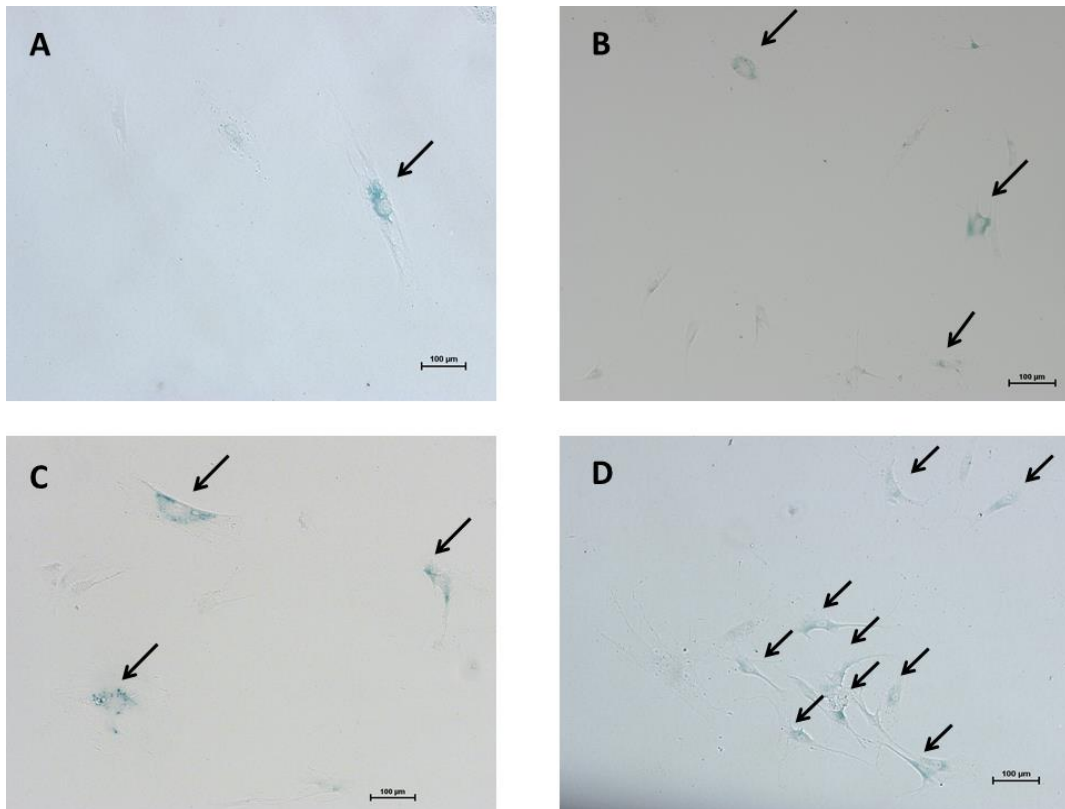
## 10. ผลการศึกษาการย้อม senescence-associated $\beta$ -galactosidase staining (SA- $\beta$ -gal) ของเซลล์ไฟโบบลาสจากชิ้นเอ็น ligamentum flavum

จากการศึกษาการเกิดเซลล์ชราในเซลล์ไฟโบบลาสจากชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวของผู้ป่วยอายุ 61, 66, 77 และ 84 ปี โดยการย้อม SA-  $\beta$ -gal นั้น ในช่วงต้นของการเลี้ยงเซลล์ไฟโบบลาสจากชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวของผู้ป่วยอายุ 61 และ 66 ปี มีค่าร้อยละของเซลล์ที่ย้อมติดสีเท่ากับ 0.3, 0, 0.3 และ 0.3 ตามลำดับ และมีค่าร้อยละการติดสีนั้นเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตามแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งค่าร้อยละของเซลล์ที่ย้อมติดสีของผู้ป่วยอายุ 61 และ 66 ในการเลี้ยงเซลล์รอบหลัง ๆ มีค่าน้อยกว่าร้อยละ 50 ดังแสดงในรูปที่ 19A

ในขณะที่ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่ย้อมติดสี SA- $\beta$ -gal เซลล์ไฟโบบลาสของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวของผู้ป่วยอายุ 77 และ 84 ปี พบว่าในการเลี้ยงเซลล์ช่วงแรกมีค่าร้อยละของเซลล์ที่ย้อมติดสีเท่ากับ 2.70, 6.30, 2.30 และ 1.70 ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อเลี้ยงเซลล์ถึง passage 9 พบว่ามีค่าร้อยละการย้อมติดสีของเซลล์มากกว่าร้อยละ 50 ดังแสดงในรูปที่ 19B นอกจากนี้พบว่าร้อยละของเซลล์ไฟโบบลาส ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัว มีการย้อมติดสี SA- $\beta$ -gal มากกว่าเซลล์จากชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หน้าตัวของผู้ป่วย 4 ช่วงอายุในรายเดียวกัน



รูปที่ 19 ค่าร้อยละของเซลล์ที่ย้อมติดสี SA- $\beta$ -gal ในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ไฟโบบลาสจาก (A) ชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หน้าตัวและ (B) ชิ้นเอ็นช่องไขสันหลัง ระดับที่หน้าตัวจากผู้ป่วยที่มีอายุ 61, 66, 77 และ 84 ปี



รูปที่ 20 การย้อมติดสี SA-β-gal (ลูกศร) ของเซลล์ไฟโบรบลาสจากชิ้นเอ็นช่องไขสันหลังระดับที่หน้า  
 ตัวเปรียบเทียบใน (A) passage 1 และ (B) passage 10 จากผู้ป่วยอายุ 61 กับ  
 (C) passage 1 และ (D) passage 10 จากผู้ป่วยอายุ 84 ปี (กำลังขยาย X10)

## บทที่ 5

### สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

โรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบเป็นโรคที่พบได้ในผู้สูงอายุ เกิดจากสาเหตุหลักสำคัญคือชิ้นเอ็นช่องไขสันหลัง ligamentum flavum มีการอักเสบและเกิดการหนาตัวกดทับเส้นประสาทไขสันหลังบริเวณกระดูกสันหลังส่วนเอวและก่อให้เกิดอาการปวดหลัง ซึ่งปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum และทำให้เกิดอาการปวดหลังคือ การอักเสบจากการกดทับเป็นระยะเวลานาน (mechanical stress) และจากการสะสมของสารอนุมูลอิสระจากสิ่งแวดล้อมทำให้ร่างกายเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) DNA ถูกทำลาย ส่งผลกระทบต่อ DNA ภายในเซลล์และ DNA ภายในไมโทคอนเดรีย ซึ่งการศึกษาปัจจัย เช่น เทโลเมียร์ จำนวน mtDNA copy ภาวะเครียดออกซิเดชัน และการเกิดเซลล์ชราเป็นเรื่องที่น่าสนใจ เพื่อช่วยอธิบายความสัมพันธ์กับการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ในผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษา relative telomere length จำนวน mtDNA copy number และภาวะเครียดออกซิเดชัน ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัวในผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบในรายเดียวกัน จากการเปรียบเทียบ relative telomere length ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัวในผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบรายเดียวกันโดยเทคนิค real-time PCR จำนวน 48 ราย พบว่าชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัวมีค่า relative telomere length ต่ำกว่าชิ้นเอ็นระดับที่ไม่หนาตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อแบ่งกลุ่มระหว่างกลุ่มชิ้นเอ็นระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัวกับกลุ่มอายุที่แตกต่างกัน พบว่าชิ้นเอ็นระดับที่หนาตัวในกลุ่มผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม มีแนวโน้มค่า relative telomere length สั้นกว่ากลุ่มชิ้นเอ็นระดับที่ไม่หนาตัว และจากผลการศึกษาเปรียบเทียบค่า relative telomere length กับเพศชายและเพศหญิง พบว่าชิ้นเอ็นระดับที่หนาตัวของกลุ่มผู้ป่วยเพศชายมีค่า relative telomere length สั้นกว่าในกลุ่มผู้ป่วยเพศหญิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการศึกษา relative telomere length สอดคล้องกับสมมติฐานงานวิจัยที่ตั้งไว้ว่า ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัวมีค่า relative telomere length ต่ำกว่าชิ้นเอ็นระดับที่ไม่หนาตัว ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับ Felice และคณะในปีพ.ศ. 2552 (46) พบว่าอัตราความยาวเทโลเมียร์ในเนื้อเยื่อไฟโบบลาส (fibroblast tissue) ในผู้ป่วยเนื้อเยื่อแผลเป็น (keloid skin) สั้นกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และอีกการศึกษาในปีพ.ศ. 2555 ของ Monickaraj และคณะ (64)

พบว่าขึ้นเนื้อเยื่อใต้ผิวหนังและขึ้นไขมันในช่องท้องของผู้ป่วยโรคเบาหวานประเภทที่ 2 และโรคอ้วนมี เทโลเมียร์สั้นกว่าในกลุ่มสุขภาพดี ทั้งนี้เนื่องมาจากการเผชิญต่อภาวะเครียดออกซิเดชันและการเกิดการอักเสบนั้น ถือเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้นทั้งยังกระตุ้น inflammatory cells เพื่อกระตุ้นภาวะอักเสบแบบเรื้อรัง และการที่ DNA ถูกทำลายรวมถึงเทโลเมียร์สั้นลงนั้น เป็นเพราะการได้รับสารอนุมูลอิสระมากขึ้น เกิดการสะสมเปลี่ยนแปลงของเบส guanosine มากขึ้น ส่งผลให้สารอนุมูลอิสระสามารถเข้าทำลายและนำไปสู่การทำลายลำดับของเทโลเมียร์ให้หดสั้น (79)

ในการศึกษา relative telomere length โดยแบ่งกลุ่มตามเพศของผู้ป่วย จากการศึกษาพบว่าค่า relative telomere length ในกลุ่มผู้ป่วยเพศชายต่ำกว่าในผู้ป่วยเพศหญิง ทั้งในชั้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัว พบว่าเทโลเมียร์มีการหดสั้นลงในเลือดของผู้ป่วยโรคจิตเภทเพศชายมากกว่าผู้ป่วยเพศหญิงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งพบว่าในกลุ่มเพศชายมีการสะสมของภาวะเครียดออกซิเดชัน เช่น การสูบบุหรี่และการดื่มแอลกอฮอล์ นอกจากนี้เพศชายมีฮอร์โมน เทสโทสเตอโรน (testosterone hormone) สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระและไม่มีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (80) อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลให้สารอนุมูลอิสระนั้นสามารถเข้ามาทำลายลำดับเทโลเมียร์ ทำให้เทโลเมียร์เกิดการหดสั้นลงมากกว่าในเพศหญิง ในทางตรงกันข้ามเพศหญิงนั้น มีฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen hormone) ซึ่งสามารถลดการเกิดสารอนุมูลอิสระ ทั้งยังเป็นตัวควบคุมยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระ (81)

ในการเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ พบว่ามีความสัมพันธ์กับโรคเกี่ยวข้องกับอายุที่มากขึ้น ส่งผลให้เกิดความเสื่อมของร่างกาย ซึ่งไมโทคอนเดรียถือเป็นออร์แกเนลล์ที่มีบทบาทสำคัญ เพราะเป็นออร์แกเนลล์เกี่ยวข้องกับกระบวนการถ่ายโอนอิเล็กตรอน การสร้างพลังงาน ATP และการสร้างสารอนุมูลอิสระ (82) เมื่อไมโทคอนเดรียได้รับสารอนุมูลอิสระมากเกิดไปจนไม่สามารถขจัดไปได้ ส่งผลให้ไมโทคอนเดรียมี DNA ผิดปกติ จำนวน mtDNA copy number เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งจำนวน mtDNA copy number เปลี่ยนแปลงไปนั้น ก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคต่าง ๆ เช่น โรคข้อเข่าเสื่อม (83) โรคหัวใจเต้นผิดจังหวะ (40) และโรคหัวใจหลอดเลือดตีบตัน (84) เป็นต้น ซึ่งโรคเหล่านี้ ถือเป็นโรคที่เกิดขึ้นจากอายุที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิดความเสื่อมของร่างกาย

สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบจำนวน mtDNA copy number ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบรายเดียวกัน โดยเทคนิค real-time PCR จำนวน 48 ราย พบว่าจำนวน mtDNA copy number ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวมีแนวโน้มต่ำกว่าในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หน้าตัวแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เช่นเดียวกับเมื่อแบ่งกลุ่มระหว่างกลุ่มชิ้นเอ็นระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวกับกลุ่มอายุที่ต่างกัน พบว่าชิ้นเอ็นระดับที่หน้าตัวในกลุ่มผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม มีแนวโน้มจำนวน mtDNA copy number ต่ำกว่ากลุ่มชิ้นเอ็นระดับที่ไม่หน้าตัว และเมื่อเปรียบเทียบแบ่งกลุ่มระหว่างเพศชายและเพศหญิง พบว่าชิ้นเอ็นระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวของกลุ่มผู้ป่วยเพศชายมีจำนวน mtDNA copy number ต่ำกว่าในกลุ่มผู้ป่วยเพศหญิงแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

การศึกษาจำนวน mtDNA copy number ในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับ Pyle และคณะ ในปี พ.ศ. 2559 (85) จากกลุ่มผู้ป่วยโรคพาร์กินสันและกลุ่มควบคุมจากการวัดทั้งในเลือด ชิ้นเนื้อสมองส่วนกลาง (substantia nigra pars compacta) และชิ้นเนื้อสมองบริเวณคอร์เทกซ์กลีบหน้า (frontal cortex) พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคพาร์กินสันมีจำนวน mtDNA copy number ต่ำกว่าในกลุ่มกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทำให้ทราบว่าจำนวนที่เปลี่ยนแปลงของ mtDNA copy number นั้นมีส่วนทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคพาร์กินสัน ในทางกลับกันกับ Fang และคณะในปี พ.ศ. 2557 (61) พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมนั้นมีจำนวน mtDNA copy number สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องมาจากเซลล์ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีการทำงานเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นกลไกของเซลล์ในการเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อมีการสูญเสียไป ส่งผลทำให้ไมโทคอนเดรีย และจำนวน mtDNA copy number เพิ่มขึ้นตาม

จากการเปรียบเทียบจำนวน mtDNA copy number โดยการแบ่งกลุ่มตามเพศและอายุ พบว่าทั้งในเพศและอายุนั้นไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับ Kamfar และคณะในปี พ.ศ. 2559 (86) พบว่าจำนวน mtDNA copy number ของกลุ่มผู้ป่วยไขมันพอกตับและกลุ่มควบคุมไม่ต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบทั้งเพศหญิงเพศชายรวมถึงอายุที่ต่างกัน ซึ่งหน้าที่ของไมโทคอนเดรียนั้นถูกควบคุมในกระบวนการถอดรหัส (transcriptional level) ตอบสนองต่อความต้องการพลังงานของเซลล์ ไม่ใช่การตอบสนองโดยการเพิ่มจำนวน mtDNA copy number (87)



อีกปัจจัยที่สำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคต่าง ๆ คือภาวะเครียดออกซิเดชัน ผลจากการสะสมของสารอนุมูลอิสระมากกว่าปกติ ทำให้เซลล์ไม่สามารถขจัดออกหมด ทำให้เกิดความเสียหาย โดยเฉพาะต่อ DNA ของเซลล์ (88) อาจทำให้เกิดการหายไปของเบส เกิดการกลายพันธุ์ เพราะ DNA ไม่สามารถเข้าคู่กันได้ ส่งผลต่อโครโมโซมมีการเรียงตัวแบบใหม่และสุดท้ายเกิดการสร้างโปรตีนผิดปกติ (89) ซึ่งหนึ่งในรูปแบบของ DNA ที่ถูกทำลายสร้างขึ้นมาก็คือ 8-hydroxy-2'-deoxygaunosine (8-OHdG) โดยการเกิด 8-OHdG ใช้บ่งบอกระดับของ DNA ถูกทำลายด้วยสารอนุมูลอิสระ (38)

ในการศึกษาเปรียบเทียบระดับ 8-OHdG ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวในผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบรายเดียวกันโดยเทคนิค ELISA จำนวน 30 ราย พบว่าในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวมีระดับของ 8-OHdG มากกว่าชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หน้าตัวและมีความแตกต่างทางสถิติ ทั้งนี้เมื่อแบ่งกลุ่มตามอายุ พบว่าในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวของผู้ป่วยอายุน้อยกว่า 63 ปี มีระดับ 8-OHdG สูงกว่าในชิ้นเอ็นระดับที่ไม่หน้าตัว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาจาก Tsai และคณะในปีพ.ศ. 2553 (41) พบว่าในเซลล์ orbital fibroblasts ของกลุ่มผู้ป่วยโรคคอพอกตาโปน (Graves' ophthalmopathy) มีระดับของ 8-OHdG สูงกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งมากกว่าตัวอย่างจากชิ้นเนื้อ อาจบ่งบอกได้ว่าการเกิดพยาธิสภาพของโรคต่าง ๆ นั้นมีผลมาจากการเพิ่มสูงขึ้นของ DNA ที่ถูกทำลาย ซึ่งมีสาเหตุมากจากการได้รับสารอนุมูลอิสระมากขึ้นจนมีระดับของ 8-OHdG เพิ่มขึ้นตาม ยิ่งถ้ามีการศึกษาในเซลล์คาดว่าให้ผลที่น่าเชื่อถือมากกว่า เพราะเป็นเซลล์จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่เรานำมาศึกษา ซึ่งการศึกษาในชิ้นเนื้อนั้นมีส่วนประกอบ เช่น โปรตีนและไขมันอยู่ปริมาณมาก ทำให้ค่าที่ได้ อาจคลาดเคลื่อน นอกจากนี้ในการศึกษาปีพ.ศ. 2556 ของ Dede และคณะ (90) พบว่าน้ำในร่องเหงือก (gingival crevicular fluid) ของกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์ชนิดเรื้อรัง (chronic periodontitis) มีระดับ 8-OHdG สูงกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งสภาวะที่นำไปสู่การเพิ่มขึ้นของภาวะเครียดออกซิเดชันเป็นผลมาจากโมเลกุลของ DNA ถูกทำลายจากการสะสมของสารอนุมูลอิสระ และอาจถูกกระตุ้นผ่านกลไกที่เกี่ยวข้องสารประกอบที่มีออกซิเจนในโมเลกุล (91, 92) เช่น hydroxyl radicals ( $\text{OH}^\cdot$ ) hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) และ superoxide radicals ( $\text{O}_2^\cdot$ ) เป็นต้น (34) และในการศึกษาระดับโปรตีนของระดับ 8-OHdG จากชิ้นเอ็น ligamentum flavum กับอายุ แสดงให้เห็นว่าระดับ 8-OHdG ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวไม่มีความสัมพันธ์กับอายุ

สามารถอธิบายได้ว่าอายุอาจไม่ใช่ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของระดับ 8-OHdG ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum

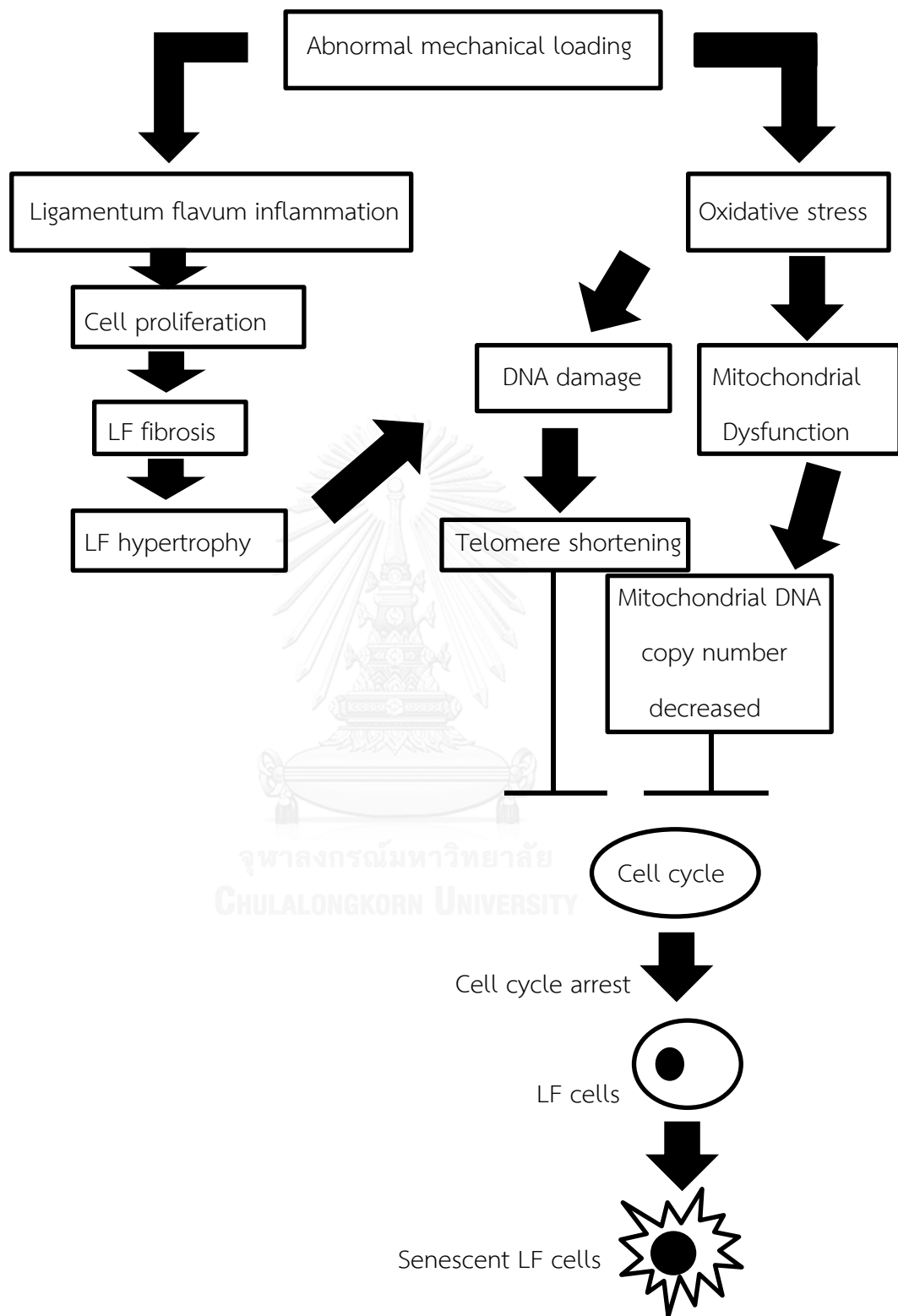
เมื่อศึกษาความสัมพันธ์จากการแสดงออกระดับยีนของค่า relative telomere length และจำนวน mtDNA copy number จากชิ้นเอ็น ligamentum flavum พบว่าค่า relative telomere length และจำนวน mtDNA copy number ระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัวไม่มีความสัมพันธ์กับอายุของผู้ป่วย ซึ่งสอดคล้องกับการเปรียบเทียบค่า relative telomere length และจำนวน mtDNA copy number เมื่อแบ่งกลุ่มตามอายุ พบว่ากลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัวระหว่างกลุ่มอายุ 2 กลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ ทั้งนี้การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า relative telomere length กับจำนวน mtDNA copy number และระดับ 8-OHdG พบว่าค่า relative telomere length จากชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัวไม่มีความสัมพันธ์กับจำนวน mtDNA copy number และระดับ 8-OHdG

จากการศึกษานี้พบว่าชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัวนั้นมีค่า relative telomere length สั้นกว่า จำนวน mtDNA copy number มีแนวโน้มต่ำกว่า และระดับของ 8-OHdG สูงกว่าในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่ไม่หนาตัว ซึ่งในการศึกษานี้ได้มีการศึกษาในระดับเซลล์เปรียบเทียบค่า relative telomere length จำนวน mtDNA copy number และ cell senescence ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัวจากผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบในช่วงอายุที่แตกต่างกัน ผลการศึกษาพบว่าเซลล์จากชิ้นเอ็นระดับที่หนาตัวมีค่า relative telomere length สั้นกว่าเซลล์จากชิ้นเอ็นระดับที่ไม่หนาตัว และเมื่อเลี้ยงเซลล์ผ่านไปในแต่ละรอบ แนวโน้มของค่า relative telomere length ลดลงตามจำนวนรอบในแต่ละช่วงของการเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปีพ.ศ. 2550 Le Maitre และคณะ (50) พบว่าเซลล์จากหมอนรองกระดูกสันหลังเสื่อมมี relative telomere length สั้นกว่าเซลล์หมอนรองกระดูกสันหลังไม่เสื่อม นอกจากนี้ค่า relative telomere length ลดลงในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเป็นผลมาจากการแบ่งตัวของเซลล์ ทำให้ทุกครั้งที่มีการแบ่งตัว ค่า relative telomere length เกิดการสั้นลง

ในขณะที่จำนวน mtDNA copy number ในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ไฟโบบลาสของชั้นเอ็น ligamentum flavum พบว่ามีจำนวนลดลงเช่นเดียวกับค่า relative telomere length ทั้งนี้เซลล์ได้รับพลังงานมากพอจากการหายใจระดับเซลล์แบบใช้ออกซิเจนมากกว่าไม่ใช้ออกซิเจน ทำให้เวลาเลี้ยงเซลล์ในแต่ละรอบอาจมีการสะสมของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ซึ่งอาจเป็นต้นเหตุที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อม ซึ่งชั้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัว หรือชั้นเนื้อที่เกิดพยาธิสภาพมีอัตราการแบ่งตัวของเซลล์เพิ่มขึ้นมากกว่าเซลล์ปกติ ทำให้ในทุกครั้งของการแบ่งเซลล์ส่งผลให้จำนวน mtDNA copy number และค่า relative telomere length ลดลง

ซึ่งค่า relative telomere length สิ้นลงและจำนวน mtDNA copy number น้อยลงนั้น อาจเกี่ยวเนื่องกับปัจจัยระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับอายุ โดยกระตุ้นให้เซลล์เกิดความเสื่อมและเกิดพยาธิสภาพของโรคตามมา ซึ่งเป็นต้นเหตุของการเกิด cell senescence การสะสมเซลล์ชราส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพของโรคต่าง ๆ ทั้งนี้จากการศึกษาเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบบลาสจากชั้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัวจากผู้ป่วยที่อายุแตกต่างกัน เพื่อศึกษาการย้อมติดสี SA- $\beta$ -gal ตรวจวัดการเกิด cell senescence ในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ พบว่ามีความแตกต่างในการย้อมติดสี SA- $\beta$ -gal ระหว่างเซลล์จากผู้ป่วยอายุน้อยและผู้ป่วยอายุมาก โดยในเซลล์ของผู้ป่วยอายุมากนั้นมีจำนวนเซลล์ติดสี SA- $\beta$ -gal เกิดขึ้นในรอบแรกของการเลี้ยงเซลล์และมีจำนวนเซลล์ติดสีมากกว่าเซลล์จากผู้ป่วยอายุน้อย ซึ่งให้ผลไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาในปีพ.ศ. 2557 ของ Jeong และคณะ (52) พบว่าเซลล์จากหมอนรองสันหลังของผู้ป่วยโรคหมอนกระดูกสันหลังเสื่อมจากผู้ป่วยอายุมาก มีจำนวน cell senescence มากกว่าผู้ป่วยอายุน้อย ซึ่งเหตุผลสำหรับการเกิด cell senescence ในผู้ป่วยอายุมากมีจำนวนมากกว่าในผู้ป่วยอายุน้อยนั้น อาจเป็นเพราะมีการสะสมของ cell senescence ในระดับหนึ่งอยู่แล้ว ประกอบกับมีการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรสต่ำ (telomerase activity) จึงส่งผลให้ค่า relative telomere length สิ้นลงและเกิด cell senescence เพิ่มขึ้น และในการศึกษาของ Robert และคณะในปีพ.ศ. 2549 พบว่าค่าร้อยละของการติดสี SA- $\beta$ -gal ของเซลล์ nucleus pulposus ในผู้ป่วยโรคหมอนรองกระดูกสันหลังเคลื่อน มีความสัมพันธ์กับอายุของผู้ป่วยไปในทิศทางเดียวกัน เมื่อผู้ป่วยมีอายุมากขึ้น ค่าร้อยละของการติดสี SA- $\beta$ -gal เพิ่มขึ้นตาม ในทางกลับกันพบว่าค่าเทโลเมียร์และการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรสลดลงตามอายุที่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าอายุที่เพิ่มมากขึ้น รวมถึงเทโลเมียร์และการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส ถือเป็นปัจจัยที่สำคัญและมีความสัมพันธ์กับการเกิดเซลล์ senescence (93)

สรุปได้ว่ามีผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบมีค่า relative telomere length จำนวน mtDNA copy number และระดับ 8-OHdG ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า relative telomere length จำนวน mtDNA copy number และระดับ 8-OHdG มีส่วนเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัว โดยค่า relative telomere length กับจำนวน mtDNA copy number ลดลง และระดับ 8-OHdG เพิ่มขึ้น อาจเป็นผลมาจากการเกิดกระบวนการอักเสบขึ้นที่ชิ้นเอ็น ligamentum flavum จากแรงเค้นหรือแรงเค้นผิดปกติ (abnormal mechanical loading) ทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในบริเวณนั้นเพิ่มสูงขึ้น เกิดสารอนุมูลอิสระเข้าไปทำลายเซลล์ ทำให้บริเวณนั้นมีจำนวนเซลล์ลดลง ส่งผลให้ค่า relative telomere length และจำนวน mtDNA copy number ลดลงเช่นเดียวกัน แต่ทั้งนี้ในอีกด้านหนึ่งการที่จำนวนเซลล์ลดลงจากภาวะเครียดออกซิเดชัน เกิดกระบวนการสร้างเซลล์ขึ้นมาทดแทนมากขึ้นกลายเป็นชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หน้าตัว ทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้ค่า relative telomere length สิ้นลงและจำนวน mtDNA copy number ภายในเซลล์ลดลงตาม ดังรูปที่ 21 (94)



รูปที่ 21 แสดงภาพสมมติฐานความสัมพันธ์ของปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum (94)

จากการวิจัยหลายเรื่องที่ผ่านมาได้ศึกษาปัจจัยระดับโมเลกุลทั้งในชั้นเนื้อ เลือด และตัวอย่างอื่น ๆ การวิเคราะห์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ต่อการเกิดความเสี่ยงและการเกิดพยาธิสภาพของโรคต่าง ๆ อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้ นับเป็นการศึกษาแรกที่มีการศึกษาเปรียบเทียบและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า relative telomere length จำนวน mtDNA copy number และภาวะเครียดออกซิเดชันในชั้นเอ็น ligamentum flavum ในผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ รายเดียวกัน ถือเป็นการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการหนาตัวในชั้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัวจากการแสดงออกของยีนและโปรตีนในผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ นอกจากนี้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกจากราคา relative telomere length จำนวน mtDNA และภาวะเครียดออกซิเดชันกับอายุและเพศ ซึ่งข้อจำกัดของการศึกษานี้ถูกจำกัดโดยประการแรกคือจำนวนตัวอย่างในการศึกษา โดยเฉพาะในการศึกษาระดับเซลล์ถือเป็น การศึกษานำร่องในผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ ดังนั้นหากมีการศึกษาต่อไปในอนาคต ควรศึกษาระดับเซลล์ในระยะเวลานานขึ้นและเพิ่มจำนวนตัวอย่างจากผู้ป่วยให้มีอายุแตกต่างกัน เพื่อสามารถวิเคราะห์ได้อย่างแม่นยำ ชัดเจน และเชื่อถือมากขึ้น ประการต่อมาในการศึกษานี้วิเคราะห์เฉพาะ relative telomere length จำนวน mtDNA copy number และภาวะเครียดออกซิเดชัน รวมถึง cell senescence แต่ไม่ได้มีการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส ซึ่งกลไกการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรสในชั้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัวยังไม่มียผลเปรียบเทียบที่ชัดเจน ประการสุดท้าย การวิจัยนี้ศึกษาภาวะเครียดออกซิเดชันจากการศึกษาระดับ 8-OHdG ซึ่งเป็นตัวชี้วัดในระดับของ DNA ถูกทำลาย ซึ่งถ้ามีการศึกษาภาวะเครียดออกซิเดชันในตัวชี้วัดอื่น ๆ หรือศึกษาดูระดับของภาวะเครียดออกซิเดชันทั้งหมด (total oxidative stress) ยิ่งช่วยยืนยันผลในการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันได้ดีมากขึ้น

อย่างไรก็ตาม ผลการวิจัยนี้ได้แสดงผลการศึกษาระดับโมเลกุลและระดับโปรตีนในชั้นเอ็น ligamentum flavum เป็นเพียงการศึกษาค่า relative telomere length จำนวน mtDNA copy number และภาวะเครียดออกซิเดชันในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่มีการหนาตัว ไม่อาจบ่งบอกได้ว่าการแสดงออกของค่า relative telomere length จำนวน mtDNA copy number รวมถึงภาวะเครียดออกซิเดชันเป็นสาเหตุทำให้ชั้นเอ็น ligamentum flavum เกิดการหนาตัว อาจมีปัจจัยอื่นอีกมาก ซึ่งถือเป็นเรื่องใหม่และน่าสนใจสำหรับการศึกษาต่อไปในอนาคต

## รายการอ้างอิง

1. Porter RW. Spinal stenosis and neurogenic claudication. *Spine*. 1996; 21:2046-52.
2. Bai XC, Lu D, Bai J, Zheng H, Ke ZY, Li XM, et al. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF-kappa B. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 314:197-207.
3. Lee HC, Wei YH. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2007; 232:592-606.
4. Houben JM, Moonen HJ, van Schooten FJ, Hageman GJ. Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic Biol Med*. 2008; 44:235-46.
5. Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37:961-76.
6. Kim KW, Ha KY, Lee JS, Na KH, Kim YY, Woo YK. Senescence of nucleus pulposus chondrocytes in human intervertebral discs. *Asian Spine J*. 2008; 2: 1-8.
7. Baek KH, Oh KW, Lee WY, Lee SS, Kim MK, Kwon HS, et al. Association of oxidative stress with postmenopausal osteoporosis and the effects of hydrogen peroxide on osteoclast formation in human bone marrow cell cultures. *Calcif Tissue Int*. 2010; 87:226-35.
8. Zhu J, Yue Z, Wang J. Oxidative DNA damage of cartilage in osteoarthritis. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 1998; 23:438-40.
9. ธเนศ วรธนอภิสิทธิ์, พิชัย สันต์สวัสดิ์, เมฆพันธ์ ปรมาทิกุล, ราชวิทยาลัยแพทย์ออร์โธปิดิกส์ แห่งประเทศไทย. ไทย. อนุสาขาโรคกระดูกสันหลัง. การประชุมวิชาการ, วิทยาลัย แพทยศาสตร์กรุงเทพมหานครและวชิรพยาบาล. Comprehensive spine course. 2549.
10. กอบกู้ เชียงทอง. Anatomy of the lumbosacral spine. โรคกระดูกสันหลังเล่ม. 2551:29-57.

11. Kalichman L, Cole R, Kim DH, Li L, Suri P, Guermazi A, et al. Spinal stenosis prevalence and association with symptoms: the Framingham Study. *Spine J.* 2009; 9:545-50.
12. Katz JN, Harris MB. Clinical practice. Lumbar spinal stenosis. *N Engl J Med.* 2008; 358:818-25.
13. Siebert E, Pruss H, Klingebiel R, Failli V, Einhaupl KM, Schwab JM. Lumbar spinal stenosis: syndrome, diagnostics and treatment. *Nat Rev Neurol.* 2009; 5:392-403.
14. Saito K, Miyakoshi N, Hongo M, Kasukawa Y, Ishikawa Y, Shimada Y. Congenital lumbar spinal stenosis with ossification of the ligamentum flavum in achondroplasia: a case report. *J Med Case Rep.* 2014; 8:88.
15. Covaro A, Vila-Canet G, de Frutos AG, Ubierna MT, Ciccolo F, Caceres E. Management of degenerative lumbar spinal stenosis: an evidence-based review. *EFORT Open Rev.* 2016; 1:267-74.
16. ยงค์กิติ หวังรุ่งทรัพย์. ภาวะโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ. กรุงเทพมหานคร: ราชวิทยาลัยแพทย์ออร์โธปิดิกส์แห่งประเทศไทย; 2556.
17. Issack PS, Cunningham ME, Pumberger M, Hughes AP, Cammisa FP, Jr. Degenerative lumbar spinal stenosis: evaluation and management. *J Am Acad Orthop Surg.* 2012; 20:527-35.
18. Kreiner DS, Shaffer WO, Baisden JL, Gilbert TJ, Summers JT, Toton JF, et al. An evidence-based clinical guideline for the diagnosis and treatment of degenerative lumbar spinal stenosis (update). *Spine J.* 2013; 13:734-43.
19. Yabe Y, Hagiwara Y, Ando A, Tsuchiya M, Minowa T, Takemura T, et al. Chondrogenic and fibrotic process in the ligamentum flavum of patients with lumbar spinal canal stenosis. *Spine.* 2015; 40:429-35.
20. Li S, Xia H, C. H. Retrospective analysis correlation factors of preserving the ligamentum flavum in microendoscopic discectomy. *Clin Neurol Neurosurg* 2015; 139:46-50.
21. Losiniecki AJ, Serrone JC, Keller JT, Bohinski RJ. Lumbar ligamentum flavum: spatial relationships to surrounding anatomical structures and technical



- description of en bloc resection. *J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg.* 2013; 74:388-92.
22. Mobbs RJ, Dvorak M. Ossification of the ligamentum flavum: diet and genetics. *J Clin Neurosci.* 2007; 14:703-5.
  23. Munns JJ, Lee JY, Espinoza Orias AA, Takatori R, Andersson GB, An HS, et al. Ligamentum flavum hypertrophy in asymptomatic and chronic low back pain subjects. *PLoS one.* 2015; 10:e0128321.
  24. Park JB, Lee JK, Park SJ, Riew KD. Hypertrophy of ligamentum flavum in lumbar spinal stenosis associated with increased proteinase inhibitor concentration. *J Bone Joint Surg Am.* 2005; 87:2750-7.
  25. Altinkaya N, Yildirim T, Demir S, Alkan O, FB. S. Factors associated with the thickness of the ligamentum flavum: is ligamentum flavum thickening due to hypertrophy or buckling? *Spine (Phila Pa 1976)* 2011; 36:E1093-7.
  26. Sairyo K, Biyani A, Goel V, Leaman D, Booth R, Jr., Thomas J, et al. Pathomechanism of ligamentum flavum hypertrophy: a multidisciplinary investigation based on clinical, biomechanical, histologic, and biologic assessments. *Spine.* 2005; 30:2649-56.
  27. Park JB, Chang H, Lee JK. Quantitative analysis of transforming growth factor-beta 1 in ligamentum flavum of lumbar spinal stenosis and disc herniation. *Spine.* 2001; 26:E492-5.
  28. Jirathanathornnukul N, Limthongkul W, Yingsakmongkol W, Singhatanadgige W, Parkpian V, S. H. Increased expression of vascular endothelial growth factor is associated with hypertrophic ligamentum flavum in lumbar spinal canal stenosis. *J Investig Med.* 2016; 64:882-7.
  29. Nakamura T, Okada T, Endo M, Nakamura T, Oike Y, Mizuta H. Angiopoietin-like protein 2 promotes inflammatory conditions in the ligamentum flavum in the pathogenesis of lumbar spinal canal stenosis by activating interleukin-6 expression. *Eur Spine J.* 2015; 24:2001-9.
  30. Chen MH, Hu CK, Chen PR, Chen YS, Sun JS, Chen MH. Dose-dependent regulation of cell proliferation and collagen degradation by estradiol on ligamentum flavum. *BMC Musculoskelet Disord.* 2014; 15:238.

31. Hur JW, Bae T, Ye S, Kim JH, Lee S, Kim K, et al. Myofibroblast in the ligamentum flavum hypertrophic activity. *Eur Spine J.* 2017; 8
32. Lu F. Reactive oxygen species in cancer, too much or too little? *Med Hypotheses.* 2007; 69:1293-8.
33. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J. Environ. Sci. Health C Environ.* 2009; 27:120-39.
34. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys.* 1986; 246:501-14.
35. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002; 82:47-95.
36. Ed. SJ. *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.
37. Kawanishi S, Hiraku Y, S. O. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat Res.* 2001; 488:65-76.
38. Kroese LJ, Scheffer PG. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and cardiovascular disease: a systematic review. *Curr Atheroscler Rep.* 2014; 16:452.
39. Comparison of different methods of measuring 8-oxoguanine as a marker of oxidative DNA damage. ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage). *Free Radic Res* 2000; 32:333-41.
40. Lin PH, Lee SH, Su CP, Wei YH. Oxidative damage to mitochondrial DNA in atrial muscle of patients with atrial fibrillation. *Free Radic Biol Med.* 2003; 35:1310-8.
41. Tsai CC, Wu SB, Cheng CY, Kao SC, Kau HC, Chiou SH, et al. Increased oxidative DNA damage, lipid peroxidation, and reactive oxygen species in cultured orbital fibroblasts from patients with Graves' ophthalmopathy: evidence that oxidative stress has a role in this disorder. *Eye.* 2010; 24:1520-5.

42. Udomsinprasert W, Kitkumthorn N, Mutirangura A, Chongsrisawat V, Poovorawan Y, Honsawek S. Global methylation, oxidative stress, and relative telomere length in biliary atresia patients. *Sci Rep*. 2016; 6:26969.
43. Diotti R, Loayza D. Shelterin complex and associated factors at human telomeres. *Nucleus*. 2011; 2:119-35.
44. Friedrich U, Griesse EU, Schwab M, Fritz P, Thon KP, Klotz U. Telomere length in different tissues of elderly patients. *Mech Ageing Dev*. 2000; 119:89-99.
45. Giardini MA, Segatto M, da Silva MS, Nunes VS, Cano MI. Telomere and telomerase biology. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2014; 125:1-40.
46. De Felice B, Wilson RR, Nacca M. Telomere shortening may be associated with human keloids. *BMC Med Genet*. 2009; 10.
47. Takahashi K, Nishida H, Takeda H, Shin K. Telomere length in leukocytes and cultured gingival fibroblasts from patients with aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 2004; 75:84-90.
48. Udomsinprasert W, Poovorawan Y, Chongsrisawat V, Vejchapipat P, Zhan D, Honsawek S. Telomere Length in Peripheral Blood Leukocytes Is Associated with Severity of Biliary Atresia. *PloS one*. 2015; 10:e0134689.
49. Kveiborg M, Kassem M, Langdahl B, Eriksen EF, Clark BFC, Rattan SIS. Telomere shortening during aging of human osteoblasts in vitro and leukocytes in vivo: lack of excessive telomere loss in osteoporotic patients. *Mech Ageing Dev*. 1999; 106:261-71.
50. Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Accelerated cellular senescence in degenerate intervertebral discs: a possible role in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9:R45.
51. Martin JA, Buckwalter JA. The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am*. 2003; 85a:106-10.
52. Jeong SW, Lee JS, KW. K. In vitro lifespan and senescence mechanisms of human nucleus pulposus chondrocytes. *Spine J*. 2014; 14:499-504.
53. Lee JS, Jeong SW, Cho SW, Juhn JP, KW. K. Relationship between Initial telomere length, initial telomerase activity, age, and replicative capacity of

- nucleus pulposus chondrocytes in human intervertebral discs: What is a predictor of replicative potential? . PLoS One. 2015; 10:e0144177.
54. von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. Trends Biochem Sci. 2002; 27:339-44.
  55. Oikawa S, Kawanishi S. Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. FEBS Lett. 1999; 453:365-8.
  56. Ma D, Zhu W, Hu S, Yu X, Y. Y. Association between oxidative stress and telomere length in Type 1 and Type 2 diabetic patients. J Endocrinol Invest 2013; 36:1032-7.
  57. Zhang J, Li X, Mueller M, Wang Y, Zong C, Deng N, et al. Systematic characterization of the murine mitochondrial proteome using functionally validated cardiac mitochondria. Proteomics. 2008; 8:1564-75.
  58. Henze K, Martin W. Evolutionary biology: Essence of mitochondria. Nature. 2003; 426:127-8.
  59. Lin CS, Wang LS, Tsai CM, Wei YH. Low copy number and low oxidative damage of mitochondrial DNA are associated with tumor progression in lung cancer tissues after neoadjuvant chemotherapy. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2008; 7:954-8.
  60. Lotz M, Blanco FJ, von Kempis J, Dudler J, Maier R, Villiger PM, et al. Cytokine regulation of chondrocyte functions. J Rheumatol Suppl. 1995; 43:104-8.
  61. Fang H, Liu X, Shen L, Li F, Liu Y, Chi H, et al. Role of mtDNA haplogroups in the prevalence of knee osteoarthritis in a southern Chinese population. Int J Mol Sci. 2014; 15:2646-59.
  62. Sahin E, DePinho RA. Axis of ageing: telomeres, p53 and mitochondria. Nat Rev Mol Cell Biol. 2012; 13:397-404.
  63. Kim JH, Kim HK, Ko JH, Bang H, DC. L. The relationship between leukocyte mitochondrial DNA copy number and telomere length in community-dwelling elderly women. PloS one. 2013; 8:e67227.
  64. Monickaraj F, Aravind S, Gokulakrishnan K, Sathishkumar C, Prabu P, Prabu D, et al. Accelerated aging as evidenced by increased telomere shortening and

- mitochondrial DNA depletion in patients with type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem.* 2012; 365:343-50.
65. Alegria-Torres JA, Velazquez-Villafana M, Lopez-Gutierrez JM, Chagoyan-Martinez MM, Rocha-Amador DO, Costilla-Salazar R, et al. Association of Leukocyte Telomere Length and Mitochondrial DNA Copy Number in Children from Salamanca, Mexico. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2016; 20:654-9.
  66. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol.* 2011; 192:547-56.
  67. de Lange T. Telomere capping—one strand fits all. *Science.* 2001; 292:1075–6.
  68. Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology.* 2004; 5:1-10.
  69. Mathon NF, Lloyd AC. Cell senescence and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001; 1:203-13.
  70. Adnot S, Amsellem V, Boyer L, Marcos E, Saker M, Houssaini A, et al. Telomere dysfunction and cell senescence in chronic lung diseases: therapeutic potential. *Pharmacol Ther.* 2015; 153:125-34.
  71. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A novel biomarker identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92:9363–7.
  72. B.Y L. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell.* 2006; 5:187–95.
  73. Li J, Pei M. Cell senescence: a challenge in cartilage engineering and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2012; 18:270-87.
  74. Muller KC, Welker L, Paasch K, Feindt B, Erpenbeck V, Hohlfield J, et al. Lung fibroblasts from patients with emphysema show markers of senescence in vitro. *Respir Res.* 2006; 7:32.
  75. Kim KW, Chung HN, Ha KY, Lee JS, Kim YY. Senescence mechanisms of nucleus pulposus chondrocytes in human intervertebral discs. *Spine J.* 2009; 9:658-66.

76. Li C, Wei GJ, Xu L, Rong JS, Tao SQ, Wang YS. The involvement of senescence induced by the telomere shortness in the decline of osteogenic differentiation in BMSCs. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017; 21:1117-24.
77. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30:e47.
78. Chen Y, Zhang J, Huang X, Zhang J, Zhou X, Hu J, et al. High leukocyte mitochondrial DNA content contributes to poor prognosis in glioma patients through its immunosuppressive effect. *Br J Cancer*. 2015; 113:99-106.
79. Rhee DB, Ghosh A, Lu J, Bohr VA, Y L. Factors that influence telomeric oxidative base damage and repair by DNA glycosylase OGG1. *DNA Repair (Amst)*. 2011; 10:34-44.
80. Alonso-Alvarez C, Bertrand S, Faivre B, Chastel O, Sorci G. Testosterone and oxidative stress: the oxidation handicap hypothesis. *Proc Biol Sci*. 2007; 274:819-25.
81. Viña J, Borrás C, Gambini J, Sastre J, FV P. Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. *FEBS Lett*. 2005; 579:2541-5.
82. Grattagliano I, de Bari O, Bernardo TC, Oliveira PJ, Wang DQ, Portincasa P. Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease--from origin to propagation. *Clin Biochem*. 2012; 45:610-8.
83. Soto-Hermida A, Fernandez-Moreno M, Oreiro N, Fernandez-Lopez C, Pertega S, Cortes-Pereira E, et al. Mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups influence the progression of knee osteoarthritis. Data from the Osteoarthritis Initiative (OAI). *PloS one*. 2014; 9:e112735.
84. Haber M, Youhanna SC, Balanovsky O, Saade S, Martinez-Cruz B, Ghassibe-Sabbagh M, et al. mtDNA lineages reveal coronary artery disease-associated structures in the Lebanese population. *Ann Hum Genet*. 2012; 76:1-8.
85. Pyle A, Anugrha H, Kurzawa-Akanbi M, Yarnall A, Burn D, G H. Reduced mitochondrial DNA copy number is a biomarker of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2016; 38:216.

86. Kamfar S, Alavian S, Houshmand M, Yadegarazari R, Zarei S, A K. Liver mitochondrial DNA copy number and deletion levels may contribute to nonalcoholic fatty liver disease susceptibility. *Hepat Mon.* 2016; 16:e40774.
87. Frahm T, Mohamed SA, Bruse P, Gemund C, Oehmichen M, Meissner C. Lack of age-related increase of mitochondrial DNA amount in brain, skeletal muscle and human heart. *Mech Ageing Dev.* 2005; 126:1192-200.
88. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.* 2000; 21:361-70.
89. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 2004; 266:37-56.
90. Dede FO, Ozden FO, Avci B. 8-hydroxy-deoxyguanosine levels in gingival crevicular fluid and saliva in patients with chronic periodontitis after initial periodontal treatment. *J Periodontol.* 2013; 84:821-8.
91. Guentsch A, Preshaw PM, Bremer-Streck S, Klinger G, Glockmann E, Sigusch BW. Lipid peroxidation and antioxidant activity in saliva of periodontitis patients: effect of smoking and periodontal treatment. *Clin Oral Investig.* 2008; 12:345-52.
92. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003; 17:1195-214.
93. Roberts S, Evans EH, Kletsas D, Jaffray DC, Eisenstein SM. Senescence in human intervertebral discs. *Eur Spine J.* 2006; 15:S312-6.
94. Feng C, Liu H, Yang M, Zhang Y, Huang B, Zhou Y. Disc cell senescence in intervertebral disc degeneration: Causes and molecular pathways. *Cell cycle.* 2016; 15:1674-84.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY



## การเตรียมสารเคมี

การเตรียม phosphate buffer saline (PBS)

- ชั่ง sodium chloride (NaCl) 8 กรัม
- ชั่ง di-sodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 1.44 กรัม
- ชั่ง potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0.204 กรัม
- ชั่ง potassium chloride (KCl) 0.2 กรัม
- เทสารทั้งหมดลงในขวดแก้วผ่านการฆ่าเชื้อ เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 800 ml
- ปรับ pH อยู่ในช่วง 7.4-7.8
- เติมน้ำส่วนที่เหลือลงในขวด ปริมาตรสุดท้าย 1000 ml

## การคำนวณ relative telomere length และจำนวน mtDNA copy number

### Relative telomere length

คำนวณโดยใช้สูตร  $\Delta\Delta \text{Ct} = \Delta\text{Ct} (\text{sample}) - \Delta\text{Ct} (\text{reference})$

$$\Delta\text{Ct} (\text{sample}) = \text{Ct} (\text{telomere of sample}) - \text{Ct} (\text{single copy gene of sample})$$

$$\Delta\text{Ct} (\text{reference}) = \text{Ct} (\text{telomere of ref}) - \text{Ct} (\text{single copy gene of ref})$$

ตัวอย่าง  $\Delta\text{Ct} (\text{patho LF}) = \text{Ct} (\text{telomere of patho LF}) - \text{Ct} (\text{single copy gene of patho LF})$

แทนค่า  $\Delta\text{Ct} (\text{patho LF}) = (12.65) - (22.51) = -9.85$

$$\Delta\text{Ct} (\text{reference}) = \text{Ct} (\text{telomere of ref}) - \text{Ct} (\text{single copy gene of ref})$$

$$\Delta\text{Ct} (\text{reference}) = (13.07) - (22.49) = -9.42$$

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

$$\Delta\Delta \text{Ct} = (-9.85) - (-9.42) = -0.43$$

ฉะนั้นค่า relative telomere length ในชิ้นเอ็น LF ระดับที่หนาตัว เท่ากับ

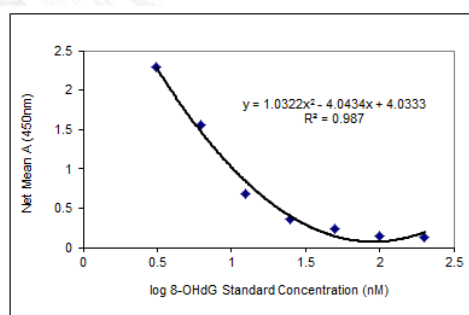
$$2^{(-\Delta\Delta \text{Ct})} = 2^{-(-0.43)} = 1.35$$

จากค่าที่ได้บ่งบอกว่า ชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระดับที่หนาตัว มีค่า relative telomere length ประมาณ 1.35

### การคำนวณระดับ 8-OHdG

- นำค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร คำนวณหาระดับ 8-OHdG จากสารละลาย standard ตัวอย่าง และ blank
- หักค่าดูดกลืนแสงจาก blank ในค่าดูดกลืนแสงของ 8-OHdG จากสารละลาย standard และ ตัวอย่าง
- วาดกราฟโดยให้แกน X คือ 8-OHdG standard concentration (nM) และแกน Y คือค่าดูดกลืนแสงจากตัวอย่าง
- เส้นมาตรฐาน (standard curve) ของ 8-OHdG แทนด้วยสมการ  $y = a+bx+cx^2$   
โดย  $y$  คือค่า relative absorbance  
 $x$  คือค่า log ของ 8-OHdG concentration (nM)  
 $a$ ,  $b$ , และ  $c$  คือค่าสัมประสิทธิ์ (coefficients)

Standard Curve		
Standard No.	[8-oxo-dG Standard] (nM)	Net Mean $A_{450nm}$
1	200	0.123
2	100	0.151
3	50	0.245
4	25	0.353
5	12.5	0.687
6	6.25	1.557
7	3.13	2.288



รูปแสดงค่าดูดกลืนแสงของ 8-OHdG ของสารละลาย standard

- จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากตัวอย่าง ใส่ลงในตาราง จะได้ค่าระดับของ 8-OHdG ในตัวอย่าง

### Unknown Samples

Sample No.	Net Mean $A_{450nm}$	[8-OHdG] (nM)	Dilution Factor	Corrected [8-OHdG] (nM)
1	0.456	22.386942	1	22.386942
2	0.231	37.000505	1	37.000505
3	0.52	19.999722	1	19.999722
4	0.44	23.060365	1	23.060365

รูปแสดงระดับ 8-OHdG จากตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานของ 8-OHdG

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อผู้วิจัยหลัก

(ภาษาไทย) นางสาวสินสุดา เดชสุภา

(ภาษาอังกฤษ) Miss. Sinsuda Dechsupa

ที่อยู่สามารถติดต่อได้ 201/145 หมู่ 1 ซอย 1 ถ.เทพารักษ์ ต.บางเสาธง

อ.บางเสาธง จ.สมุทรปราการ 10540

โทรศัพท์ 087-7835959

การศึกษา

- วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (พ.ศ. 2551-2554)

- วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตรการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ. 2557-2559)

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

- นำเสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง Relative telomere length and mtDNA copy number in Ligamentum flavum of lumbar spinal stenosis patients ในการประชุมวิชาการออร์โธปิดิกส์ระดับนานาชาติ ครั้งที่ 1 (ICORS 2016 – 1st International Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies) ระหว่างวันที่ 21-25 กันยายน พ.ศ.2559 ณ เมืองซีอาน สาธารณรัฐประชาชนจีน

- เผยแพร่ผลงานวิจัยระดับชาติเรื่อง การเปลี่ยนแปลงความยาวเทโลเมียร์ และจำนวนชุดไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ จากเซลล์ขึ้นเอ็นในโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบซ การศึกษานำร่อง ในจุฬาลงกรณ์เวชสาร เล่มที่ 61 ฉบับที่ 4 เดือนกรกฎาคม-สิงหาคม พ.ศ. 2560