

ความสัมพันธ์ของไฮโดโคโคกับตัวชี้วัดทางคลินิกภายหลังการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมและ
ความหลากหลายทางพันธุกรรมของอินเตอร์ลิวคินหกในผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม



นางสาวเบญจมาศ ดีไพศาลสกุล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

INFLAMMATORY CYTOKINES IN RELATION TO CLINICAL OUTCOMES FOLLOWING
TOTAL KNEE ARTHROPLASTY AND INTERLEUKIN-6 GENE POLYMORPHISM OF
KNEE OSTEOARTHRITIS

Miss Benjamad Deepaisarnsakul



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ความสัมพันธ์ของไซโตไคน์กับตัวชี้วัดทางคลินิกภายหลัง
การผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมและความหลากหลายทาง
พันธุกรรมของอินเตอร์ลิวคินหกในผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม
นางสาวเบญจมาศ ดีไพศาลสกุล

โดย

วิทยาศาสตร์การแพทย์

สาขาวิชา

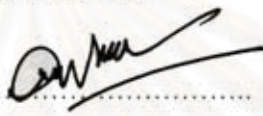
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์สิทธิศักดิ์ ھرรษาเวก

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

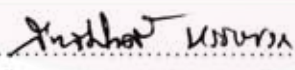
รองศาสตราจารย์ นายแพทย์อารี ตनावลี


คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

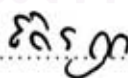

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์อดิศร ภัทราดุลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์สิทธิศักดิ์ ھرรษาเวก)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์อารี ตनावลี)


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

เบญจมาศ ตีไพศาลสกุล : ความสัมพันธ์ของไซโตไคน์กับตัวชี้วัดทางคลินิกภายหลังการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของอินเตอร์ลิวคินหกในผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม. (Inflammatory Cytokines in Relation to Clinical Outcomes Following Total Knee Arthroplasty and Interleukin-6 Gene Polymorphism of Knee Osteoarthritis) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. นพ.สิทธิศักดิ์ หารราชเวก, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ. นพ. อารี ตनावลี, 96หน้า.

การผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม เป็นวิธีการรักษาผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับความนิยมในปัจจุบัน ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นผู้สูงอายุ ภาวะแทรกซ้อนภายหลังการผ่าตัดที่สำคัญคือการอักเสบติดเชื้อ ปัจจุบันตัวชี้วัดสำหรับการติดตามการอักเสบ ได้แก่ erythrocyte sedimentation rate (ESR) และ C-reactive protein (CRP) จากการศึกษาที่ผ่านมาสารกลุ่มไซโตไคน์ เช่น interleukin-6 (IL-6) พบว่ามีความไวและความจำเพาะในการตรวจติดตามการอักเสบได้ดีกว่า ดังนั้นในการศึกษานี้จึงศึกษาตัวชี้วัดที่จำเพาะต่อผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม ได้แก่ ESR, CRP, IL-6 และอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่า จากผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัด 52 ราย จากผลการวิจัยพบว่า ระดับ ESR เพิ่มขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 หลังการผ่าตัด หลังจากนั้นระดับ ESR จึงมีแนวโน้มลดลงจนระดับใกล้เคียงกับระยะก่อนการผ่าตัดในสัปดาห์ที่ 6 หลังการผ่าตัด สำหรับระดับ CRP และ IL-6 มีค่าเพิ่มขึ้นจนถึงระดับสูงสุดในช่วง 24 ชั่วโมงภายหลังการผ่าตัด แล้วจึงเริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 2 หลังการผ่าตัด นอกจากนี้ผลการวัดอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่า พบว่าข้อเข่าข้างที่ทำการผ่าตัดมีอุณหภูมิสูงกว่าข้างปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) โดยอุณหภูมิผิวหนังลดลงใกล้เคียงกับข้อเข่าข้างปกติภายหลังจาก 26 สัปดาห์ของการผ่าตัด ทั้งนี้จากการศึกษา snip (single nucleotide polymorphism; SNP) IL-6 ตำแหน่ง -174 จากผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม 70 รายและกลุ่มควบคุม 100 ราย พบลักษณะของจีโนไทป์ 3 แบบ คือ GG, GC และ CC โดยมีความถี่ในกลุ่มผู้ป่วยเป็น 53, 16 และ 1 ตามลำดับ สำหรับความถี่ในกลุ่มควบคุมเป็น 88, 12 และ 0 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ด้วย logistic regression พบว่า GC และ เพศหญิง ไม่ได้เป็นปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (โดยมีค่า odds ratio เท่ากับ 2.21 และ 1.71 $p = 0.06$ และ 0.15 ตามลำดับ) ดังนั้น IL-6 อาจนำมาใช้ในการบ่งชี้ภาวะการอักเสบภายหลังการผ่าตัดได้

สาขาวิชา.....วิทยาศาสตร์การแพทย์.....
ปีการศึกษา.....2551.....

ลายมือชื่อนิสิต.....เบญจมาศ ตีไพศาลสกุล.....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5074793630 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : Total Knee Arthroplasty / Cytokines / Erythrocyte Sedimentation Rate / C-Reactive Protein / Single Nucleotide Polymorphism

BENJAMAD DEEPAISARNSAKUL: INFLAMMATORY CYTOKINES IN RELATION TO CLINICAL OUTCOMES FOLLOWING TOTAL KNEE ARTHROPLASTY AND INTERLEUKIN-6 GENE POLYMORPHISM OF KNEE OSTEOARTHRITIS. ADVISOR: ASST. PROF. SITTISAK HONSAWEK, PH.D., M.D.CO-ADVISOR : ASSOC.PROF. AREE TANAVALLEE, M.D., 96 pp.

Total knee arthroplasty (TKA) is a well-established surgical treatment for knee osteoarthritis patients. Most of the patients are aging. The most common complications after operation that orthopedic surgeons concerns are inflammation and infection of the surgical wound. Erythrocyte sedimentation rate (ESR) and C-reactive protein (CRP) are routinely used as inflammatory markers. Previous studies have demonstrated that interleukin-6 (IL-6) had sensitivity and specificity more than ESR and CRP. The aim of this study was to determine serum IL-6 level, ESR, CRP and knee skin temperature before and after TKA. The results revealed that ESR was elevated to maximum in 2 weeks after surgery and then went slightly down to nearly preoperative level within 6 months. CRP and IL-6 levels were maximum at 24 hours after surgery and will decreased within 2 weeks. Skin temperature of operative knee differed significantly ($p < 0.001$) compared with that of normal knee and was nearly normal at 6 months after surgery. Additionally, single nucleotide polymorphism (SNP) of -174 IL-6 from 70 osteoarthritis patients and 100 controls expressed GG, GC and CC genotype. Frequencies of the osteoarthritis patients were 53 GG, 16 GC, 1CC and frequencies of the controls were 88 GG, 12 GC, 0 CC, respectively. Logistic regression analysis showed GC and female independence with risk knee osteoarthritis (odds ratio 2.21 and 1.71, $p = 0.06$ and 0.15). The serum level of IL-6 could be useful to identify inflammation during the postoperative period.

Field of Study : Medical science Student's Signature *Benjamad Deepaisarnsakul*
 Academic Year : 2008 Advisor's Signature *Sittisak Honsawek*
 Co-Advisor's Signature *Aree Tanavalee*

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สามารถสำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ โดยได้รับความร่วมมือจากหลายฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ ผศ. นพ. สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อระดับปริญญาโท และให้คำแนะนำ คำสั่งสอน ตลอดช่วงระยะเวลาในการศึกษา และเป็นทีปรึกษาที่ดีในการทำวิทยานิพนธ์ทั้งในเรื่องการรวบรวมข้อมูล การทดลอง การทำรูปเล่ม และการนำเสนอ จนสำเร็จอย่างสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ รศ. นพ.อารี ตनावลี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความอนุเคราะห์ในการคัดกรองตัวอย่างผู้ป่วยที่ใช้ในการวิจัยเป็นอย่างดี ขอกราบขอบพระคุณ รศ. พญ.วิไล ชินธเนศ และ รศ. ดร. กอบธัม สติรกุล ประธานและกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ช่วยตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ช่วยประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆ ที่จะนำมาใช้ในการทำวิทยานิพนธ์และที่จะนำไปใช้ในการประกอบอาชีพในอนาคต ขอกราบขอบพระคุณ นพ. สีหัช งามอุโฆษ นพ. มนูญ คักดินาเกียรติกุล นพ. ธนา โรจน์ประดิษฐ์ นพ. สุกรี คุ้มรักษา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการคัดกรองและให้ความช่วยเหลือเก็บตัวอย่างทั้งหมดในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ นพ. กนก วุฒิวัดัญญูและภาคปริสติวิทยา สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือในวิธีการทดลอง อุปกรณ์สำหรับการวิจัยและการแปลผลการวิจัย ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านทั้งฝ่ายผู้ป่วยนอกและห้องผ่าตัด แผนกออโรโธปิดิกส์ ตึกผู้ป่วยเจริญสมศรีชั้น 4, 5 และ 6 ตึกผู้ป่วย ภาปร. 16 และ 17 ห้องปฏิบัติการชั้นสูตโรค ตึกภาปร.4 ที่ให้ความอนุเคราะห์และช่วยเหลือการเก็บตัวอย่าง ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการภาคชีวเคมีและฝ่ายบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือรอบด้าน ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์วิจัยคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ คำแนะนำในการใช้อุปกรณ์วิจัยภายในศูนย์วิจัย ขอขอบพระคุณทุนการศึกษาระหว่างเรียนจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้แก่ ทุนผู้ช่วยสอนและทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภชน์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ท้ายสุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เป็นผู้อุปการะทุกๆด้านของชีวิต ขอขอบคุณญาติพี่น้อง เพื่อนๆระดับปริญญาตรี ปริญญาโท และเพื่อนๆในห้องปฏิบัติการทุกคนที่ช่วยทำงานและคอยให้กำลังใจเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	3
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	4
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
วิธีดำเนินการวิจัย.....	5
กรอบแนวคิดวิจัย.....	6
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	7
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
โรคข้อเข่าเสื่อม.....	12
ไซโตไคน์.....	12
อัตราการตกของเม็ดเลือดแดง (ESR) และ C-reactive protein (CRP)	14
คุณสมบัติของยาลดการอักเสบ.....	15
การศึกษาความสัมพันธ์ของตัวชี้วัดภาวะการอักเสบในผู้ป่วยเปลี่ยนข้อเทียม.....	15
ความหลากหลายทางพันธุกรรมในมนุษย์.....	18
ปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอเรส.....	22
การศึกษาความสัมพันธ์ของ SNP IL-6 กับการเกิดโรค.....	23
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	26
ประชากร.....	26
เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	27

	หน้า
การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	30
การดำเนินการวิจัย.....	31
การวิเคราะห์ข้อมูล	42
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	43
ผลของการเปลี่ยนแปลง ESR, CRP และ IL-6.....	43
ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่า.....	50
ผลการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของตัวชี้วัด	52
ความสัมพันธ์ของระดับ IL-6 ในน้ำไขข้อและในซีรัม	53
ผลการศึกษา Restriction enzyme ที่เหมาะสมต่อ IL-6 polymorphism.....	55
ผลการตรวจหาจีโนไทป์ของ SNP IL-6.....	56
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	60
สรุปผลการวิจัย.....	60
อภิปรายผลการวิจัย.....	62
ข้อเสนอแนะ.....	66
รายการอ้างอิง.....	67
ภาคผนวก.....	71
ภาคผนวก ก.....	72
ภาคผนวก ข.....	79
ภาคผนวก ค.....	81
ภาคผนวก ง.....	83
ภาคผนวก จ.....	93
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	96

สารบัญตาราง

ตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของ primer IL-6 ที่ใช้ในการทำ PCR.....	35
ตารางที่ 2 ปริมาณสารต่าง ๆ สำหรับการทำให้ PCR.....	36
ตารางที่ 3 Condition สำหรับการทำให้ PCR	36
ตารางที่ 4 ปริมาณสารต่าง ๆ สำหรับการทำให้ ligation	37
ตารางที่ 5 ปริมาณสารต่าง ๆ สำหรับการทำให้ Colony PCR	38
ตารางที่ 6 Condition สำหรับการทำให้ colony PCR	39
ตารางที่ 7 ปริมาณสารต่าง ๆ สำหรับการทำให้ PCR เพื่อหา SNP IL-6	40
ตารางที่ 8 Condition สำหรับการทำให้ PCR เพื่อหา SNP IL-6.....	41
ตารางที่ 9 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำให้ digestion	41
ตารางที่ 10 ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียม 8% polyacrylamide gel ต่อ 1 gel.....	42
ตารางที่ 11 ค่ามัธยฐานของตัวชี้วัดต่าง ๆ ในแต่ละช่วงเวลา.....	43
ตารางที่ 12 ค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่าที่ได้รับการผ่าตัดและไม่ได้ผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม	50
ตารางที่ 13 ลำดับเบสของ IL-6 ในผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มควบคุม.....	55
ตารางที่ 14 การกระจายตัวของจีโนไทป์, อัลลีลของ IL-6 และเพศ	58
ตารางที่ 15 ปัจจัยที่มีผลต่อความเสี่ยงของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมวิเคราะห์โดยใช้ Logistic regression.....	59
ตารางที่ 16 การเปรียบเทียบเวลาที่ระดับของตัวชี้วัดขึ้นสูงสุดของผู้ป่วยผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม ระหว่างการศึกษาในครั้งนี้และการศึกษาที่ผ่านมา	61

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
รูปที่ 1 ลักษณะข้อเข่าของผู้ป่วยที่เป็นโรคข้อเข่าเสื่อม.....	9
รูปที่ 2 ภาพถ่ายรังสีบริเวณข้อเข่าซึ่งแบ่งตามความรุนแรงของโรคในแต่ละระดับตามหลักเกณฑ์ ของ Kellegren และ Lawrence.....	10
รูปที่ 3 ภาพถ่ายรังสีบริเวณข้อเข่าของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม.....	11
รูปที่ 4 การทำงานของเซลล์ชนิดต่าง ๆ เมื่อมีการอักเสบ.....	13
รูปที่ 5 การกระตุ้นเซลล์ต้นของไซโตไคน์ที่ทำให้มีการหลั่งโปรตีนชนิดต่าง ๆ	15
รูปที่ 6 ความหลากหลายทางพันธุกรรมชนิด RFLPs ซึ่งสามารถตรวจสอบความแตกต่างในลำดับ เบสได้โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoR I</i>	19
รูปที่ 7 ลักษณะของ VNTR ชนิด minisatellite และ microsatellite	20
รูปที่ 8 แผนภาพแสดงตัวอย่าง SNP จำนวน 1 ตำแหน่ง.....	21
รูปที่ 9 วิธีการเก็บตัวอย่าง	32
รูปที่ 10 กราฟแสดงความเปลี่ยนแปลงของ ESR ในเวลาที่แตกต่างกัน.....	45
รูปที่ 11 กราฟแสดงความเปลี่ยนแปลงของ CRP ในเวลาที่แตกต่างกัน.....	47
รูปที่ 12 กราฟแสดงความเปลี่ยนแปลงของ IL-6 ในเวลาที่แตกต่างกัน.....	49
รูปที่ 13 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิบริเวณเข่าทั้ง 2 ข้างของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัด เปลี่ยนข้อเข่าเทียม.....	51
รูปที่ 14 กราฟแสดงความเปลี่ยนแปลงของ biomarker ในเวลาที่แตกต่างกัน.....	53
รูปที่ 15 กราฟแสดงการเปรียบเทียบระดับของ IL-6 ในน้ำไขข้อและในซีรัม.....	54
รูปที่ 16 ดีเอ็นเอจากการทำ PCR ขนาด 198 bp.....	56
รูปที่ 17 ลักษณะของดีเอ็นเอในแบบจีโนไทป์ต่าง ๆ.....	57
รูปที่ 18 ลักษณะของดีเอ็นเอในแบบจีโนไทป์ต่าง ๆ.....	57

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคข้อเข่าเสื่อม (knee osteoarthritis) เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความทุกข์ ความทรมานแก่ผู้ป่วยเป็นอย่างมาก อีกทั้งยังทำให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยด้อยลงและไม่สามารถดำรงชีวิตประจำวันได้อย่างปกติ และอาจเป็นปัจจัยเสริมหรือพบร่วมกับโรคในระบบอื่น เช่น โรคหัวใจ และหลอดเลือด โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน และภาวะอ้วน เป็นต้น เนื่องจากผู้ป่วยไม่สามารถดำเนินกิจกรรมตามปกติหรือไม่สามารถออกกำลังกายบางชนิดได้ รวมทั้งผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นผู้สูงอายุ และมีน้ำหนักตัวค่อนข้างมาก ดังนั้นการรักษาโรคดังกล่าวจึงเป็นสิ่งจำเป็น แม้ว่าการรักษาจะไม่สามารถทำให้กลับมาอยู่ในสภาพปกติได้ แต่การรักษาโรคนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อช่วยในการบรรเทาอาการเจ็บปวด และลดปัญหาเรื่องข้อติดหรือข้อโก่งงอ เป็นต้น ในกรณีที่ผู้ป่วยมีอาการรุนแรงและข้อเข่าโก่งพิการมากจำเป็นต้องได้รับการรักษาที่ถูกต้องเหมาะสม วิธีการรักษาที่ได้รับความนิยมในปัจจุบันคือ การผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม (total knee arthroplasty: TKA) เนื่องจากได้ผลดี ผู้ป่วยฟื้นตัวเร็วมีโรคแทรกซ้อนภายหลังการผ่าตัดน้อย และใช้เวลาในการอยู่ในโรงพยาบาลไม่นานนัก

สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงและพึงระวังเป็นอย่างมากคือ การอักเสบ (inflammation) และการติดเชื้อ (infection) ของแผลภายหลังการผ่าตัด เนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นผู้สูงอายุ ซึ่งหากเกิดการอักเสบติดเชื้อแล้วจะทำให้การรักษาเป็นไปได้ยากและใช้ระยะเวลาในการพักฟื้นที่โรงพยาบาลนานกว่าปกติ รวมทั้งต้องมาทำการตรวจติดตามหลังการผ่าตัด ดังนั้นถ้าหากสามารถวินิจฉัยว่ามีการเกิดการติดเชื้อภายหลังการผ่าตัดได้อย่างรวดเร็วก็จะทำให้สามารถช่วยให้การรักษามีประสิทธิภาพมากขึ้น

ในปัจจุบันพบว่ามีการอักเสบ (inflammation) อยู่หลายชนิดที่สามารถใช้ในการประเมินถึงภาวะการอักเสบภายหลังการผ่าตัดได้ แต่ก่อนแพทย์นิยมเลือกใช้เป็นตัวบ่งชี้ตามปกติคือ erythrocyte sedimentation rate (ESR) และ C-reactive protein (CRP) เนื่องจากสามารถบ่งบอกถึงการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของร่างกายแบบ acute phase ได้ โดยภายหลังถูกกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอมแล้วจะทำให้ค่าทั้ง 2 ชนิดเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วและจะลดลงอย่างช้าๆ ในช่วงระยะเวลาสั้นๆ ทำให้สามารถสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน และค่าใช้ง่ายในการตรวจไม่เปลี่ยนแปลงมากจนเกินไป^(1, 2, 3) ดังนั้นจึงมีความสำคัญต่อการวินิจฉัยภาวะการอักเสบติดเชื้อภายหลังการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม แต่ก็ยังพบว่าการใช้ ESR และ CRP เพื่อพิจารณาถึงภาวะการอักเสบติดเชื้อภายหลังการผ่าตัดยังไม่ชัดเจนพอ เนื่องจากว่าค่าดังกล่าวไม่จำเพาะเจาะจงกับภาวะการ

อักเสบติดเชื้อก่อนและหลังการผ่าตัดและยังมีความแปรปรวนอย่างมากทั้งในช่วงก่อนและหลังการผ่าตัดเช่นกัน^(4, 5, 6)

จากการศึกษาของ Di Cesare PE. และคณะ ในปี ค.ศ.2005 พบว่าสารจำพวกไซโตไคน์ (cytokines) ได้แก่ interleukin 6 (IL-6) สามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยการเกิดภาวะการติดเชื้อภายหลังการผ่าตัดในผู้ป่วยที่ทำการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมได้ โดยมีค่าความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) positive predictive value, negative predictive value และความถูกต้อง (accuracy) เท่ากับ 1.0, 0.95, 0.89, 1.0 และ 97% ตามลำดับ โดยที่การเพิ่มขึ้นของ IL-6 สัมพันธ์กับภาวะการติดเชื้อบริเวณข้อเทียมของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าและข้อสะโพกเทียม ดังนั้นสามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยกับผู้ป่วยในภาวะดังกล่าวได้⁽⁷⁾

จากที่ผ่านมาโดยส่วนใหญ่แพทย์ให้ความสำคัญกับเรื่องภาวะการอักเสบติดเชื้อของผู้ป่วยในช่วงระยะแรกๆ ภายหลังจากการผ่าตัดและพักฟื้นอยู่ในโรงพยาบาลเท่านั้น แต่สำหรับในผู้ป่วยที่ทำการเปลี่ยนข้อเข่าเทียมแล้วการระวังเรื่องการอักเสบติดเชื้อก็ยังเป็นเรื่องที่สำคัญถึงแม้ว่าระยะเวลาในการผ่าตัดจะผ่านไปนานแล้วก็ตาม หากมีการอักเสบติดเชื้อเกิดขึ้นมาอีกอาจทำให้การรักษายุ่งยากขึ้น ถ้าหากมีการอักเสบรุนแรงมากก็อาจจำเป็นต้องได้รับการผ่าตัดซ้ำซึ่งทำให้ผู้ป่วยต้องเสียเวลาและค่าใช้จ่ายในการรักษามากขึ้น

เนื่องจากการศึกษาลักษณะความสัมพันธ์ของ IL-6 กับค่า ESR, CRP และ อุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่า ที่ผ่านมามีพบว่าไม่ได้ศึกษาจำเพาะเจาะจงกับผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมเท่านั้น และส่วนใหญ่จะทำการวิจัยในผู้ป่วย osteoarthritis (OA) ร่วมกับผู้ป่วย rheumatoid arthritis (RA) ในช่วงสัปดาห์แรกหลังการผ่าตัดเท่านั้น ดังนั้นการศึกษานี้จึงทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของ IL-6 กับค่า ESR, CRP และ อุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่า ในผู้ป่วย osteoarthritis ที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมตั้งแต่ช่วงเริ่มต้นก่อนการผ่าตัด จนถึงระยะเวลาภายหลังการผ่าตัด 6 เดือน และศึกษาลักษณะการแสดงออกของ IL-6, ESR, CRP และ อุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่า ในผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคที่แตกต่างกันเพื่อประเมินการฟื้นตัวภายหลังการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม

นอกจากนั้นการศึกษาก็ยังพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) ของยีน IL-6 ในโครโมโซมคู่ที่ 7 เหนือส่วนของ promoter ซึ่งมีความยาว 303 คู่เบส และในตำแหน่งที่ 174 ของ single nucleotide polymorphism (SNP) หรือ SNP ที่มีจีโนไทป์ (genotype) 3 ลักษณะ ได้แก่ GG, GC และ CC มีความสัมพันธ์กับความชุกของโรค (prevalence) อุบัติการณ์ (incidence) หรือ การทำนายอาการของโรคหลายโรค ได้แก่ โรคอัลไซเมอร์ โรคหลอดเลือดแข็งตัว (atherosclerosis) โรคหัวใจและหลอดเลือด

(cardiovascular) โรคมะเร็ง โรคเบาหวานชนิดขาดอินซูลิน โรคกระดูกพรุน การติดเชื้อในกระแสโลหิต และโรคข้ออักเสบเรื้อรังในเด็ก (systemic-onset juvenile chronic arthritis) เป็นต้น⁽⁸⁾

ดังนั้นในการศึกษานี้จึงศึกษาถึงความสัมพันธ์ของจีโนไทป์ SNP IL-6 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมเพื่อศึกษาถึงจีโนไทป์ที่จะทำให้เกิดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคซึ่งอาจนำไปใช้เพื่อเป็นแนวทางในการวินิจฉัยหรือการรักษาโรคดังกล่าวต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาตรวจวัดระดับและการเปลี่ยนแปลงของ IL-6, ESR, CRP และ อุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่า เพื่อใช้เป็นค่ามาตรฐานของผู้ป่วยที่มารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง IL-6, ESR, CRP และ อุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่า ในผู้ป่วยที่มารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม
3. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ IL-6 ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

ขอบเขตของการวิจัย

1. ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการรักษา แผนกออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ซึ่งยินยอมเข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจตลอดระยะเวลาของการศึกษาวิจัย
2. กลุ่มควบคุม (control) เป็นอาสาสมัครคนปกติที่ไม่มีประวัติการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ที่มีอายุและเพศตรงใกล้เคียงกับผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม ซึ่งมารับการตรวจสุขภาพประจำปี

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. เครื่องมือและชุดการทดสอบต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำของการทดสอบเครื่องมือและชุดการทดสอบนั้นๆ
2. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยเป็นผู้ป่วยที่มารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม และผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย
3. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยให้ความร่วมมือด้วยความเต็มใจตลอดการศึกษาวิจัย โดยมีการลงลายมือชื่อในใบยินยอม (informed consent) ด้วยความสมัครใจ ภายหลังได้รับการชี้แจงให้ทราบในทุกด้าน ซึ่งรวมถึงความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น

ข้อจำกัดของการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างของผู้ป่วยแต่ละรายจึงต้องใช้ระยะเวลาในการเก็บ 6 เดือน แต่เนื่องจากผู้ทำการวิจัยมีเวลาในการทำวิจัยเพียง 1 ปี จึงทำให้ขนาดของประชากรตัวอย่างมีจำนวนน้อย

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

ELISA - วิธีการตรวจหาสารโดยอาศัยหลักการการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี โดยทำการเคลือบพื้นผิวของ plate ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการตรวจหาในสารตัวอย่าง ซึ่งจะถูกลบไปพร้อมกับแอนติเจน ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์คอนจูเกต (enzyme conjugate) โดยทั้งคู่จะแย่งกันลงไปจับกับแอนติบอดีที่เคลือบผิวเอาไว้ซึ่งจะขึ้นอยู่กับปริมาณกับสารที่ต้องการตรวจหา ดังนั้นถ้าตัวอย่างมีแอนติเจนมากกว่าก็จะจับกับแอนติบอดีได้มากกว่า และเมื่อเติมสับสเตรท (substrate) ก็จะได้สีที่เข้มต่างกันตามจำนวนของแอนติเจนและแอนติบอดีคอนจูเกต

Buffy coat - ชั้นของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้จากการปั่นแยกพลาสมา กับเซลล์เม็ดเลือดแดงออกจากกัน

Ligation - การเชื่อมต่อกันของโมเลกุลดีเอ็นเอ

Transformation - การนำโมเลกุลของดีเอ็นเอ เข้าไปในสิ่งมีชีวิต ส่วนใหญ่จะใช้แบคทีเรีย เพื่อให้มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมไปยังรุ่นต่อไป

Plasmid - Extrachromosomal หรือ circular DNA ที่พบในแบคทีเรีย

Gel electrophoresis - เทคนิคที่ใช้ในการแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือ โปรตีนที่สนใจ โดยอาศัยหลักการความสามารถในการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันในสนามไฟฟ้า

Genotype - รูปแบบที่พบในอัลลีลที่มีความจำเพาะในแต่ละบุคคล

Promoter - ลำดับของดีเอ็นเอ ซึ่ง RNA polymerase ไปจับเพื่อเริ่มต้นกระบวนการสังเคราะห์แม่แบบของ RNA

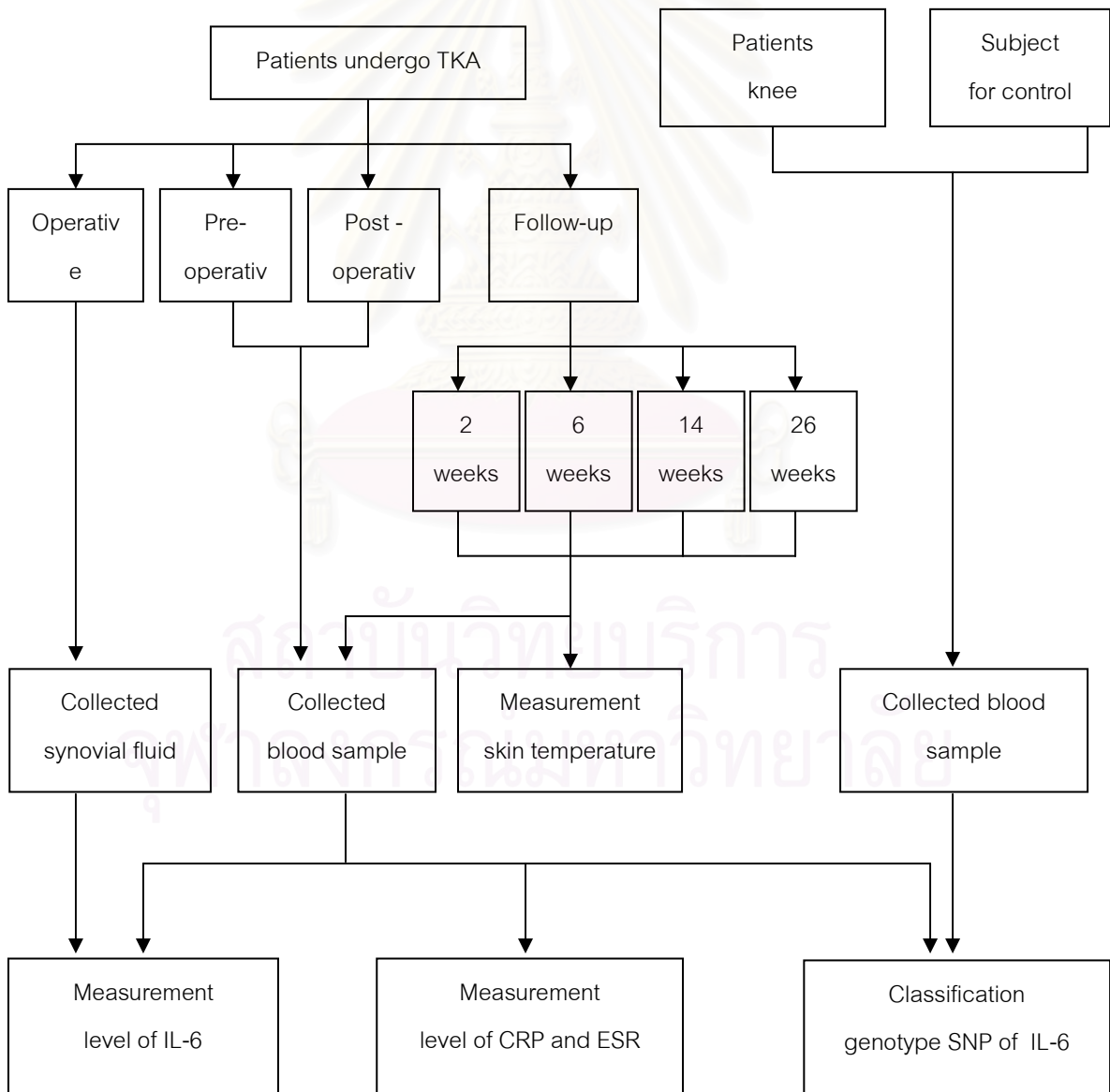
Primer - Oligonucleotide หรือ ดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ที่ใช้ในการเป็นแม่แบบของการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่

Restriction enzyme - เอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรียที่สามารถตัดสายดีเอ็นเอ ในตำแหน่งที่จำเพาะ

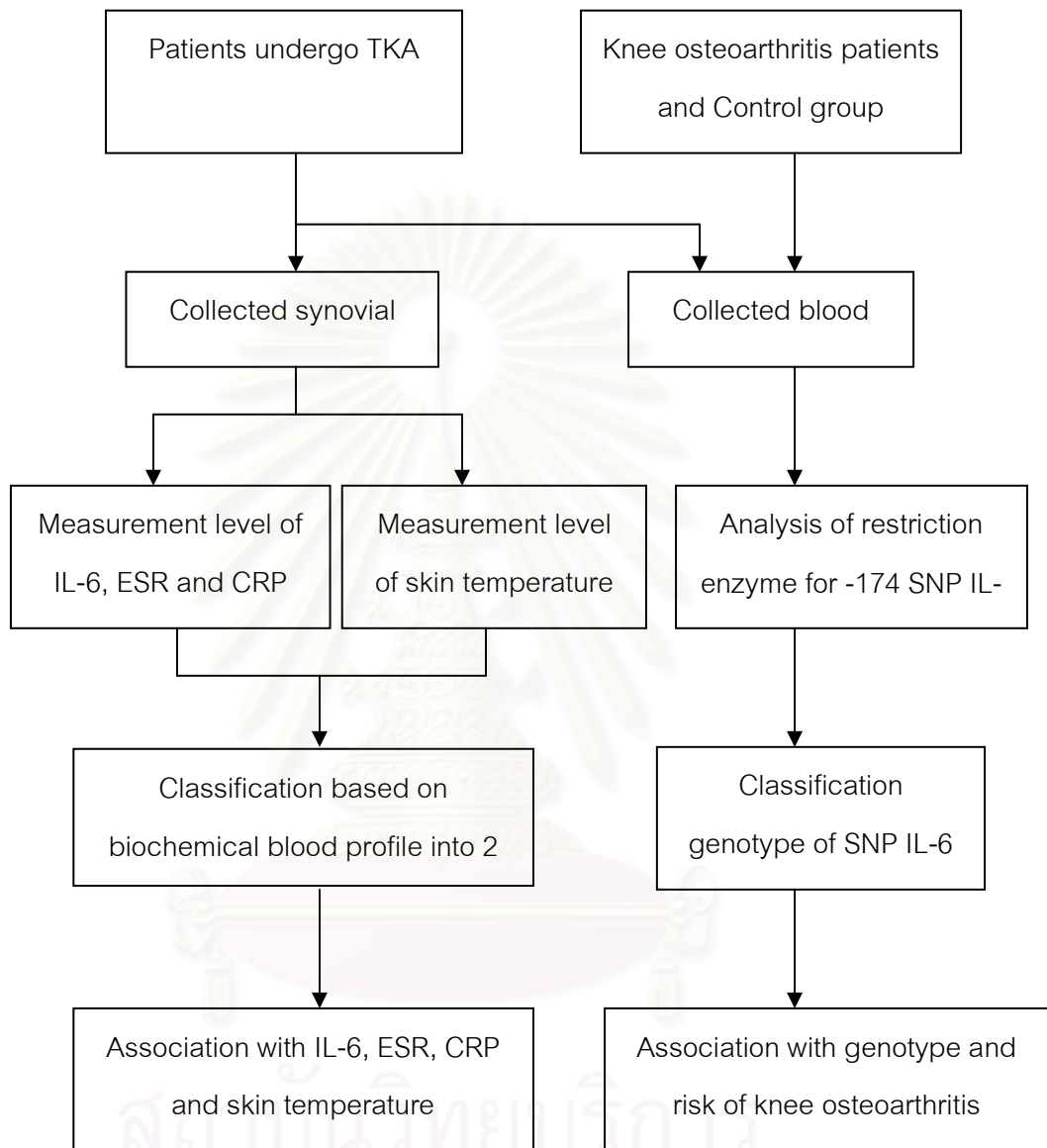
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเป็นแนวทางให้แพทย์สามารถใช้เป็นมาตรฐานในการประเมินการอักเสบติดเชื้อในภายหลังของผู้ป่วยที่ทำการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมได้
2. เพื่อใช้เป็นประโยชน์ในการประเมินถึงภาวะการฟื้นตัวของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม
3. เพื่อทราบถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม โดยอาจใช้ในการประยุกต์ทางคลินิกให้ทราบถึงปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมต่อการเกิดโรค

วิธีดำเนินการวิจัย



กรอบแนวคิดการวิจัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. ยื่นเสนอโครงร่างวิทยานิพนธ์ต่อคณะกรรมการวิทยานิพนธ์ หลักสูตร วท.ม. (สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ยื่นเสนอโครงร่างวิทยานิพนธ์ต่อคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมในการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. ดำเนินการวิจัย รวบรวมข้อมูล สรุปและวิเคราะห์ผลการวิจัย
4. จัดทำบทความวิจัยและโปสเตอร์จากบางส่วนของวิทยานิพนธ์ เพื่อตีพิมพ์และนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 12 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคข้อเข่าเสื่อม (Knee Osteoarthritis)

โรคข้อเข่าเสื่อม เป็นโรคที่เกิดจากการที่กระดูกอ่อนผิวข้อมีการเสื่อมสภาพทำให้กระดูกอ่อนไม่สามารถรองรับน้ำหนักได้ และมีการสูญเสียคุณสมบัติของน้ำไขข้อ (synovial fluid) ดังนั้นในขณะที่ข้อเข่ามีการเคลื่อนไหวจะเกิดการเสียดสีของกระดูกอ่อนผิวข้อและเกิดการสึกหรอของกระดูกอ่อนภายในข้อ เมื่อข้อเข่าเสื่อมมากขึ้นทำให้กระดูกอ่อน (cartilage) มีขนาดบางลง ผิวขรุขระ และเกิดมีกระดูกงอกขึ้นมาใหม่เรียกว่า osteophytes เมื่อข้ออักเสบก็จะมีการสร้างน้ำไขข้อเพิ่มขึ้นทำให้ข้อเข่ากระดูกและเอ็นรอบข้อมีขนาดใหญ่ขึ้น กล้ามเนื้อลีบลง การเปลี่ยนแปลงของข้อดังกล่าวจะดำเนินไปอย่างช้าๆ ในรายที่เป็นรุนแรงกระดูกอ่อนจะบางมาก ปลายกระดูกเข้ามาชนกันทำให้เวลาขยับจึงเกิดเสียงเสียดสีในข้อ

ปัจจัยที่ทำให้เกิดข้อเข่าเสื่อม ได้แก่ อายุ ส่วนใหญ่จะพบในผู้สูงอายุเนื่องจากมีอายุการใช้งานของข้อมาก เพศ โดยเฉพาะเพศหญิงมีโอกาสเกิดข้อเข่าเสื่อมมากกว่าเพศชาย เพราะความแข็งแรงของกระดูกและกล้ามเนื้อน้อยกว่าเพศชาย น้ำหนักตัว ยิ่งมีน้ำหนักตัวมากจะทำให้ข้อเข่าเสื่อมเร็วขึ้น การใช้ข้อเข่า สำหรับผู้ที่ชอบนั่งยองๆ หรือ ชัดสมาธิส่วนใหญ่พบข้อเข่าเสื่อมได้เร็ว หากมีการได้รับการบาดเจ็บบริเวณข้อเข่าสามารถทำให้เกิดข้อเข่าเสื่อมได้ และความแข็งแรงของกล้ามเนื้อและกระดูก โดยผู้ที่ออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอผู้ที่ควบคุมน้ำหนักให้อยู่ในเกณฑ์ปกติและได้รับแคลเซียมในปริมาณที่เพียงพอสามารถช่วยชะลอการเสื่อมของข้อเข่าได้ แต่ในผู้ป่วยที่มีโรคข้อเรื้อรัง เช่น โรครูมาตอยด์ โรคเกาต์ หรือผู้ที่ได้รับอุบัติเหตุบริเวณข้อเข่าอาจจะทำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในขณะที่อายุยังไม่แก่ก็ได้

ลักษณะของโรคข้อเข่าเสื่อม สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ข้อเข่าเสื่อมชนิดปฐมภูมิ (primary osteoarthritis) เป็นภาวะที่ข้อเข่าเกิดความผิดปกติไม่ทราบสาเหตุ อาจเนื่องจากสภาพร่างกายที่เปลี่ยนแปลงแบบถดถอย ซึ่งสัมพันธ์โดยตรงกับอายุที่มากขึ้น และข้อเข่าเสื่อมชนิดทุติยภูมิ (secondary osteoarthritis) เป็นโรคข้อเข่าเสื่อมที่เกิดจากความผิดปกติหรือทราบสาเหตุที่ทำให้ข้อเสื่อมมาก่อน เช่น การติดเชื้อ การบาดเจ็บต่อข้อ กระดูกหัก เป็นต้น ต่อมาบริเวณผิวข้อผิดปกติ และเกิดข้อเสื่อมตามมา อาการที่สำคัญสำหรับโรคข้อเข่าเสื่อม ได้แก่ อาการปวดเข่า เป็นอาการที่สำคัญ เริ่มแรกจะปวดเมื่อยตึงทั้งด้านหน้าและด้านหลังของเข่า หรือบริเวณน่อง หากเป็นมากขึ้นจะมีอาการปวดขณะที่มีการเคลื่อนไหว ลูกนั่งหรือเดินขึ้นบันไดไม่คล่องเหมือนเดิม มีเสียงลั่นในข้อ เมื่อเคลื่อนไหวผู้ป่วยรู้สึกมีเสียงในข้อและปวดเข่า ข้อเข่าบวม ถ้าข้อมี

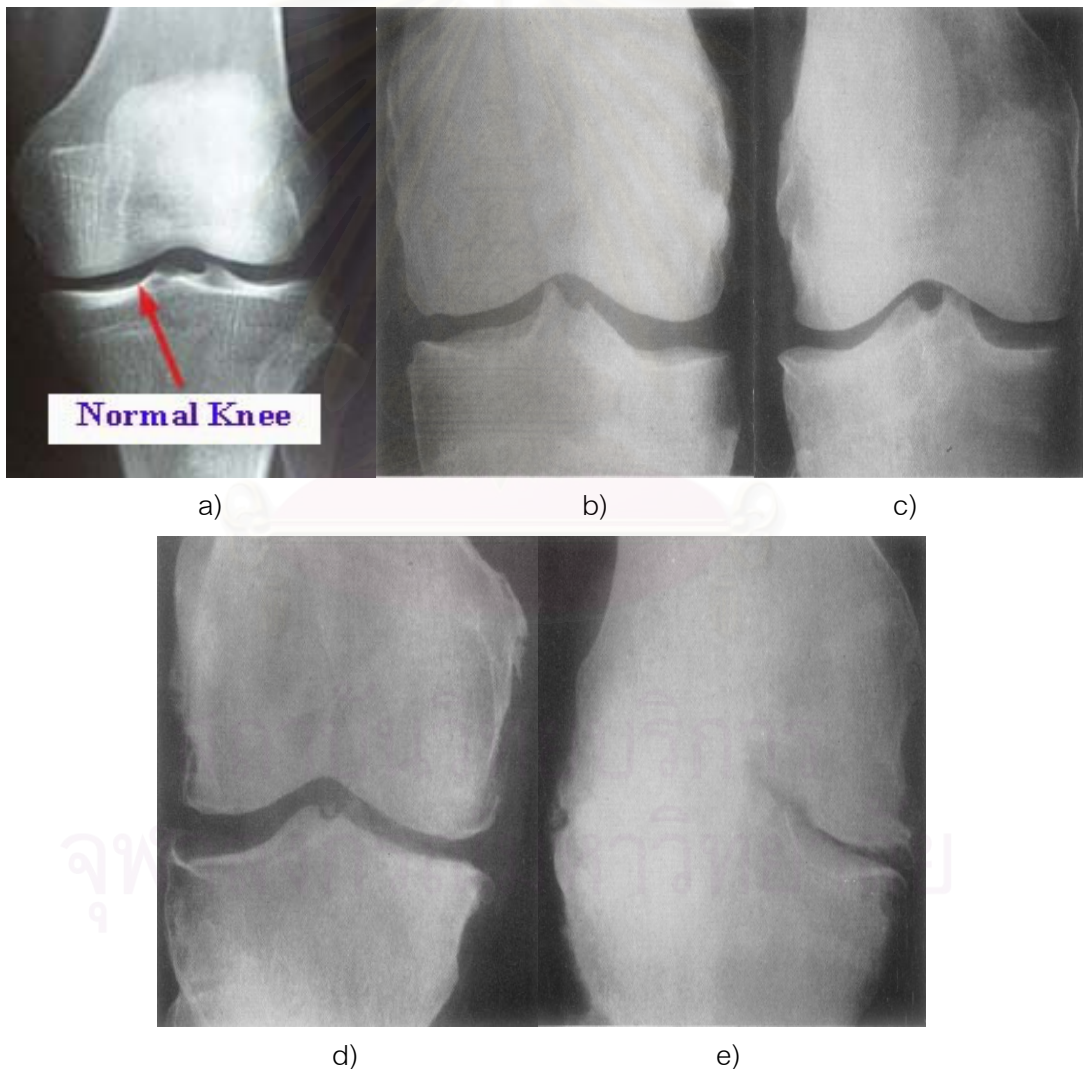
การอักเสบเกิดข้อบวม ข้อเข่าโก่งงอ อาจจะโก่งด้านนอกหรือโก่งด้านใน ทำให้ขาสั้นลง เดินลำบาก มีอาการปวดเวลาเดินและการเกิดข้อเข่ายึดติดจะทำให้ผู้ป่วยจะไม่สามารถเหยียดหรืองอขาได้สุดเหมือนเดิม เนื่องจากการยึดติดภายในข้อ



รูปที่ 1 ลักษณะข้อเข่าของผู้ป่วยที่เป็นโรคข้อเข่าเสื่อม

การวินิจฉัยโรคข้อเข่าเสื่อม แพทย์จะทำการซักประวัติและตรวจร่างกายโดยทำการตรวจบริเวณข้อเข่า ลักษณะที่สำคัญคือ ข้อบวม หรือขนาดข้อใหญ่และมีการงอของข้อเข่า เมื่อทำการถ่ายภาพรังสีพบว่า มีช่องว่างระหว่างปลายกระดูกภายในข้อแคบลงซึ่งเกิดจากการที่กระดูกอ่อนมีการสึกหรอ จากนั้นจึงทำการเจาะเลือดเพื่อแยกโรคที่อาจเป็นสาเหตุของโรคปวดเข่าเรื้อรัง เช่น โรคเกาต์ หรือ โรครูมาตอยด์ ถ้าในกรณีที่มีเข่าบวมจะมีการเจาะน้ำไขข้อออกมาเพื่อตรวจสอบโดยสังเกตุสีและปริมาณ และตรวจสอบโดยกล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดขาว

โรคข้อเข่าเสื่อมสามารถแบ่งตามความรุนแรงของโรคได้เป็น 5 ระดับ คือ grade 0: Normal, grade 1: Doubtful narrowing of joint space and possible osteophytic lapping, grade 2: Definite osteophytes and possible narrowing of joint space, grade 3: Moderate multiple osteophytes, definite narrowing of joint space, some sclerosis and possible deformity of bone ends และ grade 4: Large osteophytes, marked narrowing of joint space, severe sclerosis and definite deformity of bone ends. Subchondral cysts may be present. โดยการแบ่งความรุนแรงดังกล่าวตามหลักเกณฑ์ของ Kellegren และ Lawrence ซึ่งพิจารณาจากภาพถ่ายรังสีบริเวณข้อเข่า^(9, 10)



รูปที่ 2 ภาพถ่ายรังสีบริเวณข้อเข่าซึ่งแบ่งตามความรุนแรงของโรคในแต่ละระดับตามหลักเกณฑ์ของ Kellegren และ Lawrence a) grade 0 b) grade 1 c) grade 2 d) grade 3 และ e) grade 4

การรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม จะเลือกวิธีการรักษาโดยดูจากระดับความรุนแรงของโรค ในรายที่ยังไม่มีอาการรุนแรงของโรคนัก ส่วนใหญ่จะใช้การรักษาทางกายภาพบำบัดและการใช้ยา แต่สำหรับในรายที่มีอาการรุนแรงจะใช้วิธีการรักษาโดยการผ่าตัด สำหรับการผ่าตัดมีหลายวิธี ได้แก่ การผ่าตัดโดยการส่องกล้อง ใช้สำหรับข้อเสื่อมไม่มาก การผ่าตัดแก้ความโค้งงอของเข่า วิธีนี้ต้องตัดกระดูกบางส่วนและจัดแนวกระดูกของข้อ ซึ่งใช้ระยะเวลาฟื้นตัวภายหลังการผ่าตัดนานกว่า ทำให้ปัจจุบันความนิยมในการผ่าตัดด้วยวิธีดังกล่าวลดลง แต่วิธีที่นิยมกันอย่างมากในปัจจุบันคือ การผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม การรักษาโดยการผ่าตัดทำให้เกิดการอักเสบบริเวณแผลซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่สามารถหลีกเลี่ยงได้ ทำให้การประเมินภาวะการอักเสบของแผลภายหลังการผ่าตัดเพื่อดูการฟื้นตัวของผู้ป่วยจึงเป็นสิ่งสำคัญที่แพทย์จำเป็นต้องคำนึงถึง โดยในปัจจุบันมี markers อยู่หลายชนิดที่สามารถนำมาใช้ในการพิจารณาถึงภาวะการอักเสบ



รูปที่ 3 ภาพถ่ายรังสีบริเวณข้อเข่าของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม

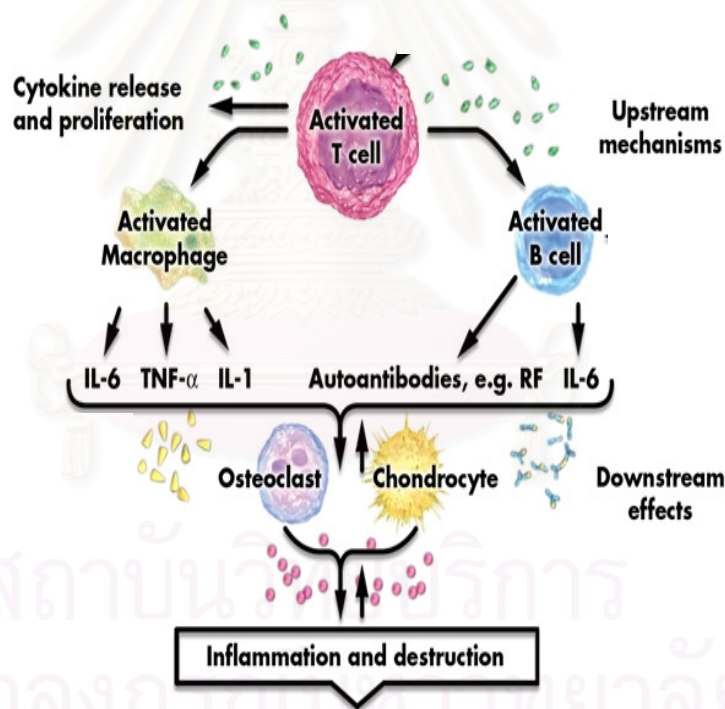
ไซโตไคน์ (Cytokines)

ไซโตไคน์ เป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่สร้างและหลั่งโดยเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ต่างๆ ในร่างกายที่ตอบสนองต่อสิ่งทีกระตุ้นทั้งจาก innate และ adaptive immunity สารจำพวกไซโตไคน์เหล่านี้มีหน้าที่ไปควบคุมและชักนำให้เกิดการทำงานของเซลล์ โดยถูกสร้างขึ้นมาจากการตอบสนองของเซลล์ต่อสิ่งกระตุ้น เช่น เชื้อจุลินทรีย์ และแอนติเจน เป็นต้น ไซโตไคน์ชนิดต่างๆ สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของเซลล์ที่แตกต่างกันไปโดยมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันและการอักเสบ ไซโตไคน์สามารถออกฤทธิ์โดยการจับกับ cytokine receptor ด้วย affinity ที่สูงทำให้สามารถออกฤทธิ์ได้แม้มีปริมาณน้อย รวมทั้งไซโตไคน์มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันหลายลักษณะที่สำคัญคือ บทบาทในการปรับสภาพภูมิคุ้มกัน ถ้าเซลล์ประเภท monocytes หรือ macrophages ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide ของแบคทีเรียหรือ เกิดกระบวนการ phagocytosis เป็นเหตุให้มีการสร้าง IL-1, IL-6 และ tumor necrosis factor- α (TNF- α) สารเหล่านี้มีการแพร่ผ่านผนังหลอดเลือดและชักนำให้เซลล์ mononuclear cells มายังบริเวณที่มีการอักเสบ ทำให้เซลล์ lymphocytes เจริญเพิ่มจำนวนและกระตุ้นให้มีการหลั่ง proinflammatory cytokines ออกมามากขึ้น จึงมีผลช่วยเพิ่มและขยายสัญญาณการตอบสนองต่อภาวะการอักเสบ

สารจำพวกไซโตไคน์ที่ควบคุมการตอบสนองภาวะการอักเสบเรียกว่า anti-inflammatory cytokines เช่น IL-4 สร้างโดย lymphocytes ส่วน IL-10 สร้างโดย monocytes และ lymphocytes ทั้ง IL-4 และ IL-10 มีผลลดการหลั่ง proinflammatory cytokines โดยที่ IL-1, IL-6 และ TNF- α เป็นตัวควบคุมการสลายกระดูก ไซโตไคน์เหล่านี้กระตุ้นให้ osteoclasts มาชุมนุมกันจึงมีผลทำให้เกิดการสลายกระดูกเพิ่มขึ้น ซึ่งพบได้ในภาวะที่มีการอักเสบ เช่น การติดเชื้อ การสลายเนื้อกระดูกรอบข้อเทียม (periprosthetic osteolysis) และทำให้เกิดข้อเทียมหลวมคลอน (loosening) รวมทั้งโรคข้ออักเสบ (inflammatory arthritis) เนื่องจากบางชนิด เช่น pigmented villonodular synovitis มะเร็ง Ewing sarcoma และมะเร็งที่แพร่กระจายไปยังกระดูกก็สามารถสร้างและหลั่ง proinflammatory cytokines ได้ นอกจากนี้ IL-6 อาจมีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคกระดูกโปร่งบางหลังวัยหมดประจำเดือน (postmenopausal osteoporosis) เซลล์ osteoclasts สามารถผลิต IL-1, IL-6 และ TNF- α และอาจกระตุ้นให้มีการสลายกระดูกอย่างต่อเนื่องโดยผ่านกลไกกระตุ้นตัวเซลล์เอง (autocrine) เช่น โรค giant cell tumor ของกระดูก พบเซลล์ osteoclasts จำนวนมาก เป็นต้นเซลล์ osteoblasts สามารถสร้างและหลั่ง IL-6 หลังจากถูกกระตุ้นด้วย parathyroid hormone (PTH) หรือ prostaglandins พบว่า PTH มีผลทำให้เกิดการสลายกระดูกโดยกระตุ้นให้เซลล์ osteoblasts สร้าง IL-6 และยังพบว่า IL-6 สามารถกระตุ้นให้

เซลล์เจริญเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ osteoblasts และอาจสามารถเป็นตัวกระตุ้นให้มีการสร้างกระดูกได้⁽¹¹⁾

โดยทั่วไปแล้ว IL-6 สร้างมาจาก monocytes, macrophages, lymphocytes, endothelial cells, และ fibroblasts สามารถกระตุ้น hepatocytes ให้สร้าง acute phase protein นอกจากนี้ IL-6 ยังมีความสำคัญในกระบวนการเจริญเติบโตของ B cells และการสร้าง IgG, IgM และ IgA ของ activated B cells จึงมีบทบาทสำคัญทั้ง innate และ adaptive immune response และ IL-6 ยังสามารถกระตุ้นให้สร้าง neutrophils จากไขกระดูก ในภาวะติดเชื้อรุนแรง จะพบมีการเพิ่มขึ้นของ IL-6 ซึ่งเป็นผลมาจากการกระตุ้นโดย IL-1, TNF พบว่า human herpes virus type 8 (HHV8) สามารถสร้างโปรตีนที่มีความเหมือนกับ IL-6 ซึ่งมีความสำคัญต่อการติดเชื้อ HHV8 อีกด้วย⁽¹²⁾



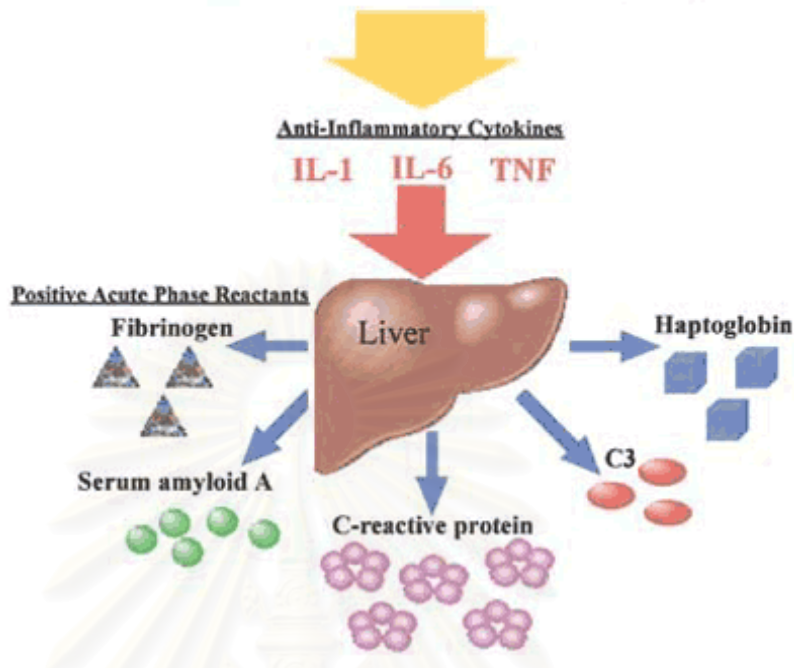
รูปที่ 4 การทำงานของเซลล์ชนิดต่าง ๆ เมื่อมีการอักเสบ

อัตราการตกของเม็ดเลือดแดง (Erythrocyte Sedimentation Rate: ESR) และ C-Reactive Protein (CRP)

การตรวจวัด ESR เป็นการวัดอัตราการตกของเม็ดเลือดแดงในพลาสมา จากตัวอย่างตรวจที่เป็น whole blood โดยที่การตกของเม็ดเลือดแดงเกิดขึ้น เนื่องจากเม็ดเลือดแดงมีความถ่วงจำเพาะมากกว่าพลาสมา นอกจากนี้แล้วยังเกิดจากการที่เม็ดเลือดแดงมาวางเรียงตัวซ้อนกันเป็นลักษณะที่เรียกว่า Rouleaux formation ซึ่งปกติแล้วผิวของเม็ดเลือดแดงจะมีประจุลบ ทำให้เม็ดเลือดแดงเกิดการผลักกันเอง ดังนั้นในภาวะปกติการเกิด Rouleaux formation จึงเป็นไปได้ยากแต่ในภาวะที่มีการเพิ่มขึ้นของ fibrinogen หรือ globulin จะทำให้ความเป็นประจุลบของเม็ดเลือดแดงลดลงทำให้มีโอกาสเกิด formation ได้ง่ายขึ้น ทั้งนี้ค่า ESR ยังเป็นสัดส่วนโดยตรงกับมวลของเม็ดเลือดแดง แต่เป็นสัดส่วนผกผันกับความหนืดของพลาสมา ดังนั้นค่า ESR จะสูงกว่าปกติในภาวะที่มีการอักเสบ เนื่องจากการเพิ่มของระดับ fibrinogen และยังสามารถพบได้ในภาวะที่มี acute และ chronic infection ด้วย⁽¹³⁾

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า IL-6 สร้างมาจากเซลล์จำพวก macrophages, monocytes, fibroblasts และ T helper 2 lymphocytes เมื่อมีบาดแผลเกิดขึ้นแล้ว IL-6 สามารถกระตุ้นให้ตับเกิดการสร้าง CRP และ serum amyloid A protein เมื่อเกิดภาวะการอักเสบอย่างเฉียบพลัน (acute inflammation)⁽¹⁴⁾ CRP ที่ถูกสร้างมาจากเซลล์ตับ (hepatocytes) จะถูกควบคุมโดย proinflammatory cytokines ได้แก่ IL-6 และ IL-1 โดยมีหน้าที่ที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของ innate immune response เมื่อมีการทำลายของเนื้อเยื่อเกิดขึ้น CRP จะไปกระตุ้นระบบของคอมพลีเมนต์ (complements) และเพิ่มกระบวนการ phagocytosis⁽¹⁵⁾ จึงทำให้ CRP เป็นตัวชี้วัดที่สำคัญสำหรับภาวะการติดเชื้ออย่างฉับพลันจากการผ่าตัด จากหลายการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า CRP จะเพิ่มขึ้นในช่วง 1-2 วันแรกหลังการผ่าตัดและจะมีการลดลงจนถึงระดับปกติอย่างรวดเร็วในเวลาต่อมา^(5, 16, 17) อย่างไรก็ตามพบว่าค่า CRP ไม่ได้สูงขึ้นจากการผ่าตัดหรือในภาวะที่มีการติดเชื้อเพียงเท่านั้นแต่ยังสามารถพบได้ในผู้ป่วยที่เป็น rheumatoid arthritis ได้เช่นกัน⁽¹⁵⁾

INFLAMMATION



รูปที่ 5 การกระตุ้นเซลล์ตับของไซโตไคน์ที่ทำให้มีการหลั่งโปรตีนชนิดต่างๆ

อุณหภูมิบริเวณผิวหนัง (Skin Temperature)

บริเวณเนื้อเยื่อที่มีการเกิดภาวะการอักเสบจะทำให้มีการรวมตัวของเซลล์ที่จะมาทำการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในร่างกาย เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ และมีการปล่อยสารที่ทำให้เกิด toxic ต่อเนื้อเยื่อบริเวณนั้น ทำให้มีอาการปวด บวม แดง และร้อน ขึ้นมากกว่าปกติ ดังนั้น อุณหภูมิบริเวณผิวหนังจึงเป็นตัวชี้วัดที่สำคัญในการใช้ประเมินถึงภาวะการอักเสบได้

การศึกษาความสัมพันธ์ของตัวชี้วัดภาวะการอักเสบในผู้ป่วยเปลี่ยนข้อเทียม

ในปี ค.ศ. 2001 Laiho K และคณะ ได้ทำการศึกษาการเพิ่มขึ้นของ CRP ในผู้ป่วย RA หลังจากการทำ TKA และ total hip arthroplasty (THA) จำนวน 37 รายเป็นเวลา 1 สัปดาห์ภายหลังการผ่าตัด พบว่า CRP จะมีระดับสูงสุดในวันที่ 1 และ 2 ภายหลังการผ่าตัดโดยเพิ่มมากกว่าค่าก่อนการผ่าตัดประมาณ 7 เท่า หลังจากนั้นใช้เวลาอีกประมาณ 1 สัปดาห์ ระดับ CRP จึงจะลดลงเท่ากับระดับก่อนการผ่าตัด ซึ่งในการศึกษารั้งนี้ไม่พบว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้อแต่อย่างใด ดังนั้นจึงเป็นปกติที่พบว่าการเพิ่มขึ้นของ CRP ภายหลังการผ่าตัดในผู้ป่วย RA หลังจากการทำ TKA และ THA แต่ก็สามารถลดลงได้เท่ากับก่อนการผ่าตัดภายใน 1 สัปดาห์⁽¹⁸⁾

ในปี ค.ศ. 2001 Bilgen O และคณะ ทำการศึกษาความเปลี่ยนแปลงของ CRP และ ESR ในผู้ป่วย primary osteoarthritis ที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเทียม ซึ่งได้ศึกษาทั้งในกลุ่ม เป็น TKA และ THA พบว่าภายหลังการผ่าตัดทั้ง 2 กลุ่มจะมีระดับ CRP เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและ ขึ้นสูงสุดในวันที่ 2 ภายหลังการผ่าตัด แต่ในผู้ป่วย THA เริ่มลดลงเท่ากับระดับค่าก่อนการผ่าตัด ในวันที่ 21 และ TKA จะลดลงในเดือนที่ 2 ภายหลังการผ่าตัด ส่วน ESR พบว่าทั้ง 2 กลุ่มจะ เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 5 ภายหลังการผ่าตัด สำหรับกลุ่ม THA พบว่า ESR จะลดลงจนถึงเท่ากับ ก่อนได้รับการผ่าตัดในเดือนที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด ส่วนในกลุ่ม TKA นั้นจะลดลงในเดือนที่ 9 ภายหลังการผ่าตัด ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า CRP มีระดับการเปลี่ยนแปลงที่รวดเร็วและกลับสู่ค่า ปกติได้รวดเร็วกว่า ESR โดยที่ทั้งค่า CRP และ ESR ในผู้ป่วย TKA มีแนวโน้มสูงกว่า THA⁽⁴⁾

ในปี ค.ศ. 2008 Park KK และคณะ ทำการศึกษาเพื่อหาระดับพื้นฐาน CRP และ ESR ในผู้ป่วย OA ที่ผ่านการทำ unilateral และ bilateral TKA ช่วงเวลาที่ใช้ในการศึกษาคือช่วง ก่อนการผ่าตัด และภายหลังการผ่าตัด ในวันที่ 1, 2, 5, 7, 14, 42 และ 90 วัน โดยแบ่งกลุ่มผู้ป่วย ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ unilateral, first knee bilateral และ second knee bilateral พบว่าผู้ป่วยทั้ง 3 กลุ่มมีรูปแบบของ CRP และ ESR ที่เหมือนกันคือค่าเฉลี่ยของ CRP จะสูงขึ้นอย่างรวดเร็วโดย จะสูงสุดในวันที่ 2 ภายหลังการผ่าตัด ในวันที่ 42 ภายหลังการผ่าตัดจะลดลงต่ำกว่าค่าปกติ และ จะลดลงจนถึงค่าก่อนการผ่าตัดในวันที่ 90 ภายหลังการผ่าตัด ส่วนค่าเฉลี่ยของ ESR นั้นจะขึ้น สูงสุดในวันที่ 5 ภายหลังการผ่าตัดและลดลงจนถึงก่อนการผ่าตัดในวันที่ 90 ภายหลังการผ่าตัด แต่จากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้พบว่าผู้ป่วยถึง 43% ที่ไม่เป็นไปตามรูปแบบดังกล่าวเช่นกัน⁽¹⁹⁾

จากการศึกษาของ Wirtz DC และคณะในปี ค.ศ. 2000 พบว่าผู้ป่วยที่ผ่านการทำ total knee replacement (TKR) จะมีค่า IL-6 สูงที่สุดภายหลังการผ่าตัด 12 ชั่วโมง และจะเริ่ม ลดลงภายหลังการผ่าตัด 24 ชั่วโมง ส่วน CRP จะขึ้นสูงสุดในวันที่ 2 ภายหลังการผ่าตัดและเริ่มลดลง ในวันที่ 3 และพบว่าในผู้ป่วยในกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับ non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ความเข้มข้นของ IL-6 มีความสัมพันธ์กับระดับของการอักเสบโดยจะเพิ่มขึ้นเร็วกว่าและลดลงได้เร็วกว่า CRP ซึ่งแสดงว่า การตรวจวัด IL-6 ในผู้ป่วยหลังทำ TKR สามารถติดตามการอักเสบได้ดีกว่าการตรวจวัด CRP⁽²⁰⁾

จากนั้นในปี ค.ศ. 2007 Lisowska B และคณะ ได้ทำการศึกษาผู้ป่วย RA ที่ได้รับ การผ่าตัดเปลี่ยนข้อเทียมโดยเปรียบเทียบระดับ IL-6 และ IL-8 ในซีรัม และ drainage fluid ก่อน และหลังการผ่าตัด พบว่าระดับ IL-6 มีแนวโน้มสูงขึ้นทั้งในซีรัม และใน drainage fluid โดยมี ระดับสูงสุด 24 ชั่วโมงภายหลังการผ่าตัด ซึ่ง drainage fluid พบว่ามีค่าสูงกว่าใน ซีรัมส่วนระดับ IL-8 ใน drainage fluid จะเริ่มสูงขึ้นที่ 6 ชั่วโมง ภายหลังการผ่าตัด แต่ในซีรัมไม่มีการเปลี่ยนแปลง

โดยที่ใน drainage fluid ระดับ IL-6 จะมีค่าสูงกว่า IL-8 อย่างมีนัยสำคัญที่ 24 ชั่วโมงหลังการผ่าตัด ส่วนค่า CRP ในซีรัม พบว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน โดยจะเพิ่มขึ้นจนถึง 36 ชั่วโมงหลังการผ่าตัด ส่วนใน drainage fluid พบว่าในช่วงระหว่าง 6-36 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกัน ดังนั้น การวัดระดับไซโตไคน์ใน drainage fluid จะบ่งบอกถึงการเกิด local inflammation จากการผ่าตัดได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับในซีรัม เนื่องจากในผู้ป่วย RA พบว่ามีการอักเสบเรื้อรังทำให้ระดับไซโตไคน์ในเลือดสูงก่อนที่เข้ารับการผ่าตัด⁽²¹⁾

จากการศึกษาของ Mehra A และคณะ ในปี ค.ศ. 2005 ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของ CRP และ อุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่า โดยแยกกลุ่มผู้ป่วยที่เป็น OA และ RA พบว่าผู้ป่วยทั้งหมดจะมีค่า CRP สูงสุดในวันที่ 5-7 หลังการผ่าตัด ส่วนในผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดจาก OA จะลดลงมาที่ระดับปกติในสัปดาห์ที่ 6 หลังการผ่าตัด และผู้ป่วยที่เป็น RA จะค่อยๆ ลดลงในสัปดาห์ที่ 6 หลังการผ่าตัดและกลับมาเท่ากับก่อนการผ่าตัดในสัปดาห์ที่ 18 แต่จะพบว่าผู้ป่วยจาก OA 5 รายที่จะมีค่า CRP สูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 18 โดยผู้ป่วยกลุ่มนี้จะกลับมาตรวจที่คลินิกซ้ำ จากการตรวจ พบว่าผู้ป่วยทั้งหมดไม่มีอาการปวด ลักษณะแผลแห้งดี และอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่าที่วัดได้มีค่าต่ำ และพบว่าผู้ป่วย TKR มีค่าอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่าสูงขึ้นในช่วงแรกหลังการผ่าตัดหลังจากนั้นจะลดลงสู่ปกติในสัปดาห์ที่ 18 หลังการผ่าตัด ส่วน CRP จะสูงขึ้นในสัปดาห์แรกหลังการผ่าตัดเช่นกัน แต่จะมีค่าลดลงใกล้เคียงกับก่อนผ่าตัดในสัปดาห์ที่ 6 ซึ่งทั้ง 2 ปัจจัยดังกล่าวจะมีการลดลงภายใน 18 สัปดาห์หลังการผ่าตัด ดังนั้น ค่า CRP และอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่าเมื่อมีค่าสูงขึ้นสามารถสนับสนุนให้เชื่อว่ามีอาการแทรกซ้อนของการอักเสบจากการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าได้⁽²²⁾

การศึกษาของ Haidar SG และคณะ ในปี ค.ศ. 2006 ที่ได้ทำการวัดอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่าพบว่า อุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่าที่ทำการผ่าตัดจะสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเข่าที่ไม่ได้รับการผ่าตัดโดยจะมีความแตกต่างกันจนถึงเดือนที่ 6 หลังการผ่าตัด ซึ่งแสดงว่าการลดลงของอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่าบริเวณที่ได้รับการผ่าตัดจะต้องใช้เวลานานหลายเดือนกว่าจะลดลงเท่าเข่าข้างปกติแต่ถึงแม้ว่ามีอุณหภูมิที่สูงอยู่ก็ไม่ได้พบว่ามีอาการติดเชื้อแต่อย่างใด⁽²³⁾

ในปี ค.ศ. 2006 Matsumoto T และคณะ ทำการศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของระดับ IL-6 จาก synovial fluid และจำนวนเซลล์ที่บ่งบอกถึงการเกิดภาวะการอักเสบที่พบบริเวณของ synovial membrane ในผู้ป่วย RA ที่ทำการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม พบว่าจำนวนของเซลล์ที่บ่งบอกถึงการอักเสบและระดับของ IL-6 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น ระดับของ IL-6 สามารถใช้ในการประเมินภาวะการอักเสบได้⁽²⁴⁾

ดังนั้นจากหลายการศึกษาที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่า markers ส่วนใหญ่จะทำการศึกษาโดยรวมซึ่งไม่จำเพาะเจาะจงในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมและจะทำการศึกษาในช่วงระยะเวลาสั้นๆ ในขณะที่ผู้ป่วยยังพักฟื้นอยู่ในโรงพยาบาล แต่การฟื้นตัวของผู้ป่วยภายหลังการผ่าตัดก็เป็นเรื่องสำคัญต่อการรักษาของแพทย์เช่นกัน อีกทั้งที่ผ่านมายังไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ของตัวชี้วัดทั้ง 4 ตัวในระยะยาว ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จะทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของ IL-6 กับค่า ESR , CRP และ อุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่า ในผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมในช่วงก่อนการผ่าตัด 24 ชั่วโมง, 2, 6, 14 และ 26 สัปดาห์ รวมเป็นระยะเวลา 6 เดือนภายหลังได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมว่ามีความแตกต่างของตัวชี้วัดทางคลินิกดังกล่าวอย่างไร

ความหลากหลายทางพันธุกรรมในมนุษย์ (Human genetic polymorphism)

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic polymorphism หรือ DNA polymorphism) หมายถึง การเปลี่ยนแปลงรหัสทางพันธุกรรมที่ไม่ก่อให้เกิดโรค หรือความหลากหลายของดีเอ็นเอที่เป็นลักษณะปกติในประชากร ความหลากหลายนี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในจีโนมของมนุษย์ ทำให้แต่ละบุคคลมีลำดับเบส ณ ตำแหน่งเดียวกันบนโครโมโซมหนึ่ง ๆ แตกต่างกัน เรียกว่ามีอัลลีล (allele) ที่แตกต่างกัน

ความหลากหลายทางพันธุกรรมแบ่งเป็น 3 ชนิด ได้แก่ restriction fragment length polymorphism (RFLP), variable number of tandem repeats (VNTR) และ single nucleotide polymorphism (SNP) ^(25, 26)

ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) หรือ RFLP คือ การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสทำให้เอนไซม์ตัดจำเพาะดังกล่าวสามารถตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้แตกต่างกัน ดังนั้นการตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะจะทำให้ได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันเป็น 2 แบบ โดยชิ้นหนึ่งเป็นชิ้นที่ถูกตัดได้จะมีขนาดเล็กลงและอีกชิ้นหนึ่งไม่ถูกตัด เรียกลักษณะอัลลีลที่แตกต่างกัน 2 แบบว่าเป็นความหลากหลายแบบไบอัลลิลิก (bi-allelic polymorphism) เป็นความหลากหลายที่มีนำมาใช้ประโยชน์ในการทำ DNA marker สำหรับทำแผนที่ยีนของมนุษย์ (human gene mapping)

GCCGCATTCTA
CGGGCGTAAGAT

อัลลีล 1 ลำดับเบสที่ 5 เป็น C
เอนไซม์ EcoRI ตัดไม่ได้

GCCGAATTCTA
CGGCTTAAGAT

อัลลีล 2 ลำดับเบสที่ 5 เป็น A
เอนไซม์ EcoRI ตัดได้

รูปที่ 6 ความหลากหลายทางพันธุกรรมชนิด RFLPs ซึ่งสามารถตรวจสอบความแตกต่างในลำดับเบสได้โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoR I

ความแตกต่างของความยาวลำดับเบสในดีเอ็นเอ หรือ VNTR เกิดจากการมีจำนวนชุดที่แตกต่างกันของลำดับเบสที่เหมือนกันเรียงต่อกันในลักษณะซ้ำกันเป็นชุดๆ ที่มีความหลากหลายของจำนวนชุดที่เรียกว่าเป็น hypervariable region ทำให้ VNTR เป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีขนาดอัลลีลต่างกันได้หลายขนาดในประชากรเรียกลักษณะเช่นนี้ว่า ความหลากหลายแบบมัลติอัลลีลิก (multi-allelic polymorphism) ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะย่อย ได้แก่ minisatellite และ microsatellite โดยที่ minisatellite เป็นการซ้ำของลำดับเบสเป็นชุด แต่ละชุดมีจำนวนเบส 14 –100 เบส ส่วน microsatellite เป็นการซ้ำของลำดับเบส 2 เบส ดังตัวอย่างที่แสดงในรูปที่ 7 VNTR เป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมที่นำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของอัลลีลกับลักษณะที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม เพื่อติดตามอัลลีลก่อโรคที่ถ่ายทอดผ่านพ่อแม่มาสู่ลูก หรือที่เรียกว่า การหาตำแหน่งยีนหรือการวิเคราะห์ลิงค์เกจ (genetic linkage) ซึ่งนำไปสู่การทำแผนที่จีโนม (genetic mapping)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Minisatellite: Tandem repeats of sequences that vary from 14 – 100 base pairs in length

CGAT ATCGGACCAATCG ATCGGACCAATCG ATCGGACCAATCG TAGG

CGAT ATCGGACCAATCG ATCGGACCAATCG TAGG

Polymorphism variable number of repeats

Microsatellite: Short sequence of random repeats, i.e.,
CA repeats

TGCATA CACACACACACACA TTAGTCGA

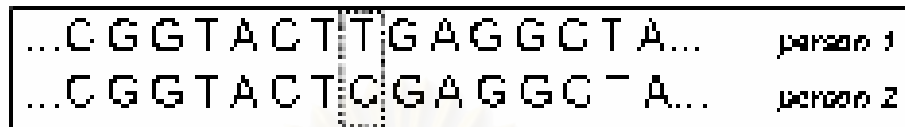
TGCATA CACACACACACACACACACACACACA TTAGTCGA

Polymorphism variable number of CA repeats

รูปที่ 7 ลักษณะของ VNTR ชนิด minisatellite และ microsatellite

Single Nucleotide Polymorphism (SNP) คือ ความแตกต่างหรือความหลากหลายทางพันธุกรรมที่แต่ละบุคคลมีลำดับเบสต่างกันเพียงตำแหน่งเดียว ณ ตำแหน่งเดียวกันของยีนที่อยู่บนโครโมโซม เป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อย มีการประมาณว่าจะพบ SNP ในทุก ๆ หนึ่งพันเบส แต่จำนวน SNP ทั้งหมดยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัด คาดว่าน่าจะอยู่ในช่วง 3 – 4 ล้านเบสตลอดจีโนมมนุษย์ SNP เป็นความแตกต่างของลำดับเบสเพียงหนึ่งตำแหน่ง โดย 2 ใน 3 ของ ที่พบจะเป็นการเปลี่ยนจากเบสไซโตซีน (cytosine หรือ C) ไปเป็นเบสไทมีน (thymine หรือ T) ความแตกต่างของลำดับเบสที่พบแม้เพียง 1 ตำแหน่งนี้อาจส่งผลถึงการแสดงออกของยีน ปริมาณและการทำงานของโปรตีน หรืออาจไม่ส่งผลกระทบใดๆ เลย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของ SNP บนสายดีเอ็นเอ SNP haplotype คือ SNP alleles หลายๆ ตำแหน่งที่อยู่ใกล้กันบนโครโมโซมเดียวกัน ลักษณะของ SNP haplotype ในจีโนมของมนุษย์จะกระจายอยู่ทั่วไปเป็นกลุ่มเรียกว่า แฮปโลไทป์บล็อก (haplotype block) คือ SNP อัลลีลที่อยู่ใกล้กันมีแนวโน้มที่จะถูกถ่ายทอดไปด้วยกันทั้งหมดเป็นชุดโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มประชากรที่ไม่มีการอพยพ เคลื่อนย้าย หรือแต่งงานข้ามเชื้อชาติ ซึ่งมีโอกาสสูงที่ SNP จะถูกถ่ายทอดไปด้วยกันเป็นชุด ปรากฏการณ์ที่ SNP อัลลีลหลายตำแหน่งถูกพบอยู่ด้วยกันใน

ประชากรบ่อยกว่าที่จะพบโดยบังเอิญ แสดงถึงการถูกถ่ายทอดไปพร้อมๆ กัน เรียกว่า SNP เหล่านี้มีลิงค์เกจดิสอีควิลิเบรียม (linkage disequilibrium: LD) ต่อกันและกัน ซึ่งหมายความว่า SNP เป็นลักษณะอย่างหนึ่งในกลุ่มประชากร



รูปที่ 8 แผนภาพแสดงตัวอย่าง SNP จำนวน 1 ตำแหน่ง

ตำแหน่งการเกิด SNP ในยีนจะทำให้สามารถแบ่ง SNP ได้เป็น 2 ประเภทคือ SNP ที่เกิดขึ้นในส่วนที่ไม่มีการถอดรหัสและที่เกิดขึ้นในส่วนที่มีการถอดรหัส⁽²⁷⁾

SNP ที่เกิดขึ้นในส่วนที่ไม่มีการถอดรหัส (non-coding SNP) ได้แก่ regulatory SNP (rSNP) จะเป็น SNP ที่มีผลในการควบคุมการแสดงออกของยีน ซึ่งบ่อยครั้งเกิดที่บริเวณโปรโมเตอร์ (promoter region) ซึ่งมีความสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนในการสร้างโปรตีนให้มากขึ้นหรือลดลง SNP ที่เกิดบริเวณรอยต่อระหว่างเอ็กซอน (exon) และอินทรอน (intron) ที่เรียกว่า สไปลซิงไซต์ (splicing site) ทำให้การตัดต่ออาร์เอ็นเอ (RNA) ผิดไปจากเดิม ส่งผลให้จำนวนกรดอะมิโนในสายพอลิเพปไทด์ผิดไป และสุดท้ายคือ intronic SNP (iSNP) เป็น SNP ที่เกิดบริเวณส่วนของอินทรอน จึงมักไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใดที่สำคัญ

SNP ที่เกิดขึ้นในส่วนที่มีการถอดรหัส (coding SNP) ได้แก่ non-synonymous SNP คือ SNP ที่เกิดขึ้นภายในลำดับเบส 3 ตัวที่ใช้ในการแปลรหัสกรดอะมิโน (triplet codon) จึงก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน และ synonymous SNP คือ SNP ที่เกิดขึ้นภายในลำดับเบส 3 ตัวที่ใช้ในการแปลรหัสกรดอะมิโนแล้วไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน

ปัจจุบันจึงมีการประยุกต์ใช้ SNP ทางการแพทย์อย่างหลากหลาย อาทิ การใช้ SNP เพื่อการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม หรือการวินิจฉัยโรคซึ่งใช้วิธีการอื่นตรวจวินิจฉัยไม่ชัดเจน เช่น โรคทางจิตและประสาท ตลอดจนการทำนายปัจจัยเสี่ยง (risk factors) หรือยีนชักนำภาวะการก่อโรค (predisposing gene) การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมกับการตอบสนองต่อยาในแต่ละบุคคล เรียกว่าเภสัชพันธุศาสตร์ (pharmacogenetics) รวมถึงการใช้ SNP ในงานวิจัยระดับชีวโมเลกุลเพื่อพัฒนายา⁽²⁸⁾

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction หรือ PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือ PCR เป็นวิธีการสำหรับการทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) เพื่อเพิ่มสายของดีเอ็นเอบริเวณที่จำเพาะเจาะจง จากสายดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นแบบ double helix โดยดีเอ็นเอแต่ละสายจะวิ่งแบบสวนทางกัน (antiparallel) และทั้ง 2 สายจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ของเบสคู่สมที่จับคู่กัน ได้แก่ อะดีนีน (adenine: A) จับกับไทมีน (thymine: T) และ กวานีน (guanine: G) จับกับไซโตซีน (cytosine: C) โดยแต่ละเบสจะจับอยู่กับโมเลกุลของน้ำตาลดีออกซีไรโบส ดังนั้น 1 หน่วยของดีเอ็นเอประกอบด้วย โมเลกุลฟอสเฟต น้ำตาลและเบส ซึ่งเรียกว่า นิวคลีโอไทด์ (nucleotide)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งจะทำให้ oligonucleotide primers ที่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวสั้น ๆ ที่สามารถจับกับลำดับส่วนปลายของดีเอ็นเอสายแม่แบบที่ถูกแยกสายให้เป็นสายเดี่ยวแล้ว เมื่อมี deoxynucleotide triphosphate (dNTPS) ซึ่งประกอบด้วย deoxynucleotide triphosphate (dNTPS) อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจะสามารถสังเคราะห์สายใหม่ที่มีลำดับเบสเหมือนกับ ดีเอ็นเอสายแม่แบบแล้วกลับมาอยู่ในลักษณะของ double strand DNA เช่นเดิม

การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ 1 รอบ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนเริ่มจากการให้ความร้อนเพื่อให้ดีเอ็นเอเกิดการแยกสายเรียกขั้นตอนนี้ว่า denature จากนั้นจะเป็น annealing ซึ่งเป็นกระบวนการที่ทำให้ primer จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ และสุดท้ายในช่วงของ extension เอนไซม์ DNA polymerase จะเริ่มทำงานเพื่อทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อไป

จำนวนของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์จาก PCR สามารถคำนวณได้จากสูตร $(2^n - 2n) \times$ โดย n คือจำนวนรอบที่ใช้ในการสังเคราะห์ 2n คือ ผลผลิตครั้งแรกที่ได้มาจากรอบที่ 1 และผลผลิตครั้งที่สองที่ได้มาหลังจากรอบที่ 2 และ x คือ จำนวน copies ของสายแม่แบบตั้งต้น ซึ่งโดยปกติเอนไซม์ที่ใช้ในการทำ PCR จะมีประสิทธิภาพในการทำงานได้ดีประมาณ 25-30 รอบ⁽²⁹⁾

การศึกษาความสัมพันธ์ของ SNP IL-6 กับการเกิดโรค

เนื่องจาก IL-6 อยู่ในกลุ่มของ pro-inflammatory cytokine จึงมีความสำคัญต่อการควบคุมกระบวนการอักเสบได้ ดังนั้นจึงพบว่ามีหลายโรคที่สัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกับ gene ที่ควบคุมการทำงานของ IL-6 จะเห็นได้จากการศึกษาของ Bennermo M. และคณะในปี ค.ศ. 2004 ซึ่งได้ศึกษาบทบาทของ SNP IL-6 ตำแหน่ง -174 กับการทำให้เกิดโรคหลายชนิด ได้ทำการทดลองแบบ in vivo พบว่า อัลลีล G SNP -174 มีผลทำให้ร่างกายมีปฏิกิริยาต่อการอักเสบโดยการผลิต IL-6 ได้มากกว่าในกลุ่มที่เป็น อัลลีล C ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงบทบาทของ IL-6 แล้วจึงสรุปได้ว่า SNP IL-6 ที่ตำแหน่ง -174 มีผลต่อการทำให้เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อโรคได้หลายชนิด⁽³⁰⁾

ในปี ค.ศ. 2008 Maitra A. และคณะ ได้ทำการศึกษา ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ IL-6 ในโรคหลอดเลือดแข็งตัวและโรคหัวใจและหลอดเลือดในครอบครัวชาวอินเดีย จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของ IL-6 gene มีความสำคัญเนื่องจากมีปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดในเด็กอีกทั้งยังมีบทบาทในควบคุมการเกิดตัวชี้วัดของหลอดเลือดในกลุ่มของชาวอินเดีย⁽³¹⁾

ในปี ค.ศ. 2008 Enjuanes A. และคณะ ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด chronic lymphocytic leukemia (CLL) พบว่ามี gene หลายตัวรวมทั้ง gene ของ IL-6 มีผลต่อการเกิดกระบวนการ apoptosis ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CLL⁽³²⁾

การศึกษาของ Chung HW. และคณะในปี ค.ศ. 2003 ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของ SNP IL-6 กับ Bone mineral density (BMD) และ IL6 -174 อัลลีล C มีความสัมพันธ์ต่อการเพิ่มขึ้นของ BMD อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่าเฉลี่ยของ BMD จะสูงสุดเมื่อมีลักษณะของจีโนไทป์เป็นแบบ homozygous C ส่วนแบบ homozygous G จะมีค่าต่ำสุด ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของ IL-6 มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของ BMD อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้หญิงวัยก่อนหมดประจำเดือน⁽³³⁾

ในปี ค.ศ. 2003 การศึกษาความสัมพันธ์ของความไวของ 17 beta-estradiol (E(2)) จาก SNP ในตำแหน่ง -174 กับผู้หญิงที่มีอาการเริ่มต้นของเบาหวานชนิดที่ 1 ของ Kristiansen OP. และคณะ พบว่า SNP -174 IL-6 ทำให้มีอัตราเสี่ยงต่อการเป็นเบาหวานชนิดที่ 1 ในผู้ที่มีอายุน้อยโดยอัตราเสี่ยงจะเพิ่มตามอายุและระดับของ E(2) ในหญิงวัยเจริญพันธุ์⁽³⁴⁾

การศึกษาความสัมพันธ์ของโรคอัลไซเมอร์และ SNP -174 IL-6 ในแถบยุโรปของ Capurso C. และคณะในปี 2004 จากการศึกษาพบว่าในกลุ่มของผู้ป่วยอัลไซเมอร์และกลุ่มควบคุมจากภูมิภาคของยุโรปจากตอนเหนือไปยังตอนใต้มีความถี่ของจีโนไทป์ GG และ GC เพิ่มขึ้นและพบอัลลีล G ว่าก็เพิ่มขึ้นด้วยแต่ อัลลีล C จะลดน้อยลงซึ่งความแตกต่างของความถี่ในอัลลีลและจีโนไทป์ในผู้ป่วยอัลไซเมอร์อาจเกิดจากความหลากหลายของภูมิภาคในยุโรปได้⁽³⁵⁾

ในปี ค.ศ. 2008 การศึกษาของ Kesarwani P. และคณะเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของจีโนไทป์ GC จาก SNP IL-6 ตำแหน่ง -174 กับความก้าวหน้าของโรคมะเร็งต่อมลูกหมากจากประชากรตอนเหนือของประเทศอินเดีย ซึ่งในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษา SNP ของ IL-4 ด้วย พบว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ IL-4 และ IL-6 ไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก แต่อย่างไรก็ตามพบว่าในผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากมีอัตราเสี่ยงต่อการกระจายของมะเร็งไปยังกระดูกเป็น 2 เท่า ดังนั้นความหลากหลายทางพันธุกรรมของ IL-6 มีผลต่อการเกิดการกระจายของเซลล์มะเร็งไปยังกระดูกในผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก⁽³⁶⁾

ในปี ค.ศ. 2005 การศึกษาของ E Pola. และคณะ ได้ทำการศึกษา SNP ของ IL-6 ที่ตำแหน่ง -174 ของผู้ป่วยผ่าตัดเปลี่ยนข้อสะโพกเทียม พบว่ามีจีโนไทป์ 3 แบบ คือ GG, GC และ CC พบว่า จีโนไทป์ CC ในกลุ่มควบคุมมีสัดส่วนสูงกว่าในกลุ่มของผู้ป่วยเกือบ 2 เท่า ส่วนจีโนไทป์ GG ในกลุ่มของผู้ป่วยถึงแม้จะสูงกว่ากลุ่มควบคุมแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการวิเคราะห์ด้วย logistic regression แสดงให้เห็นว่าจีโนไทป์ CC ไม่มีความสัมพันธ์กับการลดลงของอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคข้อสะโพกเสื่อม⁽³⁷⁾

ในปี ค.ศ. 2008 G. Andrew และคณะได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ IL-1 receptor antagonist (IL1-RA) และ IL-6 มีความเสี่ยงต่อการเกิด osteolysis ในผู้ป่วยที่ผ่านการผ่าตัดเปลี่ยนข้อสะโพกเทียม พบว่า IL1-RA +2018 อัลลีล C มีความสัมพันธ์ต่อการลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิด osteolysis และมีการเพิ่มการแสดงออกของ mRNA ในผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อสะโพกเทียม ส่วน haplotype -174G/-572G/-597A ของ IL-6 มีความสัมพันธ์ต่อการเกิด osteolysis เช่นกัน⁽³⁸⁾

ในปี ค.ศ. 2007 การศึกษาของ Kamarainen OP. และคณะ ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ IL-6 ในผู้ป่วย distal interphalangeal osteoarthritis (DIP OA) พบว่า ในตำแหน่งของ SNP IL-6 ที่ตำแหน่งของ promoter ที่ -597 และ -174 อัลลีล G ในกลุ่มของผู้ป่วย มากกว่าในกลุ่มควบคุมถึงแม้ว่ามีอัลลีล G เพียง 1 อัลลีล สามารถทำให้เพิ่มอัตราความเสี่ยงต่อการเกิดโรคได้ หากเป็น haplotype SNP ที่ -597 , -572 และ -174 จะเพิ่มอัตรา

เสี่ยงเป็น 4 เท่า ดังนั้น ส่วน GG diplotype จะเพิ่มอัตราเสี่ยงทั้งในกลุ่มที่เป็น symmetrical และ symptometrical ดังนั้นสรุปได้ว่าอัลลีล G ในตำแหน่ง SNP IL-6 ที่อยู่บน promoter มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค DIP OA ทั้งแบบ symmetrical และ symptometrical⁽³⁹⁾



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

1. กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target Population)

ผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม จากแผนกออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

2. ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample Size)

การศึกษาในครั้งนี้จะใช้จำนวนกลุ่มประชากรตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม จากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งจะคำนวณกลุ่มตัวอย่าง โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

$$\text{โดย } n = \frac{(Z_{\alpha/2})^2 PQ}{\Delta^2}$$

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

n	=	ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง
Z	=	ค่า Z score ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
Δ	=	relative acceptable error = 20% ของ P
P	=	sensitivity ของ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
Q	=	(1-sensitivity ของ ELISA)

$$\text{ดังนั้น } n = \frac{(1.96)^2 \times 0.83 \times 0.17}{(0.2 \times 0.83)^2} = 19.6708$$

เพราะฉะนั้นจะต้องใช้ตัวอย่างในการศึกษาวิจัยครั้งนี้อย่างน้อย 20 ตัวอย่าง แต่เนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องการเก็บตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวจะได้มาเมื่อผู้ป่วยมาทำการตรวจติดตามการรักษาตามกำหนดเท่านั้น จึงทำให้ต้องมีการเก็บจำนวนตัวอย่างเพิ่มมากขึ้นกว่าที่คำนวณได้ เพื่อป้องกันการสูญหายของกลุ่มตัวอย่างขณะทำการวิจัย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จะใช้กลุ่มตัวอย่างจำนวนมากที่สุดที่สามารถเก็บได้ อย่างน้อย 30 ตัวอย่าง

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือ

- 1.1 Autoclave (Hydroclave Harvey, USA)
- 1.2 Automatic adjustable micropipette (Eppendorf, Germany)
- 1.3 Balance (Sartorius)
- 1.4 Beaker: 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)
- 1.5 Centrifuge, refrigerated centrifuge (Eppendorf, USA)
- 1.6 Centrifuge, microcentrifuge high speed (Eppendorf, USA)
- 1.7 Combs (BIO-RAD, Hercules, California, USA)
- 1.8 Cuvette 80-100 μ l
- 1.9 Cylinder : 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)
- 1.10 Digital Timer
- 1.11 DNA Thermal cycler (Thermo Hybaid, USA)
- 1.12 Electrophoresis chamber set (BIO-RAD, USA)
- 1.13 Flask : 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)
- 1.14 Freezer -80 °C (Forma Scientific, USA)
- 1.15 Gel Doc 1000 (BIO-RAD, USA)
- 1.16 Multi-block heater (Techne DRI Block, USA)
- 1.17 Multi-channel pipettor (Biohit, Finland)
- 1.18 pH meter (Eutech Cybernataics)
- 1.19 Pipette aid (Tecnomara, Switzerland)
- 1.20 Pipette rack (Autopack, USA)
- 1.21 ELISA Plate Reader (Multiascent, USA)
- 1.22 Reagent bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Duran, USA)
- 1.23 Refrigerator (Sanyo, Japan)
- 1.24 Spectrophotometer (BIO-RAD, USA)
- 1.25 Stirring-magnetic bar
- 1.26 Mixing Block (BIOER,USA)
- 1.27 Spreader (Pyrex, USA)
- 1.28 Shaker for broth

- 1.29 Test tube racks
 - 1.30 Thermometer (IR Thermometer, USA)
 - 1.31 Vortex mixer (Scientific Industry, USA)
 - 1.32 Water purification equipment (Water pro Ps, Labconco USA)
 - 1.33 Water bath, Thermostat shaking (Mettler, Germany)
2. วัสดุอุปกรณ์
- 2.1 Clotted blood and EDTA tube (vacuette, Austria)
 - 2.2 Disposable gloves
 - 2.3 Glass pipette : 1 ml, 5 ml, 10 ml (Witeg, Germany)
 - 2.4 Microcentrifuge tube : 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (BIO-RAD, USA)
 - 2.5 Needle, sterile (Nipro)
 - 2.6 Parafilm (American National Can, USA)
 - 2.7 Pipette tip : 10 μ l, 200 μ l, 1,000 μ l (AxyGen, USA)
 - 2.8 Plastic wrap
 - 2.9 Polypropylene conical tube, sterile : 15 ml, 50 ml (Elkay, USA)
 - 2.10 PCR marker (Bio-Rad, USA)
 - 2.11 Sanitary tissue paper (Celox, Thailand)
 - 2.12 Syringe disposable (Nipro, Japan)
 - 2.13 Petridish (Sterillin, UK)
 - 2.14 foil
3. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย
- 3.1 สารเคมีทั่วไป
 - 3.1.1 70% ethanol
 - 3.2 สารเคมีสำหรับการทำ ELISA
 - 3.2.1 1X coating buffer
 - 3.2.2 1X PBS buffer pH 7.2
 - 3.2.3 1X assay diluents
 - 3.2.4 diluted detection antibody
 - 3.2.5 TMB substrate solution
 - 3.2.6 2N H₂SO₄

3.3 สารเคมีสำหรับการสกัด ดีเอ็นเอ

- 3.3.1 RBC lysis buffer
- 3.3.2 1X PBS buffer pH 7.2
- 3.3.3 Proteinase K
- 3.3.4 Lysis solution
- 3.3.5 Wash buffer
- 3.3.6 Absolute ethanol
- 3.3.7 Elution buffer

3.4 สารเคมีสำหรับการทำ PCR

- 3.4.1 10X PCR buffer
- 3.4.2 25 mM MgCl₂
- 3.4.3 2 mM Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)
- 3.4.4 10 μM primer forward
- 3.4.5 10 μM primer reverse
- 3.4.6 Taq polymerase enzyme
- 3.4.7 Agarose molecular biology grade (Sigma, USA)
- 3.4.8 PCR marker (Bio-Rad, USA)
- 3.4.9 Loading dye
- 3.4.10 1X TAE buffer
- 3.4.11 Ethidium bromide (Sigma, USA)

3.5 สารเคมีสำหรับการทำ ligation

- 3.5.1 pGEM vector
- 3.5.2 5X T4 ligase buffer
- 3.5.3 T4 ligase enzyme

3.6 สารเคมีสำหรับการทำ Transformation

- 3.6.1 LB broth
- 3.6.2 IPTG
- 3.6.3 X-gal
- 3.6.4 Ampicillin

Record Form 2: สำหรับบันทึกค่า CRP, ESR และ IL-6

ชื่อ สกุล	HN	อายุ	ESR (mm/hr)				CRP (mg/dl)				IL-6 (pg/dl)												
			Pre op	Post op	2 wk	6 wk	14 wk	26 wk	Pre op	Post op	2 wk	6 wk	14 wk	26 wk	fluid	Pre op	Post op	2 wk	6 wk	14 wk	26 wk		

Record Form 3: สำหรับบันทึกค่าความเข้มข้น, ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ และจีโนมไทป์ของ
SNP IL-6

ชื่อ-นามสกุล	HN	อายุ	ความเข้มข้น ดีเอ็นเอ ($\mu\text{g}/200\mu\text{l}$)	จีโนมไทป์

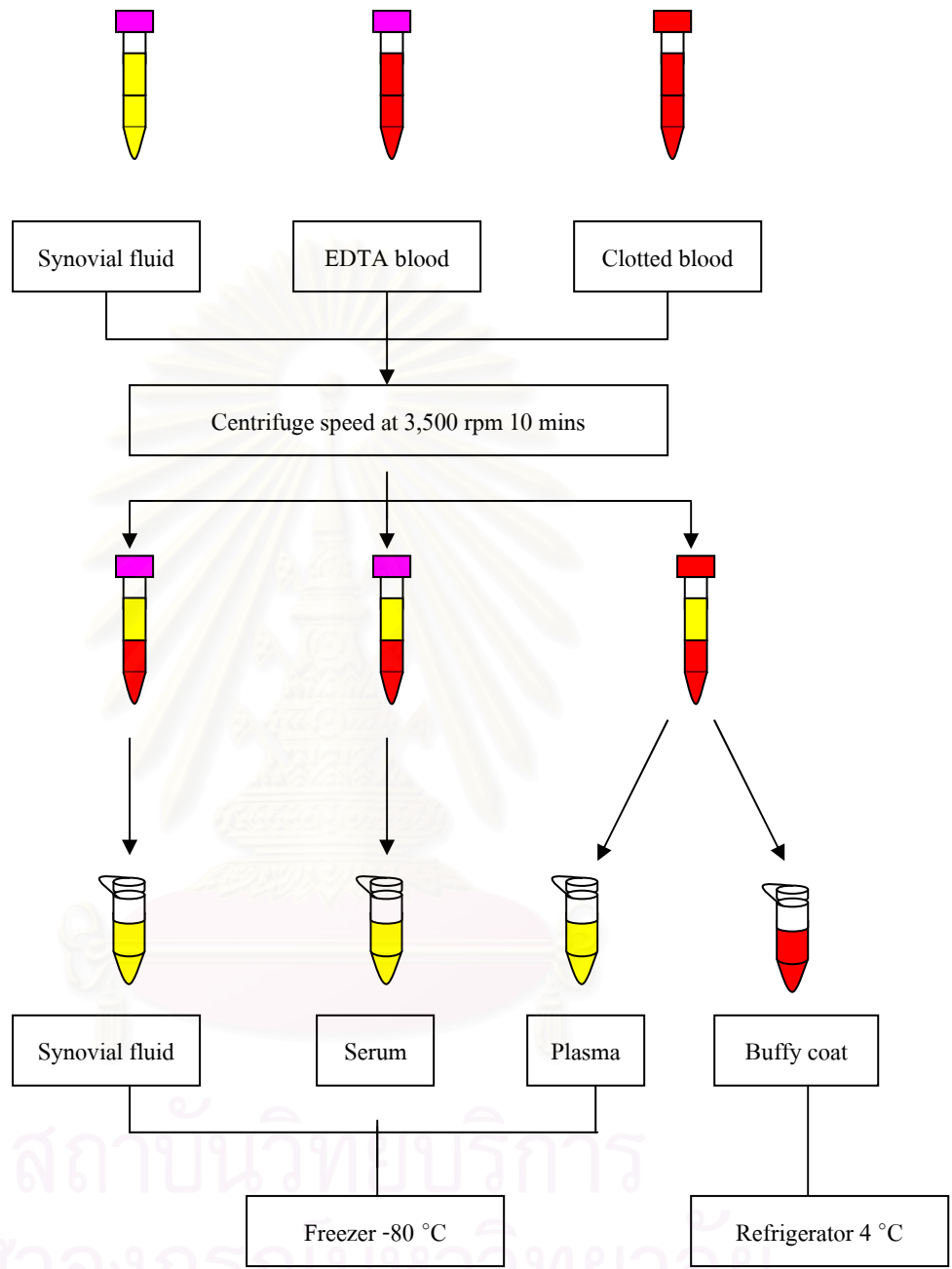
การดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง (Specimen Collection)

การเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนข้อเข่าเทียม มีขั้นตอน ดังนี้

- ก่อนเข้ารับการผ่าตัด ทำการเจาะเลือดแบบ clotted blood และ EDTA blood
- ระหว่างการผ่าตัด ทำการเก็บน้ำไขข้อจากบริเวณข้อเข่าเก็บใส่ EDTA tube
- หลังทำการผ่าตัดประมาณ 1-3 วัน ทำการเจาะเลือดแบบ clotted blood และ EDTA blood
- เมื่อมีการตรวจติดตามการรักษาในสัปดาห์ที่ 2 , 6 , 14 และ 26 หลังการผ่าตัด ทำการเจาะเลือดแบบ clotted blood และ EDTA blood

ตัวอย่างส่วนหนึ่งจะถูกแบ่งไปยังห้องปฏิบัติการ serology I หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยาและห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา ฝ่ายเวชศาสตร์ชั้นสูงตร โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย เพื่อส่งตรวจ ESR และ CRP อีกส่วนหนึ่งจะนำมาทำการปั่นแยกโดยใช้เครื่องปั่นตกตะกอน (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที ส่วนของซีรัมและพลาสมาที่ได้จะถูกแบ่งใส่ microtube และนำไปเก็บไว้ที่ตู้เย็น - 80 °C ส่วนของ buffy coat จะเก็บไว้ที่ตู้เย็น 4 °C เพื่อรอทำการตรวจวิเคราะห์ต่อไป (รูปที่ 9)



รูปที่ 9

วิธีการเก็บตัวอย่าง

การตรวจวัดอุณหภูมิบริเวณหัวเข่า

ผู้ป่วยที่มารับการตรวจติดตามที่คลินิกข้อเข่าเทียม หลังการผ่าตัดในสัปดาห์ที่ 2, 6, 14 และ 26 จะได้รับการตรวจวัดอุณหภูมิบริเวณหัวเข่าทั้ง 2 ข้าง โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ (IR Thermometer model : T560 จากสหรัฐอเมริกา) โดยจะทำการวัดข้างละ 4 ตำแหน่ง ได้แก่

ตำแหน่งที่ 1 บริเวณเหนือหัวเข่าด้านซ้าย (superomedial)

ตำแหน่งที่ 2 บริเวณเหนือหัวเข่าด้านขวา (superolateral)

ตำแหน่งที่ 3 บริเวณใต้หัวเข่าด้านซ้าย (inferomedial)

ตำแหน่งที่ 4 บริเวณใต้หัวเข่าด้านขวา (inferolateral)

ในการวัดให้นำปลายของเทอร์โมมิเตอร์แนบบริเวณผิวหนังในตำแหน่งที่ต้องการวัดให้สนิท จากนั้นกดปุ่มเพื่อให้เครื่องเริ่มทำการวัด เมื่อเครื่องวัดเสร็จจะได้ยินสัญญาณดังขึ้นหนึ่งครั้ง จึงจะอ่านค่าที่วัดได้จากหน้าจอของเทอร์โมมิเตอร์

จากนั้นทำการหาค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิที่วัดได้ในแต่ละข้างโดยจะใช้อุณหภูมิของข้างที่ไม่ได้รับการผ่าตัดเป็นตัวเปรียบเทียบ

การตรวจวัด CRP

การตรวจวัดระดับของ CRP ใน serum ของผู้ป่วยทั้งหมด จะถูกส่งตรวจไปยังห้องปฏิบัติการ serology I หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ซึ่งใช้หลักการ particle enhanced immunonephelometry ด้วยเครื่อง BN Prospec โดยหลักการดังกล่าวเกิดจาก CRP ที่มีอยู่ใน serum ของผู้ป่วยจะตกตะกอนกับ monoclonal antibodies ที่ coat ไว้กับ polystyrene particle ปริมาณ CRP ที่ทำปฏิกิริยาจะวัดด้วยเครื่อง Nephelometer โดยการวัด intensity ของ scattered light และ CRP concentration จะทราบโดยเครื่องจะวัดเทียบกับ calibration curve ของสารมาตรฐานที่รู้ค่า

การตรวจวิเคราะห์ ESR

การตรวจ ESR เป็นการวิเคราะห์อัตราการเกิด Rouleaux formation ของเซลล์เม็ดเลือดแดงจาก whole blood ที่ได้จากผู้ป่วย โดยทำการส่งตรวจไปยังห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา ฝ่ายเวชศาสตร์ชั้นสูง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติรุ่น MICROsed-system สำหรับตรวจ ESR โดยเฉพาะ หลักการคือ Infrared Barrier ที่ความยาวคลื่น 900 nm โดย reading plate จะประกอบด้วยตัวส่งและรับแสง (Infrared transmitter – receiver pair) 10 คู่ ในตำแหน่งของแต่ละ test tube จะมีการเคลื่อนที่ขึ้น-ลง เพื่ออ่านระดับการตกของ

เซลล์เม็ดเลือดแดง ณ เวลาเริ่มต้น 0, 10 และ 30 นาที เมื่อตั้งครบ 30 นาทีแล้ว เครื่องจะแสดงผลเป็นตัวเลขของอัตราการตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงเทียบกับ 1 ชั่วโมงของ Westergen ซึ่งเป็นวิธีการตรวจมาตรฐานของ ICSH ใน mode ของการปรับค่า ESR จากอุณหภูมิห้อง เป็นค่าที่อุณหภูมิห้องอ้างอิง 18 °C (เมื่ออุณหภูมิในการวิเคราะห์หรืออยู่ในช่วง 15-32 °C) เครื่องจะแปลงค่าโดยอาศัย Manley table

การตรวจวัดระดับ IL-6

การตรวจหาระดับของ IL-6 ในซีรัมที่เก็บจากผู้ป่วยทั้งหมดโดยใช้ Biolegend's ELISA MAX™ Set (Biolegend, USA) ซึ่งจะใช้หลักการของ sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยการนำ capture antibody ใน 1X coating buffer ใส่ลงใน plate หลุมละ 100 µl แล้วนำไป incubate ที่ 4 °C ซ้ำคืน หรือ 37 °C เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการล้าง plate 4 ครั้ง ด้วย 1X PBS buffer ต่อจากนั้นทำการ block non-specific binding และ ลด background โดยการเติม 1X assay diluents หลุมละ 200 µl แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิห้องพร้อมทั้งทำการเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ระหว่าง incubation เตรียม human IL-6 standard ที่มีความเข้มข้น 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6 และ 7.8 pg/ml และใช้ assay diluent เป็น standard ที่ 0 pg/ml ทำการล้าง plate 4 ครั้ง ด้วย 1X PBS buffer เติม standard ในแต่ละ level และ sample 100 µl นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้องพร้อมทั้งทำการเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมงทำการล้าง plate 4 ครั้ง ด้วย 1X PBS buffer เติม diluted detection antibody หลุมละ 100 µl แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิห้องพร้อมทั้งทำการเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมงทำการล้าง plate 4 ครั้ง ด้วย 1X PBS buffer เติม diluted Av-HRP solution หลุมละ 100 µl แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิห้องพร้อมทั้งทำการเขย่าเป็นเวลา 30 นาทีทำการล้าง plate 5 ครั้ง ด้วย 1X PBS buffer โดยในการล้างแต่ละครั้งให้ทำการแช่ wash buffer เป็นเวลา 30 วินาทีถึง 1 นาที เติม TMB substrate solution หลุมละ 100 µl แล้วนำไป incubate ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะเห็น solution เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินทำการหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 2N H₂SO₄ หลุมละ 100 µl จากนั้นจะเห็น solution เปลี่ยนเป็นสีเหลืองนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density : OD) 450 nm ภายใน 30 นาทีหลังจากเติม stop solution

จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาทำกราฟแบบลอการิทึม คำนวณเพื่อหาระดับของ IL-6 จาก standard curve ที่ได้จากการเจือจางสารละลายมาตรฐานดังกล่าว

การแยกสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือด

การแยกสกัดดีเอ็นเอ จะใช้ชุดแยกสกัดของ illustra blood genomicPrep Mini Spin kit (GE healthcare, USA) โดยนำส่วนของ buffy coat เติม red blood cell lysis buffer ประมาณ 3 เท่าของปริมาณตัวอย่างที่มีลงใน centrifuge tube ผสมให้เข้ากันโดยการคว่ำหงาย หลอดไปมาหลาย ๆ ครั้ง ของเหลวจะเป็นสีแดงใส ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที แล้วนำไปปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 3,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้งแล้วเติม 1X PBS buffer 200 µl ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปใส่ใน microcentrifuge tube ที่มี proteinase K 20 µl เติม lysis solution 400 µl นำไป vortex 15 วินาที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ทำการ vortex เป็นครั้งคราว จนเห็นสารละลายเปลี่ยนจากสีแดงไปเป็นสีน้ำตาลเข้ม หลังจากนั้นนำไปปั่น ตกตะกอน แล้วนำสารละลายใส่ลงใน column นำไปปั่นที่ความเร็ว 11,000 g เป็นเวลา 1 นาที เท ส่วนที่เป็นของเหลวใน collection tube ทิ้ง เติม lysis solution 500 µl นำไปปั่นที่ความเร็ว 11,000 g นาน 1 นาที เทของเหลวออกให้หมด แล้วเติม wash buffer 500 µl ปั่นที่ความเร็ว 11,000 g นาน 3 นาที เทของเหลวทิ้งแล้วปั่นซ้ำที่ความเร็วรอบ 11,000 g นาน 3 นาที เพื่อให้ column แห่งสนิท ย้าย column ใส่ลงใน microtube อันใหม่แล้วเติม elution buffer 70°C 200 µl ตั้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง 1 นาทีนำไปปั่นที่ความเร็ว 11,000 g เป็นเวลา 1 นาที ทิ้ง column แล้วเก็บส่วนที่เป็นสารละลายของดีเอ็นเอไว้ที่ตู้เย็น 4 °C แบ่งสารละลายบางส่วนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm เพื่อหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (}\mu\text{g /200}\mu\text{l)} = \text{ค่า OD ที่ 260 nm} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

$$\text{ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ} = \text{ค่า OD ที่ 260 nm} / \text{ค่า OD ที่ 280 nm}$$

การศึกษา restriction enzyme ที่เหมาะสมต่อ IL-6 polymorphism

1. การทำ PCR จาก ดีเอ็นเอที่แยกสกัดจากเซลล์เม็ดเลือด

ทำการผสม master mix ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 2 แล้วนำลงเครื่อง PCR ตั้ง condition ตามรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 3

ชนิด IL-6 primer	Sequence	Length (bp)	Tm (°C)	Size product (bp)
Primer forward	5' - TGA CTT CAG CTT TAC TCT TTGT - 3'	22	57.1	198
Primer reverse	5' - CTA ATT GGA AAC CTT ATT AGG - 3'	21	56.7	

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของ primer IL-6 ที่ใช้ในการทำ PCR

สารที่ใช้	ปริมาณที่ใช้ต่อ 1 reaction (μ l)
10X PCR buffer	2.0
25 mM MgCl ₂	2.0
2 mM dNTP	2.0
10 μ M primer forward	1.0
10 μ M primer reverse	1.0
Taq polymerase enzyme	0.5
Deionized water	6.5
Template (DNA solution)	5.0
Final volume	20

ตารางที่ 2 ปริมาณสารต่าง ๆ สำหรับการทำให้ PCR

Step	Temperature ($^{\circ}$ C)	Time (min)
Initial PCR activation step	94	10
3-step cycling		
Denaturing	94	1.00
Annealing	50	1.35
Extension	72	0.35
Number of cycles: 35 cycles		
Final extension	72	10

ตารางที่ 3 Condition สำหรับการทำให้ PCR

หลังจากทำ PCR แล้วจะทำการตรวจสอบ PCR product โดยการทำให้ gel electrophoresis ซึ่งจะผสม PCR product 5 μ l กับ 6X loading dye 1 μ l หยอดลงในหลุมของ 1.2% agarose gel และใช้ marker ขนาด 100 bp มี 1X TAE buffer เป็นตัวกลางและจ่ายกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำ gel ไปย้อมด้วย 0.1% ethidium bromide เป็นเวลานาน 10-15 นาที ล้าง gel ด้วยน้ำเปล่า 2-3 ครั้ง แล้วนำ gel ไปผ่านเครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตเพื่อถ่ายรูปแถบดีเอ็นเอ

2. การทำ Ligation

การทำ ligation เป็นการนำ ดีเอ็นเอ ของ IL-6 เข้าไปแทรกยัง pGEM vector โดยใช้ชุดของ T4 ligase invitrogen

สารที่ใช้	ปริมาณต่อ 1 reaction (µl)
pGEM vector	1.0
5X T4 buffer	2.0
PCR product (insertion DNA)	2.5
T4 ligase enzyme	1
Deionized water	3.5
Final volume	10

ตารางที่ 4 ปริมาณสารต่าง ๆ สำหรับการทำให้ ligation

เมื่อผสมสารทั้งหมดให้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 30 นาที หลังจากนั้นนำไปเก็บที่ตู้เย็น 4 °C ซ้ำมคืน

3. การทำ Transformation

การทำ transformation เป็นการนำ vector ที่มีการแทรกดีเอ็นเอ ที่เราต้องการศึกษาแล้วไปเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งในการทดลองครั้งนี้โดยใช้ *Escherichia coli* (E. coli) สายพันธุ์ DH5α เป็น competent cells ซึ่งวิธีการทำคือนำ competent cells จากตู้เย็น -80 °C มาละลายในน้ำแข็งแล้วเติม ligation ของ IL-6 ปริมาณ 5 µl ลงใน competent cells 50 µl นำไปแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที หลังจากนั้นนำไป heat shock โดยการแช่ ที่ 42 °C เป็นเวลา 50 วินาทีและนำไปแช่น้ำแข็ง 2 นาที ทันทีแล้วนำไปเติม LB-broth 950 µl จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 180 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ก่อนครบเวลาประมาณ 30 นาทีให้ทำการ spread plate ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อด้วย media ที่ผสมระหว่าง IPTG: X-gal : LB broth ด้วยอัตราส่วน 30:30:40 ตามลำดับ หลังจากครบเวลาในการเขย่าแล้วให้นำมาปั่นที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที แล้วดูดส่วนที่เป็นน้ำใสทิ้ง 500 µl แล้วทำการผสมส่วนที่เหลือให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายออกมา 200 µl เพื่อ spread ลงบน plate ที่เตรียมไว้ นำไป incubate ที่ 37 °C ประมาณ 18-24 ชั่วโมงหลังจากการ incubate จะเห็น colony ของ E. coli ขึ้น 2 ลักษณะ คือ blue colony และ white colony ทำการเลือก white colony ที่มีชิ้นส่วนของ insertion มาทดสอบต่อไป

4. การทำ Colony PCR

หลังจากการทำ transformation จะทำการตรวจสอบ product ที่ได้โดยการทำ colony PCR โดยเตรียม master mix สำหรับการทำให้ PCR ดังตารางที่ 5

สารที่ใช้	ปริมาณที่ใช้ต่อ 1 reaction (μ l)
10X PCR buffer	1.0
25 mM $MgCl_2$	0.6
2 mM dNTP	1.0
10 μ M primer forward	0.5
10 μ M primer reverse	0.5
Taq polymerase enzyme	0.1
Deionized water	6.3
Final volume	10

ตารางที่ 5 ปริมาณสารต่าง ๆ สำหรับการทำให้ Colony PCR

เมื่อแบ่ง master mix ใส่ลงใน microtube แล้วให้ใช้ไม้จิ้มฟันจิ้ม colony ที่เลือกไว้ (colony ที่มีสีขาว) เพื่อเป็น template ลงไปแกว่งใน microtube จากนั้นนำไม้จิ้มฟันไปใส่ลงในหลอดที่มี LB broth 2 ml ผสมกับ ampicillin 2 μ l นำ microtube ไปเข้าเครื่อง PCR โดยมี condition ที่แสดงในตารางที่ 6

Step	Temperature (°C)	Time (min)
Initial PCR activation step	95	2
3-step cycling		
Denaturing	95	0.30
Annealing	50	0.30
Extension	72	0.30
Number of cycles: 30 cycles		
Final extension	72	7

ตารางที่ 6 Condition สำหรับการทำ colony PCR

ส่วนในหลอดที่เป็น LB broth ให้นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 180 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C หลังจากนั้นทำการตรวจสอบ product PCR โดยการทำให้ electrophoresis ใช้ 1.2% agarose gel แล้วเลือก colony ที่มี band เข้มที่สุดและไม่มี non specific band มาทำต่อโดยเลือกหลอด LB broth ของ clone ที่ต้องการนำมาเติม LB broth จนได้ปริมาณ 6 ml และ ampicilin 4 µl จากนั้นนำไปเขย่าต่อด้วยความเร็ว 180 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C ประมาณ 14-18 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้ในการสกัดพลาสมิดต่อไป

5. การสกัดพลาสมิด

การสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์ E.coli ทำโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิดของ Nucleospin® plasmid โดยการนำ LB broth ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงไว้ข้างต้น มาแบ่งใส่ microtube ประมาณ 1.5 ml นำไปปั่นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเท LB broth ที่เหลือในหลอดแล้วปั่นซ้ำด้วยความเร็วและเวลาเหมือนข้างต้นทำซ้ำเช่นเดิมจน LB broth เหลือ 2 ml นำไปผสมกับ glycerol เพื่อเก็บเป็น stock ที่ -80 °C ส่วนตะกอนที่ได้นำมาเติม A₁ buffer 250 µl ใช้เครื่อง vortex เพื่อผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติม A₂ buffer 250 µl ผสมโดยการคว่ำ-หงายหลอดไปมาประมาณ 6-8 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วเติม A₃ buffer 300 µl คว่ำ-หงายหลอดอีกประมาณ 6-8 ครั้ง นำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นดูดส่วนใสที่ได้จากการปั่นใส่ลงใน column แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เติม A₄ buffer 600 µl ลงใน column แล้วผสมโดยใช้ pipette ดูดขึ้น-ลง นำไปปั่นต่อด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วปั่นซ้ำที่ความเร็วเดิมเป็นเวลา 2 นาที

เพื่อให้ column แห้ง หลังจากนั้นนำ column ใส่ลงใน microtube อันใหม่ เติม AC buffer 50 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาทีแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนใสไว้ซึ่งเป็นส่วนของ พลาสมิดที่สกัดได้ เมื่อทำการสกัดพลาสมิดได้แล้วให้นำพลาสมิดที่ได้ไปทำการตรวจสอบโดยทำ electrophoresis ซึ่งจะใช้ 1.2% agarose gel เช่นเดิม

พลาสมิดที่สกัดได้ทำการส่งตรวจเพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA-sequencing) (Ward Medic, Thailand) เพื่อจะนำ sequence หรือลำดับเบสที่ได้มาทำการหา restriction enzyme ที่เหมาะสมต่อการตัด SNP ของ IL-6 ในตำแหน่งที่ต้องการต่อไป

การตรวจหาจีโนไทป์ ของ SNP IL-6

1. การทำ PCR จากดีเอ็นเอ ที่แยกสกัดจากเซลล์เม็ดเลือด

ทำการผสม master mix ตามรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 7 แล้วนำไปใส่ในเครื่อง PCR ตั้ง condition ตามที่แสดงในตารางที่ 8

สารที่ใช้	ปริมาณที่ใช้ต่อ 1 reaction (μ l)
10X PCR buffer	2.0
25 mM MgCl ₂	2.0
2 mM dNTP	2.0
10 μ M primer forward	0.8
10 μ M primer reverse	0.8
Taq polymerase enzyme	0.5
Deionized water	6.5
Template (DNA solution)	5.0
Final volume	20

ตารางที่ 7 ปริมาณสารต่าง ๆ สำหรับการทำให้ PCR เพื่อหา SNP IL-6

Step	Temperature (°C)	Time (min)
Initial PCR activation step	94	10
3-step cycling		
Denaturing	94	1.00
Annealing	50	1.35
Extension	72	0.30
Number of cycles: 5 cycles		
Denaturing	95	0.30
Annealing	50	0.30
Extension	72	0.30
Number of cycles: 25 cycles		
Final extension	72	10

ตารางที่ 8 Condition สำหรับการทำให้ PCR เพื่อหา SNP IL-6

จากนั้นทำการตรวจสอบ PCR product โดยการทำให้ gel electrophoresis ซึ่งจะใช้ 1.2% agarose gel

2. การทำให้ Digestion

เมื่อได้ PCR product แล้ว ใช้เอนไซม์ SfaNI (Lwel) เป็น restriction enzyme ในการทำให้ digestion เพื่อหา จีโนไทป์ ของ SNP IL-6 ซึ่งจะเตรียมสารดังตารางที่ 9

สารที่ใช้	ปริมาณที่ใช้ต่อ 1 reaction (µl)
TANGO buffer	1.2
SfaNI enzyme (1 unit)	0.1
Deionized water	7.2
PCR product	2.5
Final volume	12.0

ตารางที่ 9 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำให้ digestion

จากนั้นให้นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10-12 ชั่วโมงและเพื่อให้เอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยาได้สมบูรณ์ควรทำการปั่นตกตะกอนทุก 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปให้ความร้อนที่ 80 °C เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์

หลังจากการทำ digestion แล้วจะนำไปทำการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ ที่ได้ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยหยอด sample 12 µl ที่ผสมกับ loading dye 3 µl และ marker ขนาด 50 bp ลงในหลุมของ 8% polyacrylamide gel แบบแนวตั้งซึ่งจะใช้สารในการเตรียมตามตารางที่ 10 โดยมี 0.5X TBE buffer เป็นตัวกลางจ่ายกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที แล้วนำ gel ไปย้อมด้วย 0.1% ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที ล้างออกด้วยน้ำเปล่า ประมาณ 2-3 ครั้ง จากนั้นนำไปผ่านเครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตเพื่อถ่ายรูปแบบดีเอ็นเอ ที่ได้ต่อไป

สารที่ใช้	ปริมาณที่ใช้
30% polyacrylamide	1.33 ml
5X TBE buffer	1 ml
Deionized water	2.635 ml
10% ammonium persulfate	35 µl
TEMED	1.75 µl

ตารางที่ 10 ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียม 8% polyacrylamide gel ต่อ 1 gel

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

วิเคราะห์ข้อมูลโดยสถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistic) โดยจะนำเสนอในรูปของค่าเฉลี่ย(mean) มัธยฐาน(median) และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(standard deviation) จากนั้นนำเสนอโดยใช้กราฟและตาราง ในการนำเสนอโดยการสรุปรวมจากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดและจะใช้สถิติเชิงอนุมาน (inferential statistic) เพื่อสรุปผลของประชากรและใช้ Wilcoxon ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของก่อนและหลังได้รับการผ่าตัดของค่าตัวชี้วัด ได้แก่ IL-6, ESR, CRP และ skin temperature สำหรับ Spearman จะใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของตัวชี้วัด โดยโปรแกรม SPSS16.0 ในส่วนของ SNP จะนำเสนอจำนวนผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมในแต่ละจีโนไทป์ และ ความถี่ของอัลลีลเปรียบเทียบโดยใช้ chi square test คำนวณ Odd ratio โดยใช้ 95% confident interval และคำนวณ logistic regression analysis โดยใช้โปรแกรม STATA 8.0 โดยมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

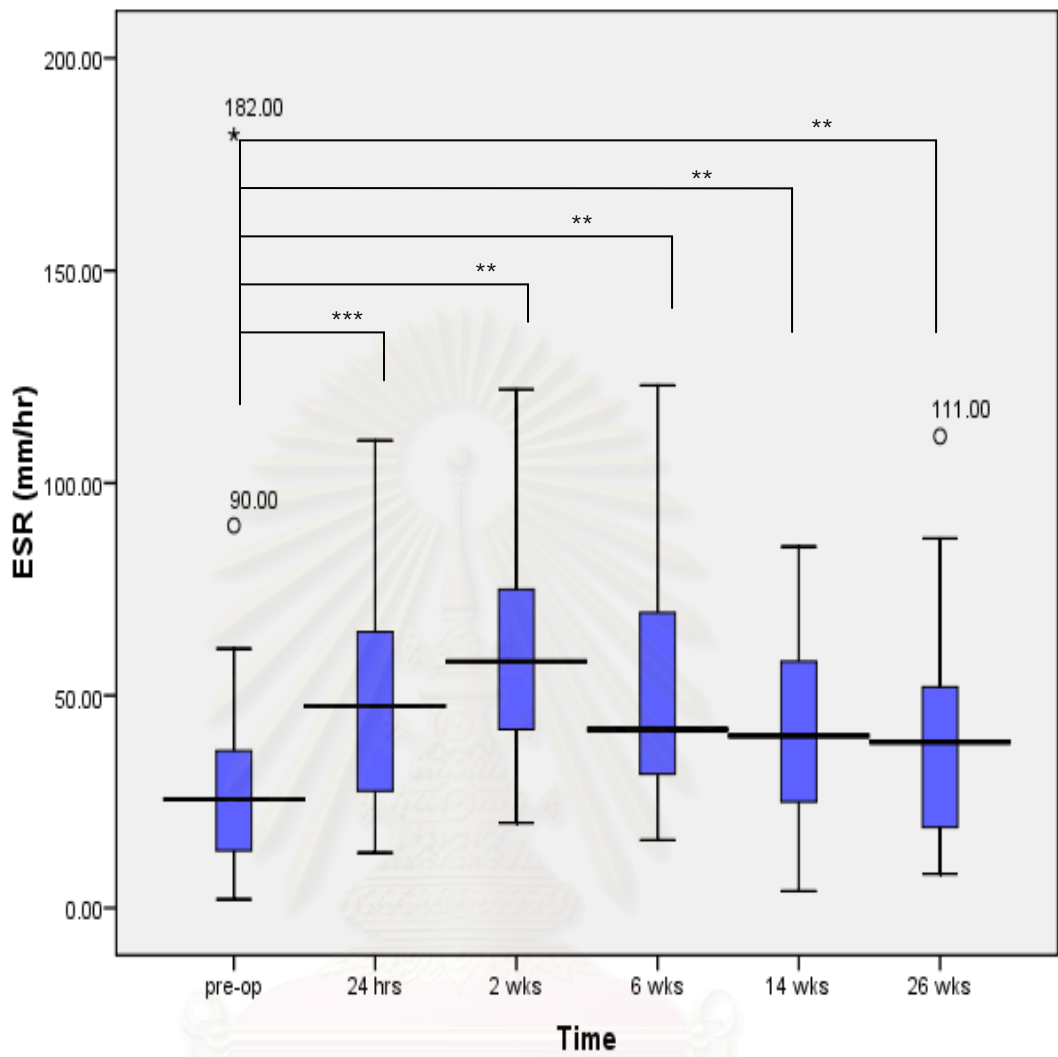
ผลของการเปลี่ยนแปลง ESR, CRP และ IL-6

	Pre-operative	24 hours	2 weeks	6 weeks	14 weeks	26 weeks
ESR (mm/hr)						
Median	26.5	47.5	58.0	42.0	40.5	26.5
Percentile 25	14.0	27.3	42.0	31.0	23.5	14.0
Percentile 75	37.5	65.5	79.0	70.0	58.0	37.5
p value		0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
CRP (mg/dl)						
Median	3.12	84.10	6.87	5.02	3.12	3.12
Percentile 25	3.12	34.20	3.12	3.12	3.12	3.12
Percentile 75	8.45	158.50	15.13	12.98	5.83	8.45
p value		0.000	0.520	0.217	0.205	0.868
IL-6 (pg/ml)						
Median	55.96	173.95	66.32	55.31	55.79	55.96
Percentile 25	40.25	79.71	51.77	48.73	40.25	40.25
Percentile 75	62.04	271.95	77.31	70.61	63.82	62.04
p value		0.000	0.254	0.799	0.361	0.054

ตารางที่ 11 ค่ามัธยฐานของตัวชี้วัดต่าง ๆ ในแต่ละช่วงเวลา

การวัด ESR ของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม พบว่าในช่วงก่อนการผ่าตัด, 24 ชั่วโมง, 2, 6, 14 และ 26 สัปดาห์ภายหลังการผ่าตัด ค่ามัธยฐาน (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 50) มีค่าเท่ากับ 26.5, 47.5, 58.0, 42.0, 40.5 และ 26.5 mm/hr ตามลำดับ จากกราฟแสดงให้เห็นโดยใช้เส้นสีดำแบ่งตรงกลางระหว่าง box ของกราฟ ขอบล่างของ box แสดงถึงค่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25 มีค่าเท่ากับ 14.0, 27.3, 42.0, 31.0, 23.5 และ 14.0 mm/hr ตามลำดับ ส่วนขอบบนของ box แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 75 มีค่าเท่ากับ 37.5, 65.5, 79.0, 70.0, 58.0 และ 37.5 mm/hr ตามลำดับ มีค่า outlier ที่สูงกว่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 95 จำนวน 2 ค่า คือ ที่ก่อนการผ่าตัด 90 mm/hr และ 26 สัปดาห์ภายหลังการผ่าตัดคือ 111 mm/hr แสดงโดยใช้สัญลักษณ์^o และในช่วงก่อนการผ่าตัด มีส่วนที่เป็น outlier มากกว่า 3 เท่ามี 1 ค่าคือ 182 mm/hr แสดงโดยใช้สัญลักษณ์ * (รูปที่ 10)

พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการผ่าตัดพบว่า ESR เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในช่วง 24 ชั่วโมง ($p < 0.05$) และสัปดาห์ที่ 2 ภายหลังการผ่าตัด ($p < 0.001$) ซึ่งในสัปดาห์ที่ 2 ภายหลังการผ่าตัดจะมีระดับสูงสุด จากนั้นเริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 6 ภายหลังการผ่าตัด แต่จนถึงสัปดาห์ที่ 26 ระดับ ESR สูงกว่าก่อนการผ่าตัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 10) แสดงว่าหลังจากได้รับการผ่าตัดจนถึงสัปดาห์ที่ 26 ระดับ ESR ของผู้ป่วยสูงกว่าระดับก่อนการผ่าตัด

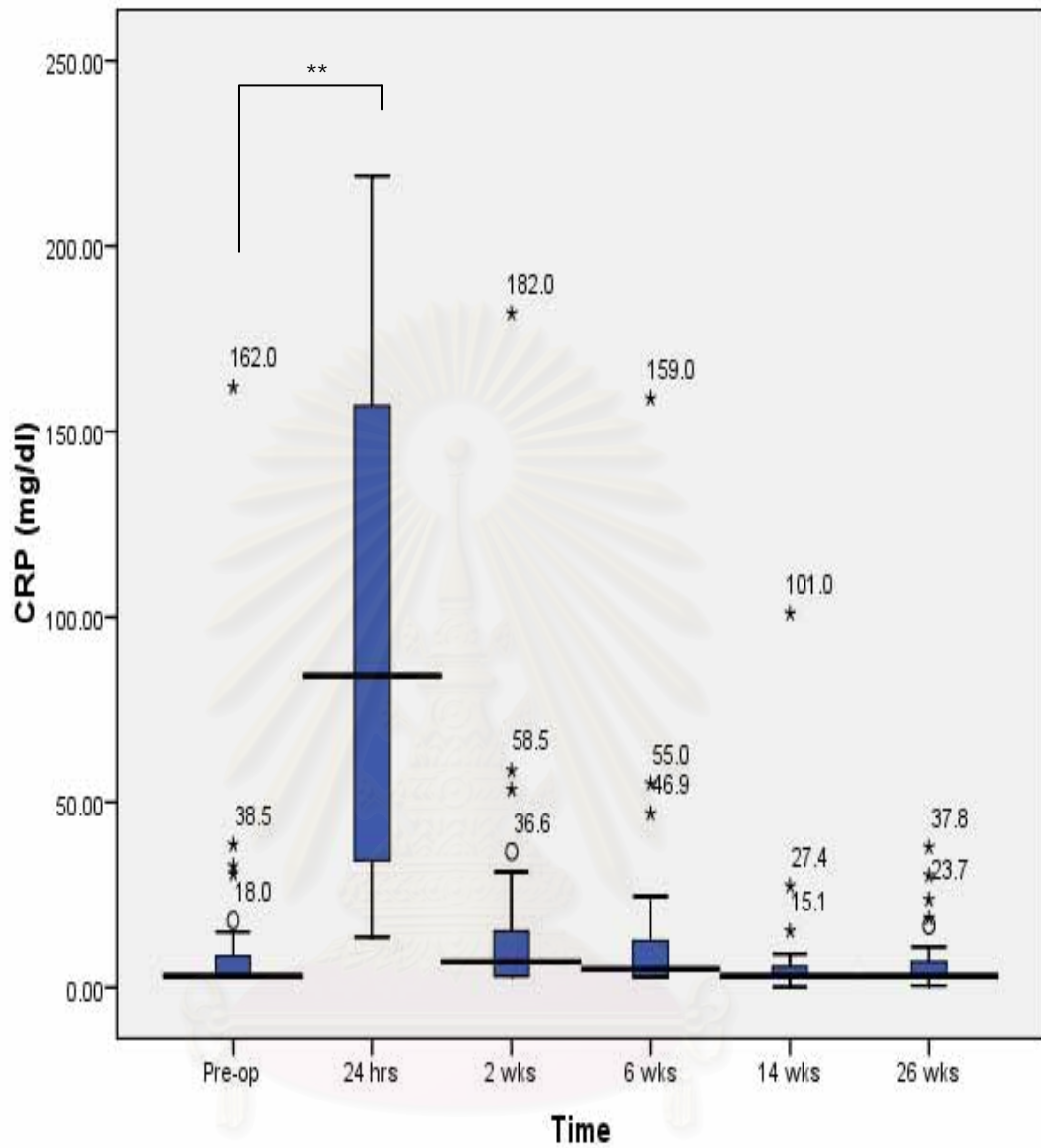


รูปที่ 10 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของ ESR ในเวลาที่แตกต่างกัน (** p < 0.001, *** p < 0.05)

การวัด CRP ของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม พบว่าในช่วงก่อนการผ่าตัด, 24 ชั่วโมง, 2, 6, 14 และ 26 สัปดาห์ภายหลังการผ่าตัด ค่ามัธยฐาน (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 50)มีค่าเท่ากับ 3.12, 84.10, 6.87, 5.02, 3.12 และ 3.12 mg/dl ตามลำดับ จากกราฟแสดงให้เห็นโดยใช้เส้นสีดำแบ่งตรงกลางระหว่าง box ของกราฟ ขอบล่างของ box แสดงถึงค่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25 มีค่าเท่ากับ 3.12, 34.20, 3.12, 3.12, 3.12, และ 3.12 mg/dl ตามลำดับ ส่วนขอบบนของ box แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 75 มีค่าเท่ากับ 8.45, 158.50, 15.13, 12.98, 5.83 และ 8.45 mg/dl ตามลำดับ สัญลักษณ์^o แทนค่า outlier ที่สูงกว่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 95 สัญลักษณ์ * แสดงถึง outlier มากกว่า 3 เท่าซึ่งพบว่ามีหลายค่า (รูปที่ 11)

พบว่า ใน 24 ชั่วโมงภายหลังการผ่าตัด จะมีระดับ CRP สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการผ่าตัด ($p < 0.001$) จากนั้นจะเริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 2 ภายหลังการผ่าตัดโดยจะลดลงจนใกล้เคียงกับก่อนการผ่าตัดในสัปดาห์ที่ 26 ภายหลังการผ่าตัด (รูปที่ 11) ดังนั้น CRP สามารถลดลงจนใกล้เคียงกับก่อนการผ่าตัดได้ตั้งแต่ในสัปดาห์ที่ 2 หลังจากได้รับการผ่าตัด หลังจากสัปดาห์ที่ 2 ภายหลังการผ่าตัดไม่พบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าก่อนการผ่าตัด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

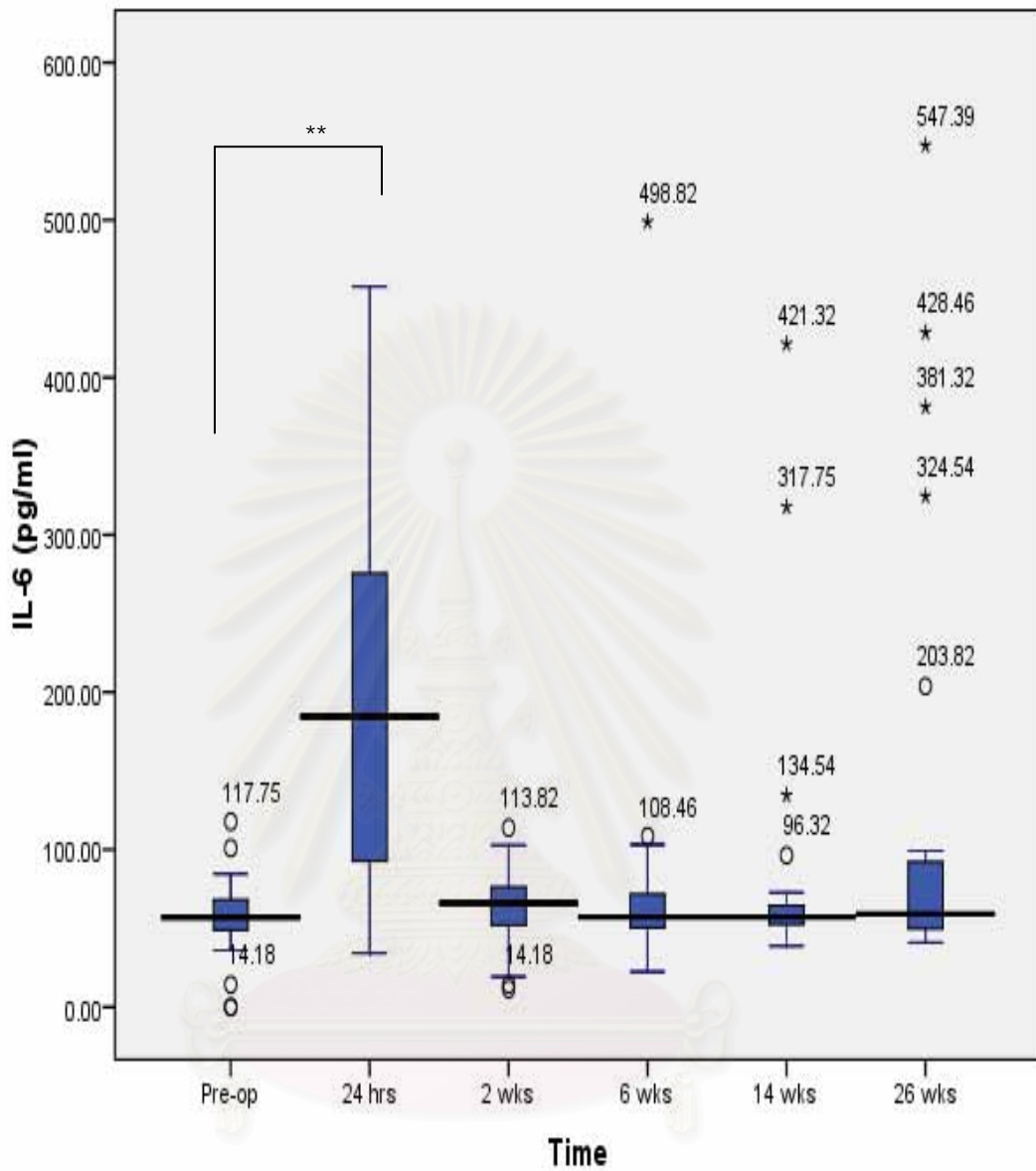


รูปที่ 11

กราฟแสดงความเปลี่ยนแปลงของ CRP ในเวลาที่แตกต่างกัน (**p<0.001)

ระดับของ IL-6 ของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม พบว่าในช่วงก่อนการผ่าตัด, 24 ชั่วโมง, 2, 6, 14 และ 26 สัปดาห์ภายหลังการผ่าตัด ค่ามัธยฐาน (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 50) มีค่าเท่ากับ 55.96, 173.95, 66.32, 55.31, 55.79 และ 55.96 pg/ml ตามลำดับ จากกราฟแสดงให้เห็นโดยใช้เส้นสีดำแบ่งตรงกลางระหว่าง box ของกราฟ ขอบล่างของ box แสดงถึงค่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25 มีค่าเท่ากับ 40.25, 79.71, 51.77, 48.73, 40.25 และ 40.25 pg/ml ตามลำดับ ส่วนขอบบนของ box แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 75 มีค่าเท่ากับ 62.04, 271.95, 77.31, 70.61, 63.82 และ 62.04 pg/ml ตามลำดับ สัญลักษณ์^o แทนค่า outlier ที่สูงกว่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 95 สัญลักษณ์ * แสดงถึง outlier มากกว่า 3 เท่ามีซึ่งพบว่ามีหลายค่า (รูปที่ 13)

พบว่า ในช่วง 24 ชั่วโมงภายหลังการผ่าตัด IL-6 มีระดับสูงกว่าก่อนการผ่าตัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) จากนั้นเริ่มลดลงใกล้เคียงกับก่อนการผ่าตัดในสัปดาห์ที่ 2 จนถึง สัปดาห์ที่ 26 ภายหลังการผ่าตัด (รูปที่ 13) แสดงว่า IL-6 สามารถลดระดับใกล้เคียงกับก่อนการผ่าตัดตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 เช่นเดียวกับ CRP โดยหลังจากสัปดาห์ที่ 2 ภายหลังการผ่าตัดไม่พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าก่อนการผ่าตัด



รูปที่ 12

กราฟแสดงความเปลี่ยนแปลงของ IL-6 ในเวลาที่แตกต่างกัน (** p < 0.001)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่า

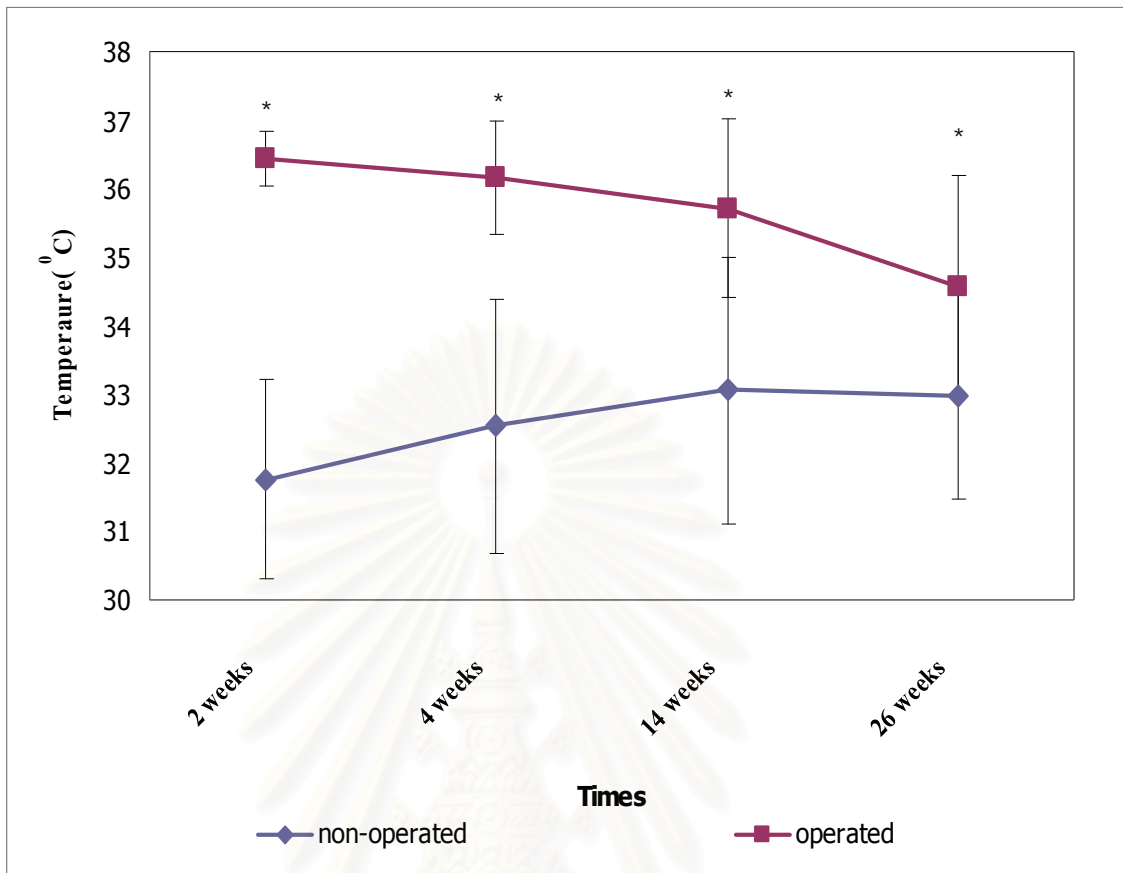
ค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่าหลังได้รับการผ่าตัดที่ 2, 6, 14 และ 26 สัปดาห์ คือ 36.4, 36.2, 35.7 และ 34.6 °C ตามลำดับ ส่วนในข้างที่ไม่ได้รับการผ่าตัดมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 31.8, 32.5, 33.1 และ 33.0 เช่นกัน (ตารางที่ 12)

	2 weeks	6 weeks	14 weeks	26 weeks
Non-operated knee	31.8 ± 1.45	32.5 ± 1.86	33.1 ± 1.95	33.0 ± 1.51
Operated knee	36.4 ± 0.40	36.2 ± 1.87	35.7 ± 1.30	34.6 ± 1.61

ตารางที่ 12 ค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่าที่ได้รับการผ่าตัดเปรียบเทียบกับข้อเข่าอีกข้างที่ไม่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม

พบว่าตลอดระยะเวลาการตรวจวัดเข่าข้างที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมจะมีอุณหภูมิสูงกว่าเข่าที่ไม่ได้รับการผ่าตัดโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) (รูปที่ 14) จะเห็นได้ว่าอุณหภูมิบริเวณผิวหนังข้อเข่าที่ได้รับการผ่าตัดจะเริ่มแนวโน้มลดลงตามลำดับจนถึงสัปดาห์ที่ 26 อุณหภูมิจึงใกล้เคียงกันเข่าอีกข้างที่ไม่ได้รับการผ่าตัด

โดยเข่าที่ได้รับการผ่าตัด พบว่าอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่าในสัปดาห์ที่ 14 และสัปดาห์ที่ 26 ภายหลังการผ่าตัดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับอุณหภูมิภายหลังการผ่าตัดในสัปดาห์ที่ 2 แสดงว่าอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่าลดลงช้าที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวชี้วัดอื่นๆ

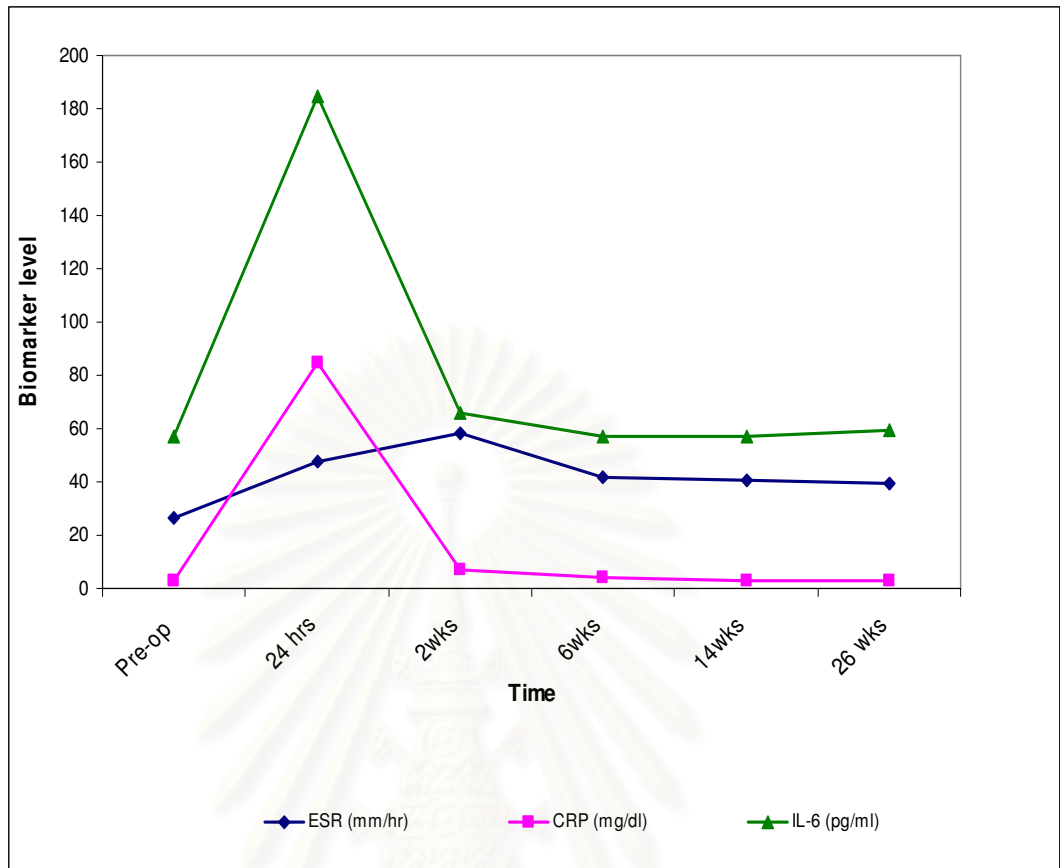


รูปที่ 13 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิบริเวณเข้าทั้ง 2 ข้างของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน (* p < 0.001)

ผลการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของตัวชี้วัด

จากการเปรียบเทียบตัวชี้วัดทั้ง 3 ตัวดังกล่าว (รูปที่ 13) จะเห็นได้ว่าระดับ CRP และ IL-6 ในช่วง 24 ชั่วโมงภายหลังการผ่าตัด เพิ่มขึ้นมากกว่าก่อนการผ่าตัด 28 และ 3 เท่าตามลำดับ และมีระดับสูงขึ้นถึงระดับสูงสุดได้เร็วกว่า ESR ซึ่งจะมีระดับสูงสุดในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ภายหลังการผ่าตัด หลังจากนั้นทั้ง IL-6 และ CRP จึงเริ่มลดลงใกล้เคียงกับค่าก่อนการผ่าตัดในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ภายหลังการผ่าตัดแต่ ESR จะเริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 6

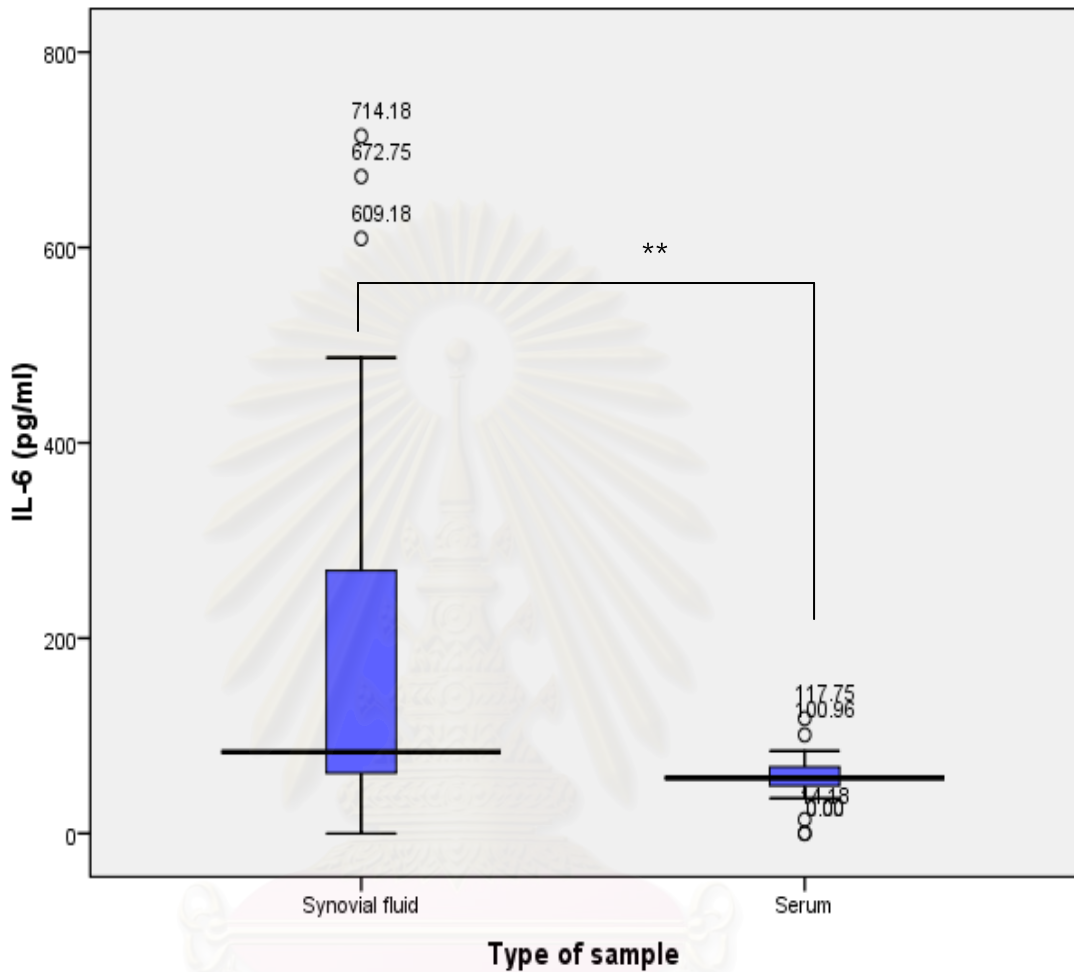
เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติโดยใช้ Spearman พบว่าก่อนการผ่าตัดไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับตัวชี้วัดใด ในช่วง 24 ชั่วโมงภายหลังการผ่าตัด พบว่าระดับของ ESR และ CRP มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$ และ $r = 0.651$) ในสัปดาห์ที่ 2 ภายหลังการผ่าตัดมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ ESR และ CRP ($p < 0.001$ และ $r = 0.665$) ESR และ IL-6 ($p = 0.013$ และ $r = 0.434$) CRP และ IL-6 ($p = 0.001$ และ $r = 0.539$) ส่วนในสัปดาห์ที่ 26 ภายหลังการผ่าตัด ระดับของ ESR และ CRP มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.013$ และ $r = 0.441$) ส่วน IL-6 และ CRP มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ($p = 0.03$ และ $r = 0.452$) อีกทั้งยังพบว่าคุณหมอมิฉวิหังบริเวณข้อเข่าไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญกับตัวชี้วัดใดเลย



รูปที่ 14

กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของ biomarker ในเวลาที่แตกต่างกัน

ความสัมพันธ์ของระดับ IL-6 ในน้ำไขข้อและในซีรัม



รูปที่ 15 กราฟแสดงการเปรียบเทียบระดับของ IL-6 ในน้ำไขข้อและในซีรัม ($p < 0.001$)

ระดับ IL-6 จากน้ำไขข้อมีค่ามัธยฐานเท่ากับ 87.03 pg/ml โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25 ซึ่งเป็นขอบล่างของ box และเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 75 ขอบบนของ box เท่ากับ 25 และ 269.45 pg/ml ตามลำดับ ส่วนซีรัมมีค่ามัธยฐานเท่ากับ 56.86 pg/ml ค่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25 และ 75 เท่ากับ 25 และ 75 pg/ml ตามลำดับ พบว่าระดับ IL-6 จากน้ำไขข้อจะมีค่าสูงกว่าซีรัมก่อนการผ่าตัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เนื่องจากน้ำไขข้อจะบ่งบอกถึงการอักเสบของแผลผ่าตัดจาก local response ทำให้มีค่าสูงกว่าในซีรัมซึ่งเป็น systemic response

ผลการศึกษา restriction enzyme ที่เหมาะสมต่อ IL-6 polymorphism

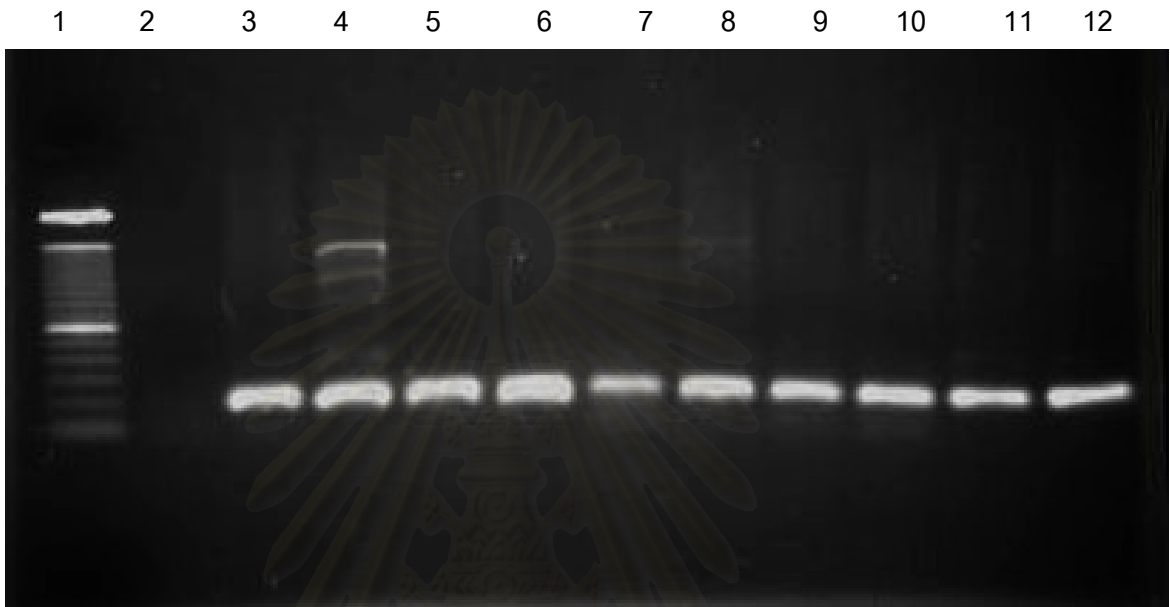
จากการส่งตรวจลำดับเบสของ SNP IL-6 (ตารางที่13) ในกลุ่มของผู้ป่วยที่เป็นโรคข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นคนปกติที่มาเข้ารับการตรวจสุขภาพประจำปี พบว่า เอนไซม์ SfaNI (Lwel) เหมาะสมต่อการใช้เป็น restriction enzyme เพื่อตรวจหาจีโนไทป์ของ SNP IL-6 ที่ตำแหน่ง -174

ชนิด	ลำดับเบส
osteoarthritis	CTGATTGGAAACCTTATTAGGATTGTGCAATGTGACGTCCTTTA GCATCGCAAGACACAACCTAGGGGGAAAAGTGCAGCTTAGGTC GTCATTGAGGCTAGCGCTAAGAAGCAGAACCACTCTTCCTTTA CTTTCTTTTTTCTTTTATTAGTGACTCAGCACTTTGGCATGTCCT GACAAAGAGTAAAGCTGAAGTCA
control	CTGATTGGAAACCTTATTAGGATTGTGCAATGTGACGTCCTTTA GCATCGCAAGACACAACCTAGGGGGAAAAGTGCAGCTTAGGTC GTCATTGAGGCTAGCGCTAAGAAGCAGAACCACTCTTCCTTTA CTTTCTTTTTTCTTTTATTAGTGACTCAGCACTTTGGCATGTCCT GACAAAGAGTAAAGCTGAAGTCAA

ตารางที่ 13 ลำดับเบสของ IL-6 ในผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มควบคุม

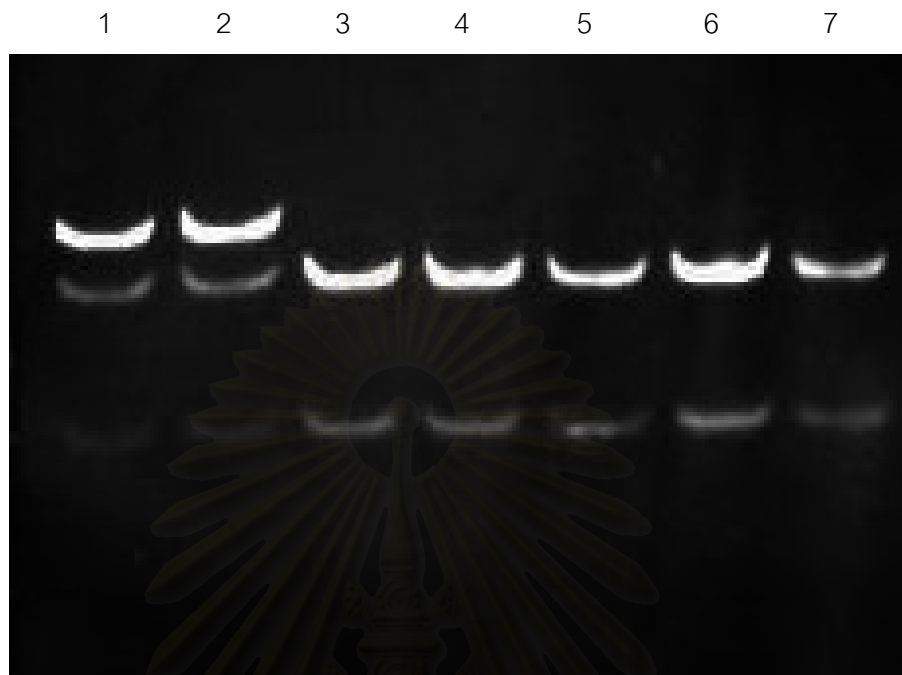
ผลการตรวจหาจีโนไทป์ของ SNP IL-6

จากการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ SNP IL-6 ที่ตำแหน่ง -174 จะได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 198 bp (รูปที่15)

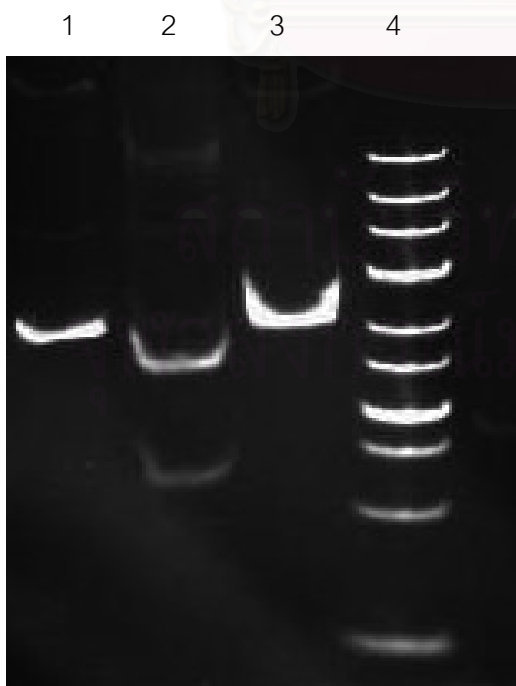


รูปที่ 16 ดีเอ็นเอจากการทำ PCR ขนาด 198 bp
แถวที่ 1 DNA marker 100 bp
แถวที่ 2 Negative control
แถวที่ 3-12 PCR product

เมื่อนำไปตัดด้วยเอนไซม์ SfaNI พบว่าจีโนไทป์ของ SNP IL-6 ที่ตำแหน่ง -174 มี 3 รูปแบบ คือ GG มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ 2 ชิ้น คือ 140 และ 58 bp , GC มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 3 ชิ้น ขนาด 198, 140 และ 58 bp และ CC ซึ่งเอนไซม์ไม่สามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ sfaN1 จะมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ 1 ชิ้นขนาด 198 bp (รูปที่ 16,17)



รูปที่ 17 ลักษณะของดีเอ็นเอในแบบจีโนไทป์ต่าง ๆ
 แถวที่ 1-2 GC (heterozygous)
 แถวที่ 3-7 GG (homozygous)



รูปที่ 18 ลักษณะของดีเอ็นเอในแบบจีโนไทป์ต่าง ๆ
 แถวที่ 1 CC (homozygous)
 แถวที่ 2 GG (homozygous)
 แถวที่ 3 PCR product
 แถวที่ 4 DNA marker 50 bp

จากการศึกษาพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมมีการกระจายตัวของจีโนไทป์ GG, GC และ CC เป็น 53, 16 และ 1 ตามลำดับ ส่วนในกลุ่มควบคุมมีความถี่ของจีโนไทป์ GG, GC และ CC เป็น 88, 12 และ 0 ตามลำดับ แสดงให้เห็นได้ว่าจีโนไทป์ GC ในผู้ป่วยมีสัดส่วนสูงกว่าประมาณ 2 เท่าของกลุ่มควบคุม (22.9 และ 12%)

อัลลีล G และ C ในกลุ่มผู้ป่วยมีการกระจายตัวเป็น 122 และ 18 ตามลำดับ ส่วนในกลุ่มควบคุมเป็น 188 และ 12 ตามลำดับ อัตราส่วนของเพศชาย/เพศหญิงในกลุ่มผู้ป่วยเป็น 14/56 ส่วนในกลุ่มควบคุมเป็น 30/70

Genotype	OA (n=70)		Control (n=100)	
	n	percentage	n	percentage
G/G	53	75.7	88	88
G/C	16	22.9	12	12
C/C	1	1.4	0	0
Alleles				
G	122	87.1	188	94
C	18	12.9	12	6
Sex				
Male	14	20	30	30
Female	56	80	70	70

ตารางที่ 14 การกระจายตัวของจีโนไทป์, อัลลีลของ IL-6 และเพศ

จากการวิเคราะห์โดยใช้สถิติ logistic regression พบว่าจีโนไทป์ GC และเพศหญิงมีอัตราการเสี่ยงต่อการเป็นโรคข้อเข่าเสื่อม โดยมี odds ratio อยู่ที่ 2.21 และ 1.71 ตามลำดับแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ส่วนจีโนไทป์ CC ไม่พบอุบัติการณ์ในกลุ่มควบคุมเลย ดังนั้นจีโนไทป์ดังกล่าวไม่น่าจะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนี้

	Odds ratio	95% CI	p
G/C genotype	2.21	0.97-5.04	0.06
Sex F	1.71	0.83-3.54	0.15

ตารางที่ 15 ปัจจัยที่มีผลต่อความเสี่ยงต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมวิเคราะห์โดยใช้ logistic regression



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมเป็นวิธีการรักษาผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมที่มีอาการรุนแรง ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นผู้สูงอายุ สิ่งที่เกี่ยวข้องที่แพทย์ตระหนักถึงการอักเสบของแผลภายหลังการผ่าตัดจึงเป็นเรื่องที่สำคัญ ตัวชี้วัดที่สามารถบอกถึงการอักเสบได้รวดเร็วจึงเป็นเครื่องมือที่สำคัญสำหรับการตรวจติดตามอาการอักเสบที่ดี ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงศึกษาความสัมพันธ์ของตัวชี้วัดการอักเสบของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม

การวิจัยครั้งนี้ใช้ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่มารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม แผนก ออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ มีจำนวนทั้งสิ้น 52 ราย เป็นชาย 8 รายและหญิง 44 ราย อายุเฉลี่ย 69.2 ปี ผลจากการวิจัยพบว่าระดับ ESR เพิ่มขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 ภายหลังการผ่าตัดและเริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 6 ภายหลังการผ่าตัดโดยลดลงจนมีค่าใกล้เคียงกับก่อนได้รับการผ่าตัด (รูปที่ 10)

สำหรับ CRP และ IL-6 จะมีค่าสูงสุดใน 24 ชั่วโมงภายหลังการผ่าตัด จากนั้นระดับเริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 2 ภายหลังการผ่าตัด โดยเมื่อพิจารณาจากกราฟ (รูปที่ 11, 12) จะเห็นว่า IL-6 ใน 24 ชั่วโมงหลังการผ่าตัด มีระดับสูงกว่าก่อนการผ่าตัดประมาณ 3 เท่า ในขณะที่ CRP ใน 24 ชั่วโมงหลังได้รับการผ่าตัดมีค่าสูงกว่าก่อนได้รับการผ่าตัดประมาณ 28 เท่า

ดังนั้น CRP และ IL-6 สามารถใช้ในการประเมินภาวะการอักเสบภายหลังการผ่าตัดของผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมได้ดีกว่า ESR เนื่องจากใช้เวลาการเปลี่ยนแปลงได้รวดเร็ว

การตรวจวัดอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่าภายหลังได้รับการผ่าตัดพบว่า อุณหภูมิบริเวณผิวหนังของเข่าที่ได้รับการผ่าตัดสูงกว่าข้างที่ไม่ได้รับการผ่าตัดโดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) หลังจากนั้นจึงเริ่มลดลงการผ่าตัดในสัปดาห์ที่ 2 ภายหลังได้รับการผ่าตัดและมีค่าใกล้เคียงกับข้างที่ไม่ได้รับการผ่าตัดในสัปดาห์ที่ 26 ภายหลังการผ่าตัด ดังนั้นอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่านำมาใช้ในการประเมินภาวะการอักเสบภายหลังการผ่าตัดได้เพียงเบื้องต้นเท่านั้น เนื่องจากใช้ระยะเวลาสั้นกว่ามีค่าใกล้เคียงกับปกติ (รูปที่ 14)

จากการที่พบว่าอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่าจะลดลงช้ากว่าตัวชี้วัดอื่นและยังพบว่าอุณหภูมิข้างที่ไม่ได้รับการผ่าตัดจะมีค่าอุณหภูมิสูงขึ้นอาจเป็นเพราะตั้งแต่ช่วงหลังการผ่าตัด 2 สัปดาห์เป็นต้นไป ผู้ป่วยมักจะมีกิจกรรมมากขึ้นทำให้การใช้งานของข้อหนักขึ้นจึงอาจทำให้อุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นโดยไม่ได้มีการอักเสบซึ่งเป็นเรื่องปกติที่จะเกิดขึ้นได้

ดังนั้นก่อนการผ่าตัดพบว่าไม่มีตัวชี้วัดใดที่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่ภายหลังได้รับการผ่าตัดในสัปดาห์ที่ 26 ระดับของ ESR กับ CRP และ IL-6 กับ CRP มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

Biomarker	ช่วงเวลาในระดับสูงสุด (ภายหลังการผ่าตัด)	
	การศึกษารั้งนี้	การศึกษาที่ผ่านมา
ESR	2 สัปดาห์	5 วัน ^(4, 19)
CRP	24 ชั่วโมง	1-2 วัน ⁽¹⁸⁾
		2 วัน ^(4, 19, 20)
		5-7 วัน ⁽²²⁾
IL-6	24 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง ⁽²⁰⁾
		24 ชั่วโมง ⁽²¹⁾
อุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่า	2 สัปดาห์	5-7 วัน ⁽²²⁾
		1 วัน ⁽²³⁾

ตารางที่ 16 การเปรียบเทียบช่วงเวลาในระดับของตัวชี้วัดขึ้นสูงสุดในผู้ป่วยผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่า เทียบระหว่างการศึกษาในครั้งนี้และการศึกษาที่ผ่านมา

ดังนั้นจากการศึกษาในผู้ป่วยผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมสามารถนำรูปแบบของการเปลี่ยนแปลงของตัวชี้วัดต่าง ๆ ที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำมาใช้ประเมินการอักเสบภายหลังการผ่าตัดได้ โดยที่หากค่าสูงกว่าค่าที่ศึกษาได้ในช่วงเวลานั้นอาจทำให้แพทย์พิจารณาถึงความผิดปกติที่อาจเกิดขึ้นได้ภายหลังการผ่าตัด เช่น การอักเสบที่อาจเกิดจากการหลวมของข้อเข่าเทียมหรือการที่มุมผิดปกติไปจากเดิม เป็นต้น ทำให้สามารถประเมินได้รวดเร็วกว่าที่รอให้ผู้ป่วยแสดงอาการได้

โรคข้อเข่าเสื่อมในปัจจุบันพบว่า มีหลายปัจจัยที่ทำให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรค แต่อีกเหตุผลสำหรับการเกิดโรคดังกล่าวที่เป็นไปได้คือ การมีความหลากหลายทางพันธุกรรม จากการศึกษาที่ผ่านมาจีโนไทป์ของ SNP มีผลต่อความเสี่ยงของการเกิดโรคข้อเสื่อม ดังนั้นการวิจัยนี้จึงศึกษาถึงลักษณะของจีโนไทป์ของ SNP IL-6 เพื่อหาปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อมได้

การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาโดยแบ่งกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมจำนวน 70 ราย เป็นชาย 14 ราย (20%) หญิง 56 ราย (80%) และ กลุ่มควบคุม 100 ราย เป็นชาย 30 ราย (30%) หญิง 70 ราย (70%) พบว่า SNP IL-6 ตำแหน่ง -174 มีลักษณะจีโนไทป์ 3 แบบ คือ GG, GC และ CC โดยทั้งในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมจะมีจีโนไทป์ GG มากที่สุด คือ 53 (75.7%) และ 88 (88%) รายตามลำดับ ส่วนจีโนไทป์ GC ในกลุ่มผู้ป่วยพบ 16 ราย (22.9%) และในกลุ่มควบคุม 12 ราย (12%) ซึ่งในผู้ป่วยมีมากกว่าเกือบ 2 เท่า แต่จีโนไทป์ CC พบในกลุ่มผู้ป่วยเพียง 1 ราย (1.4%) เท่านั้น ในขณะที่กลุ่มควบคุมไม่พบลักษณะของจีโนไทป์ดังกล่าว (ตารางที่ 14) และ จากการใช้ logistic regression เพื่อวิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อม สรุปได้ว่า จีโนไทป์ GC และเพศหญิง มีอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมเป็น 2.21 และ 1.71 เท่าแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 15)

อภิปรายผลการวิจัย

การเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย เช่น อายุ ประวัติการได้รับการบาดเจ็บ ความอ้วน หรือ การรักษาโดยใช้ยาบางชนิด เป็นต้น⁽⁴⁰⁾ ซึ่งถ้ามีระดับของการเกิดโรคที่รุนแรงการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เป็นการรักษาในปัจจุบันซึ่งเป็นวิธีการรักษาที่แพร่หลายกันอย่างมาก เพื่อที่จะทำให้ผู้ป่วยสามารถกลับมาดำเนินชีวิตประจำวันได้อย่างปกติ สิ่งที่จะตามมาภายหลังการผ่าตัดคือ ภาวะการอักเสบและการติดเชื้อ เป็นเรื่องสำคัญที่ควรพึงระวังอย่างมากเนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่จะเป็นผู้สูงอายุ

ปัจจุบันแพทย์จะใช้ ESR และ CRP ในการประเมินหรือตรวจติดตามภาวะการอักเสบของผู้ป่วยภายหลังได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม จากการศึกษาที่ผ่านมามีการตรวจวัด IL-6 ซึ่งอยู่ในกลุ่มของสารประเภทไซโตไคน์ สามารถนำมาใช้ในการประเมินภาวะการอักเสบภายหลังการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมได้⁽⁷⁾ เนื่องจาก IL-6 เป็น proinflammatory cytokine ชนิดหนึ่งที่ถูกสร้างขึ้นมาจากเซลล์ monocytes หรือ macrophages เพื่อไปกระตุ้นเซลล์ตับให้สร้าง CRP, fibrinogen, serum amyloid A, hepatoglobin และ complement⁽¹⁵⁾ ทำให้ IL-6 จะสูงขึ้นก่อน CRP เมื่อมีภาวะการอักเสบเกิดขึ้น

โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาในผู้ป่วยผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมพบว่า IL-6 จะสูงสุดที่ 12 ชั่วโมงภายหลังการผ่าตัดแล้วเริ่มลดลงหลังจากนั้น ส่วน CRP มีระดับสูงสุดในวันที่ 2 ภายหลังการผ่าตัด⁽²⁰⁾ แต่จากการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการตรวจวัดในช่วง 24 ชั่วโมง ภายหลังการผ่าตัดทำให้พบว่า IL-6 และ ESR มีระดับสูงสุดพร้อมกันในช่วงนี้ ทั้งที่ IL-6 ในช่วงวันดังกล่าวกำลังเริ่มลดลง ซึ่งเกิดจากข้อจำกัดในเรื่องของการเก็บตัวอย่างจึงไม่สามารถเก็บตัวอย่างเพื่อมาตรวจทุกชั่วโมงภายหลังการผ่าตัดได้

สำหรับการศึกษา ESR ซึ่งเป็นการวัดอัตราการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง โดยเม็ดเลือดแดงจะเกาะกันเป็นกลุ่มทำให้ เมื่อมีการอักเสบทำให้ fibrinogen ในพลาสมาเพิ่มมากขึ้น จึงเกิดความหนืด เซลล์เม็ดเลือดแดงจึงตกได้ช้าลง ดังนั้นการที่ IL-6 เป็นตัวกระตุ้นให้เซลล์ตับสร้าง fibrinogen มากขึ้นภายหลังการอักเสบ จึงทำให้การวัด ESR เกิดมีการเปลี่ยนแปลงที่ช้ากว่า IL-6 และ CRP

การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่า พบว่าอุณหภูมิที่วัดได้มีค่า SD ที่ค่อนข้างกว้างมาก อาจเกิดเนื่องมาจากในผู้ป่วยแต่ละคนมีอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่าแตกต่างกันในแต่ละสภาวะแวดล้อมซึ่งเป็นผลให้อุณหภูมิบริเวณข้อเข่าสามารถแปรผันไปตามอุณหภูมิสภาวะแวดล้อมได้เช่นกัน ดังนั้นอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่าจึงสามารถนำมาใช้ในการประเมินภาวะการอักเสบได้เพียงเบื้องต้นเท่านั้น จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า 1-2 ปีภายหลังการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่าข้างที่ได้รับการผ่าตัดเปรียบเทียบกับข้างที่ไม่ได้รับการผ่าตัดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽²³⁾

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้ทำการวิจัยได้ทำการเก็บน้ำไขข้อของผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนข้อเข่าเทียม พบว่ามีค่า IL-6 สูงกว่าในซีรัมก่อนการผ่าตัดประมาณ 3 เท่า โดยมีค่าเฉลี่ย 180.54 และ 57.0 pg/ml ตามลำดับ ซึ่งในการวิจัยไม่สามารถเก็บน้ำไขข้อภายหลังการผ่าตัดได้จึงไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของ IL-6 ในน้ำไขข้อและในเลือด ภายหลังการผ่าตัดได้ แต่จากการวิจัยของ Lisowska B ในปี ค.ศ. 2007 ได้เปรียบเทียบระดับ IL-6 และ IL-8 ในซีรัม

และ drainage fluid ก่อนและหลังการผ่าตัด พบว่าระดับ IL-6 มีแนวโน้มสูงขึ้นทั้งในซีรัม และใน drainage fluid โดยมีระดับสูงสุด 24 ชั่วโมงภายหลังการผ่าตัด ซึ่ง drainage fluid พบว่ามีค่าสูงกว่าในซีรัม ดังนั้น การวัดระดับไซโตไคน์ใน drainage fluid จึงบ่งบอกถึงการเกิด local response จากการผ่าตัดได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับในซีรัม เนื่องจากในผู้ป่วย RA นั้นมีการอักเสบเรื้อรังทำให้ระดับไซโตไคน์ในเลือดสูงก่อนที่จะได้รับการผ่าตัด⁽²¹⁾ จากการวิจัยนี้ น้ำไขข้อและ drainage fluid จึงให้ผลใกล้เคียงกัน ดังนั้นระดับ IL-6 สูงมากภายหลังการผ่าตัด 1-3 วันแสดงว่าน่าจะมี systemic response ที่มาจาก local response ของแผลหลังการผ่าตัด

เนื่องจากการวิจัยในครั้งนี้ผู้ทำการวิจัยต้องการเปรียบเทียบ IL-6 กับตัวชี้วัดที่ใช้ในปัจจุบันคือ ESR และ CRP จึงไม่ได้ทำการตรวจหาค่ามาตรฐานและ clinical outcome อื่นๆ ของผู้ป่วย เช่น การตรวจนับเม็ดเลือดแบบสมบูรณ์ (complete blood count) และการศึกษาในอนาคตจะทำการตรวจนับเม็ดเลือดแบบสมบูรณ์ รวมทั้งสารชีวเคมีของเลือดอื่น ๆ เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับระดับ IL-6, ESR, CRP และ คุณภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข้าต่อไป

สรุปได้ว่าภายหลังการผ่าตัด 26 สัปดาห์ ESR กับ CRP และ IL-6 กับ CRP มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าหลังจากได้รับการผ่าตัดประมาณ 6 เดือนตัวชี้วัดต่าง ๆ จะลดลงใกล้เคียงกับค่าก่อนการผ่าตัดแล้ว ในขณะที่คุณภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข้าไม่พบความสัมพันธ์กับตัวชี้วัดอื่นเนื่องจากจะเห็นได้ว่าภายหลังการผ่าตัดในสัปดาห์ที่ 26 คุณภูมิผิวหนังข้อเข้าข้างที่ได้รับการผ่าตัดยังมีค่าสูงมีเปรียบเทียบกับข้างที่ไม่ได้รับการผ่าตัด

ในขณะที่ก่อนการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข้าไม่มีความสัมพันธ์ของตัวชี้วัดใดเลย เนื่องจากผู้ป่วยข้อเข้าเสื่อมมักจะมีอาการอักเสบเรื้อรังก่อนแล้ว จึงทำให้ตัวชี้วัดบางตัวมีค่าสูงตั้งแต่ยังไม่ได้รับการผ่าตัด รวมทั้งในการวิจัยครั้งนี้ผู้ป่วยบางรายได้ทำการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข้าเทียมมาก่อนแล้วข้างหนึ่งหรืออีกข้างหลังการผ่าตัดครั้งแรกกำลังมีอาการอักเสบจึงทำให้ตัวชี้วัดระดับการอักเสบบางตัวสูงขึ้นได้

โรคข้อเข้าเสื่อมเป็นผลมาจากการถูกทำลายของกระดูกอ่อนบริเวณผิวข้อเข้า โดยงานวิจัยก่อนหน้านี้นี้พบว่า การทำลายกระดูกอ่อนเกิดจากการเพิ่มขึ้นของ IL-1, IL-6, acute-phases protein และ TNF- α ⁽⁴¹⁾ ดังนั้น IL-6 gene จึงมีความสำคัญต่อการเกิดโรคข้อเข้าเสื่อม โดยอัลลีล G ที่ SNP IL-6 ตำแหน่ง -174 มีความสัมพันธ์ต่อกระบวนการถอดรหัส (transcription) ในหลอดทดลอง⁽⁴²⁾

⁴³⁾ จากข้อมูลดังกล่าว จึงทำให้การแสดงออกของ IL-6 gene อาจมีปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคข้อเข้าเสื่อม

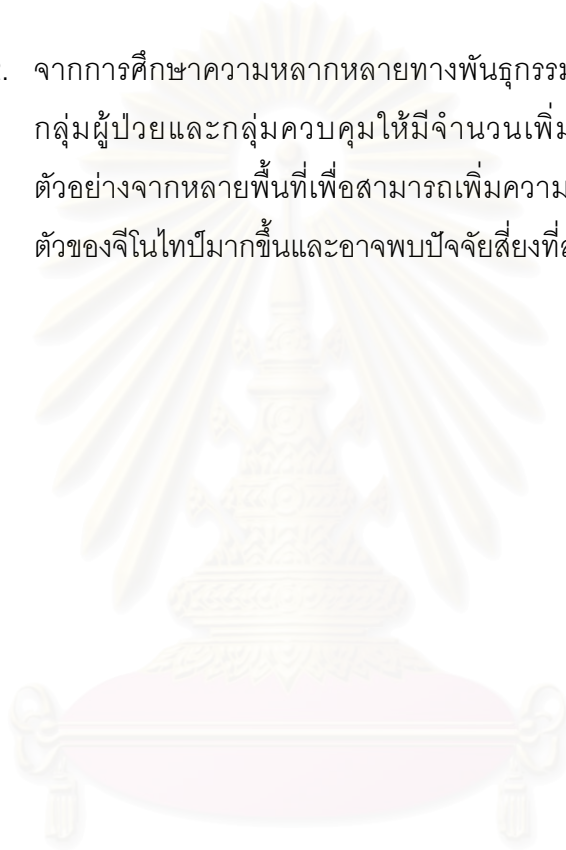
จากความหลากหลายทางพันธุกรรมของ IL-6 ทำให้เกิดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคข้อเข่าเสื่อมได้ ดังนั้นการศึกษาคำนี้จึงทำการศึกษา SNP IL-6 ตำแหน่ง -174 เพื่อหาจีโนไทป์ที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ซึ่งผลของการศึกษาพบว่าไม่มีจีโนไทป์ใดที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาจเป็นเพราะขนาดประชากรที่ใช้ในการศึกษาคำนี้ไม่มากพอเนื่องมาจากเป็นเพียงการทดลองเบื้องต้นเท่านั้น

ทั้งนี้จากการศึกษาของ Capurso C. และคณะในปี 2004 พบว่าในกลุ่มของผู้ป่วยอัลไซเมอร์และกลุ่มควบคุมจากภูมิภาคของยุโรปจากตอนเหนือไปยังตอนใต้มีความถี่ของจีโนไทป์ GG และ GC เพิ่มขึ้น และพบอัลลีล G เพิ่มขึ้นด้วย แต่อัลลีลจะลดน้อยลงซึ่งความแตกต่างของความถี่ในอัลลีลและจีโนไทป์ในผู้ป่วยอัลไซเมอร์อาจเกิดจากความหลากหลายของภูมิภาคในยุโรปได้⁽³⁵⁾ ดังนั้นจากการวิจัยในคำนี้พบว่ามีความถี่ของจีโนไทป์ CC น้อยมากซึ่งอาจเกิดจากการเก็บตัวอย่างที่มีไม่มีการกระจายภูมิภาคทำให้ลักษณะของจีโนไทป์ที่พบไม่แตกต่างกัน ดังนั้นควรจะทำการศึกษาจากหลายๆ ภูมิภาคของประเทศไทยเพื่อจะได้พบการกระจายได้มากขึ้น

อีกทั้งการมีลักษณะของ SNP ที่แตกต่างกัน คือเป็นแบบ haplotype หรือ diplotype อาจทำให้สามารถเพิ่มหรือลดอัตราการเสี่ยงต่อการเกิดโรคนั้นๆ ได้ ซึ่งพบในการศึกษาของการศึกษาของ Kamarainen OP. และคณะในปี ค.ศ. 2007 พบว่าในตำแหน่งของ SNP IL-6 ที่ตำแหน่งของ promoter ที่ -597 และ -174 อัลลีล G ในกลุ่มของผู้ป่วย มากกว่าในกลุ่มควบคุม ถึงแม้ว่ามีอัลลีล G เพียง 1 อัลลีล สามารถทำให้เพิ่มอัตราความเสี่ยงต่อการเกิดโรคได้ หากเป็น haplotype SNP ที่ -597, -572 และ -174 จะเพิ่มอัตราเสี่ยงเป็น 4 เท่า⁽³⁹⁾

ข้อเสนอแนะ

1. จากการวิจัยในครั้งนี้เห็นได้ว่าการศึกษาความสัมพันธ์ของ biomarkers ต่างๆ ทำการศึกษาช่วงระยะเวลากว้างจึงทำให้การแปลผลดังกล่าวค่อนข้างสรุปได้โดยรวม อันเนื่องมาจากข้อจำกัดในการเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วย ดังนั้นเพื่อให้ผลชัดเจน ควรจะเก็บตัวอย่างเลือดให้ถี่ขึ้น เพื่อนำมาใช้ประเมินผลความสัมพันธ์ได้ชัดเจนกว่า
2. จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมควรเก็บจำนวนตัวอย่างของกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมให้มีจำนวนเพิ่มขึ้นและควรตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างจากหลายพื้นที่เพื่อสามารถเพิ่มความหลากหลายและการกระจายตัวของจีโนมได้มากขึ้นและอาจพบปัจจัยเสี่ยงที่สามารถทำให้เกิดโรคได้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- [1] Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic response to inflammation. *N Engl J Med.* 340(1999):448-454.
- [2] Mulvey TJ, Thronhill TS. Infected total knee arthroplasty. In: Insall JN, Scott WN, eds. *Surgery of the Knee.* Philadelphia, PA: Churchill Livingstone; (2001):1875-1890.
- [3] Swason KC, Windsor RE. Diagnosis of infection after total knee arthroplasty. In: Callaghan JJ, Rosenberg AG, Rubash HE, Simonian PT, Wickiewicz TL. *The Adult Knee.* Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; (2003):1485-1491.
- [4] Bilgen O, Atici T, Durak K, Karaemino G, Bilgen MS. C-reactive protein values and erythrocyte sedimentation rates after total hip and total knee arthroplasty. *J Int Med Res.* 29 (2001):7-12.
- [5] Larsson S, Thelander U, Friberg S. C-reactive protein (CRP) levels after elective orthopedic surgery. *Clin Orthop Relat Res.* 275 (1992):237-242.
- [6] Moreschini O, Greggi G, Giordano MC, Nocente M, Margheritini F. Postoperative physiopathological analysis of inflammatory parameters in patients undergoing hip or knee arthroplasty. *Int J Tissue React.* 23 (2001):151-154.
- [7] Di Cesare PE, Chang E, Preston CF, Liu CJ. Serum interleukin-6 as a marker of periprosthetic infection following total hip and knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am.* 87(2005):1921-1927.
- [8] Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphism in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma levels, and an association with systemic onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* (102)1998:1369-76.
- [9] Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann. Rheum Dis.* (1957)16:494-502.
- [10] Stuart LW, Joseph AB. *Orthopedics principles and their application 6th Edition.* (2005):154-155.

- [11] สิทธิศักดิ์ ธรรมชาติ, วินัย พากเพียร. *วิทยาศาสตร์การแพทย์ของกระดูกเซลล์ต้นกำเนิด และวิศวกรรมเนื้อเยื่อ*. ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2007:13-15.
- [12] อรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์. *วิทยาภูมิคุ้มกันพื้นฐานและคลินิก*. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2008:131-139.
- [13] วนิตา พงศ์สถาพร. *คู่มือการปฏิบัติการโลหิตวิทยา*. คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต. 1997.
- [14] Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood*. 74(1989):1-10.
- [15] Du Clos TW, Mold C. C-reactive protein: an activator of innate immunity and a modulator of adaptive immunity. *Immunol Res*. 30(2004):261-277.
- [16] Aalto K, Ostman K, Peltola H, Rasanen J. Change in erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein after total hip arthroplasty. *Clin Orthop*. 184 (1984):118-120.
- [17] Niskanen RO, Korkala O, Pammo H. Serum C-reactive protein levels after total hip and knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Br*. 78(1996):431-433.
- [18] Laiho K, Maenpaa H, H Kautiainen, Kauppi M, Kaarela K, Lehto M, Belt E. Rise in serum C reactive protein after hip and knee arthroplasties in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 60(2001):275-277.
- [19] Park KK, Kim TM, Chang CB, Yoon SW, Park KU. Normative Temporal Values of CRP and ESR in Unilateral and Staged Bilateral TKA. *Clin Orthop Relat Res*. 466(2008):179-188.
- [20] Wirtz DC, Heller KD, Miltner O, Zilkens KW, Wolff JM. Interleukin-6: a potential inflammatory marker after total joint replacement. *Int Orthop*. 24 (2000):194-196.
- [21] Lisowska B, Maslinski W, Maldyk P, Zabek J, Baranowska E. The role of cytokine in inflammatory response after total knee arthroplasty in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 28(2007):667-71.
- [22] Mehra A, Langkamer VG, Day A, Harris S, Spencer RF. C reactive protein and skin temperature post total knee replacement. *The Knee*. 12(2005):297-300.

- [23] Haidar SG, Charity RM, Bassi Rs, Nicoli P, Singh BK. Knee skin temperature following uncomplicated total knee replacement. *The Knee*. 13 (2006):422-426.
- [24] Matsumoto T, Tsurumoto T, Shindo H. Interleukin-6 levels in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis correlated with the infiltration of inflammatory cells in synovial membrane. *Rheumatol Int*. 26(2006):1096-1100.
- [25] สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทยและสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. สารานุกรม อณูพันธุศาสตร์. กรุงเทพมหานคร. เท็กซ์ แอนด์เจอร์นัลพับลิเคชั่น, 2548: 3-11.
- [26] Brooks LD. SNPs: Why do we care? In: Kwow PY (ed.). *Single nucleotide polymorphisms method and protocols*. Totowa, New Jersey 2003:1-9.
- [27] Myhsok BE. The usefulness of single nucleotide polymorphism (SNPs) for genetic epidemiological investigation of complex psy chiatric disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 29(2005):1017-20.
- [28] กนกวรรณ จารุกัจฉา, วรัญญา จตุพรประเสริฐ. สหประชาชาติ:ความรู้พื้นฐานสู่การประยุกต์ใช้. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*. 2(2007):166-74.
- [29] Newton CR, Graham A. *PCR*. 1997:1-7.
- [30] Bennermo M, Held C, Stemme S, et.al.Genetic predisposition of the interleukin-6 response to inflammation implications for a variety of major disease. *Clinical Chemistry*. 50(2004): 2136–40.
- [31] Maitra A, Shanker J, Dash D, et.al.Polymorphism in the IL-6 gene in Asian Indianfamilies with premature coronary artery disease-The Indian Atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 99(2008): 944–950.
- [32] Enjuanes A, Benavente Y, Bosch F. Genetic variants in apoptosis and immunoregulation-related genes are associated with risk of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 68(2008):10178-86.
- [33] Chung HW, Seo JS, Hur SE,et.al. Association of interleukin-6 promoter variant with bone mineral density in pre-menopausal women. *J Hum Genet*. 48 (2003):243-8.

- [34] Kristiansen OP, Nolsøe RL, Larsen L. Association of a functional 17beta-estradiol sensitive IL6-174G/C promoter polymorphism with early-onset type 1 diabetes in females. *Hum Mol Genet.* 12 (2003):1101-10.
- [35] Capurso C, Solfrizzi V, D'Introno A, et.al. Interleukin 6-174 G/C promoter gene polymorphism and sporadic Alzheimer's disease: geographic allele and genotype variations in Europe. *Exp Gerontol.* 39(2004):1567-73.
- [36] Kesarwani P, Ahirwar DK, Mandhani A, Mittal RD. Association between -174 G/C promoter polymorphism of the interleukin-6 gene and progression of prostate cancer in North Indian population. *DNA Cell Biol.* 27(2008):505-10.
- [37] Pola E, Papaleo P, Pola R, Gaetani E, et.al. Interleukin-6 gene polymorphism and risk osteoarthritis of the hip: a case control study. *Osteoarthritis and Cartilage.* 13(2005):1025-8.
- [38] Gordon A, Kiss-Toth E, Stockley I, Eastell R, Wilkinson JM. Polymorphisms in the interleukin-6 genes affect risk of osteolysis in patients with total hip arthroplasty. *Arthritis & Rheumatism.* 58(2008):3157-65.
- [39] Kamarainen OP, Solovieva S, Vehmas T, et.al. Common interleukin-6 promoter variants associate with the more severe forms of distal interphalangeal osteoarthritis. *Arthritis research & Therapy.* (2008)10.
- [40] Sowers M. Epidemiology of risk factors for osteoarthritis: systemic factors. *Curr Opin Rheumatol.* 13(2001):447-5.
- [41] Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Bio-rheology.* (2002)39:237-46.
- [42] Fisherman D, Faulds G, Jeffry R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphism in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, an association with systemic onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* 102(1998):1369-76.
- [43] Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphism on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 275(2000):18138-4.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

หนังสือแสดงความยินยอมการเข้าร่วมในโครงการวิจัย

การวิจัยเรื่อง ความสัมพันธ์ของไซโตไคน์กับตัวชี้วัดทางคลินิกภายหลังการผ่าตัดเปลี่ยน
ข้อเข่าเทียม

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

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....ได้อ่าน

รายละเอียดพร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบ
ยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลา
ของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตรายหรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะ
เกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด จนมีความเข้าใจอย่างเดี่ยว

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว ผู้เข้าร่วมวิจัยจะ
ได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัย
เมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการ
รักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อ
ได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้นบุคคลอื่นในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการ
พิจารณาจริยธรรมการวิจัยหรือผู้ได้รับอำนาจมอบหมาย ให้เข้ามาตรวจสอบและประมวลข้อมูลของ
ผู้เข้าร่วมวิจัย ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์ตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดย
การตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติ
ทางการแพทย์ของผู้เข้าร่วมวิจัยได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่าข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและ
สามารถเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ
จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลลงในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ
การวิเคราะห์ และการรายงานเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิทยาศาสตร์ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทาง
การแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้ายินดีลงนามในใบยินยอมนี้เพื่อเข้าร่วมการวิจัยด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ยินยอม
(.....)ชื่อผู้ยินยอม ตัวบรรจง
วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามผู้ทำวิจัย
(.....)ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง
วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน
(.....)ชื่อพยาน ตัวบรรจง
วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย

ความสัมพันธ์ของไซโตไคน์กับตัวชี้วัดทางคลินิกภายหลังการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม

ผู้สนับสนุนการวิจัย ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แพทย์ผู้ทำวิจัย

ชื่อ นพ.สิทธิศักดิ์ หารษาเวก

ที่อยู่ ภาควิชา ชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4482, 085-042-5466

(ที่ทำงานและมือถือ)

แพทย์ผู้ร่วมในโครงการวิจัย

ชื่อ นพ.อารี ตनावลี

ที่อยู่ ภาควิชา ออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4510, 081-611-5086

(ที่ทำงานและมือถือ)

แพทย์ผู้ร่วมในโครงการวิจัย

ชื่อ นพ.สิทธิ์ชัช งามอุโฆษ และ นพ.มณูญ ศักดินาเกียรติกุล

ที่อยู่ ภาควิชา ออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4510(ที่ทำงาน)

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่แสดงข้อมูลเพื่อใช้ประกอบการตัดสินใจของท่านในการเข้าร่วมการศึกษาวิจัย อย่างไรก็ตามก่อนที่ท่านตกลงเข้าร่วมการศึกษาดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างละเอียดเพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย หรือแพทย์ผู้ร่วมในโครงการวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าจะเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านเซ็นชื่อยินยอมในเอกสารฉบับนี้

I. วัตถุประสงค์ของการศึกษา

วัตถุประสงค์หลักจากการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อศึกษาถึงไซโตไคน์และตัวชี้วัดทางคลินิกในผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมภายหลังได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม สำหรับใช้เป็นตัวบ่งชี้และเฝ้าติดตามการรักษา รวมทั้งใช้อธิบายกลไกการฟื้นตัวของร่างกายภายหลังการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม โดยประมาณจำนวนผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยรวม 60 คน

ถ้าท่านสนใจที่จะเข้าร่วมในโครงการ ท่านจะได้รับการตรวจร่างกายทางคลินิก และเจาะเลือดเพื่อตรวจ ก่อนการผ่าตัด และภายหลังได้รับผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมในการนัดตรวจเพื่อติดตามผลประมาณ 1, 6 และ 12 สัปดาห์หลังจากการผ่าตัด

ในการศึกษานี้จะมีการเจาะเลือดในปริมาณ 5 ซี.ซี. โดยใช้เข็มปลอดเชื้อเพื่อนำมาตรวจอันตรายที่อาจเกิดขึ้นหลังจากการเจาะเลือด พบได้น้อยมาก เช่น อาจมีรอยช้ำบริเวณเจาะเลือดเพียงเล็กน้อย ซึ่งหายได้เองภายใน 7 วัน

II. ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

เพื่อให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องได้รับความร่วมมือจากท่าน โดยท่านจะต้องปฏิบัติตามคำแนะนำของแพทย์ผู้ทำวิจัยอย่างเคร่งครัด รวมทั้งแจ้งอาการผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับท่านระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัยให้ผู้ทำวิจัยได้รับทราบ

III. ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเจาะเลือด

ท่านมีโอกาที่จะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก ช้ำจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือดหรือหน้ามืด และโอกาที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดพบได้น้อยมาก

หากท่านมีข้อสงสัยใด ๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากแพทย์ผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

IV. การพบแพทย์นอกตารางนัดหมายในกรณีที่เกิดอาการข้างเคียง

หากมีอาการข้างเคียงใด ๆ เกิดขึ้นกับท่าน ขอให้ท่านรีบมาพบแพทย์ที่สถานพยาบาลทันที ถึงแม้ว่าจะอยู่นอกตารางการนัดหมาย เพื่อแพทย์จะได้ประเมินอาการข้างเคียงของท่าน

หากอาการต่าง ๆ ดังกล่าวเป็นผลจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะได้รับการรักษาทางการแพทย์ที่เหมาะสม โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย

V. ประโยชน์ที่อาจได้รับ

ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษาทำให้สามารถนำข้อมูลมาอธิบายกลไกการฟื้นตัวของร่างกาย ภายหลังการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม และอาจนำไปสู่การพัฒนาเทคนิควิธีการผ่าตัด การเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้อาจจะนำไปสู่การพัฒนาเทคนิควิธีการผ่าตัด การเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้อาจจะทำให้ท่านมีสุขภาพที่ดีขึ้น หรืออาจลดความรุนแรงของโรคได้ แต่ไม่ได้รับรองว่าสุขภาพของท่านจะต้องดีขึ้นหรือความรุนแรงของโรคจะลดลงอย่างแน่นอน

VI. วิธีการและรูปแบบการรักษาอื่น ๆ ที่มีอยู่สำหรับอาสาสมัคร

ท่านไม่จำเป็นต้องเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เพื่อประโยชน์ในการรักษาโรคที่ท่านเป็นอยู่ เนื่องจากมีแนวทางการรักษาอื่น ๆ หลายแบบสำหรับการรักษาโรคของท่าน ดังนั้นจึงควรปรึกษากับแพทย์ผู้ให้การรักษาท่านก่อนการตัดสินใจ

VII. ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมโครงการวิจัย

สิ่งที่ท่านควรปฏิบัติ คือ

- ท่านต้องให้ข้อมูลทางการแพทย์ของท่านทั้งในอดีตและปัจจุบันแก่แพทย์ผู้ทำวิจัยด้วยความสัตย์จริง
- ท่านต้องแจ้งให้แพทย์ผู้ทำวิจัยทราบความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่ท่านร่วมในโครงการวิจัย

VIII. อันตรายที่อาจเกิดขึ้นในโครงการวิจัย

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัย และพิสูจน์ได้ว่าท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของ ทีมผู้ทำวิจัยแล้ว ผู้สนับสนุนโครงการวิจัยยินดีจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของท่าน การเซ็นชื่อในเอกสารฉบับนี้ไม่ได้หมายความว่าท่านได้สละสิทธิ์ทางกฎหมายตามปกติที่ท่านพึงมี

ในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใดๆหรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ท่านสามารถติดต่อผู้ทำวิจัยคือ นพ.สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก โทรศัพท์ 02-256-4482, 085-042-5466 หรือ นพ. อารี ตनावลี โทรศัพท์ 02-256-4510, 081-611-5066 ได้ตลอด 24 ชั่วโมง

IX. การเข้าร่วมโครงการและการสิ้นสุดโครงการวิจัย

การเข้าร่วมโครงการนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอถอนตัวจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาโรคของท่านแต่อย่างใด

แพทย์ผู้ทำการวิจัยอาจถอนท่านออกจากการเข้าร่วมการวิจัย เพื่อเหตุผลด้านความปลอดภัยของท่าน หรือเมื่อผู้สนับสนุนการวิจัยยุติการดำเนินงานวิจัย หรือ ในกรณีที่ท่านไม่ให้ความร่วมมือและไม่ปฏิบัติตามคำแนะนำของแพทย์ผู้ทำการวิจัย

X. การปกป้องรักษาข้อมูลของอาสาสมัคร

ข้อมูลนี้อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวของท่าน จะได้รับการปกปิดและไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

จากการลงนามยินยอมของท่าน แพทย์ผู้วิจัยและผู้สนับสนุนการวิจัยมีสิทธิ์สามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของท่านได้ตลอดเวลา แม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่านต้องการยกเลิกการให้สิทธิ์ดังกล่าว ท่านสามารถเขียนบันทึกยกเลิกการให้คำยินยอมได้

(หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับเข้ามาร่วมโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลที่จำเป็นสำหรับการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

จากการลงนามยินยอมของท่าน แพทย์ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของหน้าที่เกี่ยวกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

หากท่านต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ท่านสามารถติดต่อกับ
ผู้ทำการวิจัยคือ นพ.สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก โทรศัพท์ 02-256-4482, 085-042-5466 หรือ นพ.อารี
ตนาวลี โทรศัพท์ 02-256-4510, 081-611-5066

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมีสำหรับ ELISA

1. การเตรียม Wash Buffer 1X PBS
 - 1.1. ชั่ง NaCl 8.0 g, Na₂HPO₄ 1.16 g, KH₂PO₄ 0.2 g และ KCl 0.2 g
 - 1.2. ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 ml
 - 1.3. ปรับ pH ให้ได้ 7.2 แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ 1000 ml
 - 1.4. เติม Tween-20 0.5 ml ผสมให้เข้ากัน

2. การเตรียม Capture antibody ใน coating buffer
 - 2.1. เติม 5X coating buffer 2 ml น้ำกลั่น 8 ml และ Capture antibody 50 µl
 - 2.2. ทำการผสมให้เข้ากัน

3. การเจือจาง Assay diluent
 - 3.1. เติม 5X assay diluent 10 ml
 - 3.2. ผสมกับน้ำกลั่น 40 ml

4. การเตรียม Standard solution

ทำการละลายผง lyophilized standard โดยเติมน้ำกลั่น 2 ml ลงในขวด ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 100 ng/ml นำไปแบ่งเก็บที่ตู้เย็น 4 °C

5. การเจือจาง Standard solution
 - 5.1. ทำการผสม standard solution ที่มีความเข้มข้น 100 ng/ml ปริมาณ 5 µl กับ 1X assay diluent 995 µl จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 500 pg/ml
 - 5.2. นำสารละลายความเข้มข้น 500 pg/ml 110 µl ผสมกับ 1X assay diluent 110 µl จะได้ความเข้มข้น 250 pg/ml
 - 5.3. นำสารละลายความเข้มข้น 250 pg/ml 110 µl ผสมกับ 1X assay diluent 110 µl จะได้ความเข้มข้น 125 pg/ml
 - 5.4. นำสารละลายความเข้มข้น 125 pg/ml 110 µl ผสมกับ 1X assay diluent 110 µl จะได้ความเข้มข้น 62.5 pg/ml

- 5.5. นำสารละลายความเข้มข้น 62.5 pg/ml 110 μ l ผสมกับ 1X assay diluent 110 μ l จะได้ความเข้มข้น 31.3 pg/ml
- 5.6. นำสารละลายความเข้มข้น 31.3 pg/ml 110 μ l ผสมกับ 1X assay diluent 110 μ l จะได้ความเข้มข้น 15.6 pg/ml
- 5.7. นำสารละลายความเข้มข้น 15.6 pg/ml 110 μ l ผสมกับ 1X assay diluent 110 μ l จะได้ความเข้มข้น 7.8 pg/ml
- 5.8. นำสารละลายความเข้มข้น 7.8 pg/ml 110 μ l ผสมกับ 1X assay diluent 110 μ l จะได้ความเข้มข้น 3.9 pg/ml

6. การเตรียม Detection Antibody

นำ Detection antibody 60 μ l ผสมกับ 1X assay diluent 11.94 ml ผสมให้เข้ากัน

7. การเตรียม AV-HRP

นำ AV-HRP 12 μ l ผสมกับ 1X assay diluent 11.99 ml ผสมให้เข้ากัน

8. การเตรียม TMB substrate

นำ Reagent A 5 ml ผสมกับ Reagent B 5 ml ผสมให้เข้ากัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมีในการตรวจความหลากหลายทางพันธุกรรม

1. การเตรียม red blood cell lysis buffer
 - 1.1 ชั่ง KHCO_3 0.5 g, NH_4Cl 4.15 g และ EDTA 0.019 g ละลายด้วยน้ำกลั่นประมาณ 100 ml
 - 1.2 เติมน้ำกลั่นจนครบ 500 ml
 - 1.3 นำไปกรองผ่าน filter ขนาด 0.2 μm
2. การเตรียม 1X Phosphate buffer saline (PBS)
 - 2.1 ชั่ง NaCl 8.0 g, Na_2HPO_4 1.16 g, KH_2PO_4 0.2 g และ KCl 0.2 g
 - 2.2 ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 ml
 - 2.3 ปรับ pH ให้ได้ 7.2 แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ 1000 ml
 - 2.4 นำไปเข้าเครื่อง autoclave
3. การเตรียม Proteinase K
 - 3.1 เติม DNase-free water 3 ml
 - 3.2 นำไปผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex
4. การเตรียม 10X Tris-acetic EDTA buffer (TAE buffer)
 - 4.1 ชั่ง Tris base 48.4 g ละลายด้วยน้ำกลั่น ประมาณ 50 ml
 - 4.2 เติม glacial acetic 17.0 ml คนให้เข้ากัน
 - 4.3 เติม 0.5 M EDTA, pH 8.0 7.44 ml คนให้เข้ากัน
 - 4.4 เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 ml ปรับ pH 7.8
5. เตรียม 1 M Tris-hydrochloric acid, pH 8.0
 - 5.1 ชั่ง Tris (MW: 121.14 g/mol) 181.7 g ละลายใน deionized water 70 ml
 - 5.2 ปรับ pH ให้ได้ 8.0 โดยเติม concentrated HCl ประมาณ 5.0 ml
 - 5.3 เติม deionized water จนได้ 100 ml

6. การเตรียม 1.2% agarose gel
 - 6.1 ชั่งผง agarose 1.2 g เติลงใน flask ขนาด 250 ml
 - 6.2 เติม TAE buffer จนได้ปริมาตร 100-110 ml แล้วอุ่นด้วย microwave จนละลายเข้ากันดี
 - 6.3 เทลงแบบพิมพ์ (tray)

7. การเตรียม 10X Tris-boric EDTA buffer (TBE buffer)
 - 7.1 ชั่ง Tris base 121.1 g ละลายด้วยน้ำกลั่น ประมาณ 50 ml
 - 7.2 เติม Boric acid anhydrous 55.6 ml คนให้เข้ากัน
 - 7.3 เติม 0.5 M Na₂EDTA คนให้เข้ากัน
 - 7.4 เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 ml ปรับ pH 8.3

8. การเตรียม 30% polyacrylamide 100 ml
 - 8.1 ชั่ง Bis acrylamide 0.8 g ละลายใน D.W. ให้ได้ 25 ml
 - 8.2 เติม 40% acrylamide 75 ml
 - 8.3 ผสมให้เข้ากัน

9. การเตรียม 10% Ammonium persulfate
 - 9.1 ชั่ง Ammonium persulfate 0.1 g
 - 9.2 เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ml

10. การเตรียม LB broth และ LB agar
 - 10.1 ชั่ง Tryptone 5 g, NaCl 5 g และ Yeast extract 2.5 g เติมน้ำกลั่นประมาณ 50 ml
 - 10.2 เติมน้ำกลั่นจนครบ 500 ml
 - 10.3 แบ่งสารละลายที่ได้มา 200 ml นำมาเติม agar 3 g เพื่อเตรียมให้เป็น LB agar
 - 10.4 นำทั้งหมดไปเข้าเครื่อง autoclave ที่ 121 °C, 15 pound เป็นเวลา 20 นาที
 - 10.5 นำสารละลายสำหรับเตรียม LB agar มาเติม 120 mM ampicillin 200 µl ผสมให้เข้ากัน
 - 10.6 เทใส่จานเลี้ยงเชื้อประมาณ 20 ml
 - 10.7 เก็บจานเลี้ยงเชื้อเข้า incubator 37 °C ทิ้งไว้จนแห้ง นำไปเก็บที่ตู้เย็น 4 °C

ภาคผนวก ง
รายงานการตีพิมพ์เนื้อหาบางส่วนของวิทยานิพนธ์

การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 12 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
วันที่นำเสนอ 12-13 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2552

และ

บทคัดย่อที่ได้ยอมรับให้สามารถนำเสนอผลงาน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความสัมพันธ์ของอินเทอร์ลิวคินหกในซีรัมกับตัวชี้วัดทางคลินิกภายหลังการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม Serum Interleukin-6 in Relation to Clinical Outcomes Following Total Knee Arthroplasty

เบญจมาศ ดีไพศาลสกุล (Benjamad Deepaisamsakul)* อารี ตनावลี (Aree Tanawalee)**

สิทธิศักดิ์ บรรณาทก (Sittisak Honsawek)***

บทคัดย่อ

การผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม เป็นวิธีการรักษาผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับความนิยมในปัจจุบัน ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นผู้สูงอายุภาวะแทรกซ้อนภายหลังการผ่าตัดที่สำคัญคือการอักเสบติดเชื้อ ปัจจุบันตัวชี้วัดสำหรับการติดตามการอักเสบ ได้แก่ erythrocyte sedimentation rate (ESR) และ C-reactive protein (CRP) จากการศึกษาที่ผ่านมาสารกลุ่มไซโตไคน์ เช่น interleukin-6 (IL-6) พบว่ามีความไวและความจำเพาะในการตรวจติดตามการอักเสบได้ดีกว่า ดังนั้นในการศึกษานี้จึงศึกษาตัวชี้วัดที่จำเพาะต่อผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม ได้แก่ ESR, CRP, IL-6 และอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่า จากผลการวิจัยพบว่า ระดับ ESR เพิ่มขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 หลังการผ่าตัด หลังจากนั้นจึงค่อยๆ ลดลงจนมีระดับใกล้เคียงกับระยะก่อนการผ่าตัดในเดือนที่ 6 หลังการผ่าตัด ส่วนระดับ CRP และ IL-6 มีค่าเพิ่มขึ้นจนถึงระดับสูงสุดในช่วง 1-3 วันหลังการผ่าตัดและจะเริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 2 หลังการผ่าตัด ดังนั้น IL-6 สามารถนำไปใช้ในการบ่งชี้ภาวะการอักเสบภายหลังการผ่าตัดได้ นอกจากนี้ผลการวัดอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่าพบว่าข้างที่ทำการผ่าตัดมีอุณหภูมิสูงกว่าข้างปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) โดยอุณหภูมิจะลดลงใกล้เคียงกับข้อเข่าข้างปกติภายหลังจาก 6 เดือนของการผ่าตัด

ABSTRACT

Total knee arthroplasty (TKA) is a well-established surgical treatment for knee osteoarthritis patients. Most of the patients are aging. The most common complication after operation that most of the orthopedic surgeons concerns are infection of the surgical wound. Erythrocyte sedimentation rate (ESR) and C-reactive protein (CRP) are routinely used as inflammatory markers. Previous studies showed that interleukin-6 (IL-6) had sensitivity and specificity more than ESR and CRP. The aim for this study was to determine serum IL-6 level, ESR, CRP and knee skin temperature before and after TKA. The results showed that ESR was elevated to peak in 2 weeks after surgery and then went slightly down to nearly preoperative level within 6 month. CRP and IL-6 levels were maximum at 1-3 days after surgery and will decreased within 2 weeks. The serum level of IL-6 could be useful to identify inflammation during the postoperative period. Skin temperature of operative knee differed significantly ($p < 0.001$) than normal knee and nearly normal at 6 months after surgery.

คำสำคัญ : อินเทอร์ลิวคินหก, อัตราการตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง, โปรตีนซี-รีแอ็กทีฟ

Key Words : Interleukin-6, Erythrocyte Sedimentation Rate, C-Reactive Protein

* หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาอายุรโศภิตศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

โรคข้อเข่าเสื่อม (knee osteoarthritis) เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความทุกข์ ความทรมานแก่ผู้ป่วยเป็นอย่างมาก อีกทั้งยังทำให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยด้อยลงและไม่สามารถดำรงชีวิตประจำวัน ได้อย่างปกติ และอาจเป็นปัจจัยเสริมหรือพบบรร่วมกับโรคในระบอบอื่น เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน และภาวะอ้วน เป็นต้น เนื่องจากผู้ป่วยไม่สามารถดำเนินกิจวัตรตามปกติหรือไม่สามารถออกกำลังกายบางชนิดได้ รวมทั้งผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นผู้สูงอายุ และมีน้ำหนักตัวค่อนข้างมาก ดังนั้นการรักษาโรคดังกล่าวจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ แม้ว่า การรักษาจะไม่สามารถทำให้กลับมามีชีวิตปกติกได้ แต่การรักษาโรคนี้อาจมีวัตถุประสงค์เพื่อช่วยบรรเทาอาการเจ็บปวด และลดปัญหาเรื่องข้อติดหรือข้อโก่งงอ ในกรณีที่ผู้ป่วยมีอาการรุนแรงหรือข้อเข่าโก่งงอมากจำเป็นต้องได้รับการรักษาที่ถูกต้องเหมาะสม วิธีการรักษาที่ได้รับความนิยมในปัจจุบันคือ การผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม (total knee arthroplasty; TKA) เนื่องจากได้ผลดี ผู้ป่วยที่ผ่าตัดแล้วมีโรคแทรกซ้อนภายหลังการผ่าตัดน้อย และใช้เวลาในการพักฟื้นในโรงพยาบาลไม่นานนัก

สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงและที่ระวังเป็นอย่างมากคือ การติดเชื้อ (infection) และการอักเสบ (inflammation) ของแผลภายหลังการผ่าตัด เนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นผู้สูงอายุ ซึ่งหากเกิดการอักเสบติดเชื้อแล้วจะทำให้การรักษาเป็นไปได้ยากและใช้ระยะเวลาในการพักฟื้นที่โรงพยาบาลนานกว่าปกติ รวมทั้งต้องมาทำการตรวจติดตามหลังการผ่าตัด ดังนั้นถ้าหากสามารถวินิจฉัยว่ามีการเกิดการติดเชื้อภายหลังการผ่าตัดได้อย่างรวดเร็วก็จะทำให้การรักษามีประสิทธิภาพมากขึ้น

ในปัจจุบันนี้ Inflammation markers อยู่หลายชนิดที่สามารถใช้ในการประเมินภาวะ การอักเสบ ภายหลังการผ่าตัดได้ ที่นิยมเลือกใช้เป็นตัวชี้วัดตามปกติ คือ erythrocyte sedimentation rate (ESR)

และ C-reactive protein (CRP) เนื่องจากสามารถบ่งบอกถึงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายแบบ acute phase ได้ โดยภายหลังถูกกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอมแล้วจะนำให้ค่าทั้ง 2 ชนิดเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วและจะลดลงอย่างช้าๆ ในช่วงระยะเวลาสั้นๆ ทำให้สามารถสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน และค่าใช้จ่ายในการตรวจไม่แพงมากจนเกินไป ดังนั้นจึงมีความสำคัญต่อการวินิจฉัยภาวะการติดเชื้อภายหลังการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม แต่ก็ยังพบว่าการใช้ ESR และ CRP เพื่อพิจารณาถึงภาวะการอักเสบติดเชื้อภายหลังการผ่าตัดยังไม่ชัดเจนพอ เนื่องจากค่าดังกล่าวไม่จำเพาะเจาะจงกับภาวะการอักเสบติดเชื้อก่อนและหลังการผ่าตัดและยังมีความแปรปรวนอย่างมากทั้งในช่วงก่อนและหลังการผ่าตัดเช่นกัน

จากการศึกษาของ Di Cesare PE. และคณะ ในปี ค.ศ.2005 พบว่าสารจำพวกไซโตไคน์ (cytokines) เช่น interleukin 6 (IL-6) สามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยภาวะการติดเชื้อภายหลังการผ่าตัดในผู้ป่วยที่ทำการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมได้ โดยมีค่าความไว (sensitivity), ความจำเพาะ (specificity), positive predictive value, negative predictive value และ ความถูกต้อง (accuracy) เท่ากับ 1.0, 0.95, 0.89, 1.0 และ 97% ตามลำดับ โดยที่การเพิ่มขึ้นของ IL-6 สัมพันธ์กับภาวะการติดเชื้อบริเวณข้อเทียมของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าและข้อสะโพกเทียม ดังนั้นสามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยกับผู้ป่วยในภาวะดังกล่าวได้

โดยส่วนใหญ่แพทย์มักให้ความสำคัญต่อภาวะการอักเสบติดเชื้อของผู้ป่วยในช่วงระยะแรกๆ ภายหลังการผ่าตัดและพักฟื้นอยู่ในโรงพยาบาลเท่านั้น แต่สำหรับในผู้ป่วยที่ทำการเปลี่ยนข้อเข่าเทียมแล้วการระวังเรื่องการอักเสบติดเชื้อถือเป็นสิ่งสำคัญยิ่ง ถึงแม้ว่าระยะเวลาในการผ่าตัดผ่านไปนานแล้วก็ตาม เมื่อมีการอักเสบติดเชื้อเกิดขึ้นอาจทำให้การรักษายุ่งยากขึ้น ถ้าหากมีการอักเสบรุนแรงมากก็อาจจำเป็นต้องได้รับการผ่าตัดซ้ำซึ่งทำให้ผู้ป่วยต้องเสียเวลาและค่าใช้จ่ายในการ

ริกมากขึ้น ดังนั้นหากสามารถประเมินการอักเสบของผลภายหลังการผ่าตัดเมื่อผู้ป่วยมาทำการติดตามการรักษาได้เร็วจะช่วยแพทย์ที่ระวังและป้องกันการอักเสบของผลภายหลังการผ่าตัดเกิดขึ้นน้อยลง เพื่อให้ผู้ป่วยสามารถดำเนินชีวิตอย่างปกติได้เร็วขึ้น

เนื่องจากการศึกษาความสัมพันธ์ของ IL-6 กับค่า ESR, CRP และ อุณหภูมิผิวหนังบริเวณเข่า ที่ผ่านมาพบว่าไม่ได้ศึกษาเฉพาะเจาะจงกับผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมเท่านั้น และส่วนใหญ่ทำการวิจัยในผู้ป่วย osteoarthritis (OA) ร่วมกับผู้ป่วย rheumatoid arthritis (RA) โดยศึกษาในช่วงสัปดาห์แรกหลังการผ่าตัดเท่านั้น ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของ IL-6 กับค่า ESR, CRP และ อุณหภูมิผิวหนังบริเวณเข่า ในผู้ป่วย osteoarthritis ที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมตั้งแต่ช่วงเริ่มต้นก่อนการผ่าตัด จนถึงภายหลังการผ่าตัด 6 เดือน เพื่อประเมินการฟื้นตัวภายหลังการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

ผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม จากฝ่ายออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย จำนวน 49 ราย (ชาย 9 รายและหญิง 40 ราย) ที่ลงลายมือชื่อในใบยินยอมแล้ว โครงการวิจัยนี้ได้เข้ารับการพิจารณาจริยธรรมจากคณะกรรมการจริยธรรมการศึกษาวิจัยในมนุษย์ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

ในช่วงการผ่าตัดจะทำการเก็บน้ำข้อเข่าจากข้อเข่าของผู้ป่วยเพื่อนำไปตรวจวัดระดับ IL-6

การเก็บซีรัม โดยเจาะเลือดในช่วงก่อนการผ่าตัด, วันที่ 1-3, สัปดาห์ที่ 2, 6, 12 และ 24 ภายหลังการผ่าตัด

เมื่อผู้ป่วยมารับการตรวจติดตามที่คลินิกข้อเข่าเทียม ภายหลังการผ่าตัดในสัปดาห์ที่ 2, 6, 12 และ 24 โดยทำการตรวจวัดอุณหภูมิบริเวณข้อเข่าทั้ง 2 ข้าง ด้วย

เทอร์โมมิเตอร์ (IR Thermometer model: T560 จากสหรัฐอเมริกา) แต่ละข้างทำการวัด 4 จุด

การตรวจวัดระดับ IL-6 ทำการตรวจวัดระดับของ IL-6 ใน ซีรัม ที่เก็บจากผู้ป่วยทั้งหมดโดยใช้ชุดการทดสอบ Biologend's ELISA MAX™ Set (u. Biologend จากสหรัฐอเมริกา) ซึ่งจะใช้หลักการของ sandwich enzyme-linked immunosorbent assay

การตรวจวัด CRP ทำการตรวจวัดระดับของ CRP ใน ซีรัม ของผู้ป่วยทั้งหมด โดยส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการ serology I หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ซึ่งใช้หลักการ particle enhanced immunonephelometry โดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติรุ่น BN Prospec (u. Siemens Healthcare Diagnostics จากสหรัฐอเมริกา)

การตรวจวัด ESR เป็นการวัดอัตราการเกิด Rouleaux formation ของเซลล์เม็ดเลือดแดงจาก whole blood ที่ได้จากผู้ป่วย โดยทำการส่งตรวจไปยังห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา ฝ่ายเวชศาสตร์ชันสูตร โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติรุ่น MICROsed-system (u. Medcompare จากสหรัฐอเมริกา)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยสถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistic) โดยเสนอในรูปแบบของ ค่าเฉลี่ย (mean) และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) จากนั้นนำเสนอในรูปแบบกราฟ รวมถึงการวิเคราะห์ด้วยสถิติเชิงอนุมาน (inferential statistic) เพื่อสรุปผลของประชากร ด้วย *t*-test ในการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 2 กลุ่ม

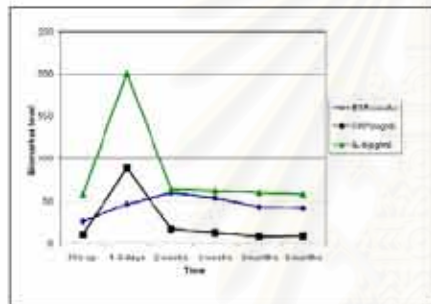
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

จากการตรวจวัดระดับตัวชี้วัดการอักเสบของผู้ป่วยที่ทำการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม พบว่า ค่าเฉลี่ยของ IL-6 จะสูงสุดในช่วง 1-3 วันหลังการผ่าตัดมีค่าอยู่ที่ $200.7 \pm$

115.9 pg/ml จากนั้นลดลงในสัปดาห์ที่ 2 หลังการผ่าตัด หลังจากสัปดาห์ที่ 6 ระดับของ IL-6 คงที่อย่างต่อเนื่อง

สำหรับ CRP มีค่าเฉลี่ยสูงสุด 88.4 ± 68.9 mg/dl ในช่วง 1-3 วันหลังการผ่าตัด จากนั้นจึงเริ่มลดลงตั้งแต่ในสัปดาห์ที่ 2 และจะมีค่าใกล้เคียงกับค่าก่อนการผ่าตัดในเดือนที่ 6

ระดับของ ESR จะมีค่าเฉลี่ยสูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 หลังการผ่าตัดมีค่าอยู่ที่ 59.9 ± 28.0 mm/hr แล้วเริ่มลดลงจนมีระดับใกล้เคียงกับก่อนการผ่าตัด ในช่วงเดือนที่ 6 หลังการผ่าตัด



รูปที่ 1: กราฟแสดงระดับการเปลี่ยนแปลงของ IL-6, ESR และ CRP ของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน

จากการเปรียบเทียบตัวชี้วัดทั้ง 3 ตัวดังกล่าว (รูปที่ 1)

จะเห็นได้ว่าระดับ CRP และ IL-6 ในช่วง 1-3 วันหลังการผ่าตัด เพิ่มสูงมากกว่าก่อนการผ่าตัด 2 และ 3 เท่า ตามลำดับ และมีระดับสูงขึ้นถึงจุดสูงสุดได้เร็วกว่า ESR ซึ่งมีระดับสูงสุดในช่วงสัปดาห์ที่ 2 หลังการผ่าตัด หลังจากนั้นทั้ง ESR และ CRP จึงเริ่มลดลงใกล้เคียงกับค่าก่อนการผ่าตัด

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า IL-6 สร้างมาจาก เซลล์ macrophages, monocytes, fibroblasts และ T helper 2 lymphocytes เมื่อมีบาดแผลเกิดขึ้นแล้ว IL-6 จะไปกระตุ้นให้ตับเกิดการสร้าง CRP และ serum amyloid A protein ขณะเกิดภาวะการอักเสบอย่าง

เฉียบพลัน (acute inflammation) CRP ที่ถูกสร้างมาจาก เซลล์ตับ (hepatocytes) ถูกควบคุมโดย proinflammatory cytokines ได้แก่ IL-6 และ IL-1 โดยมีหน้าที่ที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของ innate immune response หลังจากมีการทำลายของเนื้อเยื่อเกิดขึ้น CRP จะไปกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ (complements) และเพิ่มกระบวนการ phagocytosis ซึ่งเป็นผลให้ระดับ IL-6 เพิ่มสูงขึ้นก่อน ซึ่งอาจเนื่องมาจากผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นผู้สูงอายุ ดังนั้น อาจเกิดการอักเสบตามมาภายหลังการ รักษา นอกจากนี้ผู้ป่วยที่มีการอักเสบของอวัยวะอื่น ๆ ของร่างกายก็สามารถทำให้ค่าดังกล่าวสูงขึ้นได้ รวมทั้งยังมีผู้ป่วยอีกไม่น้อยที่หากทำการผ่าตัดเข้าข้างที่เสื่อมไปแล้วข้อเข่าอีกข้างก็ยังสามารถเกิดการเสื่อมขึ้นได้อีก

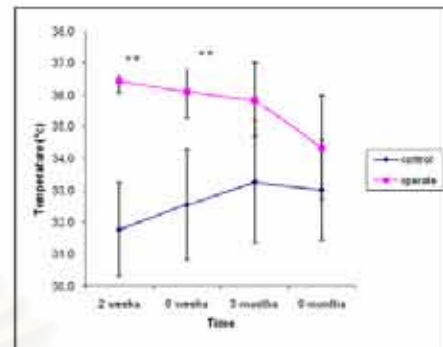
จากการศึกษาที่ผ่านมาในปี ค.ศ. 2001 Laiho K และคณะ ได้ทำการศึกษาระดับเพิ่มขึ้นของ CRP ในผู้ป่วย RA หลังการผ่าตัด TKA และ total hip arthroplasty (THA) จำนวน 37 รายเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ภายหลังจากการผ่าตัด พบว่า CRP จะมีค่าสูงสุดในวันที่ 1 และ 2 ภายหลังจากการผ่าตัด โดยเพิ่มมากกว่าค่าก่อนการผ่าตัดประมาณ 7 เท่า หลังจากนั้นจะใช้เวลาประมาณ 1 สัปดาห์ CRP ก็จะลดลงเท่ากับค่าก่อนการผ่าตัด ซึ่งในการศึกษาดังนี้ไม่พบว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้อแต่อย่างใด ดังนั้นจึงเป็นปกติที่พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ CRP ภายหลังจากการผ่าตัดในผู้ป่วย RA หลังการผ่าตัด TKA และ THA แต่ก็จะสามารถลดลงได้เท่ากับก่อนการผ่าตัดภายใน 1 สัปดาห์

ในปี ค.ศ. 2001 Bilgen O และคณะ ทำการศึกษาความเปลี่ยนแปลงของ CRP และ ESR ในผู้ป่วย primary osteoarthritis ที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม ซึ่งได้ศึกษาทั้งในกลุ่มเป็น TKA และ THA พบว่า ภายหลังจากการผ่าตัดทั้ง 2 กลุ่มจะมีค่า CRP เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและจะขึ้นสูงสุดในวันที่ 2 ภายหลังจากการผ่าตัด แต่ในผู้ป่วย THA จะเริ่มลดลงเท่ากับค่าก่อนการผ่าตัด ในวันที่ 21 และ TKA จะลดลงในเดือนที่ 2 ภายหลังจากการผ่าตัด ส่วน ESR พบว่าทั้ง 2 กลุ่มจะเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 5 ภายหลังจากการผ่าตัด สำหรับกลุ่ม THA พบว่า

ESR จะลดลงถึงเท่ากับก่อนได้รับการผ่าตัดในเดือนที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด ส่วนในกลุ่ม TKA นั้นจะลดลงในเดือนที่ 9 ภายหลังการผ่าตัด ดังนั้นจะเห็นได้ว่า CRP มีระดับการเปลี่ยนแปลงที่รวดเร็วและกลับสู่ค่าปกติได้รวดเร็วกว่า ESR โดยที่ทั้งค่า CRP และ ESR ในผู้ป่วย TKA มีแนวโน้มสูงกว่า THA

ในปี ค.ศ. 2008 Park KK และคณะ ทำการศึกษาเพื่อหาค่าพื้นฐาน CRP และ ESR ในผู้ป่วย OA ที่ผ่านการทำ unilateral และ bilateral TKA ช่วงเวลาที่ใช้ในการศึกษาคือช่วงก่อนการผ่าตัด และ ภายหลังการผ่าตัด ในวันที่ 1, 2, 5, 7, 14, 42 และ 90 วัน โดยแบ่งกลุ่มผู้ป่วยออกเป็น 3 กลุ่ม คือ unilateral, first knee bilateral และ second knee bilateral พบว่าผู้ป่วยทั้ง 3 กลุ่มมีรูปแบบของ CRP และ ESR ที่เหมือนกันคือ ค่าเฉลี่ยของ CRP จะสูงขึ้นอย่างรวดเร็วโดยจะสูงสุดในวันที่ 2 ภายหลังการผ่าตัด ในวันที่ 42 ภายหลังการผ่าตัด จะลดลงต่ำกว่าปกติ และจะลดลงจนถึงค่าก่อนการผ่าตัดในวันที่ 90 ภายหลังการผ่าตัด ส่วนค่าเฉลี่ยของ ESR นั้นจะขึ้นสูงสุดในวันที่ 5 ภายหลังการผ่าตัดและลดลงจนถึงค่าก่อนการผ่าตัดในวันที่ 90 ภายหลังการผ่าตัด แต่จากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้พบว่าผู้ป่วยถึง 43% ที่ไม่เป็นไปตามรูปแบบดังกล่าวเช่นกัน

จากการศึกษาของ Wirtz DC และคณะ ในปี ค.ศ. 2000 พบว่าผู้ป่วยที่ผ่านการทำ total knee replacement (TKR) จะมีค่า IL-6 สูงที่สุดภายหลังการผ่าตัด 12 ชั่วโมง และจะเริ่มลดลงภายหลังการผ่าตัด 24 ชั่วโมง ส่วน CRP จะขึ้นสูงสุดในวันที่ 2 ภายหลังการผ่าตัด และเริ่มลดลงในวันที่ 3 และพบว่าในผู้ป่วยในกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับ non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ความเข้มข้นของ IL-6 มีความสัมพันธ์กับระดับของการอักเสบโดยจะเพิ่มขึ้นเร็วกว่าและลดลงได้เร็วกว่า CRP ซึ่งแสดงว่าการตรวจวัด IL-6 ในผู้ป่วยหลังทำ TKR สามารถติดตามการอักเสบได้ดีกว่าการตรวจวัด CRP



รูปที่ 2: กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิบริเวณเข่าทั้ง 2 ข้างของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน (** p < 0.001)

สำหรับอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่า พบว่าเข่าข้างที่ได้รับการผ่าตัดมีอุณหภูมิสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.001) เมื่อเปรียบเทียบกับเข่าข้างที่ไม่ได้รับการผ่าตัด (รูปที่ 2) และพบว่าความแตกต่างของอุณหภูมิผิวหนังบริเวณเข่าทั้ง 2 เริ่มลดลงภายหลังสัปดาห์ที่ 2 ภายหลังการผ่าตัดและเข่าทั้ง 2 ข้างมีอุณหภูมิผิวหนังใกล้เคียงกันในเดือนที่ 6 หลังได้รับการผ่าตัด และจะเห็นได้ว่าอุณหภูมิที่วัดได้มีค่า SD ที่ค่อนข้างกว้างมาก อาจเกิดเนื่องมาจากในผู้ป่วยแต่ละคนมีอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่าแตกต่างกันในแต่ละสภาวะแวดล้อมซึ่งเป็นผลให้อุณหภูมิบริเวณข้อเข่าสามารถแปรผันไปตามอุณหภูมิสภาวะแวดล้อมได้เช่นกัน ดังนั้นอุณหภูมิผิวหนังบริเวณข้อเข่าจึงสามารถนำมาใช้ในการประเมินภาวะการอักเสบได้เพียงเบื้องต้นเท่านั้น

จากการศึกษาของ Mehra A และคณะ ในปี ค.ศ. 2005 ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของ CRP และ อุณหภูมิผิวหนังบริเวณเข่า โดยแยกกลุ่มผู้ป่วยที่เป็น OA และ RA พบว่าโดยผู้ป่วยกลุ่มนี้จะกลับมาตรวจที่คลินิกซ้ำ จากการตรวจ พบว่าผู้ป่วยทั้งหมดไม่มีอาการปวด ลักษณะแผลแห้งดี และ อุณหภูมิผิวหนังบริเวณเข่า ที่วัดได้มีค่าต่ำ และพบว่าผู้ป่วย TKA มีค่า อุณหภูมิผิวหนังบริเวณเข่า สูงขึ้นในช่วงแรกหลังการผ่าตัด หลังจากนั้นจะลดลงสู่ปกติในสัปดาห์ที่ 18 ภายหลังการผ่าตัด

ส่วน CRP จะสูงขึ้นในสัปดาห์แรกหลังการผ่าตัด เช่นกัน แต่จะมีค่าลดลงใกล้เคียงกับก่อนผ่าตัดใน สัปดาห์ที่ 6 ซึ่งทั้ง 2 ปัจจัยดังกล่าวจะมีการลดลงภายใน 18 สัปดาห์หลังการผ่าตัด ดังนั้น ค่า CRP และ อุณหภูมิ มีพหุนิยมร่วมเช่นนี้ เมื่อมีค่าสูงขึ้นสามารถสนับสนุนให้ เชื่อว่ามีอาการแทรกซ้อนของการอักเสบจากการผ่าตัด เปลี่ยนข้อเข้าได้

อีกการศึกษาหนึ่งของ Haidar SG และคณะ ในปี ค.ศ.2006 ที่ได้ทำการวัดอุณหภูมิที่มีพหุนิยมร่วมข้อเข้า พบว่า อุณหภูมิมีพหุนิยมร่วมข้อเข้า ที่ทำการผ่าตัดจะสูงกว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบข้อเข้าที่ไม่ได้รับการผ่าตัด โดยจะมีความแตกต่างกันจนถึงเดือนที่ 6 หลังการผ่าตัด ซึ่งแสดงว่าการลดลงของ อุณหภูมิมีพหุนิยมร่วมข้อเข้า บริเวณที่ได้รับการผ่าตัดจะต้องใช้เวลานานหลายเดือนกว่าจะลดลงเท่าข้อเข้าปกติแต่ก็ยังมีอุณหภูมิที่สูงอยู่ก็ไม่ได้พบว่ามีอาการติดเชื้อแต่อย่างใด

จากการวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการตรวจหา IL-6 ใน ซีรัมของผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข้าเทียม พบว่าระดับ IL-6 สูงมากภายหลังการผ่าตัด 1-3 วัน แสดงว่าน่าจะมี systemic inflammation ที่มาจาก local inflammation ของแผลหลังการผ่าตัดซึ่งจะตรวจสอบ ยืนยันได้โดยการตรวจวัดระดับ IL-6 ในน้ำไขข้อ (synovial fluid) แต่ด้วยเนื่องจากการวิจัยในครั้งนี้มี ข้อจำกัดซึ่งไม่ได้เก็บน้ำไขข้อจากผู้ป่วยจึงไม่สามารถ แสดงให้เห็นถึงระดับ IL-6 ที่เปลี่ยนแปลงไปในช่วง ก่อนและหลังการผ่าตัดในน้ำไขข้อได้ แต่จากการวิจัย ของ Lisowska B และคณะ ในปี ค.ศ. 2007 ได้ ทำการศึกษาผู้ป่วย RA ที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเทียม โดยเปรียบเทียบระดับ IL-6 และ IL-8 ใน serum และ drainage fluid ก่อนและหลังการผ่าตัด พบว่าระดับ IL-6 มีแนวโน้มสูงขึ้นทั้งใน serum และใน drainage fluid โดยจะสูงสุด 24 ชั่วโมงภายหลังการผ่าตัด ซึ่ง drainage fluid จะมีค่าสูงกว่าใน serum ส่วนระดับ IL-8 ใน drainage fluid จะเริ่มสูงขึ้นที่ 6 ชั่วโมง หลังการผ่าตัด แต่ใน serum ไม่มีการเปลี่ยนแปลง โดยที่ใน drainage fluid ระดับ IL-6 จะมีค่าสูงกว่า IL-8 อย่างมีนัยสำคัญที่

24 ชั่วโมงหลังการผ่าตัด ดังนั้น การวัดระดับไซโตไคน์ ใน drainage fluid จะบ่งบอกถึงการเกิด local inflammation จากการผ่าตัด ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ ใน serum เนื่องจากในผู้ป่วย RA จะมีการอักเสบเรื้อรัง ทำให้ระดับไซโตไคน์ในเลือดสูงก่อนที่จะได้รับการ ผ่าตัด จากการวิจัยนี้ น้ำไขข้อและ drainage fluid น่าจะ ให้ผลใกล้เคียงกัน

เนื่องจากการวิจัยในครั้งนี้ผู้ที่ทำการวิจัยต้องการ เปรียบเทียบ IL-6 กับตัวชี้วัดที่ใช้ในปัจจุบันคือ ESR และ CRP จึงไม่ได้ทำการตรวจหาค่ามาตรฐานและ clinical outcome อื่นๆ ของผู้ป่วย เช่น การตรวจนับเม็ด เลือดแบบสมบูรณ์ (Complete blood count) และ การศึกษาในอนาคตจะทำการตรวจนับเม็ดเลือดแบบ สมบูรณ์ รวมทั้งสารชีวเคมีของเลือดอื่น ๆ เพื่อวิเคราะห์ ความสัมพันธ์กับระดับ IL-6 ESR CRP และ อุณหภูมิ มีพหุนิยมร่วมข้อเข้าต่อไป

สรุปผลการวิจัย

จากการวิจัยในผู้ป่วยที่ทำการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข้า เทียม พบว่าระดับ IL-6 และ CRP สามารถนำมาใช้ในการ ประเมินภาวะการอักเสบภายหลังการผ่าตัดเปลี่ยน ข้อเข้าเทียมได้ดีกว่า ESR เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลง ได้รวดเร็วกว่า นอกจากนี้อุณหภูมิมีพหุนิยมร่วมข้อเข้า ยังเป็นตัวชี้วัดสำหรับนำมาประเมินภาวะการอักเสบได้ โดยถ้ามีอุณหภูมิสูงขึ้นก็อาจบ่งชี้ว่ามีการอักเสบบริเวณ ข้อเข้าแต่เนื่องจากว่าอุณหภูมิมีพหุนิยมร่วมข้อเข้ามีการ เปลี่ยนแปลงได้ตามอุณหภูมิร่างกายและสภาพแวดล้อม จึงเป็นข้อจำกัดสำหรับการประเมินเบื้องต้นเท่านั้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนวิจัย รัชดาภิเษกสมโภชน์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี และ ภาควิชาออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย หอผู้ป่วยเจริญสมศรี 4, 5, 6 กปร 16 และ 17 รวมทั้ง ห้องปฏิบัติการ serology I หน่วยภูมิคุ้มกัน วิทยา ห้องปฏิบัติการ โลหิตวิทยา ฝ่ายเวชศาสตร์ชั้นสูง

ห้องเจาะเลือด ๓๖๖4 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
สภากาชาดไทย

เอกสารอ้างอิง

- Bilgen O, Atici T, Durak K, Karaemino G, Bilgen MS. 2001. C-reactive protein values and erythrocyte sedimentation rates after total hip and total knee arthroplasty. *J Int Med Res.* 29(1), 7-12.
- Di Cesare PE, Chang E, Preston CF, Liu CJ. 2005. Serum interleukin-6 as a marker of periprosthetic infection following total hip and knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am.* 87(9), 1921-1927.
- Du Clos TW, Mold C. 2004. C-reactive protein: an activator of innate immunity and a modulator of adaptive immunity. *Immunol Res.* 30, 261-277.
- Gabay C., Kushner I. 1999. Acute-phase proteins and other systemic response to inflammation. *N Engl J Med.* 340, 448-454.
- Haidar SG, Charity RM, Bassi Rs, Nicoli P, Singh BK. 2006. Knee skin temperature following uncomplicated total knee replacement. *The Knee.* 13(6), 422-426.
- Kishimoto T. 1989. The biology of interleukin-6. *Blood.* 74, 1-10.
- Laiho K, Maenpaa H, H Kautiainen, Kauppi M, Kaarela K, Lehto M, Belt E. 2001. Rise in serum C reactive protein after hip and knee arthroplasties in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 60, 275-277.
- Larsson S, Thelander U, Friberg S. 1992. C-reactive protein (CRP) levels after elective orthopedic surgery. *Clin Orthop Relat Res.* 275, 237-242.
- Lisowska B, Matlinski W, Maldyk P, Zabek J, Baranowska E. 2007. The role of cytokine in inflammatory response after total knee arthroplasty in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 28(7), 667-71.
- Mehra A, Langkamer VG, Day A, Harris S, Spencer RF. 2005. C reactive protein and skin temperature post total knee replacement. *The Knee.* 12(4), 297-300.
- Moreschini O, Gregg G, Giordano MC, Nocente M, Margheritini F. 2001. Postoperative physiopathological analysis of inflammatory parameters in patients undergoing hip or knee arthroplasty. *Int J Tissue React.* 23, 151-154.
- Mulvey TJ, Thronhill TS. 2001. Infected total knee arthroplasty. In: Insall JN, Scott WN, eds. *Surgery of the Knee.* Philadelphia, PA: Churchill Livingstone. 1875-1890.
- Park KK, Kim TM, Chang CB, Yoon SW, Park KU. 2008. Normative Temporal Values of CRP and ESR in Unilateral and Staged Bilateral TKA. *Clin Orthop Relat Res.* 466, 179-188.
- Swason KC, Windsor RE. 2003. Diagnosis of infection after total knee arthroplasty. In: Callaghan JJ, Rosenberg AG, Rubash HE, Simonian PT, Wiekiewicz TL. *The Adult Knee.* Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. 1485-1491.
- Wirtz DC, Heller KD, Miltner O, Zilkens KW, Wolff JM. 2000. Interleukin-6: a potential inflammatory marker after total joint replacement. *Int Orthop.* 24, 194-196.

Association of IL-6 (-174) G/C Gene Polymorphism with Knee Osteoarthritis

Sittisak Honsawek,^{1,*} Aree Tanavalee¹, Benjamad Deepaisarnsakul¹, Manoon
Sakdinakiattikoon², Pongsak Yuktanandana¹, Vinai Parkpian¹

¹Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

²Bangkok Metropolitan Administration General Hospital, Bangkok 10100, Thailand

Objectives: Osteoarthritis is characterized by degeneration of cartilage. A single nucleotide polymorphism has been described at position -174 of IL-6 promoter region, leading to three possible genotypes, GG, GC, and CC. This polymorphism has been associated with incidence and/or prognosis of a variety of diseases including chronic inflammatory disorders. The purpose of this research was to study the association between IL-6 (-174) G/C polymorphism and susceptibility to and severity of knee osteoarthritis in a Thai population.

Methods: Genomic DNA was obtained from 44 patients with knee osteoarthritis and 100 ethnically matched healthy controls. Polymerase chain reaction-restriction fragment length analysis was used to identify G/C polymorphism at position -174 in the promoter region. Genotype distributions and allelic frequencies of IL-6 (-174) G/C polymorphism were compared between osteoarthritis patients and healthy controls. Thereafter, this association was investigated between patients and controls of the same sex. In addition, the standard Kellgren-Lawrence grading score were used to determine the radiological severity of the disease and their relationship with the IL-6 (-174) gene polymorphism was investigated.

Results and conclusions: Genotype distribution and allelic frequencies of (-174) G/C polymorphism in the IL-6 gene differed significantly between patients with knee osteoarthritis and controls ($p < 0.05$). The (-174) G/C polymorphism in the IL-6 gene may contribute to susceptibility to or severity of knee osteoarthritis in the Thai population. These findings support the notion that variations of genes encoding for cytokines, such as IL-6, could play a critical role in the series of events responsible for the pathogenesis of osteoarthritis.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Serum IL-6, C-reactive Protein, Erythrocyte Sedimentation Rate, and Knee Skin
Temperature After Total Knee Arthroplasty

Sittisak Honsawek,^{1,*} Aree Tanavalee¹, Benjamad Deepaisarnsakul¹, Manoon
Sakdinakiattikoon², Srihatach Ngarmukos¹, Pongsak Yuktanandana¹

¹*Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*

²*Bangkok metropolitan Administration General Hospital, Bangkok 10100, Thailand*

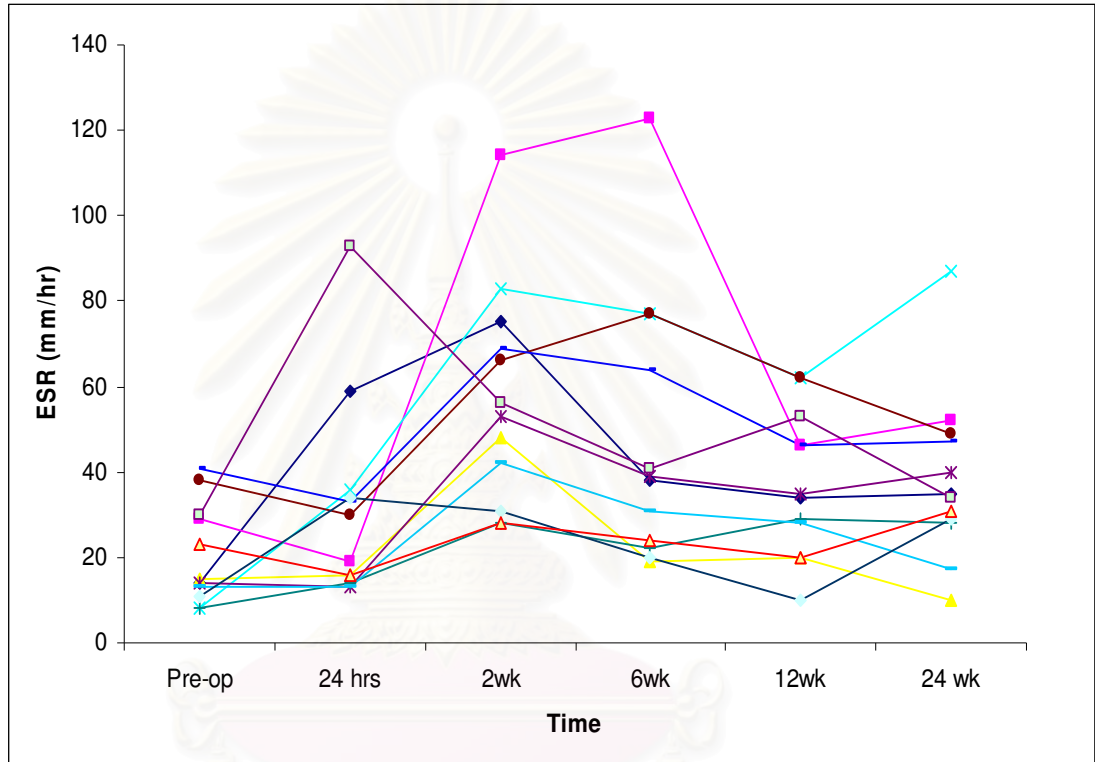
Objectives: Knee osteoarthritis is a common cause of severe pain and functional limitation. Total knee arthroplasty is an effective procedure to relieve pain, restore knee function, and improve quality of life for patients with end stage knee arthritis. The aim of this study was to investigate the inflammatory process in patients with severe osteoarthritis before surgery and in subsequent periods following total knee arthroplasty.

Methods: A prospective study of forty-nine patients undergoing primary total knee replacements was conducted. The patients were evaluated by monitoring serum interleukin-6 (IL-6), C-reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR), knee skin temperature, and clinical status. Measurements were carried out preoperatively and postoperatively at 2, 6, 12, and 24 weeks during follow up review in the knee clinic.

Results and conclusions: The serum IL-6 and CRP elevate in the first postoperative week but fall to pre-operative values at 2 weeks. Both remain within normal limits at 12 weeks. In addition, the ESR rises postoperatively and remains elevated up to 24 weeks. The difference in skin temperature between operated and contralateral knees had a mean value of +4.5 °C at 2 weeks. The mean value decreased to +3.5 °C at 6 weeks, +2.5 °C at 12 weeks, and +1.0 °C at 24 weeks. The difference in skin temperature decreases gradually but remains statistically significant up to 24 weeks after surgery. A sustained elevation in serum IL-6, CRP, ESR, and skin temperature must raise the concern of early complication.

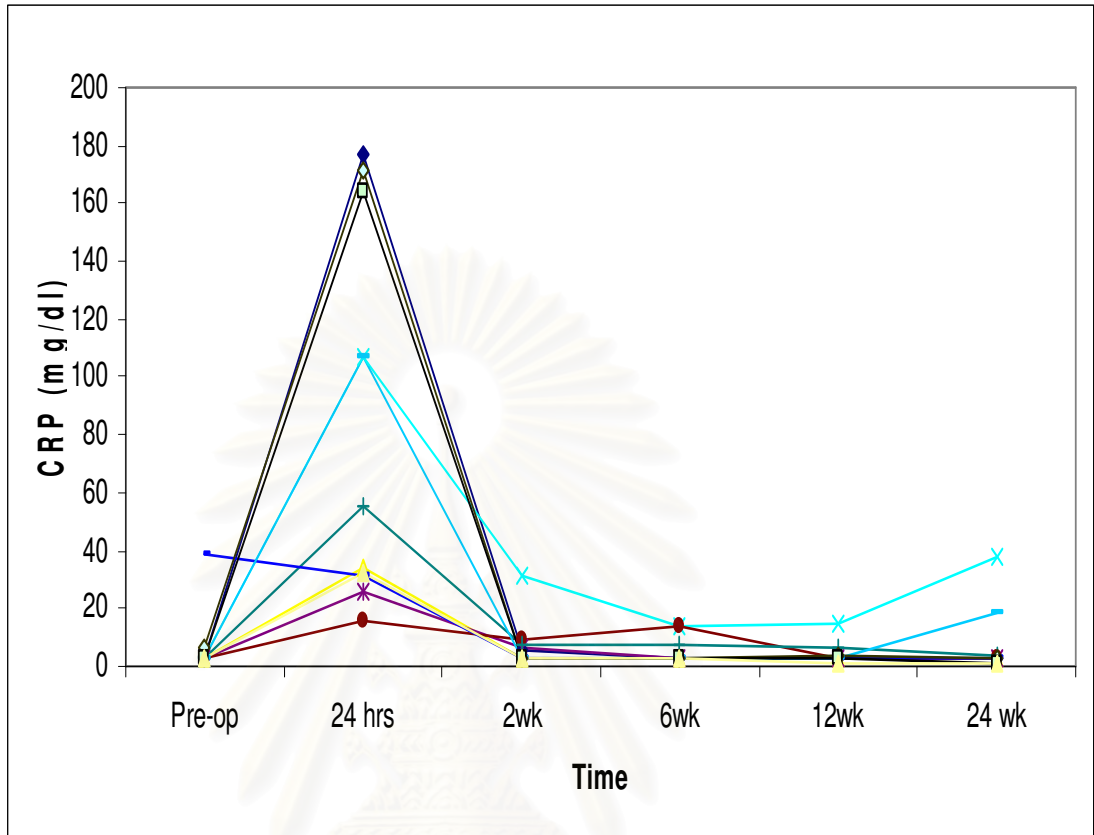
ภาคผนวก จ

รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของตัวชี้วัดต่าง ๆ ในผู้ป่วยแต่ละรายที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม

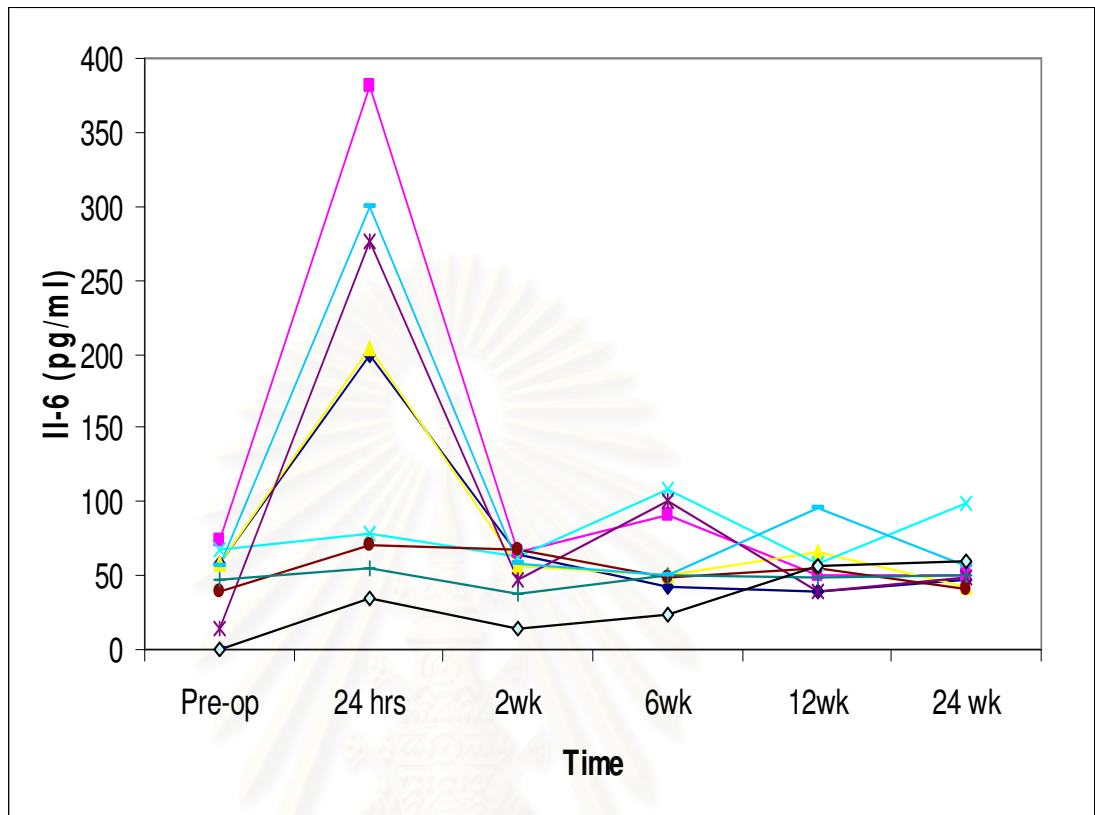


กราฟแสดงความเปลี่ยนแปลงของ ESR ในผู้ป่วยผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม

สถาบันนวัตกรรมการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของ CRP ในผู้ป่วยผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม



กราฟแสดงความเปลี่ยนแปลงของ IL-6 ในผู้ป่วยผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ – นามสกุล	นางสาวเบญจมาศ ดีไพศาลสกุล
วัน เดือน ปีเกิด	3 มกราคม พ.ศ. 2523
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย กรุงเทพฯ
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
การนำเสนอผลงาน	จัดทำบทความวิจัยและโปสเตอร์จากบางส่วนของวิทยานิพนธ์ เพื่อตีพิมพ์และนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับ บัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 12 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย