

การแสดงผลของวารสาร อนุโตทีเลียส โกรทแฟคเตอร์ ในโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EXPRESSION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR
IN DEGENERATIVE LUMBAR DISEASE

Miss Napaphat Jirathanathornnukul



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

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแสดงออกของวาสคูลาร์ เอนโดทีเลียล โกรทแฟคเตอร์ ในโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม
โดย	นางสาวณปภัช จิรชนธรรณกุล
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ วิชาญ ยิ่งศักดิ์มิ่งคล รองศาสตราจารย์พิเศษ นายแพทย์ วรวรรธน์ ลิ้มทองกุล

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธัญญา ทองตัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ วิชาญ ยิ่งศักดิ์มิ่งคล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์พิเศษ นายแพทย์ วรวรรธน์ ลิ้มทองกุล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สันชัย พยุงกร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ซาลินี รอนไพริน)

ณภัช จิรธนธรรณกุล : การแสดงออกของวาสคูลาร์ เอนโดทีเลียล โกรทแฟคเตอร์ ในโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (EXPRESSION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN DEGENERATIVE LUMBAR DISEASE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. ดร. นพ. สิทธิศักดิ์ หารธาเวก, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. นพ. วิชาญ ยิ่งศักดิ์มงคล, รศ. พิเศษ นพ. วรวรรณ์ ลิ้มทองกุล, 114 หน้า.

โรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมเป็นโรคที่พบบ่อยในผู้สูงอายุ การหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum (LF) เป็นพยาธิสภาพที่สำคัญของโรคซึ่งทำให้เกิดการตีบแคบของช่องไขสันหลังส่วนเอวและมีการกดทับเส้นประสาท การหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum อาจเกี่ยวข้องกับ vascular endothelial growth factor (VEGF) ซึ่งมีบทบาทในการสร้างหลอดเลือดใหม่และส่งผลต่อการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการแสดงออกของ ยีนและโปรตีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ของผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบในระดับกระดูกสันหลังที่เกิดรอยโรคและ ligamentum flavum ในระดับกระดูกสันหลังที่ไม่เกิดรอยโรค จำนวน 24 ราย โดยวิเคราะห์การแสดงออกของ VEGF ระดับยีนด้วยวิธี reverse transcriptase- polymerase chain reaction (RT-PCR) และ real time RT-PCR รวมทั้งศึกษาการแสดงออกของโปรตีน VEGF ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ immunohistochemistry จากผลการศึกษาการแสดงออก VEGF ใน LF ที่หนาตัวมีค่าสูงกว่าใน LF ปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.004$) และค่าความเข้มของแถบการแสดงออกของ VEGF ใน LF ที่เกิดรอยโรคมีค่าสูงกว่าที่ไม่เกิดรอยโรคอย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.0002$) นอกจากนี้ระดับโปรตีน VEGF ใน LF ที่หนาตัว มีค่ามากกว่าใน LF ปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.017$) รวมทั้งระดับโปรตีน VEGF ใน LF หนาตัวมีความสัมพันธ์กับการหนาตัวของชิ้นเอ็น LF ซึ่งบ่งชี้ถึงระดับความรุนแรงของโรค ผลการศึกษาทางอิมมูโนพยาธิวิทยาพบการย้อมติดโปรตีน VEGF ภายในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคมากกว่าชิ้นเอ็นที่ไม่เกิดรอยโรคและยังพบลักษณะของหลอดเลือดเล็ก ๆ ในชิ้นเอ็นที่เกิดรอยโรค นอกจากนี้ไม่พบความแตกต่างในการแสดงออกของ VEGF ระหว่างเพศชายและเพศหญิง อีกทั้งการแสดงออกของยีนและโปรตีน VEGF ไม่สัมพันธ์กับอายุในชิ้นเอ็นที่ไม่เกิดรอยโรค การศึกษานี้สรุปได้ว่าการแสดงออก VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับการเสื่อมจากการหนาตัวของ LF ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบ

ภาควิชา ชีวเคมี

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5574199330 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: LUMBAR SPINAL CANAL STENOSIS / HYPERTROPHY / EXPRESSION /
LIGAMENTUM FLAVUM / VEGF

NAPAPHAT JIRATHANATHORNNUKUL: EXPRESSION OF VASCULAR
ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN DEGENERATIVE LUMBAR DISEASE. ADVISOR:
PROF. SITTISAK HONSAWEK, M.D., Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. WICHARN
YINGSAKMONGKOL, M.D., ASSOC. PROF. WORAWAT LIMTHONGKUL, M.D., 114
pp.

Lumbar spinal canal stenosis (LSCS) is a degenerative lumbar disease in the elderly. Hypertrophy of the ligamentum flavum (LF) is a potential element in the development of LSCS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) may play an essential role in the LF hypertrophy. The aim of this research was to investigate the relationship of VEGF in LF from pathogenic and non-pathogenic lesions of patients with LSCS. Twenty-four patients with LSCS were enrolled in this study. We quantified localized VEGF expression in LF tissues. VEGF expression was determined using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and real time RT-PCR. The VEGF protein level was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The localization of VEGF was examined by immunohistochemical staining. The VEGF expression was significantly higher in hypertrophic LF of LSCS than that in non-pathologic LF of controls. VEGF was detected in the cytoplasm of LF fibroblasts, inflammatory cells, and endothelial cells. The average VEGF value of the hypertrophic LF was significantly elevated compared with that of controls ($P=0.017$). In RT-PCR, the mean optical density of VEGF was substantially higher in the hypertrophic LF than controls ($P=0.0002$). There was greater VEGF expression in LSCS patients as quantified by real time RT-PCR ($P=0.004$). The increased expression of VEGF was associated with the degenerative changes of hypertrophic LF, suggesting that VEGF could contribute to one of the mechanisms of pathogenesis in LSCS.

Department: Biochemistry	Student's Signature
Field of Study: Medical Biochemistry	Advisor's Signature
Academic Year: 2014	Co-Advisor's Signature
	Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยของวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้อย่างสมบูรณ์ด้วยความอนุเคราะห์จากผู้มีพระคุณหลายท่าน

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.นพ. สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่คอยให้คำชี้แนะ อบรมสั่งสอน ตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่ตลอดการศึกษาระดับปริญญาโทมาบัดนี้ขอกราบขอบพระคุณ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ นพ.วิชาญ ยิ่งศักดิ์มงคล และอาจารย์ นพ. วรวรรธน์ ลิ้มทองกุล ที่ให้ความกรุณามาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมและช่วยเหลือในการผ่าตัดเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อในการทำวิจัยซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญของการศึกษานี้ อีกทั้งขอขอบพระคุณอาจารย์ นพ.วีรศักดิ์ สิงหนัดกิจ ที่ให้ความเมตตาเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อสำหรับงานวิจัยนี้ด้วย

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนัญญา ทองตัน ที่ยินดีมาเป็นประธานกรรมการสอบ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิญชัย พยุงภร ที่ยินดีเป็นกรรมการสอบภายในมหาวิทยาลัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาลินี รอนไพริน ที่ยินดีเป็นกรรมการสอบจากภายนอกมหาวิทยาลัย

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือต่าง ๆ เช่น การออกจดหมาย การจัดงาน การเตรียมสถานที่ การเบิกใช้สิ่งของต่างๆ เป็นต้น

ขอขอบพระคุณ ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ช่วยสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการทำวิจัย

ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือกลาง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chula Medical Research Center-Chula MRC) ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือในการทำวิจัย

ขอขอบคุณสมาชิกในท้องปฏิบัติกรทุกท่านที่ช่วยเหลือ แนะนำและให้กำลังใจตลอดการศึกษา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาที่สนับสนุนการศึกษาและเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้า

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่ 1.....	1
บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
คำถามงานวิจัย.....	2
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
สมมุติฐานงานวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	3
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
วิธีดำเนินการวิจัย.....	5
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	6
คำสำคัญ.....	6
บทที่ 2.....	7
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
ลักษณะทางกายวิภาคของกระดูกสันหลังส่วนเอว.....	7

โรคกระดูกสันหลังเอวเสื่อม (degenerative lumbar disease)	9
สาเหตุของการเกิดโรคช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบ	13
อาการและอาการแสดงของโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังตีบแคบ	14
การสืบค้นเพื่อยืนยันการวินิจฉัยแยกโรค	16
การรักษาโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบ	17
ชิ้นเอ็นช่องไขสันหลัง (Ligamentum Flavum)	17
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	28
บทบาทของ VEGF ต่อการเกิดพยาธิสภาพ	31
Real-time PCR	33
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	36
BCA assay	37
Polymerase Chain Reaction (PCR)	38
บทที่ 3	40
วิธีดำเนินการวิจัย	40
ประชากร	40
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	42
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	43
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	44
การเก็บรวบรวมข้อมูล	46
การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ	46
การวิเคราะห์ข้อมูล	62
บทที่ 4	63
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	63

บทที่ 5	87
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	87
รายการอ้างอิง	96
ภาคผนวก.....	103
ภาคผนวก ก	104
ภาคผนวก ข	108
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	114



สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	แสดงชนิดและปริมาณสารที่เป็นส่วนผสมในการทำ Reverse transcription (RT Reaction Mix)	48
ตารางที่ 2	แสดง RT Thermal Cycling	49
ตารางที่ 3	แสดง primers ที่ใช้ในการทำ real time RT-PCR.....	50
ตารางที่ 4	แสดงชนิดและปริมาณสารเคมีที่ใช้ทำ real time RT-PCR	50
ตารางที่ 5	แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ real time RT-PCR.....	51
ตารางที่ 6	แสดงชนิดและปริมาณสารเคมีที่ใช้ทำ RT-PCR	53
ตารางที่ 7	แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ RT-PCR	53
ตารางที่ 8	การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA.....	56
ตารางที่ 9	ค่ามัธยฐานของความเข้มแถบการแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มที่เกิดรอยโรคและกลุ่มที่ไม่เกิดรอยโรค	67
ตารางที่ 10	แสดงค่าจำนวนเท่าในอัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในผู้ป่วยแต่ละราย	68
ตารางที่ 11	ค่ามัธยฐานอัตราส่วนปริมาณสัมบูรณ์การแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA.....	70
ตารางที่ 12	ค่ามัธยฐานปริมาณโปรตีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มที่เกิดรอยโรคและกลุ่มที่ไม่เกิดรอยโรค.....	73
ตารางที่ 13	ค่ามัธยฐานความเข้มแถบการแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคระหว่างเพศชายและหญิง	81
ตารางที่ 14	ค่ามัธยฐานอัตราการแสดงออกของยีน VEGF โดยการหาปริมาณเชิงสัมบูรณ์ของยีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคระหว่างเพศชายและหญิง	82
ตารางที่ 15	ค่ามัธยฐานของปริมาณโปรตีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคระหว่างเพศชายและหญิง	84

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1	แสดงส่วนประกอบของกระดูกสันหลังบริเวณเอว.....	8
รูปที่ 2	แสดงกายวิภาคแนวตัดขวางของช่องไขสันหลังส่วนเอวที่ปกติ (A) และผิดปกติ (B).....	8
รูปที่ 3	ภาพถ่าย T1-wighted MRI ช่องไขสันหลังส่วนเอวที่ปกติ (A) และผิดปกติ (B).....	10
รูปที่ 4	แสดงขอบเขตของการตีบแคบในช่องไขสันหลังด้านข้าง	11
รูปที่ 5	ภาพของ ligamentum flavum จากกล้องจุลทรรศน์ (A-C) การย้อมด้วย Hematoxylin และ Eosin (x10), D-F การย้อมด้วย Van Gieson's (x10).....	19
รูปที่ 6	แสดงการย้อมเส้นใยอีลาสตินด้วยสีย้อม Van Gieson (EVG) และการย้อมเส้นใยคอลลาเจนด้วยสีย้อม Massion's Trichrome (MT stain) ในเนื้อเยื่อจากชิ้นเอ็น ligamentum flavum ในกลุ่มที่เกิดพยาธิสภาพและกลุ่มควบคุม	20
รูปที่ 7	การเปรียบเทียบมุมของการเคลื่อนไหวข้อต่อกระดูกสันหลังส่วนเอว (lumbar segmental angulation) ระหว่างกลุ่มที่เป็นโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีการตีบแคบของช่องไขสันหลังและกลุ่มควบคุม.....	21
รูปที่ 8	แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum กับ segmental angulation.....	21
รูปที่ 9	ภาพของชิ้นเอ็นบริเวณกระดูกสันหลัง (ligamentum flavum) ที่มีการสะสมของแคลเซียม.....	23
รูปที่ 10	การเกิด bone nodule formation โดยใช้ Von Kossa staining ใน LF cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย inflammatory cytokines ต่าง ๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม	24
รูปที่ 11	การหนาของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับอายุที่มากขึ้น.....	27
รูปที่ 12	โปรตีน VEGF จับกับโปรตีนตัวรับ (VEGF receptor)	29
รูปที่ 13	วิธีสัญญาณของโปรตีน VEGF	30
รูปที่ 14	วิธี Taqman Probe.....	33
รูปที่ 15	วิธี SYBR-Green Dye	34
รูปที่ 16	กราฟการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (amplification plot) จากเทคนิค Real-time PCR....	35

รูปที่ 17	ขั้นตอนการทำงานของ sandwich-ELISA	37
รูปที่ 18	แสดงการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (DNA amplification)	39
รูปที่ 19	แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐาน สำหรับวัดปริมาณโปรตีน VEGF โดยเทคนิค ELISA	58
รูปที่ 20	ภาพถ่ายแถบการแสดงออกของยีน VEGF และ 18s rRNA ของผู้ป่วยแต่ละราย จากการทำ agarose gel electrophoresis โดยใช้ผลิตภัณฑ์จาก RT-PCR.....	64
รูปที่ 21	กราฟแท่งแสดงการเปรียบเทียบอัตราส่วนความเข้มของแถบการแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA ระหว่างชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคในผู้ป่วยรายเดียวกันของแต่ละคน.....	65
รูปที่ 22	แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบอัตราส่วนความเข้มแถบการแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA ระหว่างกลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค	66
รูปที่ 23	กราฟแท่งเปรียบเทียบอัตราการแสดงออกของยีน VEGF ระหว่างชิ้นเอ็นที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคในผู้ป่วยแต่ละราย.....	69
รูปที่ 24	แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบปริมาณสัมบูรณ์การแสดงออกของยีน VEGF ระหว่างกลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค ...	70
รูปที่ 25	กราฟแท่งแสดงเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคของผู้ป่วยรายเดียวกันในแต่ละคน	71
รูปที่ 26	แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน VEGF ระหว่างกลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค	72
รูปที่ 27	กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของแถบการแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและอายุผู้ป่วย.....	74
รูปที่ 28	กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของแถบการแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรคและอายุผู้ป่วย.....	75

รูปที่ 29	กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการแสดงออกของยีน VEGF เชิงสัมบูรณ์ ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคกับอายุผู้ป่วย.....	76
รูปที่ 30	กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการแสดงออกของยีน VEGF เชิงสัมบูรณ์ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรคกับอายุผู้ป่วย.....	77
รูปที่ 31	กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคกับอายุผู้ป่วย.....	78
รูปที่ 32	กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรคกับอายุผู้ป่วย.....	79
รูปที่ 33	แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความเข้มแถบการแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA ระหว่างเพศในกลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรค.....	80
รูปที่ 34	แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการแสดงออกของยีน VEGF ที่เชิงสัมบูรณ์ระหว่างเพศในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรค.....	82
รูปที่ 35	แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน VEGF ระหว่างเพศในกลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรค.....	83
รูปที่ 36	การย้อมโปรตีน VEGF ด้วยเทคนิค immunohistochemistry ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรค (A,C) และที่เกิดรอยโรค (B,D).....	85
รูปที่ 37	การย้อม Hematoxylin และ Eosin ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรค (A,C) และที่เกิดรอยโรค (B,D).....	86
รูปที่ 38	แสดงสมมุติฐานของ VEGF ที่เกี่ยวข้องกับการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum.....	92

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กระดูกสันหลังบริเวณเอวเป็นตำแหน่งที่มีการรับน้ำหนักและมีการเคลื่อนไหวมากในหลายทิศทางจึงทำให้เสื่อมสภาพได้ง่าย โดยอาจเกิดความเสื่อมได้ทั้งกระดูกสันหลัง และเนื้อเยื่อหรือข้อต่อบริเวณ โดยรอบกระดูกสันหลังที่มีพยาธิสภาพเกิดขึ้น โรคช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบ (lumbar spinal canal stenosis) เกิดจากความเสื่อมของกระดูกสันหลังที่พบได้บ่อยมากโรคหนึ่งในประเทศไทย และได้รับการผ่าตัดรักษาเป็นอันดับต้น ๆ ในผู้สูงอายุอีกด้วย (1) อุบัติการณ์ของโรคนี้นั้นสูงกว่าการเกิดโรคช่องไขสันหลังส่วนคอตีบแคบ (cervical spinal stenosis) ถึง 4 เท่า (2) โรคนี้นี้โดยทั่วไปพบในคนอายุมากกว่า 50 ปี ซึ่งสาเหตุของโรคนี้นี้เกิดจากความเสื่อมของกระดูกสันหลังที่มาจากความเสื่อมสภาพของหมอนรองกระดูก เส้นเอ็น และข้อต่อ เช่น ชิ้นเอ็น ligamentum flavum มีการหนาตัวมากขึ้น หมอนรองกระดูกสันหลังเคลื่อนไปยื่นมากขึ้นและกดทับเส้นประสาท (disc herniation) ข้อฟาเซ็ต (facet joints) โตขึ้น หรือมีภาวะเหล่านี้หลายอย่างร่วมกัน (3, 4) จากสาเหตุข้างต้นเป็นผลให้เส้นผ่านศูนย์กลางช่องไขสันหลัง (spinal canal) มีขนาดเล็กลงกว่าเดิม และไปรบกวนเส้นประสาทไขสันหลังทำให้ผู้ป่วยได้รับความทุกข์ทรมานจากอาการ neurogenic claudication คือ อาการอ่อนแรงหรือปวดขาเวลาเดินจนทำให้ต้องหยุดเดินเป็นพัก ๆ (5, 6) คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยลดลงและไม่สามารถทำกิจวัตรประจำวันได้อย่างปกติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้สูงอายุ โรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องสันหลังตีบแคบนั้นส่วนมากพบได้บ่อยในบริเวณปล้องกระดูกสันหลังส่วนเอวระดับที่ 4 และ 5 (L₄- L₅) (4)

ปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าสาเหตุของการเกิดการเสื่อมของกระดูกสันหลังเกี่ยวข้องกับ การแสดงออกของยีนใดบ้าง จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อมของกระดูกสันหลัง สามารถนำมาใช้อธิบายพยาธิกำเนิดของโรคดังกล่าวได้ เช่น การแสดงออก TGF- β , PDGF-BB, bFGF ใน ligamentum flavum ที่เกิดการหนาตัวในผู้ป่วยโรคช่องไขสันหลังตีบแคบ (7, 8) แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มการแสดงออกของโมเลกุลต่าง ๆ ที่ได้ศึกษามาก่อนหน้านี้ก็ยังไม่สามารถอธิบายการเกิดการหนาตัวของ ligamentum flavum ได้อย่างสมบูรณ์ คาดว่าน่าจะมีปัจจัยอื่น เช่น cytokines และ growth factors เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย

Vascular endothelial growth factor (VEGF) จัดเป็น angiogenic growth factor ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเยื่อบุผิวหลอดเลือดและทำให้เซลล์เพิ่มจำนวนได้ การเจริญของเซลล์บุผิวหลอดเลือดแสดงถึงความสามารถในการเจริญของเนื้อเยื่ออื่น ๆ บริเวณนั้นได้ด้วย (9) ซึ่งน่าจะเป็นปัจจัยเสริมให้เกิดการหนาตัวของชั้นเอ็น ligamentum flavum และข้อฟาเซต (facet joints) เจริญเติบโตขึ้นผิดปกติ

คำถามงานวิจัย

ระดับการแสดงออกของ VEGF ระดับ mRNA และ protein เกี่ยวข้องกับการเกิดรอยโรคของชั้นเอ็น ligamentum flavum ในผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบหรือไม่

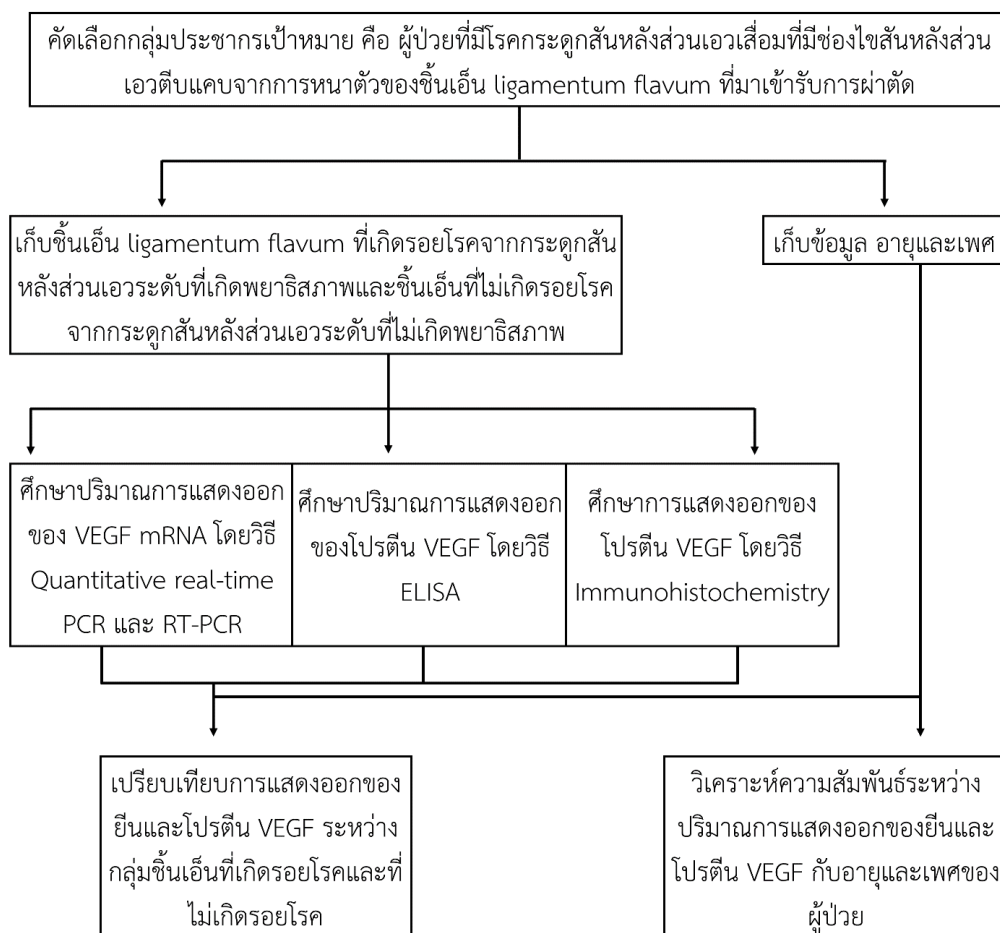
วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนและโปรตีน VEGF ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ในโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม
2. เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของยีนและโปรตีน VEGF ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคในโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนและโปรตีน VEGF เพศ และอายุของผู้ป่วย

สมมุติฐานงานวิจัย

การแสดงออกของยีนและโปรตีน VEGF ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ตำแหน่งที่เกิดรอยโรคมีค่าสูงกว่าตำแหน่งที่ไม่เกิดรอยโรคและมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดการหนาตัวของชั้นเอ็น ligamentum flavum ในผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบ

ขอบเขตของการวิจัย



CHULALONGKORN UNIVERSITY

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. เครื่องมือและชุดการทดสอบต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำตามมาตรฐานของการทดสอบเครื่องมือและชุดการทดสอบนั้นๆ
2. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยเป็นผู้ป่วยที่มารับการผ่าตัด ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย
3. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยให้ความร่วมมือด้วยความเต็มใจตลอดการศึกษาวิจัย โดยมีการลงลายมือชื่อในเอกสารยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (informed consent) ด้วยความสมัครใจภายหลังจากได้รับการชี้แจงให้ทราบในทุกด้าน ซึ่งรวมถึงความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น

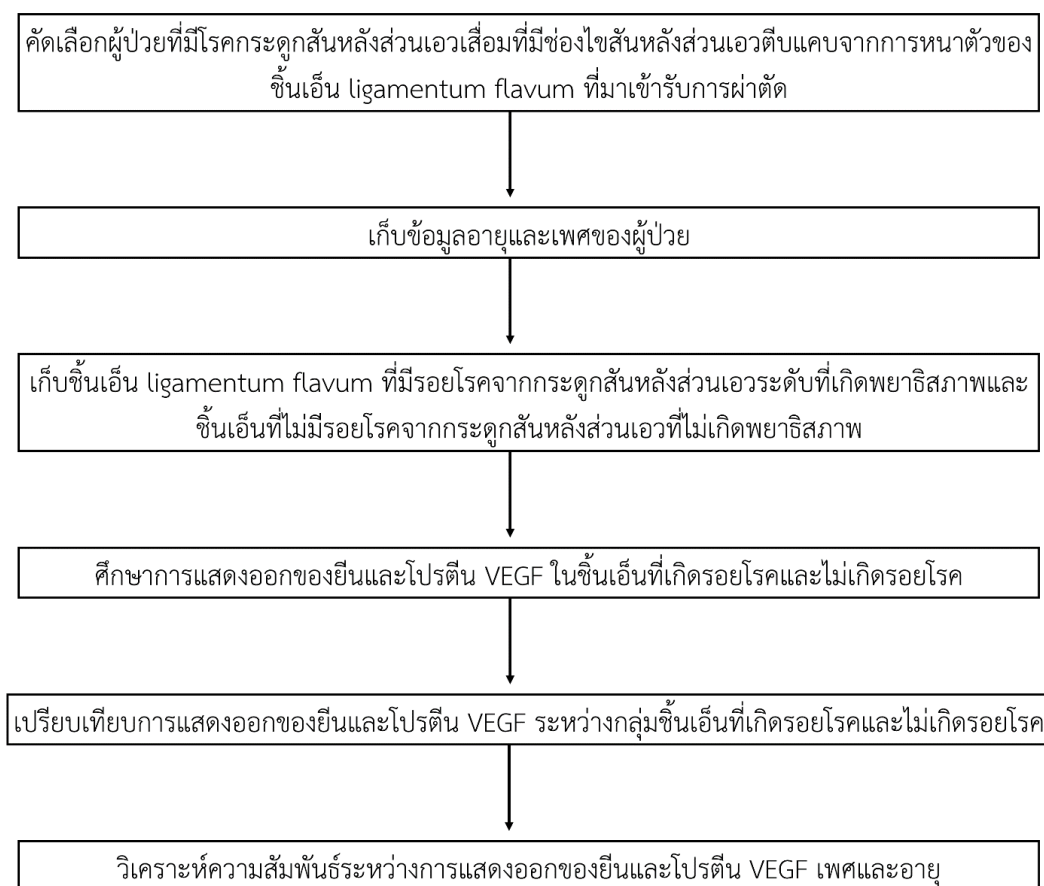
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

- Degenerative lumbar disease คือ โรคของกระดูกสันหลังส่วนเอวที่เกิดจากการเสื่อมสภาพของโครงสร้างกระดูก
- Reverse transcription-Polymerase chain Reaction (RT-PCR) คือ การเพิ่มปริมาณ DNA โดยสารพันธุกรรมที่เริ่มต้นนั้นเป็น RNA จึงต้องอาศัยการสร้างสาย cDNA จาก mRNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase การตรวจวัดการแสดงออกด้วยวิธีนี้เป็น End-point detection โดยต้องนำ PCR product มาตรวจสอบด้วยเทคนิค Agarose Gel electrophoresis และย้อมด้วย Ethidium bromide แล้วจึงตรวจสอบการเรืองแสงของแถบ DNA ภายใต้แสง UV
- Quantitative real time PCR เป็นการเพิ่มปริมาณ DNA หากสารพันธุกรรมที่ใช้ตั้งต้นเป็น RNA จะมีการเปลี่ยนเป็น cDNA โดย reverse transcriptase enzyme ก่อน เทคนิคนี้สามารถตรวจวัด PCR product ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้น ๆ โดยอาศัยการวัดปริมาณสารเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบของปฏิกิริยาที่ดำเนินไปตั้งแต่เริ่มจนจบ (real-time detection)
- ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) คือ วิธีการตรวจหาสารโดยอาศัยหลักการการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี โดยทำการเคลือบพื้นผิวของแผ่นเพลท ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการตรวจหาในสารตัวอย่าง ซึ่งจะถูกเติมลงไปพร้อมกับแอนติเจน ที่ติดฉลากด้วย เอนไซม์คอนจูเกต (enzyme conjugate) โดยทั้งคู่จะแย่งกันลงไปจับกับแอนติบอดีที่เคลือบผิวเอาไว้ ซึ่งจะขึ้นอยู่กับปริมาณกับสารที่ต้องการตรวจหา ดังนั้นถ้าตัวอย่างมีแอนติเจนมากกว่าก็จะจับกับแอนติบอดีได้มากกว่า และเมื่อเติมสารตั้งต้น (substrate) ก็จะได้สีที่เข้มต่างกันตามจำนวนของแอนติเจน และ แอนติบอดีคอนจูเกต
- Immunohistochemistry เป็นการย้อมชิ้นเนื้อเยื่อด้วยวิธีพิเศษทางเคมี โดยการใช้แอนติบอดี (antibody) ที่มีความจำเพาะสำหรับแอนติเจน (antigen) แต่ละชนิดในเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษา มีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยโรคจากเนื้อเยื่อที่ตัดออกมาตรวจในกรณีที่ไม่สามารถวินิจฉัยได้แน่นอนจากการศึกษาเนื้อเยื่อโดยวิธีการย้อมสี Hematoxylin & Eosin ที่ใช้ในการตรวจตามปกติ
- Primer คือ oligonucleotide หรือ ดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ที่ใช้เป็นแม่แบบของการสร้าง DNA สายใหม่
- Gel electrophoresis เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกโมเลกุลของ DNA หรือ โปรตีนที่สนใจ โดยอาศัยหลักการความสามารถในการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันในสนามไฟฟ้า

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถบอกความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน VEGF และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของชั้นเอ็น ligamentum flavum ในผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบ และอาจใช้ความสัมพันธ์ดังกล่าวในการทำนายสาเหตุและกลไกการดำเนินโรคได้หรือผลในการรักษาโรคดังกล่าว เนื่องจากในปัจจุบันเรายังไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริงของการเกิดโรคนี้ที่ทำให้เกิดอาการทางคลินิก ทำให้การวินิจฉัยโรคยังคงอาศัยวิธีการประเมินจากอาการทางคลินิกเป็นหลัก อีกทั้งอาจนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์เพื่อใช้พัฒนาองค์ความรู้ใหม่ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาโรคนี้ เช่น ประสิทธิภาพการตรวจ การแยกวินิจฉัยโรคออกจากโรคอื่นได้แม่นยำมากขึ้น ซึ่งสามารถลดความรุนแรงของโรคอีกทั้งยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการรักษา

วิธีดำเนินการวิจัย



ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. ยื่นเสนอโครงร่างวิทยานิพนธ์ต่อคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ และคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง
2. แสดงเอกสารข้อมูลโครงการวิจัยและเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยให้แก่อาสาสมัครโครงการวิจัย
3. เก็บข้อมูลอายุ และ เพศ จากอาสาสมัครโครงการวิจัยที่ลงชื่อยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย
4. เก็บตัวอย่างชิ้นเอ็น ligamentum flavum
5. สกัด total RNA จากชิ้นเอ็น ligamentum flavum
6. ศึกษาการแสดงออกของยีน VEGF ด้วยเทคนิค Quantitative real time PCR และ RT-PCR
7. สกัดโปรตีนจากชิ้นเอ็น ligamentum flavum
8. ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน VEGF ด้วยเทคนิค ELISA
9. ศึกษาตำแหน่งการแสดงออกของโปรตีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ด้วยเทคนิค immunohistochemistry
10. เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนและโปรตีน VEGF ระหว่างกลุ่มชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค
11. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน VEGF ระดับปริมาณของโปรตีน VEGF เพศ และอายุของผู้ป่วย
12. สรุปผลการวิจัย เขียนรายงานผลการวิจัย และนำเสนอผลงานวิจัย

คำสำคัญ

Lumbar spinal canal stenosis, Hypertrophy, Expression, Ligamentum flavum, VEGF

บทที่ 2

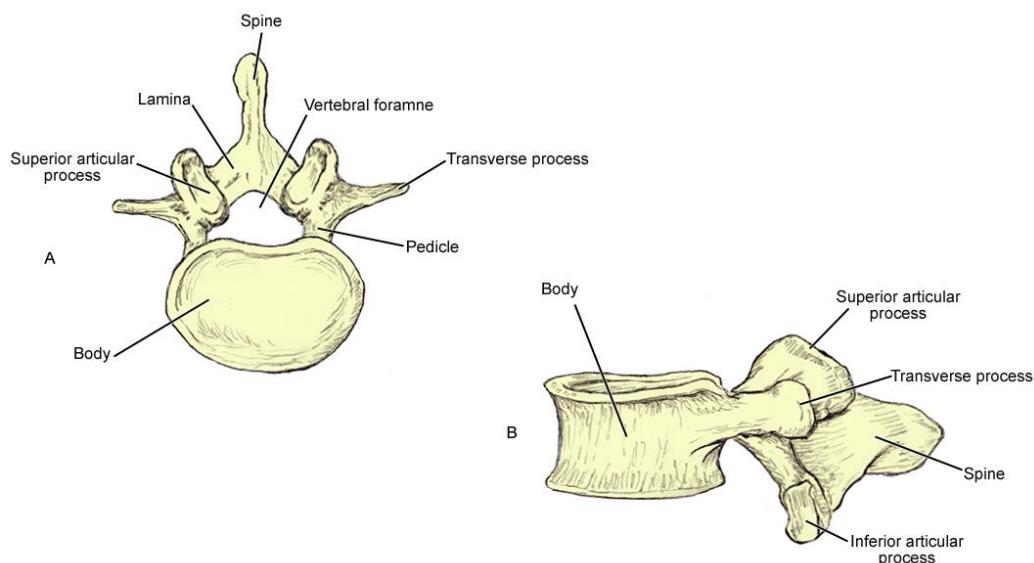
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะทางกายวิภาคของกระดูกสันหลังส่วนเอว

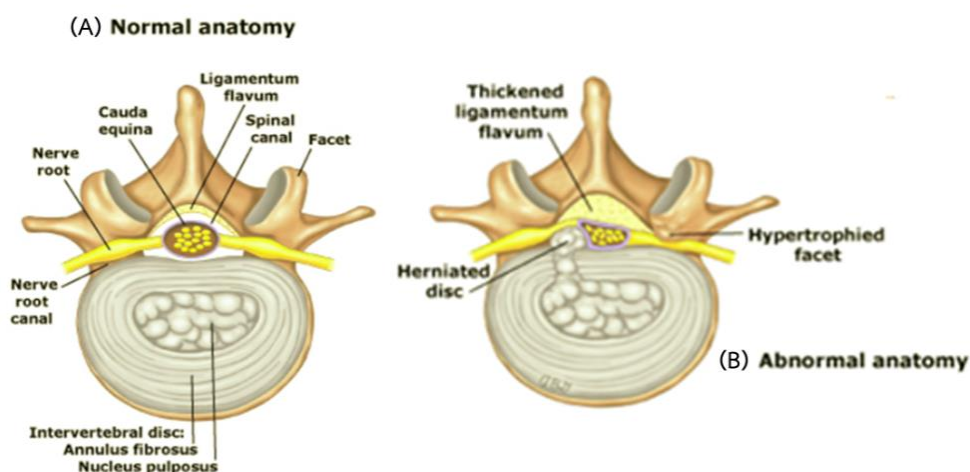
สันหลัง (vertebral column) ของมนุษย์เป็นกระดูกแนวกลางของร่างกาย (axial skeleton) ประกอบด้วยปล้องกระดูกสันหลัง (vertebrae) หลายปล้องเรียงซ้อนกันในแนวตั้งโดยมีข้อต่อหลายข้อทำหน้าที่เป็นส่วนยึด ทำให้ได้แนวแกน (axis) ของร่างกายที่มีความมั่นคงแต่เคลื่อนไหวได้ จำนวนปล้องกระดูกสันหลังในร่างกายทั้งหมด 33 ชิ้น โดยแบ่งเป็นช่วงคอ (cervic) 7 ชิ้น, ช่วงอก (thoracic) 12 ชิ้น, ช่วงเอว (lumbar) 5 ชิ้น (L_1-L_5), ช่วงกระเบนเหน็บ (sacrum) 5 ชิ้น (S_1-S_5) และช่วงก้นกบ (coccyx) 4 ชิ้น ปล้องกระดูกสันหลังแต่ละชิ้นเชื่อมต่อกันด้วยหมอนรองกระดูกสันหลังทางด้านหน้าและข้อฟาเซตทางด้านหลัง โดยมีเอ็นและกล้ามเนื้อเสริมความแข็งแรงแก่กระดูกสันหลัง (10)

กระดูกสันหลังบริเวณเอวประกอบด้วย (1-3)

1. ตัวกระดูก (lumbar vertebral body) อยู่ด้านหน้าของช่องไขสันหลัง ตัวกระดูกแต่ละชิ้นเชื่อมกันด้วยหมอนรองกระดูก ซึ่งทำหน้าที่ร่วมกันในการรับน้ำหนัก ตัวกระดูกมีขนาดเปลี่ยนแปลงตามระดับและรูปร่างของกระดูกสันหลัง ตัวกระดูกของกระดูกสันหลังบริเวณเอวมีขนาดใหญ่กว่ากระดูกสันหลังในส่วนคอและอก เนื่องจากต้องทำหน้าที่แบกรับน้ำหนักมากกว่าในบริเวณอื่น
2. Vertebral arch หรือ vertebral neural เป็นโครงสร้างที่อยู่ล้อมรอบช่องไขสันหลัง เกิดจากกระดูก pedicle, lamina และส่วน dorsum ของตัวกระดูกมาประกอบเป็นช่องไขสันหลัง บริเวณรอยต่อของ pedicle และ lamina จะพบ transverse process, superior articular process และ inferior articular process โดยที่ inferior articular processes ของกระดูกสันหลังชั้นบนเชื่อมต่อกับ superior articular process ของกระดูกสันหลังชั้นล่างต่อเนื่องกันไป เกิดเป็นข้อฟาเซต (facet joint)



รูปที่ 1 แสดงส่วนประกอบของกระดูกสันหลังบริเวณเอว (A) แสดงข้อกระดูกสันหลังส่วนเอวตามแนวขวาง (horizontal plane) (B) แสดงข้อกระดูกสันหลังส่วนเอวแนวระนาบซ้ายขวา (sagittal plane) (จาก <http://emedicine.medscape.com>)



รูปที่ 2 แสดงกายวิภาคแนวตัดขวางของช่องไขสันหลังส่วนเอวที่ปกติ (A) โดยช่องไขสันหลังทางด้านหน้าถูกล้อมด้วย vertebral body หรือ vertebral disc และ posterior longitudinal ligament ด้านข้างถูกล้อมด้วย pedicles และ facet joints ส่วนด้านหลังของช่องไขสันหลังถูกล้อมด้วย lamina และ ligamentum flavum, (B) ความผิดปกติทางกายวิภาคของช่องไขสันหลังและกระดูกสันหลังบริเวณเอวที่แสดงลักษณะการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum การหนาตัวของข้อฟาเซต และหมอนรองกระดูกสันหลังเคลื่อนทับเส้นประสาท (11)

โรคกระดูกสันหลังเอวเสื่อม (degenerative lumbar disease)

โรคกระดูกสันหลังเอวเสื่อม (degenerative lumbar disease) คือ โรคกระดูกสันหลังส่วนเอว (lumbar spine) ที่เกิดการเสื่อมสภาพของโครงสร้างกระดูก ซึ่งมีสาเหตุได้หลายประการ เช่น เกิดจากการใช้งานกระดูกสันหลังอย่างหนักโดยการยกหรือแบกวัตถุที่มีน้ำหนักมากเป็นระยะเวลานาน การเสื่อมที่เกิดจากอายุเพิ่มมากขึ้น โรคดังกล่าวนี้พบว่าการเสื่อมของหมอนรองกระดูกสันหลัง (vertebral disc) ข้อต่อฟาเซต (facet joint) และชิ้นเอ็น ligamentum flavum (12) หรือโป่งขึ้น ตัวอย่างโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่พบได้บ่อย ได้แก่ หมอนรองกระดูกสันหลังแตกและกดทับเส้นประสาท (disc herniation) และปล้องกระดูกสันหลังเคลื่อน (spondylolisthesis) ซึ่งภาวะดังกล่าวส่งผลนำไปสู่โรคช่องไขสันหลังตีบแคบ (spinal stenosis) และเกิดการกดทับเส้นประสาทไขสันหลังตามมา

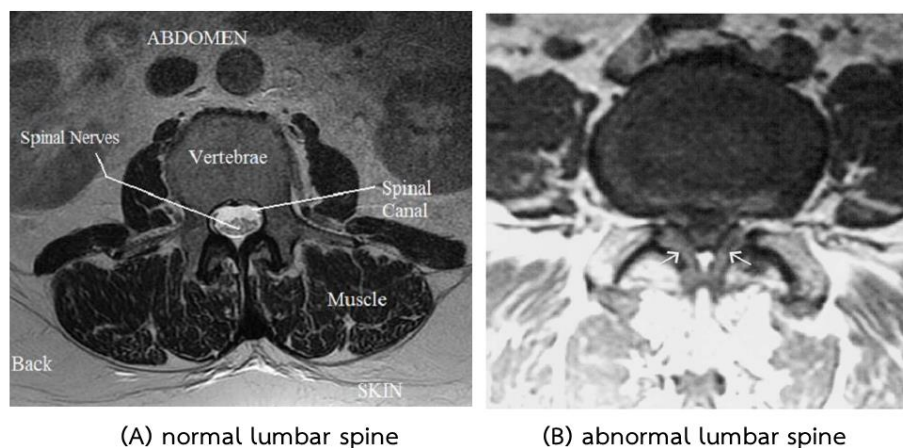
โรคกระดูกสันหลังเสื่อมส่วนเอวที่มีช่องไขสันหลังตีบแคบ (lumbar spinal stenosis) เป็นพยาธิสภาพที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ spinal column (3) โดยการตีบแคบของช่องไขสันหลังที่เกิดขึ้นทำให้เกิดการกดรากประสาท ความรุนแรงของอาการขึ้นอยู่กับระดับของการกดทับ อุบัติการณ์ของการเกิดโรค พบในเพศชายมากกว่าเพศหญิงสองเท่า แต่ถ้ามี degenerative spondylolisthesis ก็พบในเพศหญิงมากกว่าเพศชายหกเท่า และพบตำแหน่งกระดูกสันหลังส่วนเอวมากที่สุด โดยพบบ่อยที่ระดับ L₄-L₅, L₃-L₄, L₂-L₃, L₅-S₁, L₁-L₂ เรียงตามลำดับ (2) กระดูกสันหลังส่วนเอวแต่ละปล้องมีลักษณะ 3-joint complex คือ 2 facet joints และ 1 intervertebral disc ซึ่งเป็นส่วนที่ทำให้เกิด spinal stenosis เมื่อเกิด disc degeneration ทำให้ disc space แคบลง (มีการยุบตัวลง) ทำให้ facet joint รับน้ำหนักเพิ่มมากขึ้นส่งผลให้ facet joint เสื่อมและเกิดการหนาตัว (hypertrophy) นอกจากนี้ยังพบว่าการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum อีกด้วย ซึ่งส่งผลให้เนื้อที่ช่องไขสันหลังลดลง

พยาธิกายวิภาคของโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย 2 กลุ่ม คือ central stenosis และ lateral stenosis ที่หมายรวมถึง lateral recess และ neural foramen (13)

1. ช่องไขสันหลังส่วนกลางตีบแคบ (central stenosis)

พบได้ในแนวกระดูกสันหลัง ซึ่งเกิดจากการยื่นหรือการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum การโป่งยื่นของหมอนรองกระดูกสันหลัง (disc protrusion) การหนาตัวของ zygapophyseal joints และการเกิดความเสื่อมของปล้องกระดูกสันหลังที่มีการเคลื่อนของกระดูกสันหลังร่วมด้วย (degenerative spondylolisthesis) การศึกษาการตีบแคบของไขสันหลังส่วนกลางโดยใช้การถ่ายภาพฉีดสารทึบรังสีเข้าช่องไขสันหลัง (myelography) หรือใช้เครื่องถ่ายภาพด้วยคลื่น

แม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic Resonance Imaging, MRI) สามารถอธิบายระดับช่องไขสันหลังที่มีการตีบแคบได้ชัดเจน ร้อยละ 40 ของผู้ป่วยที่มีช่องไขสันหลังส่วนกลางตีบแคบมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่ออ่อนภายในช่องไขสันหลังส่วนกลาง (soft tissue hypertrophy) ส่งผลให้กลุ่มรากประสาทหางม้า (cauda equina) ถูกกดทับตรงกลางจากทางด้านหน้าและด้านหลังที่แนวระดับหมอนรองกระดูกสันหลัง การถูกกดทับนี้อาจเกิดจากทั้งที่มีการยื่นของหมอนรองกระดูกสันหลัง (disc bulge/protrusion) จากทางด้านหน้า หรือ จากการยื่นของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่สัมพันธ์กับการหนาตัวของ zygapophyseal joint (facet joint) ที่รุกรานช่องไขสันหลังมาทางด้านหลัง ซึ่งการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum นั้นเป็นที่ทราบกันดีว่ามีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเสื่อม (aging process) หรือ เกี่ยวกับความเค้นเชิงกล (mechanical stress) เนื่องจากการขาดความมันคงของกระดูกสันหลัง ในการศึกษาทางกายวิภาคพบว่าผู้ป่วยที่มีช่องไขสันหลังส่วนกลางตีบแคบมีการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum 7-8 มิลลิเมตร ขณะที่คนปกตินั้นชิ้นเอ็น ligamentum flavum มีการหนาตัวน้อยกว่าหรือเท่ากับ 4 มิลลิเมตร (รูปที่ 3) ผู้ป่วยที่มีช่องไขสันหลังส่วนกลางตีบแคบส่วนมากมักมีอาการปวดร้าวลงขาขณะเดิน (neurogenic claudication)

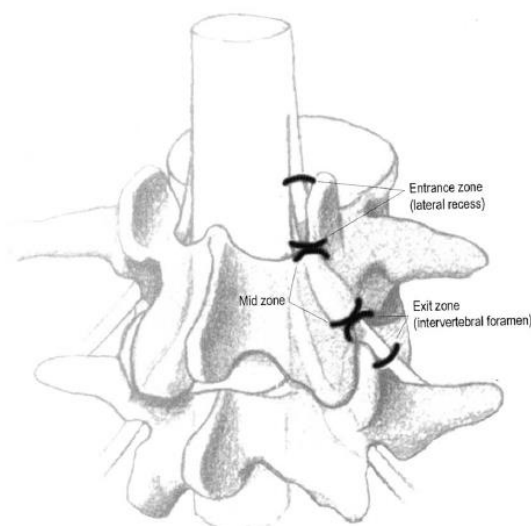


รูปที่ 3 ภาพถ่าย T1-wighted MRI แสดงถึงช่องไขสันหลังส่วนเอวที่ปกติ (A), การหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum (ลูกศรสีขาว,B) และการโป่งยื่นของหมอนรองกระดูกสันหลังที่ทำให้เกิดการตีบแคบของช่องไขสันหลังส่วนกลาง (13)

(จาก <http://www.brianjogrody.com/spinedegenerative.html>)

2. ช่องไขสันหลังด้านข้างตีบแคบ (lateral stenosis)

lateral spinal stenosis เป็นสาเหตุของอาการปวดตามเส้นประสาท (radicular pain) โดยแนวกระดูกสันหลังด้านข้างหมายถึงรวมถึง ช่องรากประสาท (nerve root canal) ในส่วน lateral recess และ intervertebral foramen (neural foramen) ซึ่งพื้นที่สองส่วนนี้รวมกันเป็นช่องท่อยาวที่มีรากประสาทแทรกอยู่ สามารถแบ่งช่องไขสันหลังด้านข้าง (lateral lumbar spinal canal) ตามลักษณะทางกายวิภาคได้เป็น 3 ส่วน ได้แก่ entrance zone, mid zone และ exit zone ดังรูป (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 แสดงขอบเขตของการตีบแคบในช่องไขสันหลังด้านข้าง (lateral stenosis) ทั้ง 3 ส่วน คือ (1) entrance zone (lateral recess), (2) mid zone และ (3) exit zone (intervertebral foramen) (13)

2.1 Entrance zone เป็นบริเวณใต้ข้อต่อ (subarticular area) และเป็นส่วนเชื่อมต่อกับ pedicle ของกระดูกสันหลัง อาจเรียกบริเวณนี้ว่าเป็น “lateral recess” ตามลักษณะทางกายวิภาค entrance zone หรือ บริเวณ lateral recess/subarticular ตั้งอยู่ข้างใต้ superior articular process ของ zygapophyseal joint (facet joint) ทางด้านข้างของ lateral recess ถูกปกคลุมด้วย pedicle และมี superior articular process ปกคลุมด้านหลัง ส่วนทางด้านหน้ามีผิวหน้าของแกนกระดูกสันหลังและหมอนรองกระดูกสันหลังส่วนที่ติดกันปกคลุมอยู่ ทางขอบแนวกลางของ lateral recess ถูกโอบล้อมด้วยถุงหุ้มเส้นประสาท (thecal sac) การหนาตัวของ superior articular process โดยเฉพาะบริเวณขอบแนวกลาง (medial border) อาจกดทับรากประสาทระหว่าง facet และส่วนด้านหลังของกระดูกสันหลัง วิธีการตรวจ lateral recess ที่ปกติ สามารถทำได้โดยใช้การถ่ายภาพรังสีภาคตัดขวางด้วยคอมพิวเตอร์ (computerized tomography) lateral recess ปกติมีความสูงมากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร หากความสูงของ lateral recess น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 มิลลิเมตรจัดว่าเกิดพยาธิสภาพ และ lateral recess ที่มีความสูง 3-4 มิลลิเมตร อาจทำให้เกิดการตีบแคบของช่องไขสันหลังด้านข้าง (lateral recess stenosis) สาเหตุทั่วไปที่ทำให้เกิดการตีบแคบส่วน entrance zone (entrance zone stenosis) คือ การหนาตัวของข้อเสื่อม (hypertrophic osteoarthritis) ของ zygapophyseal joint โดยเฉพาะส่วนที่เกี่ยวกับ superior articular process สำหรับสาเหตุอื่นที่ทำให้เกิดการตีบแคบของช่องไขสันหลังส่วน entrance zone (lateral recess) ได้แก่ หมอนรองกระดูกสันหลังเคลื่อนทับเส้นประสาททางด้านข้าง (posterior disc herniation) ซึ่งจะกดทับรากประสาทที่ไพล่ออกมาจาก dural sac

2.2 Mid zone ตั้งอยู่ที่ pars interarticularis ของ lamina และอยู่ใต้ pedicle โครงสร้างของเส้นประสาทใน mid zone คือ dorsal root ganglion และ ventral motor nerve root ซึ่งปกคลุมด้วย fibrous tissue ที่ยึดขยายจาก dura matter เส้นประสาทเหล่านี้ถูกหล่อเลี้ยงด้วยน้ำไขสันหลัง (cerebrospinal fluid) เนื่องจาก dorsal root ganglion ในส่วนของ mid zone นี้เป็นเส้นประสาทที่ครอบคลุมพื้นที่บริเวณกว้างกว่าเส้นประสาทอื่น ๆ ที่อยู่ในกระดูกสันหลังบริเวณเอว ฉะนั้นในบริเวณนี้เส้นประสาทจึงถูกกดทับได้ง่าย สามารถวินิจฉัยการเกิดโรคในส่วนนี้ได้จากภาพถ่ายรังสี CT scan และภาพจากคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าในแนวระนาบข้าง (sagittal MRI) สาเหตุทั่วไปที่ทำให้เกิดการกดทับรากประสาทในบริเวณ mid zone คือ ความบวมพองในส่วน pars interarticularis ทำให้เกิดปุ่มงอกกระดูก (osteophyte formation) ข้างใต้ pars interarticularis ซึ่งเป็นจุดที่ขึ้นเอ็น ligamentum flavum แต่จะอยู่ หรือทำให้เกิดการหนาตัวของเนื้อเยื่อ fibrocartilaginous หรือเนื้อเยื่อ bursal นอกจากนี้การตีบแคบของช่องไขสันหลังในส่วน mid zone อาจเกิดจาก pedicular

kinking ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อมีการเสื่อมสภาพของหมอนรองกระดูกสันหลังสัมพันธ์กับการแคบลงของหมอนรองกระดูก mid zone stenosis สามารถเกิดในผู้ป่วยที่มีกระดูกสันหลังคดได้ (scoliosis)

2.3 Exit zone (neural foramen) สาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการตีบแคบในส่วน exit zone คือ การหนาตัวของข้อกระดูกที่มีการอักเสบและมีการเคลื่อนของกระดูก (hypertrophic osteoarthritic changes in the zygapophyseal joints with subluxation) และการเกิดสันกระดูกตามแนวเหนือขอบหมอนรองกระดูก (osteophytic ridge formation) ทำให้รากประสาทถูกกดทับได้จากทางแนวตั้งและแนวนอน การกดทับเส้นประสาทเกิดได้จากการเคลื่อนของ superior articular facet, หมอนรองกระดูกเคลื่อนทับเส้นประสาท (lateral herniated disc), การโป่งยื่นของ annulus (protruding annulus) และการมีลักษณะตะขอยื่นมาจากกระดูกสันหลัง (uncinated spur) (13)

สาเหตุของการเกิดโรคช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบ (etiology of lumbar spinal stenosis)

แบ่งสาเหตุการเกิดโรคช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบได้เป็น 2 ประเภท

1. ประเภทที่เป็นมาแต่กำเนิด ได้แก่

1.1 Dwarfism (achondroplasia, Morquio's syndrome, spondyloepiphyseal dysplasias อื่น ๆ)

1.2 Spinal dysraphism (spina bifida, spondylolisthesis, myelomeningocele)

2. ประเภทที่เกิดขึ้นในภายหลังเนื่องจากความเสื่อม

2.1 ภาวะกระดูกสันหลังเสื่อมตามวัย (Spondylosis หรือ degenerative arthritis) จัดเป็นสาเหตุโดยทั่วไปที่ทำให้เกิดโรคช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบ การดำเนินความเสื่อมของหมอนรองกระดูกสันหลังที่เกิดขึ้นจากอายุมากขึ้น, การบาดเจ็บ และปัจจัยอื่น ๆ สามารถนำไปสู่การโป่งยื่นของหมอนรองกระดูกสันหลัง (disc protrusion) และหรือมีการสูญเสียส่วนสูงของหมอนรองกระดูกสันหลัง โดยกระบวนการเสื่อมของกระดูกสันหลัง เช่น การเติบโตของข้อต่อฟาเซต (facet osteophytes), การหนาตัวของชิ้นเอ็นบริเวณกระดูกสันหลัง (hypertrophied ligamentum flavum) และการยื่นของหมอนรองกระดูกสันหลัง (disc bulging/disc protrusion) ล้วนเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดการรุกรานพื้นที่ของช่องไขสันหลังส่วนกลาง (central canal) และ neural foramina

2.2 Degenerative spondylolisthesis (DS) คือความผิดปกติที่มีการเคลื่อนตัวของกระดูกสันหลังไปด้านหน้าเหนือข้อปล้องล่างโดย upper vertebra ทั้งหมด (vertebral body และ ส่วนด้านหลังของ vertebra รวมถึง neural arch & processes) มีการเคลื่อนตัวสัมพันธ์กับ lower vertebra เนื่องจากมีการเสื่อมเกิดขึ้นในกระดูกสันหลังบริเวณเอว และเป็นสาเหตุสำคัญของโรค

spinal canal stenosis ซึ่งมักมีอาการปวดหลังช่วงล่างและปวดขา โดยกระดูกสันหลังส่วนเอวในตำแหน่ง L₄-L₅ เป็นตำแหน่งที่มักเกิดโรคมากที่สุด ตามด้วยตำแหน่ง L₅-S₁ และ L₃-L₄ ตามลำดับ (5)

DS ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ spinal stenosis และ segmental instability ซึ่งชี้ได้ว่ามีลักษณะอาการทางคลินิกที่หลากหลาย ผู้ป่วยโรค DS ต้องทนทุกข์ทรมานจากอาการปวดร้าวลงรากประสาท อย่างเช่น intermittent claudication หรือ vesicorectal disorder มักประสบกับภาวะความผิดปกติทางระบบประสาทมากขึ้น ถ้าไม่ได้รับการผ่าตัด สาเหตุของการเกิดโรค DS เกิดจากพหุปัจจัย (multifactorial) และมีความเชื่อมโยงกับพยาธิสภาพของโรคอื่น ตัวอย่างเช่น โรคหมอนกระดูกสันหลังเสื่อมสภาพ, โรคข้อฟาเซตเสื่อม, โรคช่องไขสันหลังตีบแคบ

สาเหตุหลักที่อาจนำไปสู่การเคลื่อนของกระดูกสันหลังจากการเสื่อมสภาพ (14) คือ ข้อฟาเซตเสื่อมสภาพจากการสูญเสียโครงสร้างค้ำจุน, การทำงานที่ผิดปกติของ ligamentous stabilizing component เนื่องจากภาวะ hyperlaxity และการขาดความมั่นคงของกล้ามเนื้อหลัง

2.3 Space-occupying lesions เช่น การเกิดเนื้องอกของเซลล์ไขมัน (lipoma), การยื่นของ synovial และ neural cysts, การเกิดก้อนเนื้องอก (neoplasm) เป็นต้น

2.4 Traumatic and postoperative causes เป็นสาเหตุที่มาจากบาดแผลหรือที่เกิดขึ้นหลังการผ่าตัด เช่น การเกิดพังผืด (fibrosis)

2.5 Skeletal disease เกิดจากโรคกระดูกอื่น ๆ เช่น Paget's disease, ankylosing spondylitis (โรคกระดูกสันหลังอักเสบชนิดติดติดยึด), rheumatoid arthritis, diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (โรคไขข้อชนิดหนึ่งที่เกิดการเสื่อมสลายตัวของข้อ)

อาการและอาการแสดงของโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังตีบแคบ (15)

ผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีการตีบแคบช่องไขสันหลัง ในระยะแรกจะรู้สึกไม่ค่อยสบายหลังหรือปวดเมื่อยตึงหลังระดับเอวหรือสะโพก และมักมีอาการดังกล่าวเป็นเวลานาน เมื่อมีอาการมากขึ้นจนรบกวนการเดินหรือการทำกิจวัตรประจำวันผู้ป่วยจึงจะมาพบแพทย์ โดยอาการที่นำผู้ป่วยมาพบแพทย์ได้แก่

1. อาการปวดหลังระดับเอว (low back pain) ผู้ป่วยจะมีความรู้สึกไม่ค่อยสบายหลังส่วนล่าง ก้นกบ บางรายเกิดที่บริเวณสะโพก มีอาการปวดขณะเดิน ยืน หรือทำงาน อาจมีอาการปวดร้าวมาที่ก้นกบ, สะโพกหรือต้นขา อาการดีขึ้นเมื่อพักโดยการนั่ง การงอตัว การก้ม หรือนั่งกอดเข่า

2. Neurogenic claudication หรือ pseudoclaudication เป็นลักษณะเฉพาะที่สำคัญของโรคนี้ พบในผู้ป่วยที่มีการตีบแคบเฉพาะช่องไขสันหลังส่วนกลาง (central stenosis) ร้อยละ 87-94 ซึ่งอาการนี้เป็นผลมาจากการกดทับเส้นประสาทไขสันหลังบริเวณ cauda equina (รูปที่ 9) ผู้ป่วยมี

อาการปวด ชาที่ขาทั้ง 2 ข้าง ขณะที่กำลังยืนหรือเดิน การหยุดพักโดยการยืนเมื่อมีอาการปวดเมื่อยหรือขาที่ขาอาจไม่ได้ทำให้ผู้ป่วยมีอาการดีขึ้น แต่ถ้าก้มหรืองอตัวจะทำให้อาการดีขึ้นและสามารถเดินต่อไปได้ นอกจากนี้ยังมีอาการปวดเมื่อย ปวดเกร็งที่ขาหรือขามีอาการอ่อนแรง อาการปวดมักจะเริ่มจากหลังและร้าวไปที่สะโพก ต้นขา เข่าและน่อง มักเป็นที่ขา 2 ข้าง แต่อาจไม่เท่ากันและไม่จำเป็นต้องกระจายตามเส้นประสาทรับความรู้สึก (dermatomal pattern) กลุ่มอาการนี้แยกจากกลุ่มอาการ vascular claudication ซึ่งเป็นผลมาจากหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) หรือภาวะหลอดเลือดแดงในช่องท้องโป่ง (aortic aneurysm) ทำให้เลือดไปเลี้ยงส่วนปลายไม่พอ

3. กลุ่มอาการกดทับรากประสาทไขสันหลัง (classic radiculopathy) พบในผู้ป่วยที่มีการตีบแคบของไขสันหลังเฉพาะด้านข้าง (lateral stenosis) คือตีบแคบเฉพาะส่วน lateral recess และ neural foramen ผู้ป่วยกลุ่มนี้มักมีอายุน้อยกว่ากลุ่มที่มี neurogenic claudication โดยเริ่มมีอาการประมาณอายุ 45 ปี มีอาการปวด ชาที่ขาพร้อมกับมีกล้ามเนื้อขาอ่อนแรงตามการกระจายของเส้นประสาทที่ถูกกดเบียด มักเป็นที่ขาข้างใดข้างหนึ่ง พบบ่อยที่เส้นประสาทสันหลังส่วนเอวที่ 5 (L₅ nerve root) ผู้ป่วยไม่สามารถกระดกข้อเท้าเข้าหาตัวได้

4. กลุ่มอาการ neurogenic claudication เกิดร่วมกับกลุ่มอาการกดทับรากประสาทไขสันหลัง (radiculopathy) เป็นผลมาจากการตีบแคบของช่องไขสันหลังทั้งในแนวกลาง (central stenosis) และแนวด้านข้าง (lateral stenosis)

5. กลุ่มอาการที่มีการทำงานของกระเพาะปัสสาวะและอวัยวะเพศผิดปกติ (bladder dysfunction and sexual difficulty) พบได้ร้อยละ 11 มีอาการปัสสาวะบ่อย อาจกลั้นปัสสาวะไม่ได้ (incontinence)

การสืบค้นเพื่อยืนยันการวินิจฉัยแยกโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีการตีบแคบของช่องไขสันหลังมีดังนี้ (15)

1. Plain film X-rays ใช้ภาพถ่ายรังสีธรรมดาของกระดูกสันหลังส่วนเอวและก้นกบ (film L-S spine) โดยมากจะพบความผิดปกติที่เข้าได้กับโรคข้อกระดูกสันหลังเสื่อม เช่น หมอนรองกระดูกแคบ (narrowing intervertebral disc space) กระดูกสันหลังทึบแน่นขึ้นเนื่องจากมีแคลเซียมมาจับ (vertebral body sclerosis), มีกระดูกงอก (osteophyte), ข้อฟาเซตมีขนาดโตขึ้น สามารถบอกลักษณะกระดูกสันหลังเลื่อน (spondylolisthesis) ได้แต่ไม่สามารถบอกได้ว่ามีภาวะช่องไขสันหลังตีบแคบหรือไม่
2. Computed tomography scan (CT scan) เลือกใช้เฉพาะกรณีไม่สามารถทำ MRI ได้ สามารถดูภาวะตีบแคบของช่องไขสันหลังได้แต่ภาพไม่ชัดเจนเพราะไม่สามารถตรวจพบเนื้อเยื่ออ่อนได้ โดยเฉพาะชิ้นเอ็น ligamentum flavum เครื่อง CT scan สามารถตรวจพบการตีบแคบของ lateral recess และ neural foramen ได้ชัดเจน
3. การฉีดสีเข้าโพรงกระดูกสันหลัง (myelography) ช่วยบอกลักษณะการตีบแคบ บอกความรุนแรงของการตีบแคบและจำนวนระดับของการตีบแคบได้ดี แต่ไม่สามารถเห็นลักษณะโครงสร้างอื่นรอบช่องไขสันหลังที่ทำให้เกิดการตีบแคบ
4. Magnetic resonance imaging (MRI) หรือเครื่องสร้างภาพด้วยเรโซแนนซ์แม่เหล็ก เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการวินิจฉัยโรค แต่มีราคาแพง ใน T1-weight images จะประเมินขนาดและรูปร่างของ neural foramen และ conus medullaris ส่วนใน T2-weight images จะประเมินส่วนนอกของเนื้อเยื่อ (dura) น้ำไขสันหลัง (cerebrospinal fluid, CSF) และขนาดความกว้างของช่องไขสันหลัง
5. การตรวจคลื่นไฟฟ้ากล้ามเนื้อ (Electromyography, EMG) เป็นการวัดระบบประสาทสั่งการที่มาเลี้ยงกล้ามเนื้อ จะพบความผิดปกติร้อยละ 77-94 มักพบความผิดปกติที่ขาทั้งสองข้างและมีความผิดปกติของเส้นประสาทหลายเส้น สามารถตรวจพบความผิดปกติตั้งแต่ยังไม่มีอาการได้

การรักษาโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบ

การดำเนินโรคนี้อาจเป็นอย่างช้า ๆ ดังนั้นโรคช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบไม่ใช่โรคฉุกเฉิน สำหรับการผ่าตัดเพื่อลดการกดทับเส้นประสาท (decompression) โดยทั่วไปจะพิจารณาการรักษาแบบอนุรักษ์ (conservative treatment) เป็นอันดับแรก ซึ่งประกอบด้วยการรักษาดังต่อไปนี้

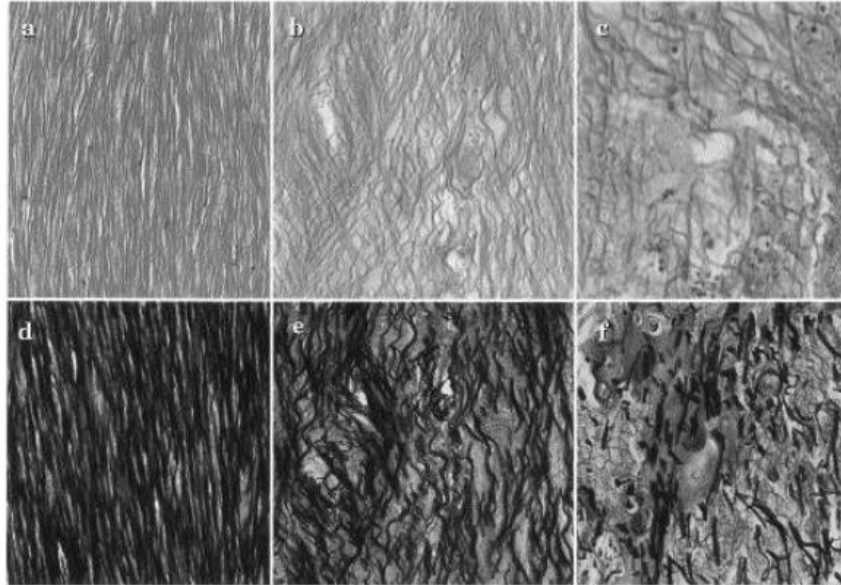
1. การให้ความรู้แก่ผู้ป่วย (education) เกี่ยวกับโรคหรือภาวะที่เป็น แนะนำวิธีการทำงานโดยใช้หลังอย่างถูกต้อง วิธีลดอาการปวดขาหรือหลังขณะเดิน โดยการก้มงอตัว หรือนั่งกอดเข่า แนะนำให้ผู้ป่วยลดน้ำหนัก เพื่อลดภาวะหลังแอ่น (lumbar lordosis) และแนะนำให้ผู้ป่วยออกกำลังกาย
2. การรักษาด้วยยา (medication) เพื่อลดอาการปวดหลังและปวดขา ได้แก่ ยาแก้ปวดพาราเซตามอล ยาต้านการอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) กลุ่มยาคลายกล้ามเนื้อ ยาคลายความวิตกกังวลและยาต้านซึมเศร้า (antidepressants)
3. การใช้อุปกรณ์พยุงหลัง ช่วยลดอาการปวดหลัง ทำให้เดินได้ดีขึ้น เช่น corset, brace
4. การฉีดยาลดอาการปวด Epidural steroid injection มีการใช้ depomedrol 80 mg ร่วมกับ xylocaine ฉีดเข้าที่ตำแหน่ง epidural สัปดาห์ละครั้ง ติดต่อกัน 3 ครั้ง ช่วยลดอาการปวดได้ดี แต่ได้ผลระยะสั้นประมาณ 3-6 เดือน
5. การรักษาอื่น ๆ ได้แก่ การทำ spinal manipulation, lumbar pelvic traction

สำหรับวิธีการผ่าตัดรักษามีแนวโน้มให้ผลการรักษาดีกว่า โดยเฉพาะกลุ่มที่มีการตีบแคบที่รุนแรง ผู้ป่วยส่วนใหญ่ประมาณ ร้อยละ 60-80 ที่ได้รับการรักษาด้วยวิธีการผ่าตัด อาการปวดหลังและขาจะดีขึ้น สามารถเดินหรือทำกิจวัตรประจำวันได้มากขึ้น

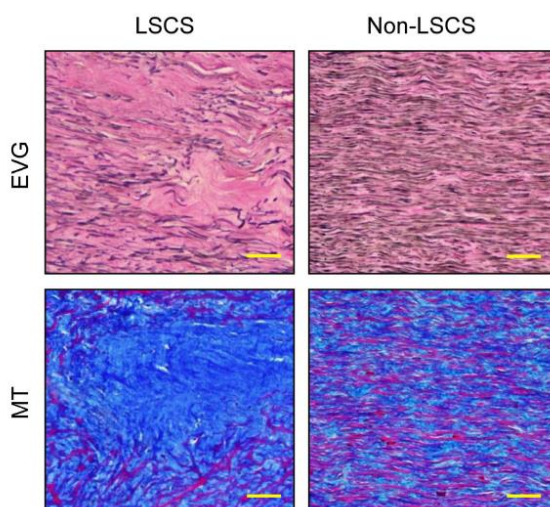
ชั้นเอ็นช่องไขสันหลัง (Ligamentum Flavum)

Ligamentum flavum (LF) เป็นแผ่นเอ็นที่หุ้มไขสันหลัง ซึ่งประกอบด้วยเส้นใยอีลาสติน (elastin) และเส้นใยคอลลาเจน (collagen) ในอัตราส่วน 2:1 เส้นใยอีลาสติน คือเส้นใยที่มีสีเหลือง ซึ่งทำหน้าที่เพิ่มความยืดหยุ่นให้กับ ligamentum flavum ในขณะที่คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เพิ่มความแข็งแรงให้แก่ ligamentum flavum) ligamentum flavum หรือ yellow ligament เนื่องจากโดยปกติมีลักษณะเป็นสีเหลือง และมีปริมาณของ elastic fibers สูงกว่า collagen fibers โดย ligaments อื่น ๆ รวมถึง LF มีปริมาณของ elastic fibers นับเป็นร้อยละ 60-70 ของเนื้อพืชนอกเซลล์ (extracellular matrix) ทั้งหมด (16, 17) การหนาตัวของ LF เกิดขึ้นในผู้สูงอายุและทำให้ช่องไขสันหลังแคบลง มีรายงานว่า การหนาตัวเป็นผลจากการเกิดเนื้อเยื่อพังผืด (scarring tissue) จากการศึกษาของ Kosaka และคณะในปี 2007 พบการแสดงออกของ type I collagen ระดับ mRNA เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับอายุมากขึ้น ในขณะที่การเพิ่มของอีลาสตินมี

ความสัมพันธ์กับอายุน้อยกว่า (7) ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่ปกติเส้นใยอีลาสตินจะมีการเรียงตัวเป็นระเบียบในทิศทางขนานไปกับแนวแกนของชั้นเอ็น ligamentum flavum และแตกกิ่งก้านรวมไปกับเส้นใยอื่น ๆ เส้นใยคอลลาเจนส่วนมากเรียงตัวในทิศทางขนานไปกับเส้นใยอีลาสติน และมีเซลล์กระดูกอ่อนปรากฏเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (18) ส่วนในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่มีการหนาตัวนั้นพบเส้นใยอีลาสตินมีปริมาณลดน้อยลง ขณะเดียวกันก็พบปริมาณเส้นใยคอลลาเจนมากขึ้น จากการศึกษาของ Zhang และคณะ ในปี 2010 (19) ชั้นเอ็นบริเวณกระดูกสันหลัง (ligamentum flavum) ที่มีพยาธิสภาพของโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมและมีการตีบแคบของช่องไขสันหลัง (lumbar spinal stenosis) พบลักษณะของเส้นใยอีลาสตินที่เรียงตัวไม่เป็นระเบียบ และเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยมีขนาดเล็กกว่าชั้นเอ็นที่ได้จากกลุ่มควบคุมที่เป็นโรคหมอนรองกระดูกเคลื่อนทับเส้นประสาท (lumbar disc herniation) และในบางบริเวณของชั้นเอ็นยังพบเส้นใยอีลาสตินที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่าปกตินั้นมีการแตกหักของเส้นใยเนื่องจากมีเส้นใยคอลลาเจนเป็นมัดหนาขึ้นมาแทรกในบริเวณดังกล่าว (รูปที่ 5) (18) และยังมีการศึกษาเนื้อเยื่อจากชั้นเอ็น ligamentum flavum ของ Nakamura และคณะในปี 2014 โดยใช้สีย้อม Van Gieson (EVG) เพื่อย้อมดูเส้นใยอีลาสติน สังเกตพบเส้นใยอีลาสตินย้อมติดสีดำเรียงตัวไม่เป็นระเบียบในเนื้อเยื่อจากชั้นเอ็น ligamentum flavum จากกลุ่มผู้ป่วยกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบ ขณะที่การย้อม Masson's Trichrome (MT stain) เพื่อศึกษาเส้นใยคอลลาเจน พบว่าเนื้อเยื่อจากชั้นเอ็น ligamentum flavum ในผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของโรคนั้นสามารถสังเกตเห็นเส้นใยคอลลาเจนที่ย้อมติดสีฟ้าจาก MT stain เป็นปื้นมากกว่าชั้นเนื้อเยื่อจากกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผู้ที่ เป็นโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบ พบว่ามีการแสดงออกของเส้นใยคอลลาเจนในชั้นเอ็น ligamentum flavum มากกว่าปกติ และมีเส้นใยอีลาสตินลดลง (รูปที่ 6) (20) สำหรับความหนาของชั้นเอ็นบริเวณกระดูกสันหลัง (ligamentum flavum) Park และคณะในปี 2001 ได้ศึกษาเปรียบเทียบทั้งในคนที่ เป็นโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีการตีบแคบของช่องไขสันหลังและกลุ่มควบคุม โดยศึกษาจากภาพถ่ายด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (axial T1 weighted MRI) พบว่าค่าเฉลี่ยความหนาของชั้นเอ็น ligamentum flavum มีค่า 4.4 มิลลิเมตร ซึ่งมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชั้นเอ็น ligamentum flavum ในกลุ่มควบคุมที่มีค่าเฉลี่ยความหนา 2.44 มิลลิเมตร (8)



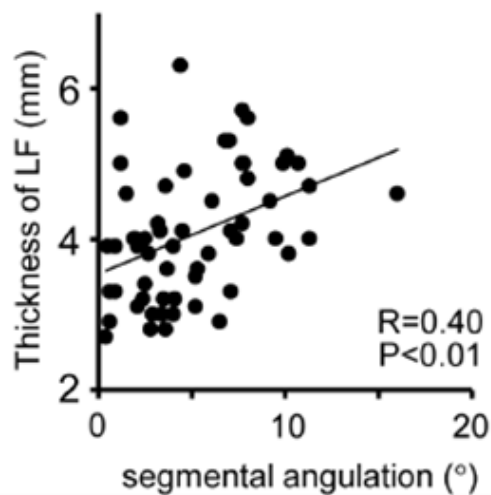
รูปที่ 5 ภาพของ ligamentum flavum จากกล้องจุลทรรศน์ (A-C) การย้อมด้วย Hematoxylin และ Eosin (x10), D-F การย้อมด้วย Van Gieson's (x10) โดยภาพ a และ d แสดงมัดของเส้นใยอีลาสตินที่มีการเรียงตัวเป็นระเบียบในชั้นเอ็น ligamentum flavum ปกติ, ภาพ b และ e แสดงมัดของเส้นใยอีลาสตินที่เรียงตัวไม่เป็นระเบียบในชั้นเอ็น ligamentum flavum ของผู้ป่วยกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีการตีบแคบของช่องไขสันหลัง, ภาพ c และ f แสดงเส้นใยอีลาสตินที่มีการแตกหักและมีการขยายพื้นที่ของเส้นใยคอลลาเจน (18)



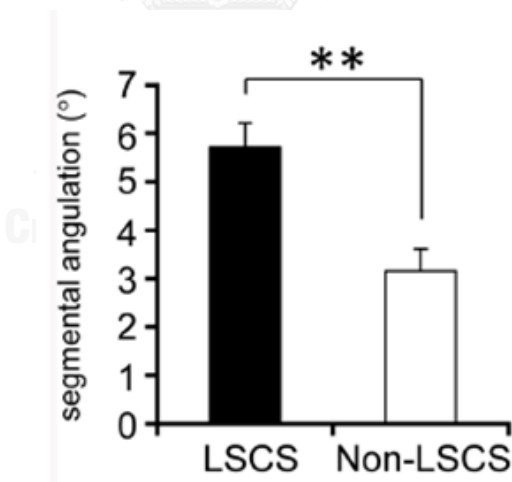
รูปที่ 6 แสดงผลการย้อมเส้นใยอีลาสตินด้วยสีย้อม Van Gieson (EVG) ย้อมติดสีดำ และการย้อมเส้นใยคอลลาเจนด้วยสีย้อม Masson's Trichrome (MT stain) ย้อมติดสีฟ้า ในเนื้อเยื่อจากชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดพยาธิสภาพของโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบและกลุ่มควบคุม (20)

1. การเคลื่อนไหวของข้อต่อกระดูกสันหลังต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบ

Nakamura และคณะในปี 2014 (20) ได้ศึกษาโดยการวัดการเคลื่อนไหวของข้อต่อกระดูกสันหลังส่วนเอวโดยใช้ภาพถ่ายรังสีของกระดูกสันหลังส่วนเอวก่อนการผ่าตัดขณะที่มีการก้มตัวและเอนตัวจากนั้นคำนวณการเคลื่อนไหวของมุมระหว่างข้อต่อ เมื่อศึกษาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มคนที่เป็นโรคและกลุ่มควบคุม พบว่า มุมของการเคลื่อนไหวระหว่างข้อต่อ (lumbar segmental angulation) ในกลุ่มคนที่เป็นโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบมี lumbar segmental angulation เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 7) และยังพบว่าการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum สัมพันธ์กับมุมที่เกิดระหว่างการเคลื่อนไหวข้อต่อกระดูกสันหลังส่วนเอว (lumbar segmental angulation) ดังรูปที่ 8



รูปที่ 7 การเปรียบเทียบมุมของการเคลื่อนไหวข้อต่อกระดูกสันหลังส่วนเอว (lumbar segmental angulation) ระหว่างกลุ่มที่เป็นโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีการตีบแคบของช่องไขสันหลัง และกลุ่มควบคุม (20)



รูปที่ 8 แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum กับ segmental angulation (20)

2. การหนาตัวของชั้นเอ็น ligamentum flavum; LF

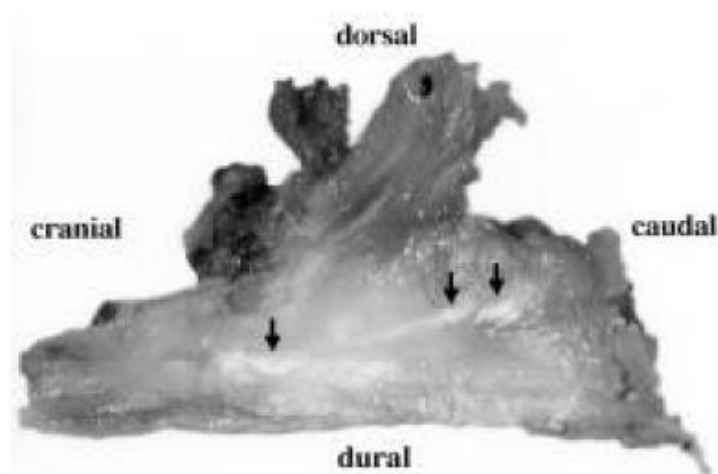
การหนาตัวของชั้นเอ็น ligamentum flavum เป็นลักษณะเฉพาะของโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีการตีบแคบของช่องไขสันหลัง โดยชั้นเอ็นบริเวณกระดูกสันหลัง LF ที่มีการหนาตัวขึ้นนั้นไปกดทับรากประสาทบริเวณไขสันหลัง (cauda equina) หลายรายงานได้ศึกษาถึงกลไกที่ทำให้เกิดการหนาตัวของชั้นเอ็น ligamentum flavum และพบว่า มี 2 กลไกด้วยกัน ได้แก่ 1. ความเสื่อมสภาพตามอายุ (degenerative changes) เนื่องจากความชรา (aging process) 2. ปัจจัยเชิงกลที่ทำให้เกิดแรงเค้น (mechanical stress) ซึ่งอาจเกิดจากความไม่มีเสถียรภาพของกระดูกสันหลัง (spinal instability)

3. การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการหนาตัวของชั้นเอ็น ligamentum flavum

จากรายงานการศึกษาบทบาท TGF- β ต่อการหนาตัวของ LF (8, 21) โดย Nakatani และคณะในปี 2002 ได้พบว่า ภายใต้ mechanical stress มีการแสดงออกของ TGF- β ระดับ mRNA เพิ่มขึ้นใน LF cells และ TGF- β กระตุ้นให้ type I collagen mRNA แสดงออกมากขึ้น จึงสามารถสรุปได้ว่าภายใต้การแสดงผลของ TGF- β ร่วมกับแรงกดเชิงกลเพิ่มสูงขึ้นต่อ LF cells ของผู้ป่วยสูงอายุ สามารถสร้างเส้นใยคอลลาเจน (collagenous fibers) มากขึ้นสำหรับการสร้าง scarring tissue มากกว่าการสร้าง elastic fibers (21) ในเอ็นที่มีการหนาตัวนอกจากพบเส้นใยคอลลาเจนเพิ่มขึ้นแล้ว ยังพบว่าการสะสมของแคลเซียมมากขึ้น (calcification) และมีการสร้างกระดูกเกิดขึ้น (ossification) อีกด้วย (8)

โปรตีนที่มีบทบาทสนับสนุนให้ ligamentum flavum เกิดการหนาตัว เช่น tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในเนื้อพืชนอกเซลล์ทำหน้าที่รักษาสสมดุล (homeostasis) ของโปรตีนในเนื้อพืชนอกเซลล์คู่กับเอนไซม์ matrix metalloproteinase (MMPs) โดยที่ TIMPs ป้องกันการสลายของคอลลาเจนโดยยับยั้งเอนไซม์ MMPs ซึ่งมีหน้าที่ย่อยคอลลาเจนที่อยู่ใน extracellular matrix (9) นอกจากนี้ยังมีหลายการศึกษาพบว่าการแสดงออก TIMP1 และ TIMP2 เพิ่มขึ้น มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดพังผืดในอวัยวะหลายชนิด เช่น ตับ ไต หัวใจ ปอด เป็นต้น การศึกษาของ Park และคณะในปี 2005 พบการแสดงออกของ TIMP2 ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ของผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังตีบแคบบริเวณเอวสัมพันธ์กับการหนาตัวและการเกิดพังผืดของเอ็นดังกล่าว (22) ต่อมาในปี 2009 Park และคณะ ได้ศึกษาพบการแสดงออกของ MMP-2 (gelatinase), MMP-3 (stromelysin) และ MMP-13 (collagenase) ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ของผู้ป่วยที่เป็นโรคกระดูกสันหลังเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบ (lumbar spinal stenosis) โดยมีการแสดงออกระดับโปรตีนของ MMP-2 และ MMP-13 สูงกว่าชั้นเอ็นในกลุ่มควบคุมที่เป็นโรคหมอนรองกระดูกเคลื่อนทับเส้นประสาท (disc herniation) อย่าง

มีนัยสำคัญทางสถิติ (23) ในบางรายงานได้ศึกษาการเกิดพยาธิสภาพที่มีการสะสมของผลึกแคลเซียมในชั้นเอ็น ligamentum flavum พบว่ามีความสัมพันธ์กับการกำเนิดโรคกระดูกสันหลังเสื่อมบริเวณเอวที่มีช่องไขสันหลังตีบแคบ เช่น การศึกษาของ Yayama และคณะ ในปี 2005 พบการสะสมผลึกแคลเซียมในเส้นใยของชั้นเอ็น ligamentum flavum (รูปที่ 9) จากคนที่เป็นโรคดังกล่าว และสัมพันธ์กับขนาดของเซลล์กระดูกอ่อนที่หนาตัว (hypertrophic chondrocytes) รวมถึงมีการสร้างหลอดเลือดขนาดเล็กๆ ขึ้นใหม่ (18)



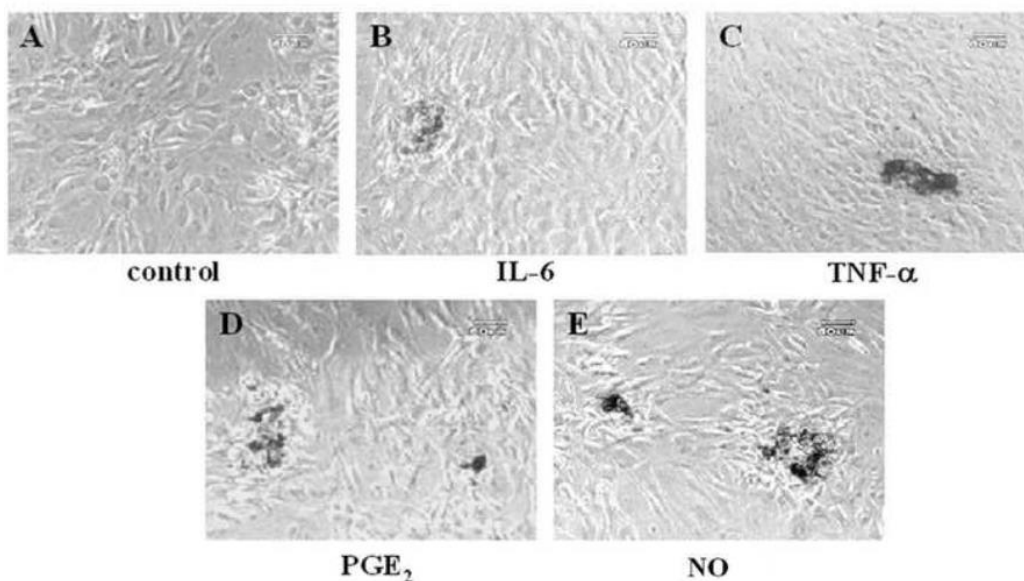
รูปที่ 9 ภาพของชั้นเอ็นบริเวณกระดูกสันหลัง (ligamentum flavum) ที่มีการสะสมของแคลเซียม มีลักษณะเป็นแคลเซียมสีขาวสะสมอยู่ในชั้นเอ็น (ลูกศรสีดำชี้) สามารถสังเกตเห็นได้จากด้านหลัง (dorsal) ของชั้นเอ็น (18)

ในปี 2011 Zhong และคณะ ได้ศึกษาการแสดงออกของ Connective tissue growth factor (CTGF) ใน ligamentum flavum ส่วนเอวที่หนาตัว พบ CTGF มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและสัมพันธ์กับการหนาตัวของ ligamentum flavum ในผู้ป่วยโรคช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบ (24)

การศึกษาของ Lakemeier และคณะในปี 2012 พบว่า การหนาตัวของ LF เกิดขึ้นสัมพันธ์กับการแสดงออกเพิ่มขึ้นของ MMP-1,3,9 และ VEGF การสร้างหลอดเลือดใหม่เพิ่มขึ้นใน LF ที่มีการหนาตัวแต่ไม่มี Hypoxia-inducible factor (HIF) แสดงออกใน hypertrophic LF (25) ในปี 2013 Honsawek และคณะ พบการแสดงออกของ basic fibroblast growth factor (bFGF) เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับการหนาตัวของ LF จากผู้ป่วยโรคช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบ (26)

จากการศึกษาของ Zhang และคณะ ในปี 2010 ได้ศึกษาการแสดงออกของ Platelet-Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB) ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสร้างพังผืด, การสังเคราะห์คอลลาเจนขึ้นใหม่ผ่าน Transforming Growth Factor โดยในการศึกษาทดลองพบการหนาตัวของชั้นเอ็น ligamentum flavum ในคนที่ เป็นโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีการตีบแคบของช่องไขสันหลัง มากกว่าในกลุ่มควบคุม และตรวจพบการแสดงออกของ PDGF-BB ในชั้นเอ็นบริเวณกระดูกสันหลังที่มีการหนาตัว (hypertrophied LF) โดยเฉพาะทางด้าน dorsal layer และมีการแสดงออกของยีน PDGF-BB ระดับ mRNA สัมพันธ์กับการหนาตัวของชั้นเอ็น ligamentum flavum และความรุนแรงของการเกิดพังผืด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (19)

Park และคณะในปี 2013 พบว่า inflammatory cytokines เช่น interleukine-6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), prostaglandin E2 (PGE₂), nitric oxide (NO) ส่งผลกระทบต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของชั้นเอ็น ligamentum flavum โดยส่งผลให้เกิดการหนาตัวและการกลายเป็นกระดูกของชั้นเอ็น ligamentum flavum (LF hypertrophy and ossification) ดังรูปที่ 10 (27)



รูปที่ 10 การเกิด bone nodule formation โดยใช้ Von Kossa staining ใน LF cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย inflammatory cytokines ต่าง ๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (27)

ในปี 2013 มีการศึกษา Lysophosphatidic acid (LPA) และ Lysophosphatidic acid receptor 1 (LPAR1) เกี่ยวข้องกับการเกิดการหนาตัวและการเกิดพังผืดของชิ้นเอ็น ligamentum flavum โดย Kai และคณะ พบว่าใน LF ที่มีการเสื่อมสภาพนั้นมีเส้นใยอีลาสตินที่เรียงตัวไม่เป็นระเบียบปริมาณมากขึ้น และเกิดภาวะพังผืดขึ้นโดยมีการสะสมของคอลลาเจนภายนอกเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าการหนาตัวของ LF สัมพันธ์กับปริมาณของ LPA และ CTGF ในชิ้นเอ็น LF ที่มีการหนาตัวมากกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (28) นอกจากนี้การศึกษายืนยันที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพังผืดแล้ว ยังมีการศึกษาการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่อาจมีผลให้เกิดการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum อย่างเช่น Oh และคณะ ในปี 2013 ได้ศึกษาการแสดงออกของ Fractalkine (CX3CL1) และตัวรับของ Fractalkine (CX3CR1) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของระบบไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับรวมตัวและจับตัวของเม็ดเลือดขาวในโรคที่มีการอักเสบเรื้อรัง โดยในการศึกษาให้ผลว่า การแสดงออกของยีน CX3CL1/CX3CR1 ระดับ mRNA ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่มีการหนาตัวของผู้ป่วยที่เป็นโรคกระดูกสันหลังเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบมีระดับการแสดงออกของ mRNA สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการศึกษาที่พบความสัมพันธ์ระหว่างการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum กับระดับ CX3CL1 ในเลือด และการแสดงออกของ CX3CL1/CX3CR1 ระดับ mRNA มีความสัมพันธ์สอดคล้องไปด้วยกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (29)

ในปี 2014 Nakamura และคณะ ได้ศึกษาการแสดงออกของ Angiopoietin-like protein 2 (Angptl2) ซึ่งเป็นตัวชักนำให้เกิดการอักเสบเรื้อรังทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคต่าง ๆ และยังทำหน้าที่เพิ่มการแสดงออกของ TGF- β 1 ที่ทราบกันดีว่าทำให้เกิดการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum และการทดลองของ Nakamura และคณะ ทำให้ทราบว่าความเค้นเชิงกล (mechanical stress) ทำให้เกิดการแสดงออกของ angiopoietin-like protein 2 ใน LF fibroblasts และกระตุ้นให้เกิดการเสื่อมสภาพของเนื้อเยื่อ ligamentum flavum โดยส่งสัญญาณผ่าน TGF- β 1/Smad signaling และส่งผลให้เกิดการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ในผู้ป่วยกระดูกสันหลังเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบ (20)

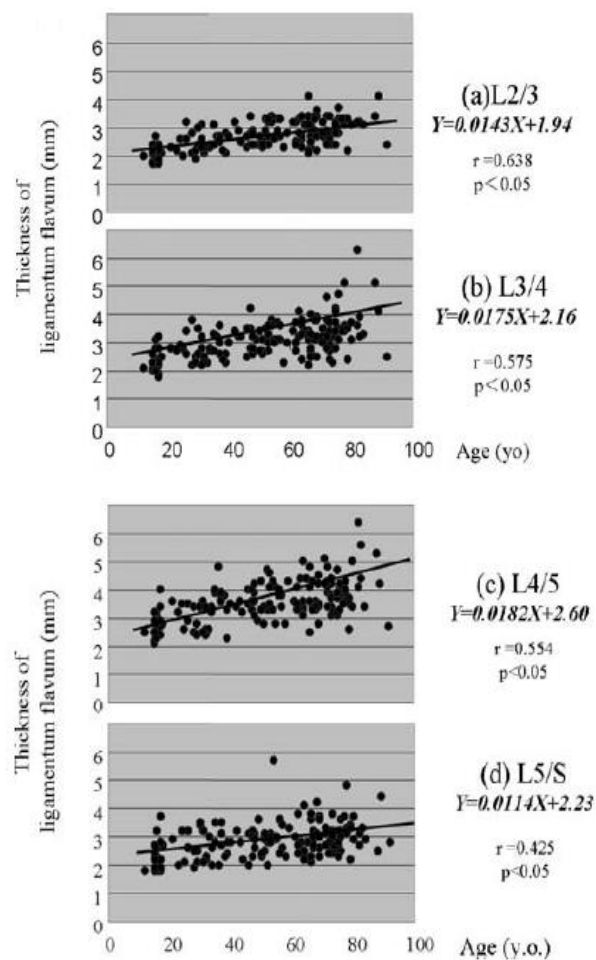
การศึกษาของ Chen และคณะ ในปี 2014 พบความสัมพันธ์ของระดับ miR-155 กับการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum โดยมีการศึกษาเปรียบเทียบระดับ miR-155 ในตัวอย่างจากกลุ่มที่มีพยาธิสภาพของโรคและกลุ่มควบคุม พบว่าชิ้นเอ็น ligamentum flavum จากกลุ่มที่เป็นโรคกระดูกสันหลังเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบมีระดับ miR-155 สูงกว่ากลุ่มที่ไม่มีพยาธิสภาพอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และระดับ miR-155 เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum เชิงบวก (30)

4. ความสัมพันธ์ระหว่างเพศ อายุ และความเสื่อมของชิ้นเอ็น ligamentum flavum

Zhang และคณะ ในปี 2013 ได้การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum และอายุพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการหนาตัวของชิ้นเอ็น LF กับอายุ โดยในการศึกษานั้นทำในผู้ป่วยที่เป็นโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีการตีบแคบของช่องไขสันหลัง (lumbar spinal stenosis) จำนวน 21 ราย และมีกลุ่มควบคุมคือผู้ป่วยที่เป็นโรคหมอนรองกระดูกเคลื่อนทับเส้นประสาทบริเวณเอว (lumbar disc herniation) จำนวน 20 ราย (28) แต่ในการศึกษาก่อนหน้าของ Sakamaki และคณะในปี 2009 (31) พบว่าชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่มีการหนาตัวของผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบนั้นมีความสัมพันธ์กับอายุ โดยมีการเพิ่มความหนาของ ชิ้นเอ็น ligamentum flavum ในตำแหน่ง L₄₋₅ และ L₃₋₄ มากกว่าตำแหน่ง L₂₋₃ และ L_{5-S} (รูปที่ 11) และสอดคล้องกับการศึกษาของ Altinkaya และคณะ ในปี 2011 (32) ที่พบว่าการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่ทุกระดับของกระดูกสันหลังส่วนเอวนั้นเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับอายุที่มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างเพศและระดับของความเจ็บปวดกับการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ในผู้ป่วยที่มีค่าดัชนีมวลกาย (body mass index; BMI) มากกว่าหรือเท่ากับ 25 kg/m² พบการหนาตัวของเอ็น ligamentum flavum มากที่สุดที่ระดับกระดูกสันหลังส่วนเอว L₃₋₄ (32, 33)

ในปี 2005 Ha และคณะ ได้ศึกษาผลของ estrogen ต่อ facet cartilage พบการแสดงออกของ estrogen receptor ในข้อฟาเซต (facet joint) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบที่มีการเลื่อนของปล้องกระดูกสันหลัง (degenerative spondylolisthesis) มากกว่าผู้ที่ เป็นโรคกระดูกสันหลังเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบที่ไม่มีการเลื่อนของกระดูกสันหลัง การแสดงออกของ estrogen receptor ที่สูงขึ้น จึงเป็นสาเหตุหนึ่งของการดำเนินโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบที่มีการเลื่อนของกระดูกสันหลัง (degenerative spondylolisthesis) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน (34)

Age (years)	n	Mean thickness of ligamentum flavum (mm)			
		L2-3	L3-4	L4-5	L5-S
10-19	23	2.0 ± 0.26	2.3 ± 0.36	2.8 ± 0.44	2.3 ± 0.50
20-29	10	2.3 ± 0.40	2.7 ± 0.48	3.0 ± 0.45	2.5 ± 0.48
30-39	20	2.5 ± 0.31	2.8 ± 0.41	3.4 ± 0.63	2.7 ± 0.52
40-49	14	2.7 ± 0.32	3.1 ± 0.43	3.6 ± 0.37	2.8 ± 0.43
50-59	21	2.8 ± 0.37	3.2 ± 0.40	3.7 ± 0.60	2.9 ± 0.74
60-69	30	2.9 ± 0.49	3.3 ± 0.48	3.8 ± 0.57	2.9 ± 0.59
70-79	34	2.9 ± 0.37	3.4 ± 0.62	3.9 ± 0.54	3.0 ± 0.51
80-	10	3.2 ± 0.41	3.9 ± 1.09	4.4 ± 1.13	3.2 ± 0.55

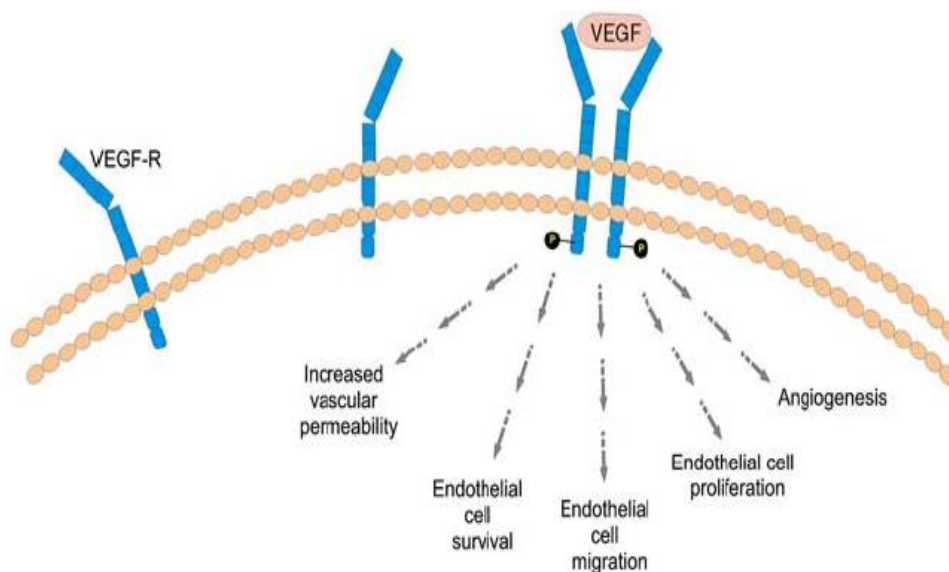


รูปที่ 11 การหนาของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับอายุที่มากขึ้นในตำแหน่ง L2-3, L3-4, L4-5 และ L5-S (31)

Vascular endothelial growth factor (VEGF)

กระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) เป็นกระบวนการทางชีวภาพที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต (physiological condition) และยังเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคหลากหลายชนิด เช่น โรคมะเร็ง (cancer) โรคเบาหวานขึ้นจอประสาทตา (diabetic retinopathy) โรครูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) (35, 36) ในช่วงทศวรรษนี้นักวิจัยได้ศึกษาบทบาทของ VEGF ต่อการควบคุมการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) และการส่งสัญญาณ VEGF เป็นตัวควบคุมการสร้างหลอดเลือดใหม่ กระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่เป็นการแตกแขนงหลอดเลือดใหม่จากหลอดเลือดที่มีอยู่เดิมและกระบวนการนี้มีความสำคัญต่อการเจริญหลอดเลือดใหม่ในการพัฒนาของตัวอ่อน (fetal development) และการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ (tissue repair) อย่างไรก็ตาม หากกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ไม่สามารถควบคุมได้สามารถก่อให้เกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับเนื้องอก (neoplastic disease) และโรคอื่น ๆ การหลั่งของ VEGF ถูกกระตุ้นได้ด้วยเนื้องอก (tumor) ภาวะขาดออกซิเจน (hypoxia) ค่า pH ในร่างกายต่ำ และปัจจัยอื่น ๆ เมื่อ VEGF จับกับโปรตีนตัวรับ (VEGFR) ที่ตั้งอยู่บนเซลล์บุผิวหลอดเลือด (endothelial cells) เซลล์บุผิวหลอดเลือดนั้นจะถูกกระตุ้นและเริ่มผลิตเอนไซม์และโมเลกุลที่นำไปสู่การเพิ่มจำนวนของเซลล์บุผิวหลอดเลือดและเจริญเติบโต (proliferation and growth) นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์ต้นกำเนิดบุผิวหลอดเลือด (endothelial progenitor cells) จากไขกระดูก (bone marrow) เพิ่ม vascular permeability และการเหนี่ยวนำ tissue factor

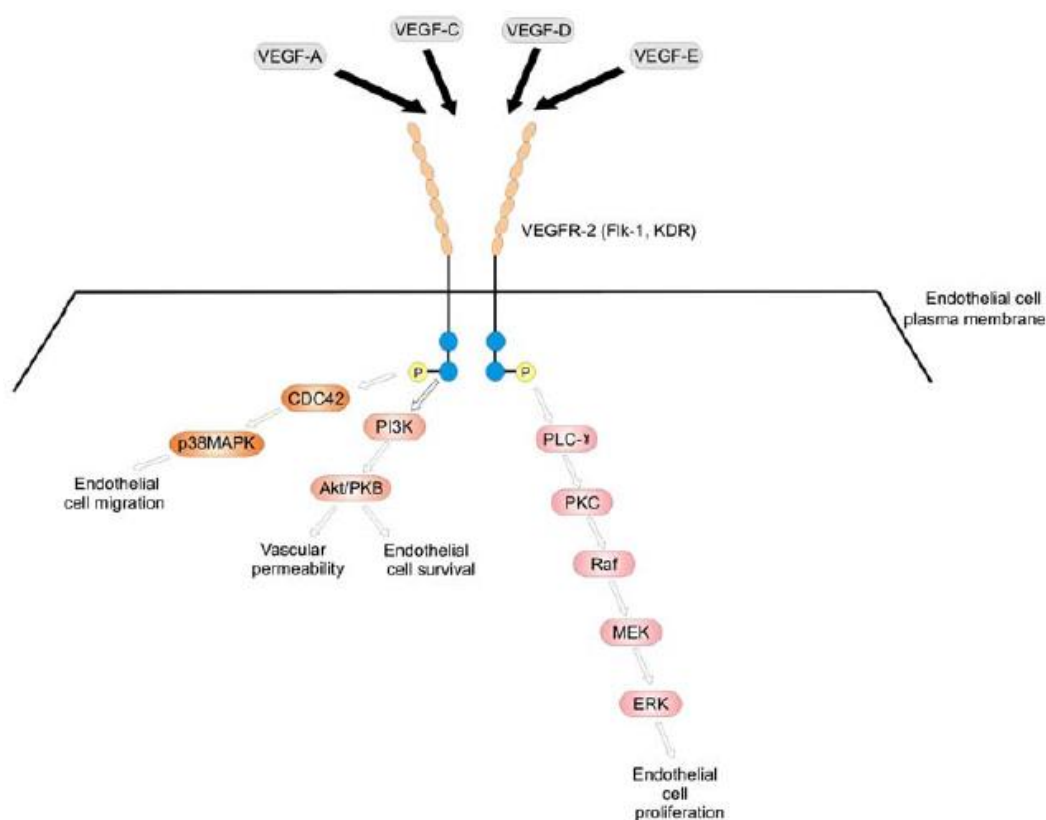
โปรตีนตระกูลวาสคูลาร์ เอนโดทีเลียล โกรทแฟคเตอร์ (VEGF family) ประกอบด้วยไกลโคโปรตีน 7 ชนิด ได้แก่ VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-F, placental growth factor (PlGF) และ VEGF-F โปรตีน VEGF ส่งผลทางกระบวนการทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตผ่านการจับกับโปรตีนตัวรับ ซึ่งตัวรับเหล่านั้นคือ transmembrane tyrosine kinases โดยการจับกันของ ligands กับ extracellular domain ของโปรตีนตัวรับจะกระตุ้น cascade ของ downstream proteins หลังจากเกิด dimerization และ autophosphorylation ของ intracellular receptor tyrosine kinases (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 โปรตีน VEGF จับกับโปรตีนตัวรับ (VEGF receptor) ส่งผลให้เกิด cascade ของ downstream protein (35)

โปรตีนตัวรับของ VEGF ได้แก่ VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 และ neuropilins (NP-1 และ NP-2) VEGF-A หรืออาจเรียกว่า VEGF ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Senger และคณะในปี 1983 (37) VEGF-A เป็นหนึ่งในตระกูล VEGF ที่มีคนศึกษากันมากที่สุด VEGF-A หรือ VEGF เป็นยีนที่ตั้งอยู่บนแขนของโครโมโซมคู่ที่ 6 ประกอบด้วย 8 exons และสามารถเกิด splicing ออกได้เป็น 4 mature isoforms ได้แก่ VEGF121, VEGF165, VEGF189, และ VEGF 206 (ตัวเลขในแต่ละ isoform แสดงถึงจำนวนกรดอะมิโนในโมเลกุลของ VEGF) และสามารถพบ isoform VEGF145, VEGF183 ได้แต่น้อยมาก VEGF-A ส่งผลทางชีวภาพผ่านการจับกับโปรตีนตัวรับที่ผิวเซลล์ (cell-surface receptors) ที่เป็น transmembrane tyrosine kinase receptors ตัวรับของ VEGF-A (VEGF) ได้แก่ VEGF receptor-1 (VEGFR-1; Flt-1) และ VEGFR-2 (kinase insert domain-containing receptor/Flk-1) ซึ่งจะแสดงออกอย่างจำเพาะกับ vascular endothelial cells นอกจากนี้ยังมี neuropilin receptors (NP-1 และ NP-2) ซึ่งเป็นโปรตีนตัวรับอีกตัวที่แสดงออกบน vascular endothelium และ neurons

การจับกันของ VEGF-A กับโปรตีนตัวรับที่อยู่นอกเซลล์ (extracellular domain of the receptor) เกิดการจับเข้าคู่กัน (dimerization) และเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟสด้วยตัวเองในส่วนของโปรตีนตัวรับที่อยู่ในเซลล์ (autophosphorylation of the intracellular receptor tyrosine kinases) VEGFR-2 จัดเป็นตัวรับหลักที่ส่งผลให้เกิด pro-angiogenic effect ของ VEGF-A และโปรตีนหลายชนิดถูกกระตุ้นโดย VEGFR-2 และการกระตุ้น downstream signal molecule นำไปสู่การทำงานที่หลากหลายของเซลล์บุผิวหลอดเลือด (รูปที่ 13)



รูปที่ 13 วิถีสัญญาณของโปรตีน VEGFR-2 (VEGF, vascular endothelial growth factor; CDC42, cell division cycle 42 (GTP binding protein); p38MAPK, p38 mitogen-activated protein kinase; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; Akt/PKB, protein kinase B; PLC- γ , phospholipase C-gamma; PKC, protein kinase C; MEK, mitogen and extracellular kinase; ERK, extracellular regulated kinase) (35)

VEGF-A เป็นโปรตีนที่มีศักยภาพในการสร้างหลอดเลือดที่ดีที่สุด (pro-angiogenic) โดยชักนำให้มีการเพิ่มจำนวน (proliferation), แยกแขนงหลอดเลือด (sprouting) และสร้างลักษณะที่เป็นท่อ (tube formation) ของเซลล์บุผิวหลอดเลือด (endothelial cells) VEGF-A ยังทำหน้าที่เป็น survival factor สำหรับเซลล์เยื่อผิวหลอดเลือด โดยมีการค้นพบว่า VEGF-A สามารถชักนำการแสดงออกของ anti-apoptotic proteins ในเซลล์เยื่อผิว VEGF-A สามารถจับกับตัวรับได้หลายตัวบน hematopoietic stem cells (HSCs), monocytes, osteoblasts และ neurons และ VEGF-A ชักนำให้เกิด HSC mobilization จาก bone marrow, monocyte chemoattraction และ osteoblast-mediated bone formation (38, 39) นอกจากนี้ยังพบว่า ไซโตไคน์หลายชนิดรวมถึง platelet-derived growth factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor และ transforming growth factor- β สามารถชักนำให้มีการแสดงออกของ VEGF-A ในเซลล์ได้ (40)

บทบาทของ VEGF ต่อการเกิดพยาธิสภาพ

Vascular endothelial growth factor (VEGF) เป็นโปรตีนควบคุมกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ที่สำคัญ มี growth factors ที่สำคัญหลายชนิด เช่น epidermal growth factor, transforming growth factor- α , transforming growth factor- β , keratinocyte growth factor, insulin-like growth factor-1, fibroblast growth factor และ platelet-derived growth factor ช่วยเพิ่มการแสดงออกของ VEGF ระดับ mRNA (41, 42) นอกจากนี้ inflammatory cytokines อย่างเช่น interleukine-1 α , interleukine-6 สามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ VEGF ในเซลล์หลายชนิดรวมถึง synovial fibroblasts ด้วย (42) VEGF ส่งผลกระทบต่อ bone marrow-derived cells โดยกระตุ้น monocyte chemotaxis (43) และชักนำให้เกิด colony formation โดย granulocyte-macrophage progenitor cells (44)

การศึกษาของ Sairy และคณะในปี 2005 และ 2007 อย่างต่อเนื่อง พบ mechanical stress ที่ชักนำให้เกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อนั้นอาจเป็นจุดเริ่มต้นในการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ (inflammatory reaction) และส่งผลให้มีการพัฒนาของการสร้างพังผืดในเนื้อเยื่อ (tissue scarring) (45, 46) ซึ่งการสร้างพังผืดที่สะสมตลอดเวลาอันส่งผลให้มีการหนาตัวของ LF เมื่อไม่นานมานี้ นักวิจัยได้เล็งเห็นความสำคัญของการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของการสร้างพังผืดหรือกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ การสร้างหลอดเลือดใหม่กลับมีความเกี่ยวข้องในการสร้าง granulation tissue ชั่วคราว และให้สารอาหารและออกซิเจนกับเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญ (47) โปรตีน VEGF จาก fibroblasts สามารถกระตุ้นองค์ประกอบหลายอย่างใน

angiogenic cascade (46) กระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) เป็นกระบวนการสำคัญในการเกิดพังผืด (scarring/fibrosis) หรือกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ (47)

ในปี 2010 Enzerink และคณะ พบ fibroblasts สามารถหลั่ง VEGF และ hepatocyte growth factor (48) ในปี 2005 Bauer และคณะ รายงานว่า fibroblasts จำเป็นสำหรับ bone marrow-derived endothelial progenitor cells ในการรบกวนพื้นที่ของ collagen และการแสดงออกของ VEGF-C ช่วยให้เกิดการสร้างหลอดเลือดซึ่งเป็นผลของ fibroblasts (49)

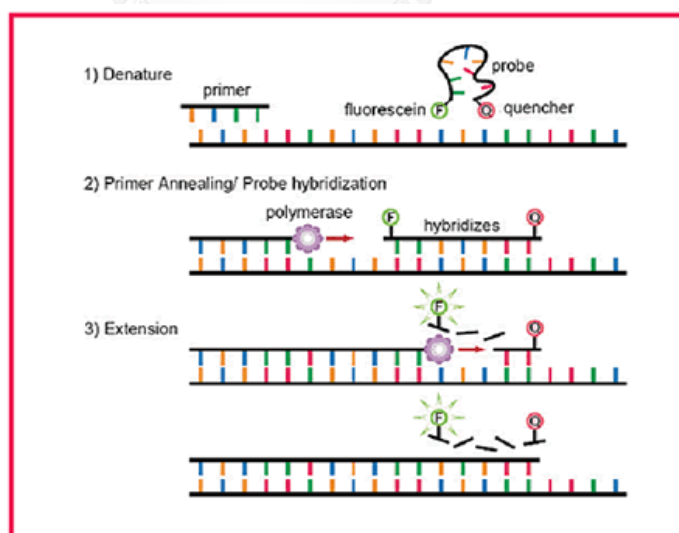
ในการศึกษาของ Moon และคณะในปี 2012 พบความสามารถในการสร้างหลอดเลือด (angiogenic capacity) จากโปรตีน VEGF ที่หลั่งจาก LF cells หลังจากกระตุ้นด้วย macrophage-like cells การอักเสบเกิดขึ้นจากแผลบาดเจ็บ เช่น mechanical stress ส่งผลให้มีกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อตามมา และในขั้นตอนนั้น LF cells ขณะที่มี macrophage ผลิตไซโตไคน์และโกรทแฟคเตอร์จำนวนมากที่สัมพันธ์กับการสร้างหลอดเลือดใหม่ (50) เนื่องจากการหนาตัว (hypertrophy) เป็นกลไกทดแทนที่ตอบสนองเพื่อรองรับแรงกดดันที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากความดันหรือการรับน้ำหนักที่มากเกินไป Leychenko และคณะในปี 2011 ได้ศึกษาการหนาตัวของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (adult cardiomyocytes) กับการหลั่งโปรตีน VEGF และพบว่า เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่เกิดการยืดหด (stretch myocardium) เนื่องจากมีความดันเกิดขึ้นมากเกินไป (pressure overload) และชักนำกระบวนการหนาตัวนั้นมีการหลั่งโปรตีน VEGF ออกมามากขึ้นจากเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจโดยมีการกระตุ้น NF- κ B เกิดขึ้น (51) และหลายการศึกษาพบว่า การยับยั้งกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) โดยการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณ VEGF (vascular endothelial growth factor signaling pathway) สามารถสกัดกั้นการขยายขนาดของหัวใจภายใต้ภาวะการกระตุ้นให้หัวใจมีการหนาตัว (hypertrophic stimulation) ในสัตว์ทดลองได้ (52, 53)

การศึกษาแบบ in vitro โดย Jin และคณะในปี 2014 รายงานว่า ระดับการแสดงออกของ VEGF ในเซลล์กระดูกอ่อนของมนุษย์ (human chondrocyte) เพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีการบาดเจ็บของเซลล์เนื่องจากความดันเชิงกล (mechanical pressure injury) (54) หลายการศึกษาค้นพบว่าการสูญเสียโปรตีน VEGF ในหนูทดลองทำให้ขาดกระบวนการสร้างหลอดเลือดในกระดูก และทำให้เซลล์กระดูกอ่อนโตซ้ำ (chondrocyte hypertrophy) รวมถึงกระบวนการสร้างกระดูก (bone formation) และการสะสมแคลเซียมในกระดูกอ่อนลดลง (cartilage calcification) นอกจากนี้โปรตีน VEGF จะมีความสำคัญต่อการพัฒนาของกระดูก endochondral bone โดยสร้างหลอดเลือดในกระดูกแล้วยังมีความสำคัญต่อการแบ่งตัวไปเป็น hypertrophic chondrocytes, osteoblasts, endothelial cells และ osteoclasts อีกด้วย (55, 56)

Real-time PCR (57)

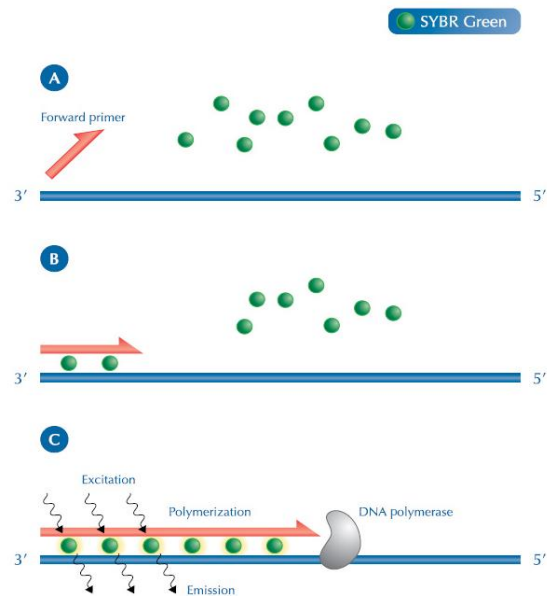
Real-time Polymerase Chain Reaction หรือ Quantitative PCR เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะและสามารถตรวจวัดปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายที่เพิ่มปริมาณขึ้นมาได้ทันทีจากปฏิกิริยา PCR ในแต่ละรอบตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดปฏิกิริยา (Real-time detection) และได้ค่าปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนจริงจากค่าของ exponential phase ที่ได้จากดีเอ็นเอตั้งต้น เทคนิคนี้ได้พัฒนามาจาก PCR แบบดั้งเดิม (Conventional PCR) โดยมีการติดฉลากสารเรืองแสงประเภท fluorochrome ที่ probe เพื่อตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบของการทำปฏิกิริยาและสัญญาณสารเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นนั้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยาในแต่ละรอบ สำหรับการตรวจสอบทางเคมีของ real-time PCR ที่ใช้โดยทั่วไป คือ การใช้ Taqman hybridization probe ซึ่งเป็น probe สายเดี่ยวที่ประกอบด้วย reporter dye ซึ่งมีสี FAM เป็นสี fluorescein จับอยู่ที่ปลาย 5' ของ probe และด้านปลาย 3' ของ probe มี quencher dye (TAMRA) ติดอยู่ เมื่ออยู่ในขั้นตอน Annealing ของ real-time PCR มีการ hybridization ของ probe กับ ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) และเมื่อเข้าสู่ขั้นตอน extension ของ real-time PCR มีเอนไซม์ Taq DNA polymerase ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น 5' nuclease activity ทำให้ reporter dye ถูกกระตุ้นและคายพลังงานออกมาในรูปของแสงฟลูออเรสเซนซ์ โดยมีการตัด reporter dye ออกจาก probe และหลุดห่างออกจาก quencher dye ดังรูปที่ 14

รูปที่ 14 วิธี Taqman Probe



(จาก <http://www.gibthai.com>)

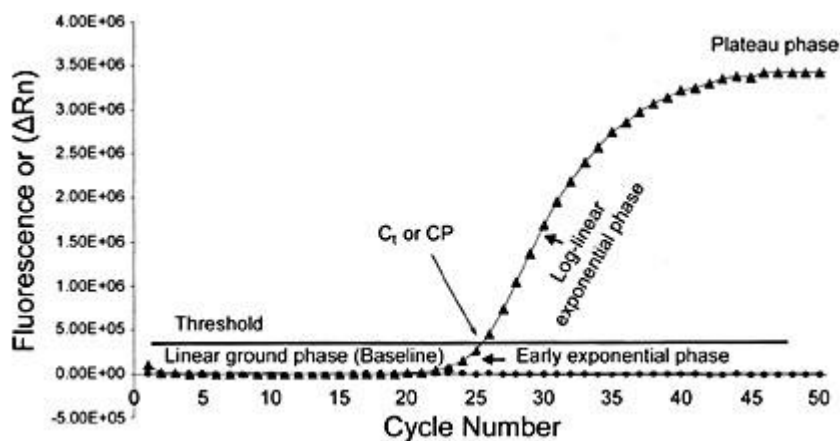
การตรวจสอบทางเคมีอีกแบบคือ การใช้สีที่สามารถแทรกจับกับเส้นดีเอ็นเออย่าง SYBR-Green Dye ที่สามารถแทรกจับกับดีเอ็นเอสายคู่ตรงตำแหน่ง minor groove ที่สร้างขึ้นใหม่ เมื่อมีการกระตุ้น SYBR-Green Dye ด้วยอัลตราไวโอเล็ต จะมีการคายพลังงานออกเป็นแสงฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อรอบของการเกิด PCR อยู่ในช่วง denaturation นั้น SYBR-Green Dye จะหลุดออกจากสายดีเอ็นเอทำให้การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ลดลง (รูปที่ 15)



รูปที่ 15 วิธี SYBR-Green Dye

(จาก <http://www.thermoscientificbio.com>)

กราฟแสดงการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (amplification plot) ด้วยวิธี Real-time PCR มีลักษณะเป็นรูป S (Sigmoid หรือ exponential curve) ดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 กราฟการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (amplification plot) จากเทคนิค Real-time PCR
(จาก <http://www.cgp-journal.com>)

คำนิยามสำหรับ amplification plot

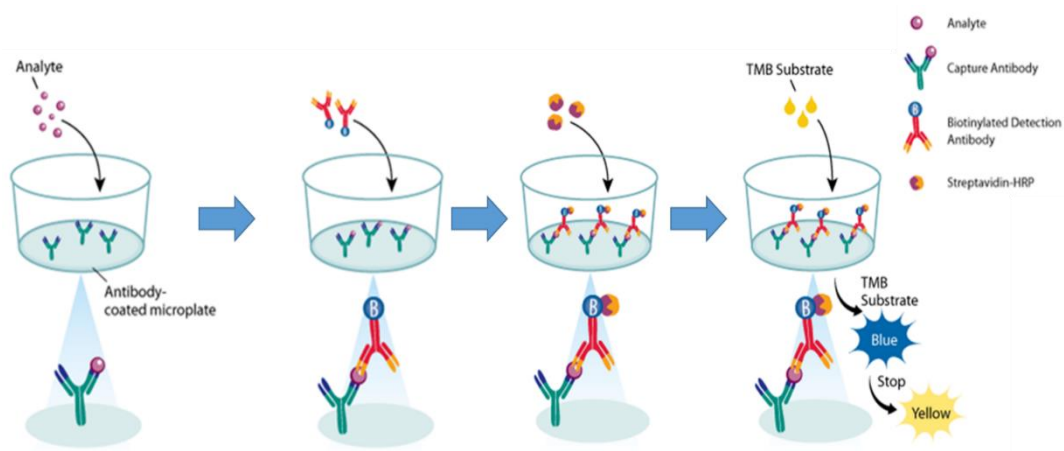
- Linear ground phase (baseline) หมายถึง ช่วงเริ่มต้นของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ซึ่งมีการสะสมของสารเรืองแสงแต่สัญญาณของสารเรืองแสงยังมีระดับต่ำกว่าเครื่องสามารถตรวจวัดได้
- Threshold หมายถึง ระดับสัญญาณสารเรืองแสงที่ใช้เป็นค่า cut-off สำหรับการตรวจวัดสารเรืองแสงในแต่ละตัวอย่าง
- Threshold cycle (C_t) หมายถึง จำนวนรอบของปฏิกิริยาในการเพิ่มจำนวนที่ทำให้สัญญาณสารเรืองแสงสูงกว่าระดับ threshold
- Log/exponential phase หมายถึง ช่วงที่ระดับสัญญาณสารเรืองแสงสูงเหนือระดับ Threshold และมีแนวโน้มการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ
- Plateau phase หมายถึง ช่วงที่ระดับสัญญาณสารเรืองแสงคงที่ ไม่มีการเพิ่มขึ้นแบบทวีคูณ เนื่องจากสารต่าง ๆ ที่จำเป็นสำหรับปฏิกิริยาหมดไป เช่น primer, dNTPs และ DNA polymerase เป็นต้น

การตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Real-time PCR อาศัยการวัดปริมาณสารเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบของปฏิกิริยาและใช้ค่า threshold cycle (Ct) เป็นตัวบ่งชี้ปริมาณดีเอ็นเอที่มีในสารตั้งต้น โดยตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายตั้งต้นมาก จะมีค่า Ct ต่ำ เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ตั้งต้นมีมาก จึงสามารถเพิ่มปริมาณสารเรืองแสงให้สูงกว่าระดับ threshold ได้ในรอบของปฏิกิริยาแรก ๆ ส่วนตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายตั้งต้นน้อย จะมีค่า Ct สูง เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายตั้งต้นน้อย จึงต้องใช้จำนวนรอบของปฏิกิริยามากเพื่อที่จะเพิ่มปริมาณสารเรืองแสงให้สูงกว่าระดับ threshold

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (58)

เป็นเทคนิคการตรวจหาปริมาณโปรตีนที่สนใจ โดยอาศัยแอนติบอดีที่จำเพาะไปจับกับโปรตีนที่สนใจ ซึ่งโมเลกุลของแอนติบอดีติดฉลากด้วยเอนไซม์ เช่น horseradish peroxidase หรือ alkaline phosphatase จากนั้นจึงใส่ substrate ที่เหมาะสมลงไป เมื่อ substrate ถูกเอนไซม์ย่อยจะเปลี่ยนเป็น product สารที่มีสีจึงทำให้สามารถตรวจสอบโปรตีนได้ และระดับโปรตีนที่ตรวจวัดสามารถทราบได้โดยการเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแล้ว สำหรับเทคนิค ELISA ที่ใช้ในการวิจัยเป็นแบบ sandwich ELISA ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. ขั้นตอนการเคลือบเพลทด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารหรือโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์หาปริมาณ (analyte-specific antibody หรือ capture antibody)
2. เติมตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณและสารมาตรฐานลงไปบนเพลท โดยสารที่ต้องการตรวจวัด (analyte) จับอย่างจำเพาะกับแอนติบอดีที่เคลือบอยู่ที่เพลท (capture antibody) ส่วนสารที่ไม่จำเพาะหรือไม่จับกับแอนติบอดีจะถูกล้างออกไป
3. เติมแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งติดฉลากด้วยไบโอติน (biotinylated detection antibody) จากนั้นเติมเอนไซม์ streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) ซึ่งจับอย่างจำเพาะกับไบโอติน
4. เติมสารละลายตั้งต้น (tetramethylbenzidine substrate; TMB) ลงไปในแต่ละหลุมของ 96-well plate เพื่อจับกับเอนไซม์ที่ถูกเติมลงไปก่อนหน้านี้ให้เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีฟ้าซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อปริมาณของโปรตีนที่ต้องการวัดซึ่งปรากฏอยู่ในสารตัวอย่าง และในการหยุดการทำงานของปฏิกิริยาสารจะเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีเหลือง และสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร



รูปที่ 17 ขั้นตอนการทำงานของ sandwich-ELISA
(จาก <http://www.mdsystems.com>)

BCA assay

Bicinchoninic acid (BCA) เป็นวิธีตรวจวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย การทดสอบนี้ประกอบด้วยปฏิกิริยาทางเคมี 2 ปฏิกิริยา (59) ได้แก่

1. เกิดการรีดักชันของ cupric ions (Cu^{2+}) เปลี่ยนเป็น cuprous ions (Cu^+) โดยอาศัยพันธะเปปไทด์ที่มีไนโตรเจน เช่น cysteine, tryptophan และ tyrosine residues ปริมาณของ cupric ions (Cu^{2+}) ที่ถูกรีดิวซ์นั้นเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อปริมาณของโปรตีนที่มีอยู่ในสารละลายตัวอย่าง

2. โมเลกุลของ bicinchoninic acid จะจับกับโมเลกุลของ cuprous ions (Cu^+) และเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีม่วงซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร การทดสอบในขั้นนี้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เพื่อเพิ่มความไวต่อปฏิกิริยา (sensitivity) และลดการแปรผันของปฏิกิริยา (variation of the response)

Polymerase Chain Reaction (PCR)

หลักการ polymerase chain reaction (PCR) ได้ถูกพัฒนาโดย Kary Mullis ในปี ค.ศ. 1980 โดยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออาศัยพื้นฐานความสามารถของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) ในการสังเคราะห์เส้นดีเอ็นเอสายใหม่ (complementary DNA) ที่เข้าคู่กับเส้นของดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) เนื่องจาก DNA polymerase สามารถเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าไปยังด้าน 3'-OH group ได้ โดยต้องอาศัยไพรเมอร์ (primer) เป็นตัวเริ่มการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (57, 60)

ส่วนประกอบที่จำเป็นสำหรับการเกิดปฏิกิริยา polymerase chain reaction ได้แก่

1. ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) คือ ดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สนใจ (target sequence) ในขั้นแรกของปฏิกิริยาเริ่มที่อุณหภูมิสูง เพื่อแยกเส้นดีเอ็นเอต้นแบบจากสองเส้นที่คู่กัน (original double-stranded DNA) ให้เป็นเส้นเดี่ยวที่แยกออกจากกัน

2. ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) เป็นชนิดของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่ซึ่งเข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ Taq DNA polymerase (จาก *Thermus aquaticus*) เป็นเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสตัวแรกที่ใช้กันโดยมาก และยังมี Pfu DNA polymerase (จาก *Pyrococcus furiosus*) ซึ่งใช้อย่างกว้างขวาง เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้ทำหน้าที่คัดลอกดีเอ็นเอได้แม่นยำมากกว่าตัวอื่น อย่างไรก็ตามเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสทั้งสองชนิดที่กล่าวถึงนั้นล้วนมีความสามารถที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของ PCR กล่าวคือ มีความสามารถในการสร้างดีเอ็นเอเส้นใหม่โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบและไพรเมอร์ นอกจากนี้เอนไซม์ดังกล่าวยังมีความทนทานต่อความร้อนอีกด้วย

3. ไพรเมอร์ (primers) คือ ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว (single-stranded DNA) ที่เข้าคู่กับลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมาย (target sequence) โดยเอนไซม์พอลิเมอเรสจะเริ่มสังเคราะห์เส้นดีเอ็นเอเส้นใหม่จากจุดที่สิ้นสุดของไพรเมอร์ (primer)

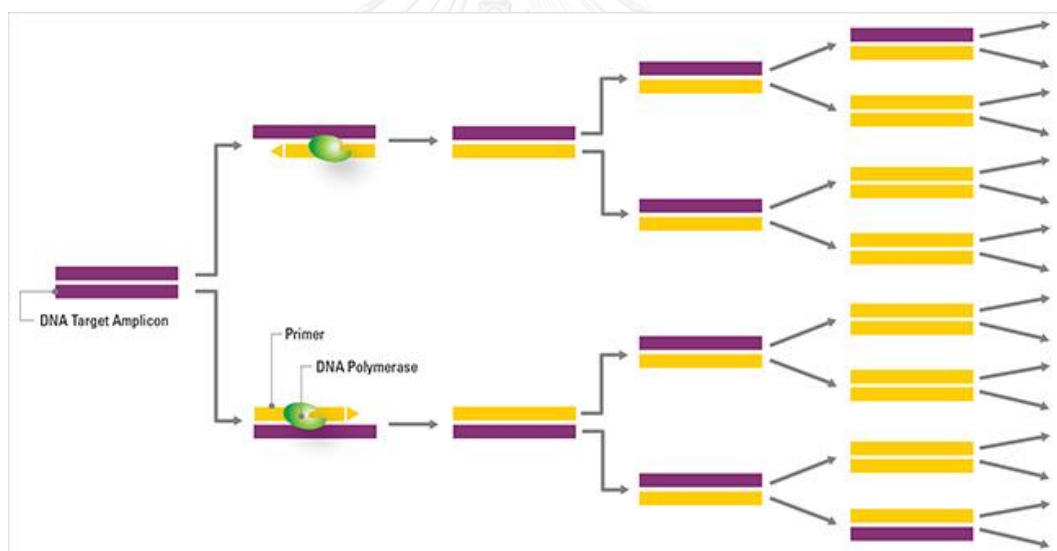
4. นิวคลีโอไทด์ (dNTPs หรือ deoxynucleotide triphosphates) เป็นเบสหน่วยเดี่ยว ๆ ได้แก่ A, T, G, และ C จัดเป็น building blocks ที่สำคัญของดีเอ็นเอเส้นใหม่

RT-PCR (Reverse Transcription PCR) เป็นการนำ PCR โดยที่ขั้นตอนก่อนทำ PCR มีการแปลงตัวอย่างตั้งต้นที่เป็น RNA ให้เป็น cDNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase

การเกิดปฏิกิริยาของ PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่

1. Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกเส้นดีเอ็นเอต้นแบบจากเส้นคู่ (double strand DNA) ให้เป็นเส้นเดี่ยว (single strand DNA) ด้วยอุณหภูมิสูง 94 °C
2. Annealing เป็นขั้นตอนที่มีการจับกันของโมเลกุลไพรเมอร์ (Forward และ Reverse primers) กับดีเอ็นเอต้นแบบอย่างจำเพาะในลักษณะ complementary กัน ในช่วงอุณหภูมิ 40-60 °C
3. Extension เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอเส้นใหม่ในทิศทาง 5' → 3' ซึ่งมีลำดับเบส complementary กับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้อุณหภูมิในช่วง 65-72 °C

ขั้นตอนของปฏิกิริยาทั้ง 3 ขั้นตอนดังกล่าวจะดำเนินไปทั้งสิ้น 35-40 รอบ และหลังจากเสร็จปฏิกิริยาแล้วจะได้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นแบบทวีคูณ $2n$ โดย n คือจำนวนรอบที่เกิดปฏิกิริยา (รูปที่ 18) ปฏิกิริยา PCR จัดเป็นปฏิกิริยาที่เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอแบบลูกโซ่โดยอาศัยเอนไซม์พอลิเมอเรส จึงเรียกว่า polymerase chain reaction (PCR)



รูปที่ 18 แสดงการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (DNA amplification)

(จาก <http://www.thermoscientificbio.com>)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

ประชากร (target population) ผู้เข้ารับการรักษาผ่าตัดรักษาโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบจากการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum อายุระหว่าง 40-90 ปี

ประชากรกลุ่มตัวอย่าง (sample population) ผู้เข้ารับการรักษาผ่าตัดรักษาโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบจากการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum อายุระหว่าง 40-90 ปี จากแผนกออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

เกณฑ์การคัดเลือก (Inclusion criteria) ผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบจากการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เข้ารับการรักษาช่องไขสันหลังตีบบริเวณเอว จากแผนกออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย อายุระหว่าง 40-90 ปี

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria) กลุ่มผู้ป่วยที่มารับการรักษาอาการบาดเจ็บในส่วนอื่น ๆ เช่น โรคหมอนรองกระดูกกดทับเส้นประสาท (herniated intervertebral disc, HIVD), โรคหมอนรองกระดูกสันหลังเสื่อม (degenerative disc disease) และภาวะปวดหลังอื่น ๆ ที่ไม่ใช่อาการป่วยจากโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบจากการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เข้ารับการรักษา จากแผนกออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample Size) การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการคำนวณจำนวนกลุ่มประชากรตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังตีบบริเวณเอวจากการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เข้ารับการรักษาผ่าตัดรักษา จากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งสามารถคำนวณกลุ่มตัวอย่าง โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้ (61)

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

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

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

n = ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

Z = ค่า Z score ที่ระดับความเชื่อมั่น

P_1 = อัตราการเกิดการแสดงออกของยีนในชิ้นเนื้อปกติ (control)

P_2 = อัตราการเกิดการแสดงออกของยีนในชิ้นเนื้อที่เกิดโรค

Q = (1-อัตราการเกิดการแสดงออกของยีนในชิ้นเนื้อ)

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

ดังนั้นจำเป็นต้องใช้ตัวอย่างในการศึกษาวิจัยครั้งนี้อย่างน้อยกลุ่มละ 18 ตัวอย่าง แต่เนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องการเก็บตัวอย่างและการเก็บตัวอย่างดังกล่าวได้มาเมื่อผู้ป่วยที่มีโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่ามีช่องไขสันหลังตีบแคบบริเวณเอว (lumbar spinal stenosis) และจำเป็นต้องรักษาโดยการผ่าตัด โดยทำการเลือกเก็บตัวอย่างเฉพาะชิ้นเอ็น ligamentum flavum ในระดับกระดูกสันหลังส่วนเอว ในกลุ่มที่เป็นโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบ โดยการศึกษาเก็บตัวอย่างเป็นอย่างน้อยจำนวน 18 ตัวอย่าง

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- 1.1 Autoclave (Hydroclave Harvey, USA)
- 1.2 Automatic adjustable micropipette (Eppendorf, Germany)
- 1.3 Balance (Satorius, Germany)
- 1.4 Centrifuge, refrigerated centrifuge (Eppendorf, USA)
- 1.5 Centrifuge, microcentrifuge high speed (Eppendorf, USA)
- 1.6 Combs (BIO-RAD, Hercules, California, USA)
- 1.7 NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer (Scientific: USA)
- 1.8 Blade (Parabolar, Germany)
- 1.9 Mortar and pestle
- 1.10 Cylinder : 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml (Pyrex, USA)
- 1.11 StepOnePlusTM Real-time PCR system (Applied Biosystems, USA)
- 1.12 Electrophoresis chamber set (BIO-RAD, USA)
- 1.13 Freezer -80 °C (Forma Scientific, USA)
- 1.14 Gel Doc 1000 (BIO-RAD, USA)
- 1.15 Multi-block heater (Techne DRI Block, USA)
- 1.16 Multi-channel pipettor (Biohit, Finland)
- 1.17 Microcentrifuge tube rack
- 1.18 Pipette rack (Autopack, USA)
- 1.19 Enzyme-linked Immunosorbent Assay Plate Reader (BIO-RAD, USA)
- 1.20 Reagent bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Duran, USA)
- 1.21 Refrigerator (Sanyo, Japan)
- 1.22 Vortex mixer (Scientific Industry, USA)
- 1.23 Water purification equipment (Water pro Ps, Labconco, USA)
- 1.24 Water bath: Memmert WB45 (Memmert, German)
- 1.25 Mastercycler personal (Eppendorf, USA)

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. Pierce® BCATM protein assay kit (Piercenet, USA)
2. Centrifuge tube, sterile (Elkay, USA)
3. Disposable gloves (Proglove, Thailand)
4. Microcentrifuge tube 1.5 ml (BIO-RAD, USA)
5. Needle No.20, sterile (Nipro, Japan)
6. Syringe disposable (Nipro, Japan)
7. Sero pipette 1, 5, 10 ml (Henneberg-Sander GmbH (HBG), Germany)
8. Pipette tip (AxyGen, USA)
9. RNA isolation RNeasy Mini kit (Qiagen, Germany)
10. RNA laterTM (Qiagen, Germany)
11. Real time PCR tube
12. RBC ThermOneTM Real-Time Premix (With SYBR Green)
(RBCBioscience, Taiwan)
13. ProteinExtract® Protein precipitation Kit (Merck, USA)
14. PerfectTaq Plus DNA Polymerase mastermix (5 PRIME, USA)
15. Taqman® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA)
16. DuoSet® ELISA development system human VEGF (R&D Systems, USA)
(R&D Systems, USA)

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารเคมีทั่วไป
 - 1.1 70% ethanol
2. สารเคมีสำหรับการสกัด RNA
 - 2.1 Liquid nitrogen
 - 2.2 Buffer RLT
 - 2.3 Buffer RW1
 - 2.4 Buffer RPE
 - 2.5 Beta-mercaptoethanol
3. สารเคมีสำหรับการทำ Real time RT-PCR
 - 3.1 Distilled water
 - 3.2 10 μ M primer forward (VEGF, 18s rRNA)
 - 3.3 10 μ M primer reverse (VEGF, 18s rRNA)
 - 3.4 2x ThermOne Premix with SYBR Green (RBCBioscience, Taiwan)
4. สารเคมีสำหรับทำ Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)
 - 4.1 2x PerfectTaq Plus MasterMix
 - 4.2 10 μ M primer forward (VEGF, 18s rRNA)
 - 4.3 10 μ M primer reverse (VEGF, 18s rRNA)
 - 4.4 Distilled water
5. สารเคมีสำหรับทำ agarose gel electrophoresis
 - 5.1 Agarose molecular biology grade
 - 5.2 100bp DNA ladder
 - 5.3 Loading dye
 - 5.4 1X TAE buffer
 - 5.5 Ethidium bromide

6. สารเคมีสำหรับการสกัดโปรตีน

6.1 0.9% Normal saline

6.2 Liquid Nitrogen

6.3 Precipitation 1

6.4 Precipitation 2

6.5 Precipitation 3

6.6 Precipitation 4

6.7 Wash buffer

7. สารเคมีสำหรับการทำ ELISA

7.1 Phosphate Buffered Saline (PBS)

7.2 Human VEGF Capture Antibody

7.3 Reagent Diluent

7.4 Streptavidin-HRP

7.5 Wash buffer

7.6 Human VEGF Detection Antibody

7.7 Human VEGF standard

7.8 Fetal Bovine Serum (FBS)

7.9 Substrate Solution

7.10 Stop Solution

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. อายุและเพศของผู้ป่วย
2. ปริมาณ RNA
3. ภาพถ่ายจากการทำ agarose gel electrophoresis
4. ค่า Cycle Threshold (Ct) ที่ได้จากการทำ real time RT-PCR
5. ค่าความเข้มของแถบ DNA บน agarose gel electrophoresis
6. ปริมาณโปรตีน
7. ภาพแสดงตำแหน่งการแสดงออกของ VEGF โปรตีนในชิ้นเนื้อที่มีรอยโรค

ข้อมูลทั้งหมดที่ได้ทำการเก็บโดยการจัดเก็บและบันทึกลงคอมพิวเตอร์

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

1. การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัดโดยเก็บชิ้นเอ็น ligamentum flavum ขนาด 0.2×0.2 เซนติเมตร จากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบ (lumbar spinal stenosis) ในระดับกระดูกสันหลังซึ่งเกิดพยาธิสภาพและไม่เกิดพยาธิสภาพ

2. การเก็บชิ้นเนื้อ

- 2.1 ทำการเก็บชิ้นเอ็น ligamentum flavum ของผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบ ทั้งในระดับกระดูกสันหลังที่เกิดรอยโรค และระดับไม่เกิด รอยโรค
- 2.2 นำชิ้นเนื้อที่ได้จากผู้ป่วยมาตัดแบ่งเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 0.3×0.3 มิลลิเมตร
- 2.3 นำชิ้นเนื้อที่ได้จากข้อ 1. ไปใส่ใน microcentrifuge tube และเติมน้ำยารักษาสภาพ RNA ลงไปพอท่วมชิ้นเนื้อ
- 2.4 นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -80°C เพื่อรอสกัด RNA ต่อไป

3. สกัดแยก total RNA จากชิ้นเนื้อ

ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

3.1 นำชิ้นเนื้อ 30 มิลลิกรัม ออกจากน้ายารักษาสภาพ RNA มาใส่ครกบด

3.2 การทำให้ชิ้นเนื้อแตกละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน (disruption & homogenization)

(1) ใช้ครกและสากบดชิ้นเนื้อใน liquid nitrogen จนเป็นผง

(2) เทผงชิ้นเนื้อที่บดได้ ลงใน microcentrifuge tube ของผู้ป่วยแต่ละราย

(3) เติม buffer RLT ที่ผสม Beta-mercaptoethanol (สัดส่วน 1 มิลลิตรต่อ 10 ไมโครลิตร) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร

3.3 ทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenization) โดย ผ่านสารละลายเซลล์ (lysate) เข้าออก เข็มเบอร์ 20 จำนวน 5-10 ครั้ง

3.4 ปั่นตกตะกอน (centrifuge) สารละลายเซลล์ (lysate) เป็นเวลา 3 นาที ที่ 13,000 rpm และดูดเอาแต่ของเหลวที่อยู่ชั้นบน (supernatant) ใส่ใน microcentrifuge tube อันใหม่

3.5 เติม 70% ethanol 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลง

3.6 ดูดสารละลายเซลล์ (lysate) 700 ไมโครลิตร นำไปใส่ใน spin column ที่ใส่อยู่ใน collection tube ขนาด 2 มิลลิตรนำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่ไหลลงสู่ collection tube ที่ตั้ง

3.7 เติม Buffer RW1 700 ไมโครลิตร ลงใน RNeasy spin column ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่ไหลลงสู่ collection tube ที่ตั้ง

3.8 เติม Buffer RPE 500 ไมโครลิตร ลงใน RNeasy spin column นำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่ไหลลงสู่ collection tube ที่ตั้ง

3.9 เติม Buffer RPE 500 ไมโครลิตร ลงใน RNeasy spin column นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เทของเหลวที่ไหลลงสู่ collection tube ที่ตั้ง

3.10 เปลี่ยน spin column ใส่ collection tube ขนาด 2 มิลลิตร อันใหม่ นำไปปั่นตกตะกอนให้แห้ง centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที

3.11 เปลี่ยน spin column ใส่ collection tube ขนาด 1.5 มิลลิตร เติม RNase-free-water 32 ไมโครลิตร ลงใน RNeasy spin column membrane นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อล้าง RNA ออกจาก membrane ในที่สุดได้สารละลาย RNA

3.12 วัดปริมาณและคุณภาพ RNA ที่ได้ทั้งหมดด้วยเครื่อง NanoDrop 1000 ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (RNA ที่มีคุณภาพมีค่าอยู่ระหว่างช่วง 1.8-2.0)

4. การแปรสภาพจาก RNA เป็น cDNA (Reverse transcription)

การสังเคราะห์ cDNA จาก total RNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างชิ้นเอ็น ligamentum flavum เป็นขั้นตอนแรกของการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี RT-PCR ในขั้นตอนนี้ใช้สารเคมีผสมดังตารางที่ 1 และเข้าสู่กระบวนการ Reverse transcription โดยตั้งอุณหภูมิของเครื่อง PCR ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 แสดงชนิดและปริมาณสารที่เป็นส่วนผสมในการทำ Reverse transcription (RT Reaction Mix)

สารเคมี	ปริมาตรต่อตัวอย่าง (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10x Taqman RT Buffer	3	1x
25 mM Magnesium Chloride	6.6	5.5 mM
100 mM deoxyNTPs Mixture	2.2	500 μ M per dNTP
Random Hexamer	1.5	2.5 μ M
RNase Inhibitor	0.6	0.4 U/ μ L
MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/ μ L)	0.75	1.25 U/ μ L
RNase-free water	See below ^a	
RNA Template	See below ^b	100 ng in 30 μ L reaction
ปริมาตรรวม	30	

หมายเหตุ

- a. ปริมาตร RNase-free water คือ 16.95 ไมโครลิตร – ปริมาตรของ RNA template
- b. ปริมาตร RNA template จากตัวอย่าง คำนวณความเข้มข้นที่วัดได้จากเครื่อง Nanodrop โดยปรับความเข้มข้นให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในหลอดทดลองคือ 100 นาโนกรัม

ตารางที่ 2 แสดง RT Thermal Cycling

ขั้นตอน	Incubation	Reverse Transcription	Reverse Transcriptase Inactivation
อุณหภูมิ	25 °C	48 °C	95 °C
ระยะเวลา	10 นาที	30 นาที	5 นาที
ปริมาณ	30 ไมโครลิตร		

ขั้นตอนมีดังนี้

- 4.1 เตรียม RT Reaction Mix โดยผสมสารที่ไม่ใช่จำพวกเอนไซม์ลงไปก่อนใน microcentrifuge tube
- 4.2 Vortex สารให้เข้ากัน
- 4.3 เติมสารที่เป็นพวกเอนไซม์ เช่น MultiScribe Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor ลงไปดังตารางที่ 1
- 4.4 Vortex สารให้เข้ากัน และแบ่งใส่ PCR Tube ของแต่ละตัวอย่าง
- 4.5 เติม RNA template และ RNase-free water ลงไปในแต่ละหลอดทดลอง
- 4.6 Vortex และปั่นเหวี่ยง PCR Tube แต่ละหลอด
- 4.7 นำ PCR tube ที่เตรียมไว้ไปใส่ในเครื่อง Thermal Cycler จากนั้นตั้งค่าอุณหภูมิและเวลาสำหรับการทำ Reverse transcription ดังตารางที่ 2
- 4.8 นำ cDNA ที่ได้ไปใช้เป็น template สำหรับการศึกษากการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real time RT-PCR และ RT-PCR

5. การศึกษาการแสดงออกของยีน VEGF ด้วยเทคนิค real time RT-PCR (real time reverse transcription-polymerase chain reaction)

ตารางที่ 3 แสดง primers ที่ใช้ในการทำ real time RT-PCR (62)

ชื่อ Primer	ลำดับเบส (5'→3')	ขนาด (คู่เบส)
VEGF (Forward)	CAA-ATG-CTT-TCT-CCG-CTC-TGA	94
VEGF (Reverse)	CCT-ACA-GCA-CAA-CAA-ATG-TGA-ATG	
18s rRNA (Forward)	GCC-CGA-AGC-GTT-TAC-TTT-GA	81
18s rRNA (Reverse)	TCC-ATT-ATT-CCT-AGC-TGC-GGT-ATC	

ตารางที่ 4 แสดงชนิดและปริมาตรสารเคมีที่ใช้ทำ real time RT-PCR

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
Forward primer แต่ละยีน (10 µM)	0.625	0.5 µM
Reverse primer แต่ละยีน (10 µM)	0.625	0.5 µM
2x ThermOne Premix	6.25	1x
Distilled water	3	
Template (ยีน VEGF, 18s rRNA positive control และ cDNA)	2	
ปริมาตรรวม	12.5	

ขั้นตอนดังนี้

- 5.1 สำหรับโปรแกรมที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 3
- 5.2 ผสมสารละลายสำหรับ real time RT-PCR ดังตารางที่ 4
- 5.3 ดูดสารละลายที่ผสมจากข้อ 1.ใส่หลอดทดลองสำหรับทำ real time RT-PCR
- 5.4 นำไปวัดการแสดงออกของยีนโดยเครื่อง real time RT-PCR โดยใช้สภาวะดังตารางที่ 5
- 5.5 ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน VEGF และ 18s rRNA โดยบันทึกค่า Ct เพื่อนำไปคำนวณ
 - ปริมาณเชิงเปรียบเทียบ relative amount ของ VEGF mRNA จาก quantitative real time-PCR ที่ normalized กับ internal control 18s rRNA โดยใช้หลักการ $2^{-\Delta\Delta Ct}$
$$\text{Normalized target gene expression level} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

โดยที่ $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct1 (\text{pathologic lesion}) - \Delta Ct2 (\text{non-pathologic lesion})$

$$\Delta Ct1 (\text{pathologic lesion}) = Ct (\text{VEGF}) - Ct (18s \text{ rRNA})$$

$$\Delta Ct2 (\text{non-pathologic lesion}) = Ct (\text{VEGF}) - Ct (18s \text{ rRNA})$$
 - ปริมาณสัมบูรณ์ของ DNA จากตัวอย่างโดยนำไปเปรียบเทียบกับ standard curve และนำปริมาณสัมบูรณ์ของ DNA ที่คำนวณได้ของ VEGF และ 18s rRNA ของแต่ละตัวอย่างมาคิดอัตราส่วน

ตารางที่ 5 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ real time RT-PCR

PCR cycle	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
Pre-denaturation	95	10.00
Denaturation	95	0.15
Annealing		
- VEGF	64	1.00
- 18s rRNA	64	1.00

5.6 การสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) จากสารละลาย DNA มาตรฐาน

- (1) นำสารละลายพลาสมิดของยีน VEGF และ 18s rRNA ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง Nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร
- (2) คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายพลาสมิดในหน่วย copies/microlitre ดังนี้

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

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

- (3) เมื่อทราบความเข้มข้นของสารละลายพลาสมิดแล้วจึงนำมาทำการเจือจางสารละลายเป็น DNA มาตรฐานเป็นความเข้มข้นที่ลดลงครั้งละ 10 เท่า (10 fold serial dilution) โดยให้ความเข้มข้นของสารละลายพลาสมิดอยู่ระหว่าง 10^9 - 10^1 copies/ไมโครลิตรของ PCR reaction
- (4) นำสารละลาย DNA มาตรฐานที่ได้จากข้อ 3.ไปทำเป็น template สำหรับทำ real time RT-PCR และบันทึกค่า Ct จาก amplification plot จากนั้นสามารถสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยที่แกน Y แสดงค่า Ct และแกน X แสดงค่า concentration ซึ่งจะได้กราฟที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง (ดังแสดงในภาคผนวก ข)
- (5) หาปริมาณการแสดงออกของยีน VEGF และ 18s rRNA จากตัวอย่าง โดยทำ real time RT-PCR และบันทึกค่า Ct และนำไปเปรียบเทียบกับ standard curve ก็จะสามารถคำนวณปริมาณสัมบูรณ์ของ DNA จากตัวอย่างได้

6. การศึกษาการแสดงออกของยีน VEGF ด้วยเทคนิค RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)

ตารางที่ 6 แสดงชนิดและปริมาณสารเคมีที่ใช้ทำ RT-PCR

สารเคมี	ปริมาณ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้น สุดท้าย
Forward primer แต่ละยีน (10 μ M)	0.25	0.2 μ M
Reverse primer แต่ละยีน (10 μ M)	0.25	0.2 μ M
2x PerfectTaq Plus MasterMix	6.25	1x
Distilled water	3	
Template (ยีน VEGF, 18s rRNA positive control และ cDNA)	3	≤ 1 μ g/reaction
ปริมาตรรวม	12.5	

ตารางที่ 7 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ RT-PCR

PCR cycle	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
Pre-denaturation	94	3.00
Denaturation	94	0.30
Annealing		
- VEGF	66	0.30
- 18s rRNA	64	0.30
Extension	72	1.00
Final Extension	72	10.00

35 cycles

ขั้นตอนมีดังนี้

- 6.1 ผสมสารละลายสำหรับ RT-PCR ดังตารางที่ 6
- 6.2 ดูดสารละลายที่ผสมจากข้อ 1.ใส่หลอดทดลองสำหรับทำ PCR
- 6.3 นำไปเพิ่มปริมาณ DNA ของยีนเป้าหมายโดยเครื่อง Thermal Cycler โดยใช้สภาวะดังตารางที่ 7
- 6.4 ตรวจสอบขนาดของยีน VEGF และ 18s rRNA โดยการทำให้ agarose gel electrophoresis โดยผสม PCR product กับ 6X loading dye ไมโครลิตร หยดลงใน หลุมของ 2% agarose gel ใช้ DNA ladder ที่มีขนาด 100 คู่เบสวัดขนาดของยีน ใช้ 1X TAE buffer เป็นตัวกลางและจ่ายกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 40 นาที จากนั้นนำ gel ไปย้อมด้วย 0.2% ethidium bromide เป็นเวลานาน 10-15 นาที ล้าง gel ด้วยน้ำเปล่า 2-3 ครั้ง แล้วนำ gel ไปผ่านเครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต Gel Doc 1000 (BIO-RAD, USA)
- 6.5 ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน VEGF และ 18s rRNA โดยใช้โปรแกรม Image Lab และนำผลจากการตรวจวิเคราะห์ความเข้มของแถบ DNA ของ VEGF และ 18s rRNA ของแต่ละตัวอย่างมาคิดอัตราส่วน

7. การศึกษาปริมาณโปรตีนที่แสดงออกในชั้นเอ็น ligamentum flavum การสกัดโปรตีนจากชั้นเนื้อ

7.1 ขั้นตอนการเตรียมชั้นเนื้อสำหรับตกตะกอน

- (1) นำชั้นเอ็น ligamentum flavum น้ำหนัก 30 มิลลิกรัม มาแยกใส่ microcentrifuge tube ของผู้ป่วยแต่ละราย
- (2) นำชั้นเนื้อที่เตรียมมาบดในครกหินด้วย liquid nitrogen จนเป็นผง
- (3) นำผงชั้นเนื้อที่บดได้ไปใส่ microcentrifuge tube เดิม
- (4) เติม 0.9% NSS ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลอด
- (5) ผสมให้เข้ากันด้วยการ Vortex และปั่นตกตะกอนที่ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 วินาที
- (6) ดูดส่วนใสชั้นบน (supernatant) 200 ไมโครลิตร ใส่ microcentrifuge tube หลอดใหม่ จากนั้นนำไปตกตะกอนโปรตีน

7.2 ขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วยชุดตกตะกอนโปรตีน ProteoExtract® Protein Precipitation Kit

- (1) เติมสารสำหรับตกตะกอนโปรตีน (precipitation agent) ที่เย็นจัด (-20°C) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่างปริมาตร 200 ไมโครลิตร
- (2) ผสมให้เข้ากันโดย Vortex และนำไปบ่ม (incubation) ที่ -20°C เป็นระยะเวลา 60 นาที
- (3) ปั่นตกตะกอน 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้ก้อนโปรตีน (pellet protein)
- (4) ดูดส่วนใสชั้นบน (supernatant) ออกให้เหลือแต่ก้อนโปรตีน (pellet)
- (5) ล้างก้อนโปรตีน โดยใส่ wash solution ที่เย็นจัด (-20 °C) ลงไป 500 ไมโครลิตร
- (6) ผสมให้เข้ากันด้วยการ Vortex และปั่นตกตะกอน 14,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- (7) ดูด wash solution ออก โดยให้รบกวนก้อนโปรตีน (pellet protein) น้อยที่สุด
- (8) ทำขั้นตอนที่ 5-7 ซ้ำอีกครั้ง
- (9) เปิดฝา microcentrifuge tube ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ถึง 1 ชั่วโมง เพื่อให้ตะกอนโปรตีนแห้ง
- (10) นำไปละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
- (11) นำไปเก็บที่ -80 °C เพื่อรอการวิเคราะห์โปรตีนต่อไป

7.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมทั้งหมด

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วย Pierce® BCA™ protein assay kit (Piercenet, USA)

ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

- (1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA) standards ดังตารางที่ 8
- (2) ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 25 ไมโครลิตร (working range = 20-2,000 µg/mL) ลงในไมโครเวลเพลท
- (3) เตรียม BCA working reagent (WR) โดยผสม BCA Reagent A กับ BCA Reagent B ในอัตราส่วน 50:1
- (4) เติม BCA working reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมและเขย่าสารละลายให้เข้ากันด้วย plate shaker เป็นเวลา 30 วินาที
- (5) ปิดไมโครเวลเพลทและบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 30 นาที
- (6) ปลอ่ยไมโครเวลเพลทให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 562 นาโนเมตร หรือใกล้เคียง ด้วยเครื่อง microplate reader

ตารางที่ 8 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA (ในช่วงความเข้มข้น 20 - 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

หลอดที่	ปริมาตร diluents (ไมโครลิตร)	ปริมาตร BSA (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้น BSA (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
1	0	25 ของ stock	2000
2	20	60 ของ stock	1500
3	30	30 ของ stock	1000
4	20	20 ของหลอดที่ 2	750
5	30	30 ของหลอดที่ 3	500
6	30	30 ของหลอดที่ 5	250
7	30	30 ของหลอดที่ 6	125
8	24	6 ของหลอดที่ 7	25
9	28.8	1.2 ของหลอดที่ 7	5
10	25	0	0 (blank)

8. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน VEGF ด้วยวิธี ELISA

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน VEGF โดยใช้ DuoSet[®] ELISA development system human VEGF (R&D Systems, USA) มีขั้นตอนดังนี้

8.1 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้งานดังนี้

(1) สารละลาย Phosphate Buffered Saline (PBS)

เตรียมจาก 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.2-7.4, 0.2 µm filtered

(2) Human VEGF Capture Antibody

เติม PBS 0.5 มิลลิลิตร ลงในผง mouse anti-human VEGF antibody จะได้ VEGF antibody ความเข้มข้น 120 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยต้องเตรียมความเข้มข้นสำหรับใช้งานคือ 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใน PBS

(3) Wash buffer 0.05% Tween[®] 20 ในสารละลาย PBS

(4) Reagent Diluent

เตรียมโดยผสม 1% Bovine Serum Albumin (BSA) ในสารละลาย PBS และแบ่งออกเป็น ส่วนที่ผสม 10% Fetal Bovine Serum (FBS) ซึ่งจะใช้กับการทำสารละลายมาตรฐาน Human VEGF, Blocking Plate และส่วนที่ไม่ผสม 10% FBS ที่ใช้กับ Streptavidin-horseradish peroxidase (HRP), Detection Antibody

(5) Streptavidin-HRP

เตรียม Streptavidin-HRP เจือจางใน Reagent Diluent (ไม่ผสม 10% FBS)

ที่ working concentration 1:40

(6) Human VEGF Detection Antibody

เติม reagent diluent ที่ปราศจาก 10% FBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดที่มีผง biotinylated goat anti-human VEGF antibody จะได้ความเข้มข้น 6.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นเจือจาง biotinylated goat anti-human VEGF antibody ให้ได้ความเข้มข้นสำหรับใช้งาน คือ 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ใน reagent diluent ที่ปราศจาก 10% FBS

(7) Human VEGF standard (2 fold serial dilution)

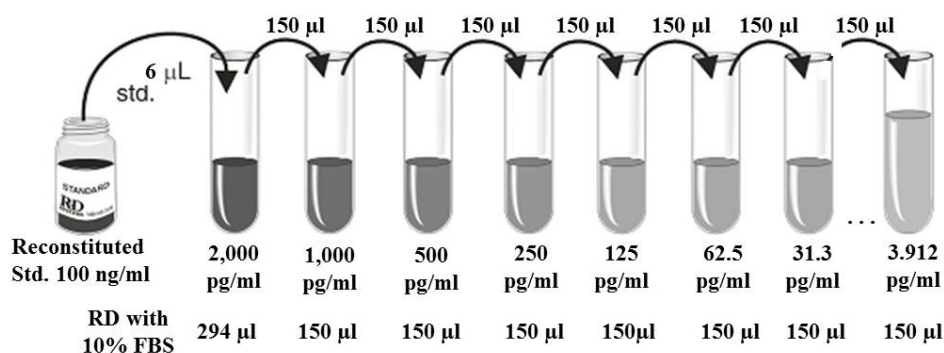
(7.1) เติมนสารละลาย reagent diluent ที่มี 10% FBS 500 ไมโครลิตร ลงในขวดที่มีผง recombinant human VEGF จะได้ recombinant human VEGF standard ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

(7.2) เตรียมสารละลายมาตรฐาน human VEGF ที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ 2,000 พิกโคกรัม/มิลลิลิตร โดยดูดสารละลาย human VEGF standard จาก stock solution 10 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย reagent diluent ที่มี 10% FBS 490 ไมโครลิตร

(7.3) ผสมสารละลายมาตรฐาน human VEGF ที่มีความเข้มข้น 2,000 พิกโคกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 250 ไมโครลิตร กับสารละลาย reagent diluent ที่มี 10% FBS 250 ไมโครลิตร ในที่สุดได้สารละลายมาตรฐาน human VEGF ที่มีความเข้มข้น 1,000 พิกโคกรัม/มิลลิลิตร

(7.4) ผสมสารละลายมาตรฐาน human VEGF ที่มีความเข้มข้น 1,000 พิกโคกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 250 ไมโครลิตร กับสารละลาย reagent diluent ที่มี 10% FBS 250 ไมโครลิตร จนกระทั่งได้สารละลายมาตรฐาน human VEGF ที่มีความเข้มข้น 500 พิกโคกรัม/มิลลิลิตร

(7.5) ทำต่อจนกระทั่งได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 3.912 พิกโคกรัม/ไมโครลิตร และใช้สารละลาย reagent diluent ที่มี 10% FBS เป็นสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0 พิกโคกรัม/ไมโครลิตร



รูปที่ 19 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐาน สำหรับวัดปริมาณโปรตีน VEGF โดยเทคนิค ELISA

(8) Substrate Solution

เตรียมโดย ผสม color reagent A (H_2O_2) กับ color reagent B (Tetramethylbenzidine) ในอัตราส่วน 1:1

(9) Stop Solution เตรียมจาก 2N H_2SO_4

8.2 การเตรียมเพลท

- (1) เจือจาง capture antibody ให้ได้ความเข้มข้นสำหรับการใช้งาน (working concentration) คือ 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย PBS
- (2) เคลือบ 96-well microplate ด้วย capture antibody ที่เจือจางความเข้มข้นแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นปิดเพลทและบ่มทิ้งไว้ตลอดคืน ที่อุณหภูมิห้อง
- (3) ดูดสารละลาย capture antibody ทิ้ง จากนั้นล้างเพลทด้วย wash buffer 400 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ในการล้างแต่ละครั้งควรซับเพลทกับกระดาษซับ (blotting) เพื่อกำจัดของเหลวที่ติดในหลุมของ microplate
- (4) เข้าสู่การ block plate โดยเติม reagent diluent ที่มี 10% FBS ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของ 96-well microplate จากนั้นปิดเพลทและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง
- (5) ดูดสารละลาย reagent diluent ที่มี 10% FBS ทิ้ง จากนั้นล้างไมโครเพลท เหมือนขั้นตอนที่ 8.2 ข้อย่อยที่ 3

8.3 ขั้นตอนของวิธีการ ELISA (Assay Procedure)

- (1) เติมสารละลายมาตรฐาน human VEGF และสารละลายตัวอย่างที่สกัดจากชิ้นเนื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุมของไมโครเพลท จากนั้นปิดเพลทและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง
- (2) ดูดสารละลายมาตรฐาน human VEGF และสารละลายตัวอย่างที่สกัดจากชิ้นเนื้อทิ้ง จากนั้นล้างไมโครเพลท ด้วย wash buffer ตามขั้นตอนที่ 8.2 ข้อย่อยที่ 3
- (3) เติม detection antibody 100 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง
- (4) ดูดสารละลาย detection antibody ทิ้ง จากนั้นล้างไมโครเพลท ด้วย wash buffer ตามขั้นตอนที่ 8.2 ข้อย่อยที่ 3
- (5) เติม streptavidin-HRP ที่เจือจางความเข้มข้นพร้อมใช้งานแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงไปใน แต่ละหลุม แล้วปิดเพลทบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 20 นาที หลีกเลี้ยงแสง
- (6) เท streptavidin-HRP ทิ้ง แล้วล้างไมโครเพลทด้วย wash buffer ตามขั้นตอนที่ 8.2 ข้อย่อยที่ 3

- (7) เติม substrate solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุมของไมโครเพลท จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 20 นาที หลีกเลี้ยงแสง
- (8) เติม stop solution ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุมของไมโครเพลท
- (9) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 450 และ 570 นาโนเมตร โดยค่าที่ได้เท่ากับ $OD_{570} - OD_{450}$
- (10) นำค่า OD ของสารละลายมาตรฐานที่ได้มาสร้างกราฟสารละลายมาตรฐาน Human VEGF เพื่อคำนวณปริมาณโปรตีน VEGF ของแต่ละตัวอย่าง

9. การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum

ทำการวิเคราะห์หาตำแหน่งการแสดงออกของโปรตีน VEGF โดยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry) มีขั้นตอนดังนี้

9.1 ขั้นตอนการเตรียมสไลด์

- (1) เติม formalin ลงไปในชิ้นเนื้อที่ต้องการศึกษา เพื่อรักษาสภาพของเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ รวมทั้งรักษาสภาพของแอนติเจนที่ต้องการตรวจหาให้อยู่ในสภาพเดิม
- (2) ตัด paraffin section ด้วยเครื่อง microtome หนา 5-10 ไมครอน ใช้สไลด์เคลือบด้วย 3-aminopropyltriethoxysilane เพื่อป้องกันชิ้นเนื้อหลุด รอให้ section แห้งสนิท นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60 °C ทิ้งไว้ข้ามคืน
- (3) Deparaffinization และ Rehydration ด้วยการล้าง paraffin ที่ เคลือบ section ด้วย xylene ผ่านไปยัง alcohol จากความเข้มข้นสูงไปต่ำแล้วแช่ในน้ำกลั่น

9.2 ขั้นตอน antigen retrieval ด้วย microwave method

- (1) เติม citrate buffer ที่มี pH 6.0 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงใน jar
- (2) เรียงสไลด์ใน rack แห่ลงใน jar
- (3) นำ jar เข้าไมโครเวฟ ใช้ Hi-Power เป็นระยะเวลา 3 นาที แล้วปรับเป็น power 30% เป็นระยะเวลา 10 นาที
- (4) นำ jar ออกมา บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 20 นาที
- (5) ล้างด้วย Phosphate buffer saline 5 นาที

9.3 ขั้นตอน block endogenous peroxidase activity

- (1) วงรอบ section ด้วย Dako pen
- (2) incubate section ด้วย 3% H_2O_2 ในน้ำ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- (3) ล้างด้วยน้ำ เป็นเวลา 5 นาที

(4) ล้างด้วย PBS เป็นเวลา 5 นาที

9.4 ขั้นตอน block non-specific background

(1) incubate section ด้วย 3% normal horse serum เป็นเวลา 20 นาที ที่ อุณหภูมิห้อง

9.5 ขั้นตอน antibody application

(1) เททิ้งส่วนเกินของ 3% normal horse serum

(2) หยด primary antibody ลงในแผ่นสไลด์ที่มีชิ้นเนื้อ (section)

(3) นำแผ่นสไลด์ไปบ่ม เป็นระยะเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ทิ้งไว้ข้ามคืน

(4) ล้างแผ่นสไลด์ด้วย PBS 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที

(5) หยด visualization agent หรือ secondary antibody

(6) นำแผ่นสไลด์ไปบ่ม เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

(7) ล้างแผ่นสไลด์ด้วย PBS 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที

9.6 ขั้นตอน color development

(1) นำ section มาหยดด้วย 3, 3-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ให้ end product สีน้ำตาล

(2) incubate เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

(3) ล้างออกด้วยน้ำ

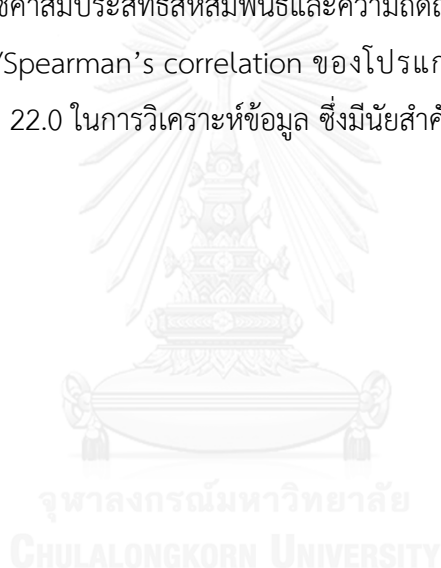
(4) counterstain ด้วยสีย้อม Hematoxilin solution

(5) mounting slides

การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) เป็นสถิติที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรวบรวมข้อมูล และการนำเสนอข้อมูล โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ในรูปแบบกราฟและตาราง

สถิติเชิงอนุมาน (inferential statistic) เป็นสถิติที่ใช้สรุปผลของประชากร เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง ได้แก่ การเปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของยีน/โปรตีน VEGF ระหว่างชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรค/ไม่เกิดรอยโรค และ เพศชาย/หญิง โดยใช้ unpaired t-test เมื่อการกระจายตัวของข้อมูลปกติ และใช้ Mann-Whitney U test เมื่อมีการกระจายของข้อมูลไม่ปกติ ส่วนการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน/โปรตีน VEGF และอายุ/เพศ จะใช้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์และความถดถอยเชิงเส้นตรงที่ได้จากการทดสอบ Pearson's correlation/Spearman's correlation ของโปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 22.0 ในการวิเคราะห์ข้อมูล ซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$



บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

1. การแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคโดยวิธี agarose gel electrophoresis

1.1 การแสดงออกของยีน VEGF ระหว่างชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคในผู้ป่วยรายเดียวกันโดยวิธี agarose gel electrophoresis

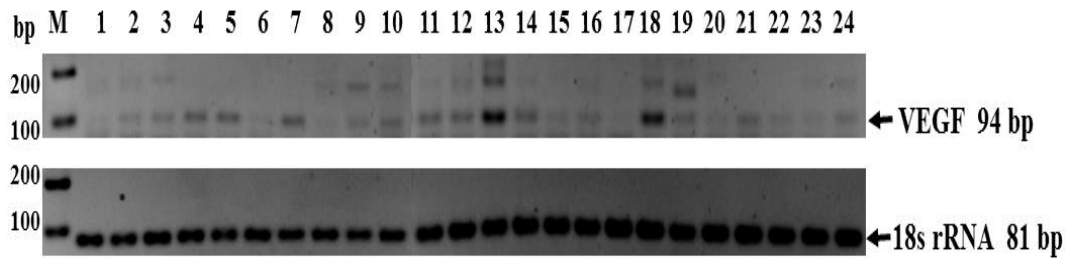
การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนวาสคูลาร์ เอนโดทีเลียล โกรทแฟคเตอร์ หรือ VEGF จากชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคในผู้ป่วยรายเดียวกัน โดยการทำให้ Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction หรือ RT-PCR ของยีนเป้าหมาย VEGF และ 18s rRNA ที่เป็น reference gene และนำ PCR product ไปทำ agarose gel electrophoresis จากนั้นย้อมด้วย ethidium bromide และนำไปส่องดูด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ตโดยเครื่อง Gel Doc 1000 (BIO-RAD, USA) และบันทึกภาพที่ได้ จากภาพแถบตีเอ็นเอที่บันทึกได้พบว่า แถบตีเอ็นเอของยีน VEGF และ 18s rRNA มีขนาด 94 และ 81 คู่เบส ตามลำดับ

จากการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน VEGF ระหว่างชิ้นเอ็น ligamentum flavum (LF) ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคจากภาพแถบการแสดงออกของยีน VEGF ในผู้ป่วย 24 ราย ซึ่งได้จากผลิตภัณฑ์ของ RT-PCR พบว่ามีการแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเอ็นที่เกิดรอยโรคจำนวน 22 ราย และไม่พบการแสดงออกของยีน VEGF จำนวน 2 ราย ส่วนในชิ้นเอ็นที่ไม่เกิดรอยโรคนั้นพบการแสดงออกของยีน VEGF จำนวน 13 ราย และไม่พบการแสดงออกของยีน VEGF จำนวน 11 ราย สำหรับการแสดงออกของ 18s rRNA ซึ่งเป็น reference gene พบว่ามีการแสดงออกในผู้ป่วยทุกรายทั้งในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค (แสดงดังรูปที่ 20)

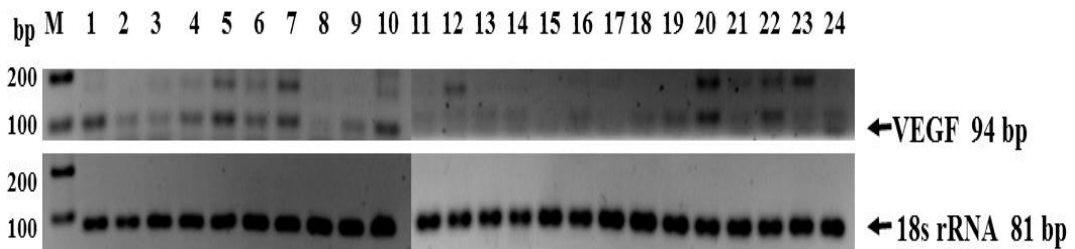
จากการวิเคราะห์ค่าความเข้มของแถบการแสดงออกของยีน VEGF และ 18s rRNA ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคของผู้ป่วยแต่ละรายด้วยโปรแกรม Image lab และนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์อัตราส่วนยีน VEGF:18s rRNA พบว่าจากผู้ป่วยจำนวน 24 ราย มีผู้ป่วยจำนวน 19 ราย ที่มีระดับการแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคมากกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค และพบว่ามีผู้ป่วยจำนวน 3 ราย มีระดับการแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคน้อย

กว่าที่ไม่เกิดรอยโรคเล็กน้อย และมีผู้ป่วยจำนวน 2 ราย ที่ไม่พบอัตราการแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA ทั้งสองกลุ่ม (แสดงดังรูปที่ 21)

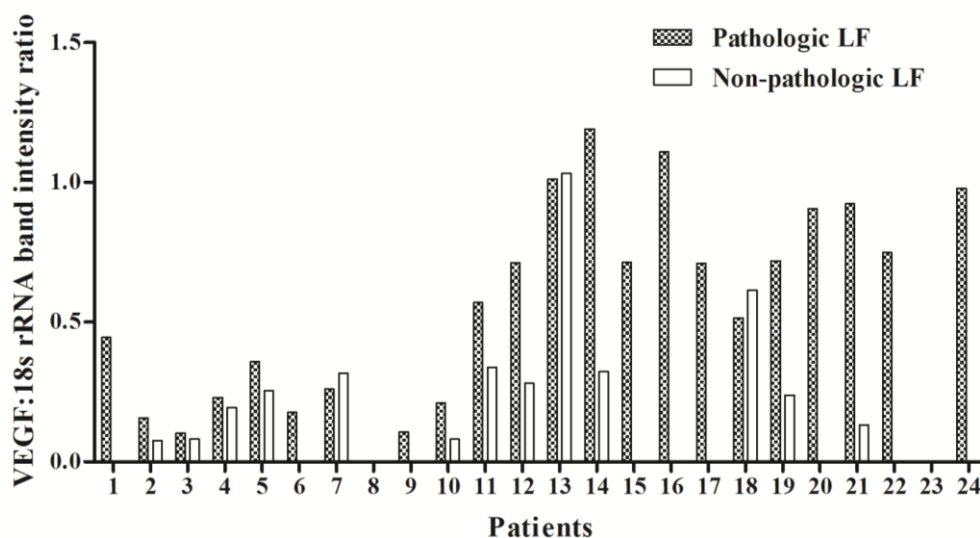
Non-pathologic LF



Pathologic LF



รูปที่ 20 ภาพถ่ายแถบการแสดงออกของยีน VEGF ขนาด 94 คู่เบส และ 18s rRNA ขนาด 81 คู่เบส ของผู้ป่วยแต่ละราย จากการทำ agarose gel electrophoresis โดยใช้ผลิตภัณฑ์จาก RT-PCR, M คือ marker แถวที่ 1-24 คือ การแสดงออกของยีนในผู้ป่วยแต่ละราย

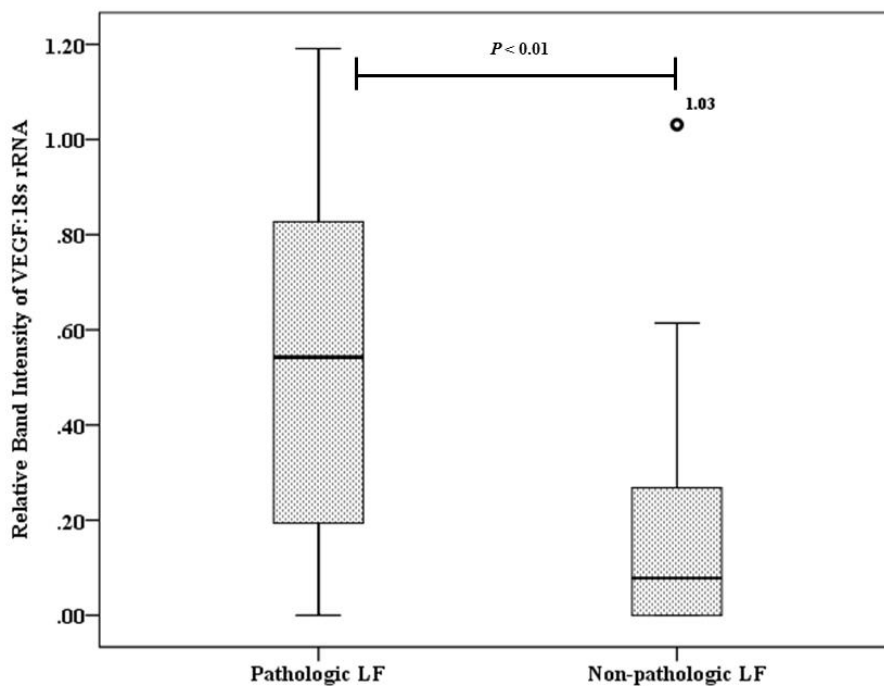


รูปที่ 21 กราฟแท่งแสดงการเปรียบเทียบอัตราส่วนความเข้มของแถบการแสดงผลของยีน VEGF:18s rRNA ระหว่างชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคในผู้ป่วยรายเดียวกันของแต่ละคน

1.2 ความเข้มแถบการแสดงผลของยีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค

จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงผลของยีน VEGF โดยวัดความเข้มของแถบการแสดงผลของยีน VEGF และ 18s rRNA จากชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคที่ได้จากการทำ RT-PCR โดยอาศัยโปรแกรม Image lab และนำค่าความเข้มของแถบการแสดงผลของยีน VEGF และ 18s rRNA ของแต่ละตัวอย่างมาคำนวณอัตราส่วนการแสดงผล พบว่าค่าเฉลี่ยความเข้มของแถบการแสดงผลของยีน VEGF:18s rRNA ในกลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคในผู้ป่วยจำนวน 24 ราย มีค่าเท่ากับ 0.54 ± 0.08 และ 0.17 ± 0.05 (แสดงเป็น mean \pm SEM) ตามลำดับ และจากการเปรียบเทียบความแตกต่างความเข้มของแถบการแสดงผลของยีน VEGF:18s rRNA ระหว่างกลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคนั้นพบว่ากลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคมีการแสดงผลของยีน VEGF มากกว่ากลุ่มชิ้นเอ็นที่ไม่เกิดรอยโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 22 นอกจากนี้พบว่าค่ามัธยฐาน หรือ เปอร์เซ็นไทล์ที่ 50 ของอัตราส่วน VEGF:18s rRNA จากกลุ่มชิ้นเอ็นที่เกิดรอยโรคและกลุ่มที่ไม่เกิดรอยโรคมีค่าเท่ากับ 0.54 และ 0.08 ตามลำดับ (ดังแสดงในเส้นสีดำตรงกลางภายในกราฟ box plot รูปที่ 22) ขอบล่างของ box (เปอร์เซ็นไทล์ที่ 25) ของชิ้นเอ็นทั้งสองกลุ่มมีค่าเท่ากับ 0.19 และ 0 ตามลำดับ ขอบบนของ box

(เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 75) มีค่าเท่ากับ 0.87 และ 0.27 ตามลำดับ สำหรับค่า outlier ที่สูงกว่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 95 มีค่าเท่ากับ 1.17 และ 0.93 ตามลำดับ (ตารางที่ 9)



รูปที่ 22 แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบอัตราส่วนความเข้มแถบการแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA ระหว่างกลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคในผู้ป่วยจำนวน 24 ราย ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางที่ 9 ค่ามัธยฐานของความเข้มแถบการแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มที่เกิดรอยโรคและกลุ่มที่ไม่เกิดรอยโรค

	Median	Percentile 25	Percentile 75	Percentile 95	Mean
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรค (n=24)	0.54	0.19	0.87	1.17	0.54
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรค (n=24)	0.08	0	0.27	0.93	0.17
<i>P</i> *					0.0002

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

2. การแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคโดยวิธี real time RT-PCR

2.1 การแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคของผู้ป่วยรายเดียวกันโดยวิธี real time RT-PCR

ในการศึกษาอัตราการแสดงออกของยีน VEGF และ 18s rRNA (reference gene) โดยเทคนิค real time RT-PCR สามารถได้ค่า threshold cycle (Ct) มาคำนวณปริมาณเชิงเปรียบเทียบ (relative quantitation) ของอัตราส่วนการแสดงออกของยีนเป้าหมายระหว่างชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค โดยผลการเปรียบเทียบแบบ relative quantitation จะแสดงออกมาเป็นจำนวนเท่าของการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันระหว่างชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค (วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ข)

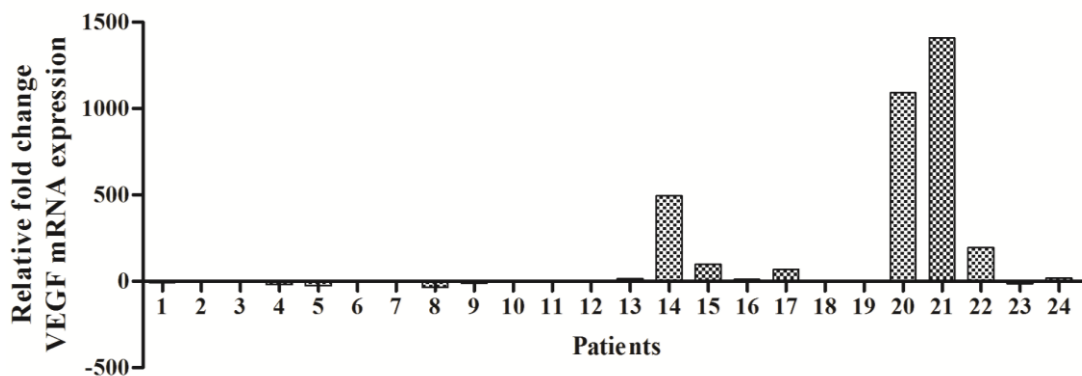
จากการศึกษาในผู้ป่วยจำนวน 23 ราย พบว่ามีการแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคเปรียบเทียบกับที่ไม่เกิดรอยโรคเฉลี่ยแตกต่างกันประมาณ 143 เท่า โดยมีผู้ป่วยจำนวน 11 ราย มีอัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคมากกว่าที่ไม่เกิดรอยโรคเฉลี่ย 309.68 เท่า และผู้ป่วยจำนวน 12 รายที่เหลือมีอัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรคมากกว่าที่เกิดรอยโรคเฉลี่ย 10.61 เท่า แสดงดังตารางที่ 10 และรูปที่ 23

ตารางที่ 10 แสดงค่าจำนวนเท่าในอัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในผู้ป่วยแต่ละราย

ผู้ป่วย	Relative fold change	ความหมาย
1	-6.72	อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคน้อยกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค 6.72 เท่า
2	3.14	อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคมากกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค 3.14 เท่า
3	-2.30	อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคน้อยกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค 2.30 เท่า
4	-19.43	อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคน้อยกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค 19.43 เท่า
5	-25.80	อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคน้อยกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค 25.80 เท่า
6	-5.37	อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคน้อยกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค 5.37 เท่า
7	-4.16	อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคน้อยกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค 4.16 เท่า
8	-34.34	อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคน้อยกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค 34.34 เท่า
9	-10.09	อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคน้อยกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค 10.09 เท่า
10	-2.19	อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคน้อยกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค 2.19 เท่า
11	-1.04	อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคน้อยกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค 1.04 เท่า
12	-2.13	อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคน้อยกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค 2.13 เท่า
13	16.29	อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคมากกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค 16.29 เท่า
14	494.89	อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคมากกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค 494.89 เท่า
15	99.97	อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคมากกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค 99.97 เท่า
16	10.26	อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคมากกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค 10.26 เท่า
17	69.37	อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคมากกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค 69.37 เท่า
18	2.68	อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคมากกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค 2.68 เท่า
19	-	-
20	1090.28	อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคมากกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค 1,090 เท่า
21	1408.89	อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคมากกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค 1,408.89 เท่า
22	193.65	อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคมากกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค 193.65 เท่า
23	-13.77	อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคน้อยกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค 13.77 เท่า
24	17.05	อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคมากกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค 17.05 เท่า

CHULALONGKORN UNIVERSITY

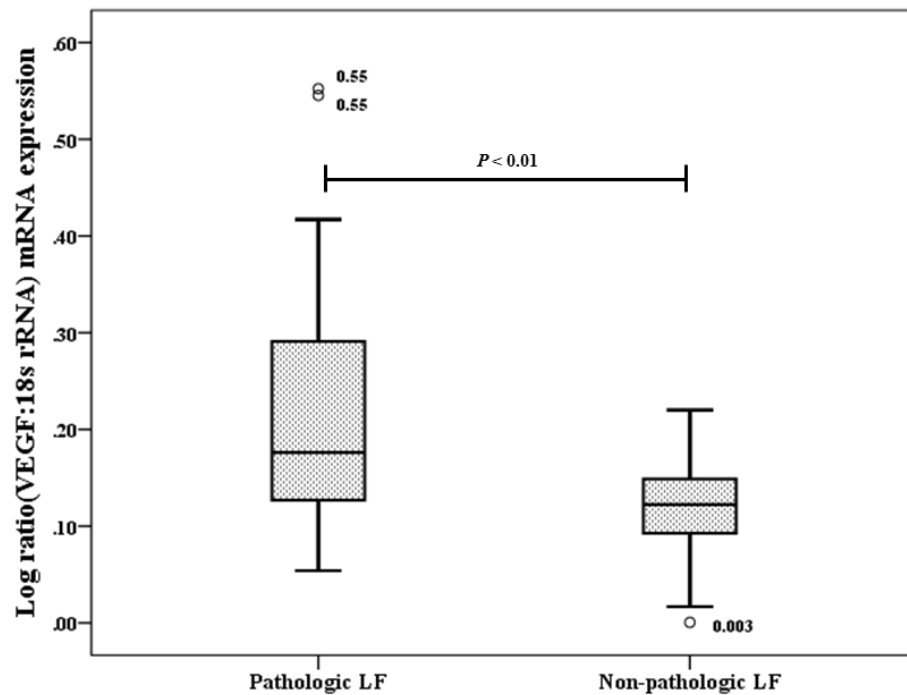
หมายเหตุ หมายเลข 19 อัตราการแสดงออกของยีน VEGF สูงเกินจริง (มากกว่า 10,000 เท่า) จึงไม่นำมาแสดงผล



รูปที่ 23 กราฟแท่งเปรียบเทียบอัตราการแสดงออกของยีน VEGF ระหว่างชิ้นเอ็นที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคในผู้ป่วยแต่ละราย

2.2 ปริมาณสัมบูรณ์การแสดงออกของยีนวาสคูลาร์ เอนโดทีเลียล โกรทแฟคเตอร์ หรือ VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค โดยเมื่อทำ real time RT-PCR ของยีน VEGF และ 18s rRNA (reference gene) ได้ค่า threshold cycle (Ct) ของแต่ละยีน และนำไปเปรียบเทียบกับกราฟตีเอ็นเอมาตรฐานของยีน VEGF และ 18s rRNA ที่ทราบปริมาณ (standard curve) จึงได้ปริมาณสัมบูรณ์ของยีนทั้งสองที่แสดงออกในแต่ละตัวอย่าง (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ข) จากนั้นนำปริมาณสัมบูรณ์ของแต่ละยีนมาคำนวณอัตราส่วนการแสดงออกในแต่ละตัวอย่าง พบว่าค่าเฉลี่ยปริมาณสัมบูรณ์ของยีน VEGF:18s rRNA ในกลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค มีค่าเท่ากับ 0.22 และ 0.11 ตามลำดับ และจากการเปรียบเทียบความแตกต่างในการแสดงออกของยีน VEGF ระหว่างกลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค พบว่าชิ้นเอ็นที่เกิดรอยโรคมีอัตราการแสดงออกของยีน VEGF มากกว่าชิ้นเอ็นที่ไม่เกิดรอยโรคและความต่างนั้นมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 11 และรูปที่ 24 นอกจากนี้พบว่าค่ามัธยฐานหรือเปอร์เซ็นต์ไทล์ของอัตราส่วนปริมาณสัมบูรณ์ VEGF:18s rRNA จากกลุ่มชิ้นเอ็นที่เกิดรอยโรคและกลุ่มที่ไม่เกิดรอยโรคมีค่าเท่ากับ 0.18 และ 0.12 ตามลำดับ (ดังแสดงในเส้นสีดำตรงกลางภายในกราฟ box plot รูปที่ 24) ขอบล่างของ box (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25) ของชิ้นเอ็นทั้งสองกลุ่มมีค่าเท่ากับ 0.12 และ 0.08 ตามลำดับ ขอบบนของ box (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 75) มีค่าเท่ากับ 0.3 และ 0.15 ตามลำดับ สำหรับค่า outlier ที่สูงกว่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 95 มีค่าเท่ากับ 0.55 และ 0.22 ตามลำดับ (ตารางที่ 11)



รูปที่ 24 แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบปริมาณสัมบูรณ์การแสดงออกของยีน VEGF ระหว่างกลุ่มชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคในผู้ป่วยจำนวน 23 ราย ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.004$)

ตารางที่ 11 ค่ามัธยฐานอัตราส่วนปริมาณสัมบูรณ์การแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มที่เกิดรอยโรคและกลุ่มที่ไม่เกิดรอยโรค

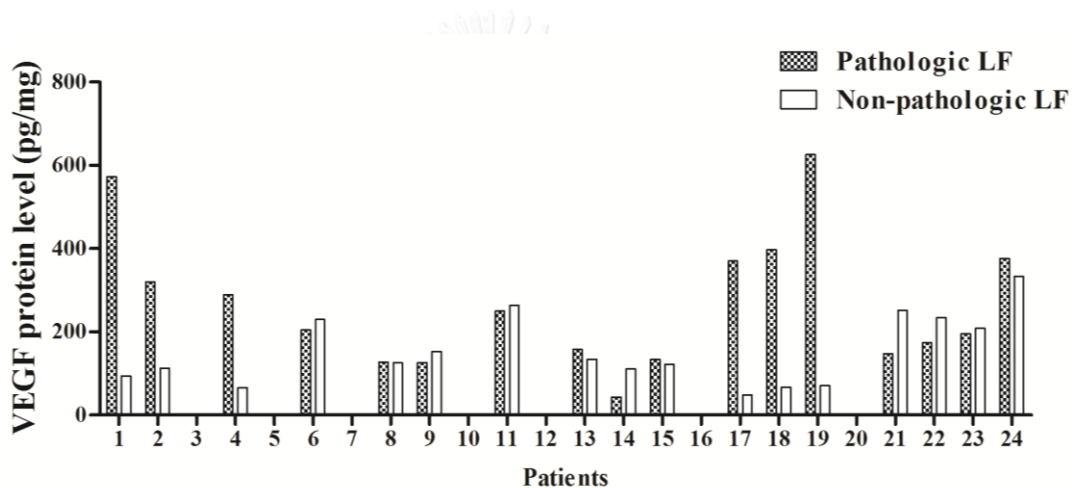
	Median	Percentile 25	Percentile 75	Percentile 95	Mean
กลุ่มชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรค (n=23)	0.18	0.12	0.3	0.55	0.22
กลุ่มชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรค (n=23)	0.12	0.08	0.15	0.22	0.11
P^*					0.004

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

3. ปริมาณโปรตีน VEGF ระหว่างชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค

3.1 ปริมาณโปรตีน VEGF ระหว่างชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคของผู้ป่วยรายเดียวกัน

การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน VEGF ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรค ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ในผู้ป่วยจำนวน 17 ราย พบว่า ผู้ป่วยจำนวน 10 ราย มีการแสดงออกของโปรตีน VEGF ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคมากกว่าที่ไม่เกิดรอยโรค และมีผู้ป่วยจำนวน 7 ราย ที่มีการแสดงออกของโปรตีน VEGF ในชั้นเอ็นที่ไม่เกิดรอยโรคมากกว่าที่เกิดรอยโรค (แสดงดังรูปที่ 25)



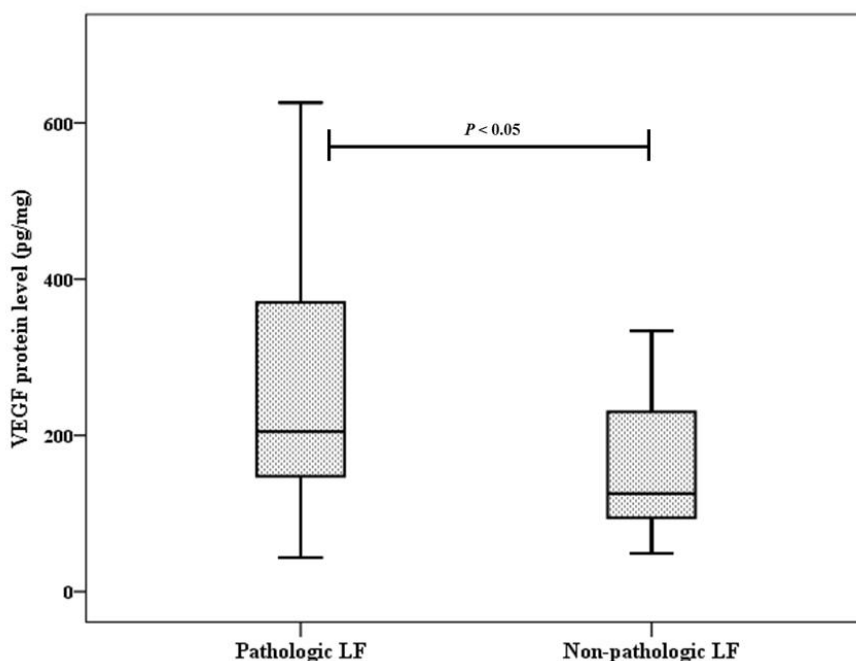
รูปที่ 25 กราฟแท่งแสดงเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน VEGF ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคของผู้ป่วยรายเดียวกันในแต่ละคน

หมายเหตุ หมายเลข 3, 5, 7, 10, 12, 16, 20 ปริมาณตัวอย่างไม่เพียงพอ จึงไม่แสดงข้อมูล

3.2 ปริมาณโปรตีน VEGF โดยรวมในชั้นเอ็น ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มที่เกิดรอยโรคและกลุ่มที่ไม่เกิดรอยโรค

ผลการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน VEGF ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มที่เกิดรอยโรคและกลุ่มที่ไม่เกิดรอยโรค โดยเมื่อทำ ELISA จึงได้ปริมาณโปรตีน VEGF และนำไปคำนวณอัตราส่วนระดับของโปรตีน VEGF ต่อปริมาณโปรตีนรวมของแต่ละตัวอย่างซึ่งปริมาณโปรตีนรวมของแต่ละตัวอย่างมาจากการทำ bicinchoninic acid assay (BCA assay) จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีน VEGF ที่เทียบสัดส่วนต่อปริมาณโปรตีนรวมในแต่ละตัวอย่างแล้ว พบว่าค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีน VEGF ในกลุ่มชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและที่ไม่เกิดรอย

โรค มีค่าเท่ากับ 265.61 ± 39.12 และ 154.59 ± 20.23 พิโคกรัม/มิลลิกรัม (แสดงเป็น mean \pm SEM) ตามลำดับ ดังแสดงใน และจากการเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับโปรตีน VEGF ระหว่างกลุ่มชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและที่ไม่เกิดรอยโรคนั้นพบว่ากลุ่มชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคมีระดับโปรตีน VEGF มากกว่ากลุ่มชั้นเอ็นที่ไม่เกิดรอยโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 26 และตารางที่ 12 นอกจากนี้พบว่าค่ามัธยฐาน หรือ เปอร์เซ็นไทล์ที่ 50 ของอัตราส่วน VEGF:18s rRNA จากกลุ่มชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคและกลุ่มที่ไม่เกิดรอยโรคมีค่าเท่ากับ 204.96 และ 125.36 พิโคกรัม/มิลลิกรัม ตามลำดับ (ดังแสดงในเส้นสีดำตรงกลางภายในกราฟ box plot รูปที่ 26) ขอบล่างของ box (เปอร์เซ็นไทล์ที่ 25) ของชั้นเอ็นทั้งสองกลุ่มมีค่าเท่ากับ 140.79 และ 82.94 พิโคกรัม/มิลลิกรัม ตามลำดับ ขอบบนของ box (เปอร์เซ็นไทล์ที่ 75) มีค่าเท่ากับ 373.15 และ 231.91 พิโคกรัม/มิลลิกรัม ตามลำดับ และค่าoutlier ที่สูงกว่า เปอร์เซ็นไทล์ที่ 95 มีค่าเท่ากับ 626.0 และ 333.7 พิโคกรัม/มิลลิกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 12)



รูปที่ 26 แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน VEGF ระหว่างกลุ่มชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและที่ไม่เกิดรอยโรคในผู้ป่วยจำนวน 17 ราย ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 12 ค่ามัธยฐานปริมาณโปรตีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระหว่างกลุ่มที่เกิดรอยโรคและกลุ่มที่ไม่เกิดรอยโรค

	Median (pg/mg)	Percentile 25 (pg/mg)	Percentile 75 (pg/mg)	Percentile 95 (pg/mg)	Mean (pg/mg)
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรค (n=17)	204.96	140.79	373.15	626.0	265.61
กลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรค (n=17)	125.36	82.94	231.91	333.7	154.59
<i>p</i> *					0.017

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการทดสอบโดยใช้ unpaired *t*-test, $P < 0.05$ ถือว่าความแตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

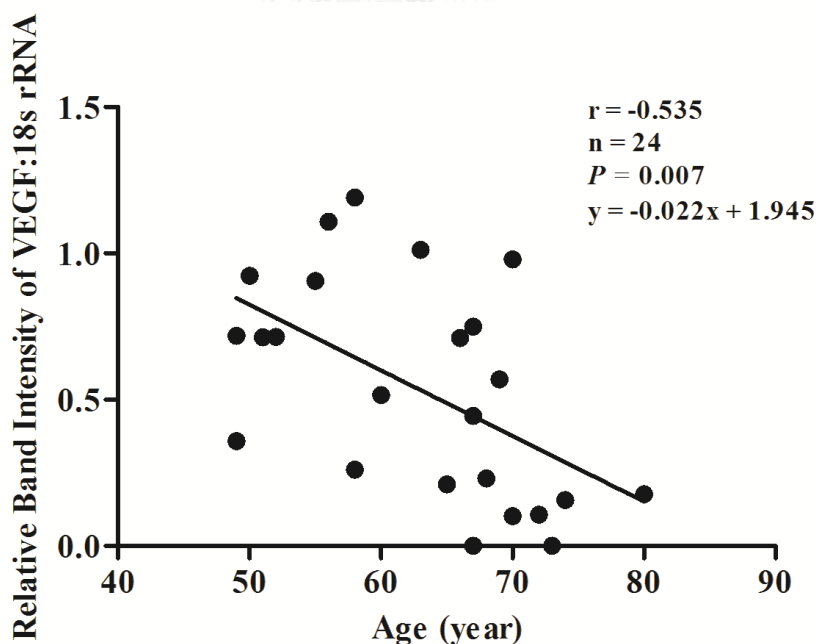
4. ความสัมพันธ์ของระหว่างการแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum และอายุผู้ป่วย

4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของการแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum และอายุผู้ป่วย

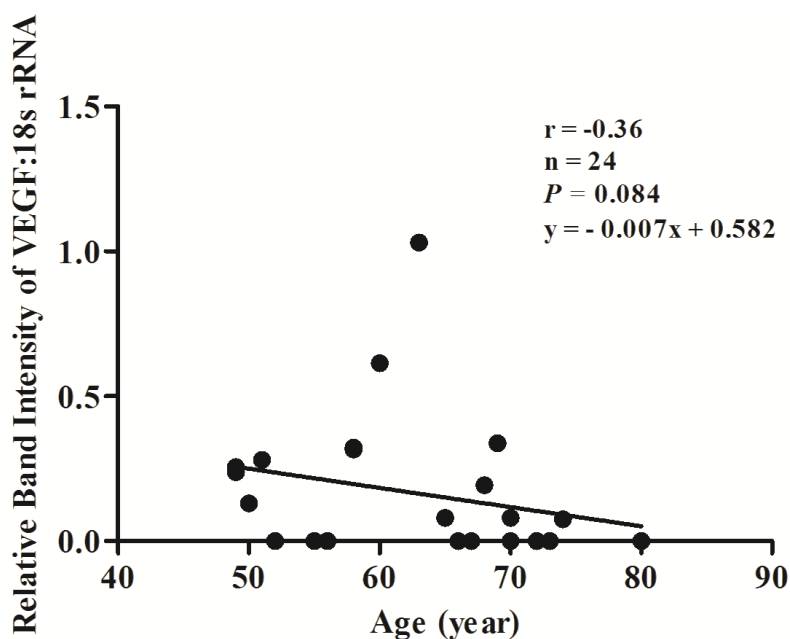
จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน VEGF จากชิ้นเนื้อ ligamentum flavum ในตำแหน่งที่เกิดรอยโรค โดยการวัดความเข้มข้นของแถบการแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA ที่ได้จากการทำ RT-PCR และนำไปคำนวณความสัมพันธ์กับอายุ โดยการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (pearson's correlation coefficient หรือ *r*) เพื่อดูระดับความสัมพันธ์ ซึ่งสามารถแปลผลได้ดังนี้ ค่า *r* อยู่ระหว่าง 0.8-1 แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมาก ค่า *r* อยู่ระหว่าง 0.5-0.8 แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันปานกลาง ค่า *r* อยู่ระหว่าง 0.2-0.5 แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันเล็กน้อย และถ้าค่า *r* น้อยกว่า 0.2 แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน (61) นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์ความถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression) เพื่อใช้พิจารณาค่าทำนายสำคัญทางสถิติของความสัมพันธ์ ซึ่งทั้งค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์และความถดถอยเชิงเส้นตรงสามารถวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS 22.0

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแถบการแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคกับอายุผู้ป่วย โดยใช้สถิติ Pearson test พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ระหว่างชิ้นเอ็นที่เกิดรอยโรคกับอายุผู้ป่วย มีค่าเท่ากับ -0.535 ดังแสดงในรูปที่ 27 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน VEGF มีความสัมพันธ์กับอายุผู้ป่วยปานกลางในลักษณะแปรผกผันกันเนื่องจากค่า r ติดลบ และจากการทดสอบค่านัยสำคัญทางสถิติของความสัมพัทธ์ระหว่างความเข้มแถบการแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคกับอายุผู้ป่วย พบว่าการแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเอ็นที่เกิดรอยโรคมีความสัมพันธ์กับอายุในลักษณะแปรผกผันกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.007$)

ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแถบดีเอ็นเอของยีน VEGF:18s rRNA ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรคกับอายุผู้ป่วย โดยใช้ Spearman test (เนื่องจากการกระจายตัวของข้อมูลไม่ปกติ) พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ระหว่างชิ้นเอ็นที่ไม่เกิดรอยโรคกับอายุผู้ป่วย มีค่าเท่ากับ -0.36 ดังแสดงในรูปที่ 28 และจากการทดสอบค่านัยสำคัญทางสถิติของความสัมพัทธ์ดังกล่าว พบว่าการแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรคมีความสัมพันธ์กับอายุผู้ป่วยเล็กน้อยแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.084$)



รูปที่ 27 กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของแถบการแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและอายุผู้ป่วย



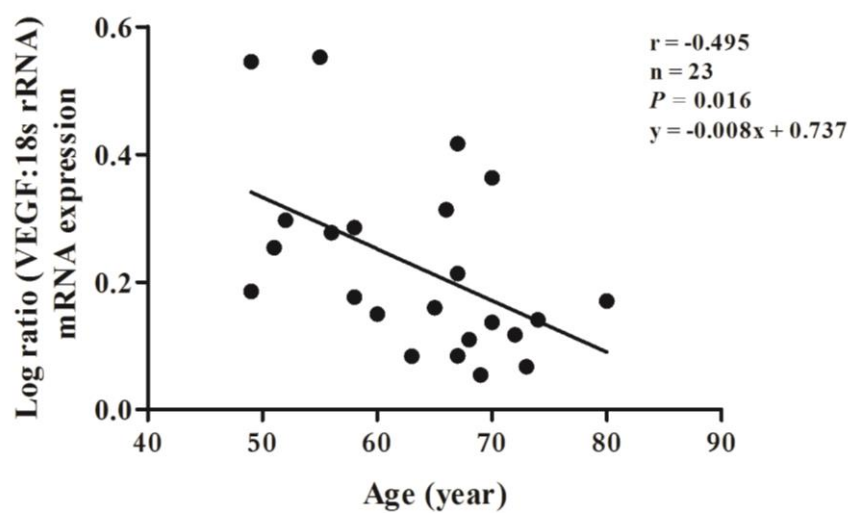
รูปที่ 28 กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของแถบการ แสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรคและอายุผู้ป่วย

4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum และ อายุผู้ป่วย

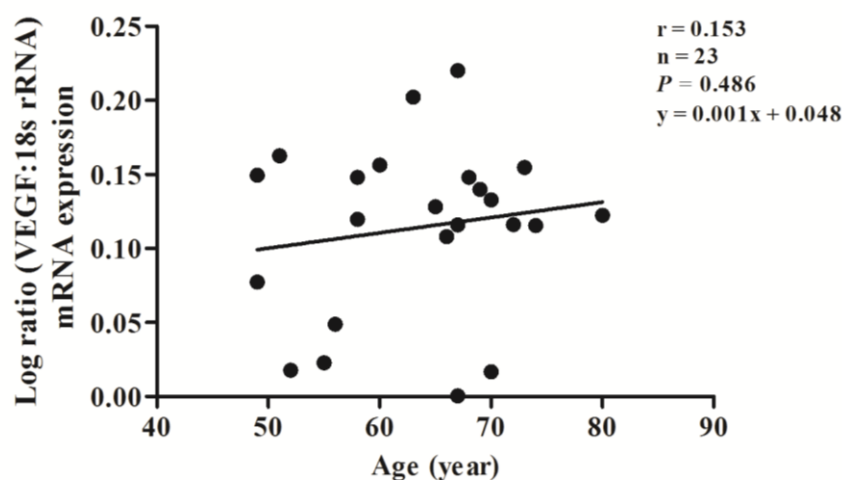
การวิเคราะห์อัตราการแสดงออกระหว่างยีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิด รอยโรคและไม่เกิดรอยโรค โดยวิเคราะห์โดยการคำนวณหาปริมาณเชิงสัมบูรณ์ (absolute quantitation) ของแต่ละกลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เปรียบเทียบกับกัน เมื่อได้ค่าการ แสดงออกในวิธีต่าง ๆ แล้วนำค่าที่ได้ไปหาความสัมพันธ์กับอายุโดยดูจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient หรือค่า r) ที่คำนวณโดยโปรแกรม SPSS 22.0

เมื่อนำค่าอัตราการแสดงออกของยีน VEGF ที่คำนวณแบบปริมาณเชิงสัมบูรณ์ (absolute quantitation) ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคไปหาความสัมพันธ์กับอายุโดยใช้สถิติ Pearson test และพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) พบว่ามีค่าเท่ากับ -0.495 ดังแสดงใน รูปที่ 29 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่ เกิดรอยโรคมีความสัมพันธ์กับอายุผู้ป่วยเล็กน้อยในลักษณะแปรผกผันกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.016$)

ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการแสดงออกของยีน VEGF ที่คำนวณแบบปริมาณเชิงสัมบูรณ์ (absolute quantitation) ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรคไปหาความสัมพันธ์กับอายุโดยใช้สถิติ Pearson test และพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.153 ดังแสดงในรูปที่ 30 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคไม่มีความสัมพันธ์กับอายุผู้ป่วย ($P=0.486$)



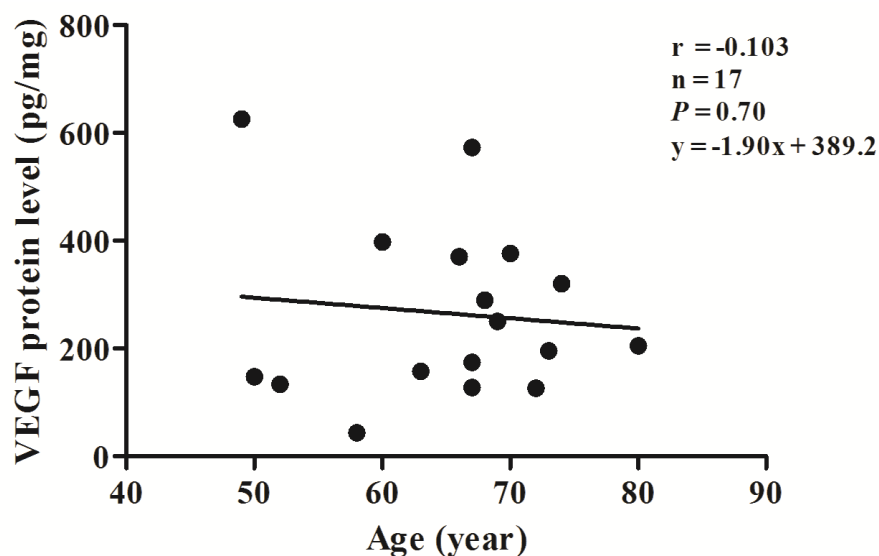
รูปที่ 29 กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการแสดงออกของยีน VEGF ที่คำนวณแบบปริมาณสัมบูรณ์ (absolute quantitation) ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคกับอายุผู้ป่วย



รูปที่ 30 กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการแสดงออกของยีน VEGF ที่คำนวณแบบปริมาณสัมบูรณ์ (absolute quantitation) ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรคกับอายุผู้ป่วย

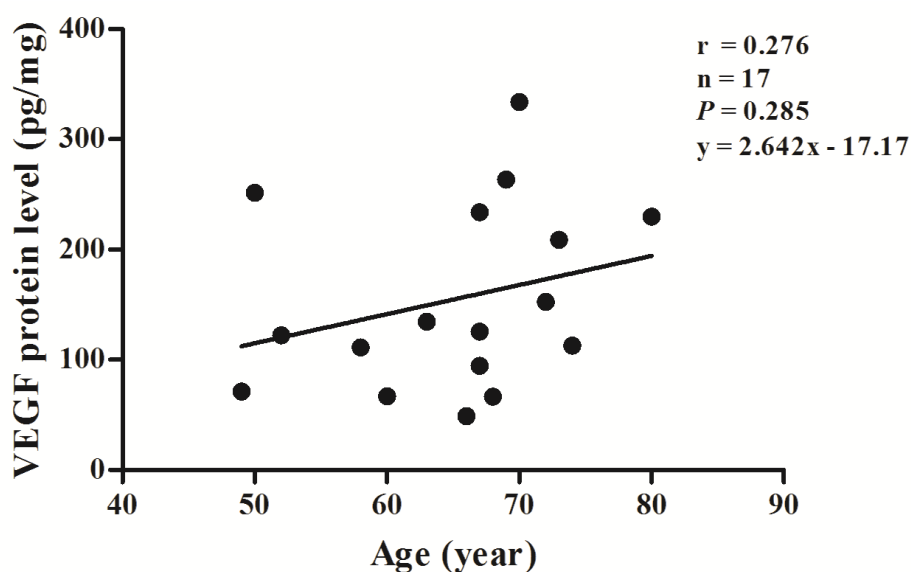
4.3 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum และอายุผู้ป่วย

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและที่ไม่เกิดรอยโรค และนำไปหาความสัมพันธ์กับอายุ จากนั้นคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) จากการทดสอบ Pearson test โดยผลการวิเคราะห์พบว่า r มีค่าเท่ากับ -0.103 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณโปรตีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคไม่มีความสัมพันธ์กับอายุ ($P=0.70$) ดังแสดงในรูปที่ 31



รูปที่ 31 กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคกับอายุผู้ป่วย

ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรคกับอายุผู้ป่วย โดยใช้ Pearson test พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มีค่าเท่ากับ 0.276 แสดงให้เห็นว่าปริมาณโปรตีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรคมีความสัมพันธ์กับอายุผู้ป่วยเล็กน้อยในลักษณะแปรผันตรง แต่จากการทดสอบค่านัยสำคัญทางสถิติของความสัมพันธ์ดังกล่าว พบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.285$) ดังแสดงในรูปที่ 32



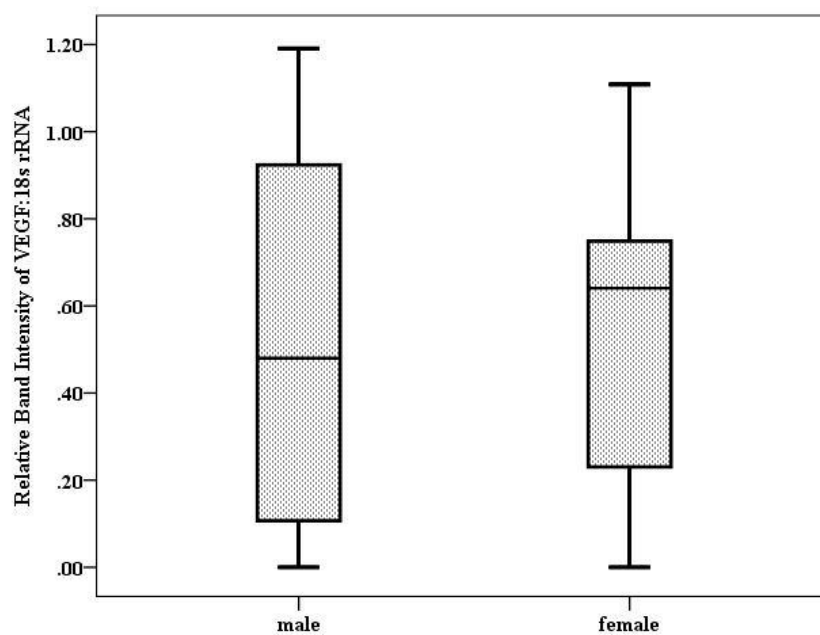
รูปที่ 32 กราฟการกระจายตัว (scatter diagram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรคกับอายุผู้ป่วย

5. ผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระหว่างเพศชายและหญิง

5.1 ความเข้มข้นของการแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระหว่างเพศชายและหญิง

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคระหว่างเพศชายและหญิง ในผู้ป่วยเพศชายจำนวน 10 ราย และผู้ป่วยเพศหญิงจำนวน 14 ราย โดยวัดความเข้มข้นของแถบการแสดงออกที่ได้จากการทำ RT-PCR ด้วยโปรแกรม Image lab และนำค่าความเข้มข้นของแถบการแสดงออกที่ได้มาคิดอัตราส่วนยีน VEGF:18s rRNA ในเพศชายและหญิง พบว่าค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของแถบการแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคของเพศชายและหญิง มีค่าเท่ากับ 0.52 ± 0.13 และ 0.55 ± 0.09 ตามลำดับ (แสดงเป็น mean \pm SEM) และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของความเข้มข้นของแถบการแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคระหว่างเพศชายและหญิง พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเพศชายและหญิง ($P > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 13 รูปที่ 33 ในการศึกษาพบว่าค่ามัธยฐานหรือ เปอร์เซ็นไทล์ที่ 50 ค่าความเข้มข้นของแถบการแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA จากกลุ่มชิ้นเอ็นที่เกิดรอยโรคในเพศชายและหญิงมีค่าเท่ากับ 0.48 และ 0.64 ตามลำดับ (ดังแสดงในเส้นสีดำตรงกลางภายในกราฟ box plot รูปที่ 33) ขอบล่างของ box

(เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25) ของชิ้นเอ็นในเพศชายและหญิงมีค่าเท่ากับ 0.11 และ 0.22 ตามลำดับ ขอบบนของ box (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 75) มีค่าเท่ากับ 0.94 และ 0.79 ตามลำดับ และค่า outlier ที่สูงกว่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 95 มีค่าเท่ากับ 1.19 และ 1.11 ตามลำดับ (ตารางที่ 13)



รูปที่ 33 แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความเข้มแถบการแสดงผลของยีน VEGF:18s rRNA ระหว่างเพศชายและหญิงในกลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคในผู้ป่วยจำนวนเพศชาย จำนวน 10 ราย และผู้ป่วยเพศหญิง จำนวน 14 ราย ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$)

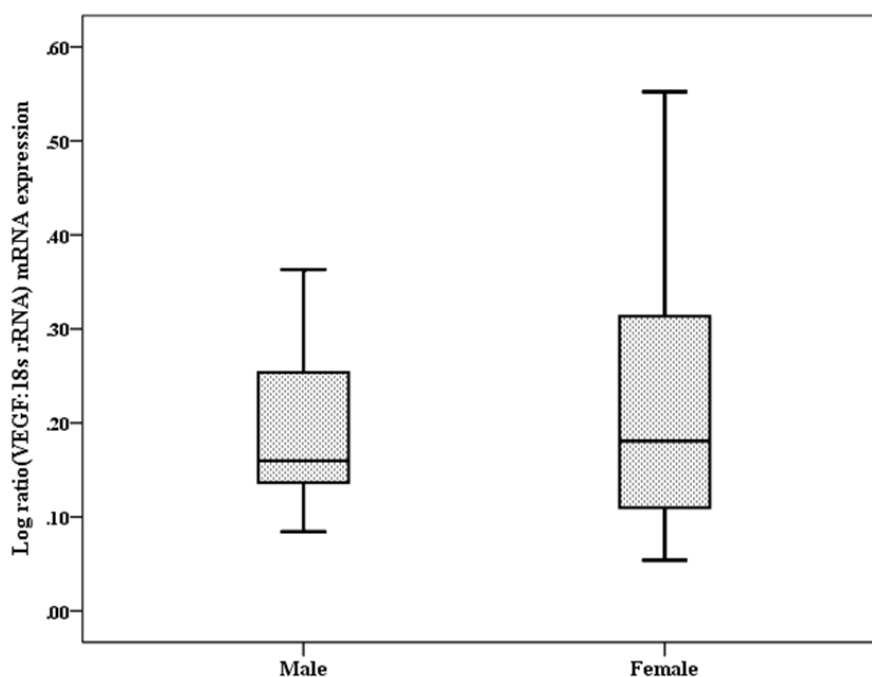
ตารางที่ 13 ค่ามัธยฐานความเข้มแถบการแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคระหว่างเพศชายและหญิง

	Median	Percentile 25	Percentile 75	Percentile 95	Mean
เพศชาย (n=10)	0.48	0.11	0.94	1.19	0.52
เพศหญิง (n=14)	0.64	0.22	0.79	1.11	0.55
<i>P</i>					0.85

ทดสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้ unpaired *t*-test, *P*>0.05 ถือว่าความแตกต่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

5.2 อัตราการแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระหว่างผู้ป่วยเพศชายและหญิง

การวิเคราะห์อัตราการแสดงออกของยีน VEGF โดยการหาปริมาณเชิงสัมบูรณ์ (absolute quantitation) ของยีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคระหว่างเพศชายและหญิง จากผลการศึกษาพบว่า ค่าเฉลี่ยอัตราแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคของเพศชายและหญิง มีค่าเท่ากับ 0.19 ± 0.03 และ 0.24 ± 0.24 ตามลำดับ (แสดงเป็น mean \pm SEM) และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของอัตราแสดงออกของยีน VEGF โดยการหาปริมาณเชิงสัมบูรณ์ (absolute quantitation) ของยีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคระหว่างเพศชายและหญิง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างเพศชายและเพศหญิง (*P*>0.05) และในการศึกษาพบว่าค่ามัธยฐาน (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 50) ของอัตราแสดงออกของยีน VEGF ของเพศชายและหญิง มีค่าเท่ากับ 0.16 และ 0.18 ตามลำดับ ขอบล่างของ box (ค่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25) มีค่าเท่ากับ 0.13 และ 0.10 ตามลำดับ ส่วนขอบบนของ box (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 75) มีค่าเท่ากับ 0.27 และ 0.34 ตามลำดับ ค่า outlier ที่สูงกว่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 95 มีค่าเท่ากับ 0.36 และ 0.55 ตามลำดับ (ตารางที่ 14 และรูปที่ 34)



รูปที่ 34 แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการแสดงออกของยีน VEGF ที่คำนวณแบบปริมาณเชิงสัมบูรณ์ (absolute quantitation) ระหว่างเพศชายและหญิงในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรค ในผู้ป่วยเพศชาย 9 ราย และผู้ป่วยเพศหญิง 14 ราย ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

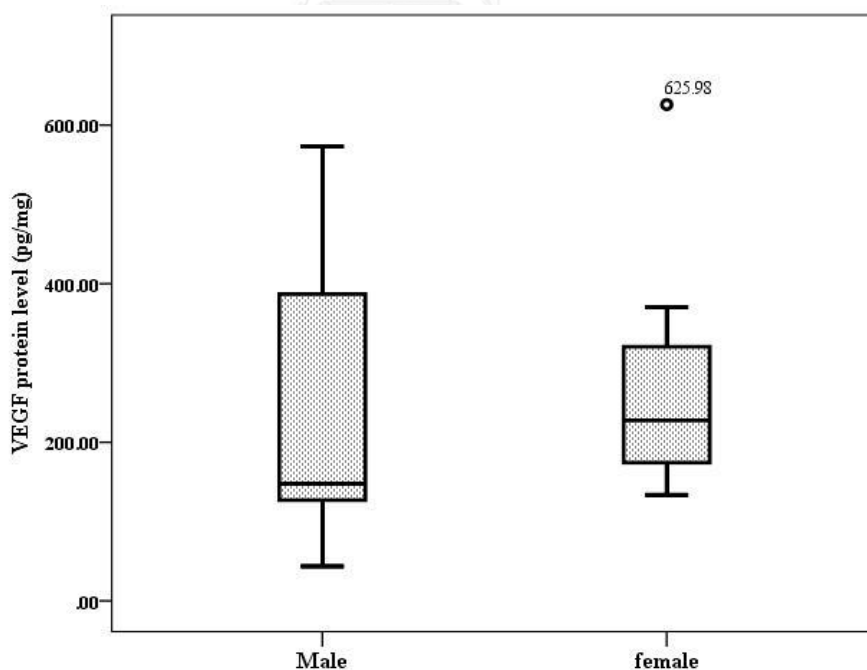
ตารางที่ 14 ค่ามัธยฐานอัตราการแสดงออกของยีน VEGF โดยการหาปริมาณเชิงสัมบูรณ์ (absolute quantitation) ของยีน VEGF ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคระหว่างเพศชายและหญิง

	Median	Percentile 25	Percentile 75	Percentile 95	Mean
เพศชาย (n=9)	0.16	0.13	0.27	0.36	0.19
เพศหญิง (n=14)	0.18	0.1	0.34	0.55	0.24
<i>P</i>					0.456

ทดสอบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ unpaired *t*-test,
 $P > 0.05$ ถือว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

5.3 ปริมาณโปรตีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ระหว่างผู้ป่วยเพศชายและหญิง

ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณโปรตีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคระหว่างเพศชายและหญิง ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีน VEGF ในกลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคของเพศชายและหญิง มีค่าเท่ากับ 256.00 ± 73.21 และ 272.33 ± 45.96 พิกโคกรัม/มิลลิกรัม (แสดงเป็น mean \pm SEM) ตามลำดับ และจากการเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับโปรตีน VEGF ในกลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคระหว่างเพศชายและหญิงนั้น พบว่ากลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคในเพศหญิงมีระดับโปรตีน VEGF มากกว่าเพศชายแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 35 และตารางที่ 15 และยังพบว่าค่ามัธยฐาน หรือ เปอร์เซ็นไทล์ที่ 50 ของปริมาณโปรตีน VEGF จากกลุ่มชิ้นเอ็นที่เกิดรอยโรคในเพศชายและหญิงมีค่าเท่ากับ 147.8 และ 227.5 พิกโคกรัม/มิลลิกรัม ตามลำดับ (ดังแสดงในเส้นสีแดงตรงกลางภายในในกราฟ box plot รูปที่ 35) ขอบล่างของ box (เปอร์เซ็นไทล์ที่ 25) ของชิ้นเอ็นในเพศชายและหญิงมีค่าเท่ากับ 126.4 และ 170.1 พิกโคกรัม/มิลลิกรัม ตามลำดับ ขอบบนของ box (เปอร์เซ็นไทล์ที่ 75) มีค่าเท่ากับ 397.7 และ 332.9 พิกโคกรัม/มิลลิกรัม ตามลำดับ และค่า outlier ที่สูงกว่าเปอร์เซ็นไทล์ที่ 95 มีค่าเท่ากับ 573.0 และ 625.98 พิกโคกรัม/มิลลิกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 15)



รูปที่ 35 แผนภูมิกล่อง (box plot) แสดงการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน VEGF ระหว่างเพศชายและหญิงในกลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรค ในผู้ป่วยจำนวนเพศชาย จำนวน 7 ราย และผู้ป่วยเพศหญิง จำนวน 10 ราย ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 15 ค่ามัธยฐานของปริมาณโปรตีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรค ระหว่างเพศชายและหญิง

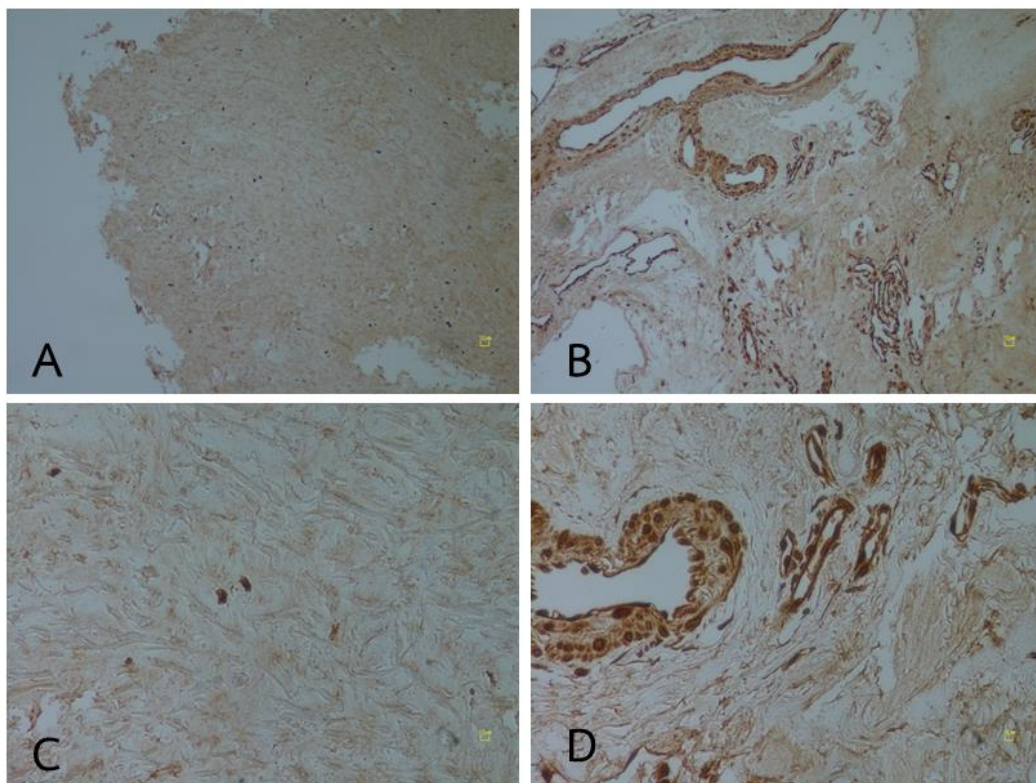
	Median (pg/mg)	Percentile 25 (pg/mg)	Percentile 75 (pg/mg)	Percentile 95 (pg/mg)	Mean (pg/mg)
เพศชาย (n=7)	147.8	126.4	397.7	573.0	256
เพศหญิง (n=10)	227.5	170.1	332.9	625.98	272.3
<i>P</i>					0.54

ทดสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้ Mann-Whitney U test,
 $P > 0.05$ ถือว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ



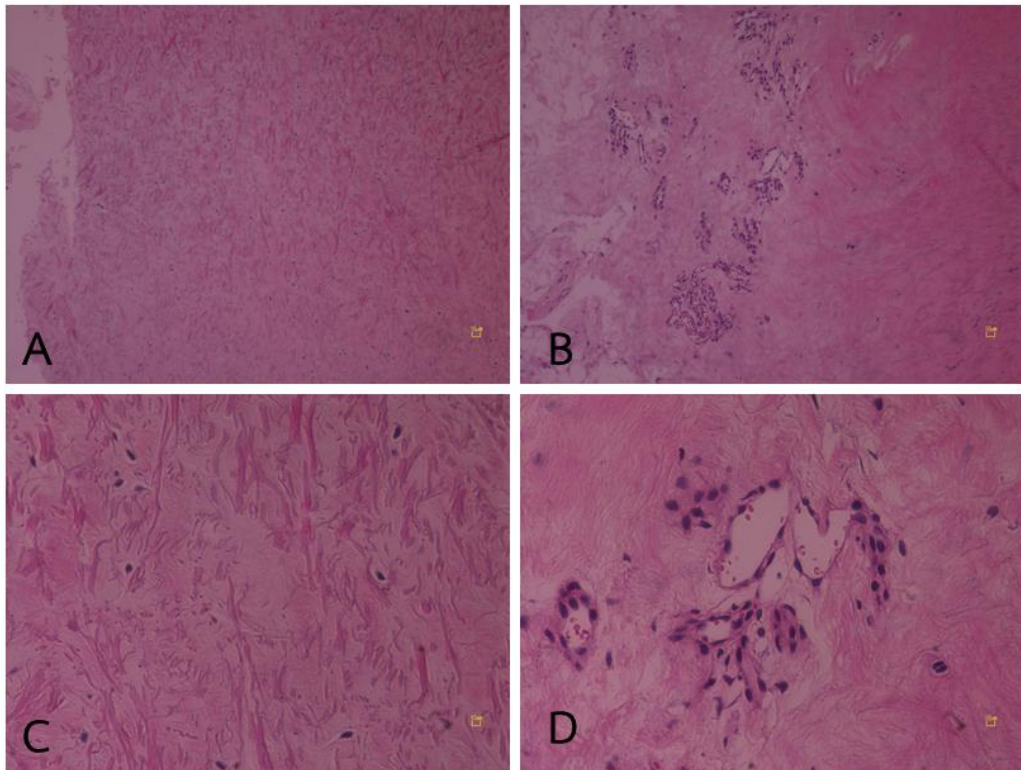
6. ผลการแสดงออกของโปรตีน VEGF ในชั้นเอ็น ligamentum flavum จากการศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนพยาธิวิทยา (immunohistochemistry)

การศึกษาอิมมูโนพยาธิวิทยาของโปรตีน VEGF พบว่าภายในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรค มีการแสดงออกของ VEGF อย่างหนาแน่นและมีลักษณะของหลอดเลือดกระจายอยู่จำนวนมาก อีกทั้งยังพบเซลล์ไฟโบรบลาสต์อยู่ล้อมรอบเซลล์บุผิวหลอดเลือด (endothelial cells) ส่วนชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรคไม่พบลักษณะของหลอดเลือดเกิดขึ้นและพบการย้อมติดโปรตีน VEGF เล็กน้อยเมื่อเทียบกับการย้อมติดโปรตีน VEGF ภายในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรค (รูปที่ 36)



รูปที่ 36 การย้อมโปรตีน VEGF ด้วยเทคนิค immunohistochemistry ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรค (A,C) และที่เกิดรอยโรค (B,D) (กำลังขยาย (A,B) x 100, (C,D) x 400)

ในการย้อม Hematoxylin และ Eosin เพื่อดูลักษณะทางกายวิภาคของเนื้อเยื่อพบว่าภายในชั้นเอ็นที่ไม่เกิดพยาธิสภาพพบเซลล์ไฟโบรบลาสต์อยู่ทั่วไปของพื้นที่ ขณะที่ภายในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดพยาธิสภาพพบลักษณะของหลอดเลือดเกิดขึ้นจำนวนมากโดยเซลล์ที่พบได้แก่ vascular endothelial cells สามารถสังเกตเห็นเซลล์เม็ดเลือดแดงกระจายอยู่เล็กน้อยภายในหลอดเลือด และบริเวณพื้นเนื้อเยื่อทั่วไปพบเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (รูปที่ 37)



รูปที่ 37 การย้อม Hematoxylin และ Eosin ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรค (A,C) และที่เกิดรอยโรค (B,D) (กำลังขยาย (A,B) $\times 100$, (C,D) $\times 400$)

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

โรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบเป็นโรคที่พบได้บ่อยในผู้สูงอายุ ซึ่งพบว่าการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum นั้นเป็นพยาธิสภาพที่สำคัญของโรคนี้ งานวิจัยหลายเรื่องที่ผ่านมาได้มุ่งเน้นศึกษาการแสดงออกของยีนและโปรตีน ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพดังกล่าว เช่น TGF- β , CTGF, bFGF, MMPs, TIMPs เป็นต้น ยีนและโปรตีนเหล่านี้ส่งผลต่อการเกิดพังผืด (fibrosis) ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับยีน VEGF ที่ส่งผลต่อการสร้างหลอดเลือดใหม่และการซ่อมแซมเนื้อเยื่ออาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการหนาตัวของชิ้นเอ็นดังกล่าวนี้เป็นเรื่องที่น่าสนใจ เพื่อช่วยอธิบายกระบวนการเกิดพยาธิสภาพของการเกิดรอยโรคซึ่งมีการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ในผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนและโปรตีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคจากผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบในรายเดียวกัน ผลจากการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนระหว่างชิ้นเอ็นที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคในผู้ป่วยแต่ละราย ด้วยวิธี RT-PCR โดยอาศัยการวิเคราะห์แถบความเข้มของการแสดงออก พบว่าการแสดงออกของยีน VEGF ในผู้ป่วยจำนวน 24 ราย มีผู้ป่วยจำนวน 20 ราย ที่มีระดับการแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคมากกว่าที่ไม่เกิดรอยโรคและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม และทำการศึกษายืนยันด้วยวิธี real time RT-PCR ในชิ้นเอ็นจากผู้ป่วยจำนวน 23 ราย พบว่ามีการแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum กลุ่มที่เกิดรอยโรคเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่เกิดรอยโรคเฉลี่ยแตกต่างกันประมาณ 143 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มโดยปริมาณเชิงสัมบูรณ์ พบว่า ในกลุ่มชิ้นเอ็นที่เกิดรอยโรคมีอัตราค่าเฉลี่ย VEGF:18s rRNA มากกว่ากลุ่มที่ไม่เกิดรอยโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากผลการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน VEGF ในชิ้นเอ็นที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคของผู้ป่วยรายเดียวกัน โดยวิธี ELISA พบว่าปริมาณโปรตีน VEGF ในกลุ่มชิ้นเอ็นที่เกิดรอยโรคมีมากกว่ากลุ่มที่ไม่เกิดรอยโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ถึงแม้ว่าการแสดงออกของ VEGF ระดับ mRNA ที่ศึกษาทั้งจากความเข้มแถบการแสดงออกของยีน และ real time RT-PCR จะมีบางรายที่ให้ผลขัดแย้งกัน ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ VEGF ระดับ mRNA และโปรตีนในผู้ป่วยรายเดียวกันแล้วสามารถสังเกตได้ว่าผู้ป่วยส่วนมากมีผลการแสดงออก

ของ VEGF ระดับ mRNA สอดคล้องกับการแสดงออกของโปรตีน ในการส่งสัญญาณในวิถีกลไกของ VEGF ที่สามารถก่อให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่ได้นั้นจำเป็นต้องใช้ VEGF ในรูปของโปรตีนเพื่อจับกับโปรตีนตัวรับและก่อให้เกิด angiogenic cascade ได้ ฉะนั้นในการวิเคราะห์การแสดงออกของ VEGF ที่ส่งผลเกี่ยวเนื่องกับการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum จึงยึดถือผลการแสดงออกในระดับโปรตีน ส่วนการแสดงออกของ VEGF ในระดับ mRNA ซึ่งยังอยู่ในขั้นตอนของการถอดรหัสสารพันธุกรรม (transcription) อาจจะมีมากหรือมีน้อยกว่า VEGF ระดับโปรตีนก็ได้ เนื่องจากยังไม่ผ่านขั้นตอนของการแปลรหัส (translation) เป็นโปรตีน แต่เมื่อศึกษาโดยรวมแล้วทั้งการแสดงออกของ VEGF ในระดับการถอดรหัส (transcription) และการแปลรหัสสารพันธุกรรม (translation) ที่ศึกษาในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ได้พบว่ามี การแสดงออกของ VEGF ทั้งระดับ mRNA และโปรตีนในกลุ่มที่เกิดรอยโรคสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เกิดรอยโรค

จากผลการศึกษาของยีนและโปรตีน VEGF ที่แสดงออกในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคมากกว่าชิ้นเอ็นที่ไม่เกิดรอยโรคนั้นทำให้สอดคล้องกับสมมุติฐานที่ตั้งไว้ในงานวิจัยว่าการแสดงออกของ VEGF มีส่วนสัมพันธ์กับการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ในผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบ ทั้งนี้ในการศึกษาของ Sairyo และคณะในปี 2007 (45) พบว่าแรงเค้นเชิงกล (mechanical stress) มีผลทำให้เนื้อเยื่อภายในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ได้รับการบาดเจ็บและการเมื่อชิ้นเอ็น ligamentum flavum ได้รับแรงเค้นเชิงกลซ้ำ ๆ เป็นระยะเวลายาวนานทำให้เนื้อเยื่อภายในชิ้นเอ็นบาดเจ็บและเหนียวนำไปเกิดการอักเสบเรื้อรัง รวมทั้งกระบวนการรักษาบาดแผลที่เกิดขึ้นภายในเนื้อเยื่อ และสุดท้ายนำไปสู่การเกิดพังผืดของชิ้นเอ็น ligamentum flavum โปรตีน VEGF มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดซ่อมแซมเนื้อเยื่อหลังจากมีการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อเกิดขึ้น และมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคต่าง ๆ รวมทั้งโรคมะเร็งซึ่งมีการเจริญของหลอดเลือดใหม่ขึ้นภายในเนื้อเยื่อทำให้เนื้อเยื่อสามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (36, 63, 64) นอกจากนี้กระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่สามารถเหนียวนำไปให้มีการหลั่ง CTGF ส่งผลกระทบทำให้เซลล์สร้าง extracellular matrix และเกิดพังผืด (fibrosis) ในที่สุด (65) โดยในปี ค.ศ. 2011 Zhong และคณะได้ศึกษา CTGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่มีการหนาตัว พบว่ามีการแสดงออกของ CTGF ระดับโปรตีนเพิ่มสูงขึ้นจริง อีกทั้งยังเหนียวนำไปให้มีการสังเคราะห์และสะสมคอลลาเจนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งระดับของ CTGF ที่เพิ่มสูงขึ้นในชิ้นเอ็น ligamentum flavum นี้ อาจเกิดจากระดับการแสดงออกของ VEGF ที่มากขึ้นในชิ้นเอ็นดังกล่าวและเหนียวนำไปให้มีการหลั่ง CTGF ภายในเนื้อเยื่อของชิ้นเอ็นก็เป็นได้ (24)

Löhr และคณะในปี 2011 ได้ศึกษาพบว่าในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เสื่อมสภาพมีการรุกร้าของหลอดเลือดภายในเนื้อเยื่อ (66) การศึกษาของ Zhang และคณะในปี 2013 พบ

ปริมาณการแสดงออกของ lysophosphatidic acid (LPA) และ CTGF สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่มีการหนาตัว (28) นอกจากนี้พบว่า LPA สามารถชักนำให้มีการแสดงออกของ VEGF ในเซลล์มะเร็งรังไข่ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของ LPA ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดใหม่ (67) ในการศึกษาความสัมพันธ์ของ VEGF กับการหนาตัวของชั้นเอ็น ligamentum flavum นี้เป็นไปตามกับสมมุติฐานที่ตั้งไว้และสอดคล้องกับหลายการศึกษาก่อนหน้านี้ เช่น การศึกษาของ Yayama และคณะในปี 2008 พบการสร้างหลอดเลือดขนาดเล็ก ๆ ขึ้นใหม่รอบบริเวณเนื้อเยื่อ ligamentum flavum ที่มีการหนาตัวและมีการสะสมผลึกแคลเซียม (68) ในปี 2013 Lakemeier และคณะได้ศึกษาย้อม immunostaining ของ MMP-1,3,9 และ VEGF พบการย้อมติดสีซึ่งชี้ให้เห็นถึงตำแหน่งการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่มีการหนาตัว (25) นอกจากนี้การศึกษาของ Nakamura และคณะในปี 2014 พบว่าแรงเค้นเชิงกลชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน angiopoietin-like protein 2 ซึ่งเป็นโปรตีนในตระกูลเดียวกับ vascular endothelial growth factor และก่อให้เกิดการแสดงออกของ TGF- β ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของชั้นเอ็น ligamentum flavum (20)

ในปี 2008 Yayama และคณะพบว่าชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เสื่อมสภาพและมีการหนาตัวสามารถพบ chondrocytes จำนวนมากในชั้นเอ็นดังกล่าว อาจเนื่องมาจากการมีเส้นใยอีลาสตินลดลงร่วมกับเส้นใยคอลลาเจนที่เพิ่มขึ้นในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เสื่อมสภาพนั้น เส้นใยคอลลาเจนที่เพิ่มขึ้นนี้อาจเนื่องมาจากการซ่อมแซมเส้นใยอีลาสตินที่เสื่อมสภาพลง นอกจากนี้พบว่าเซลล์ mesenchymal fibroblasts เจริญเพิ่มจำนวนในชั้นเอ็น ligamentum flavum และต่อมาเปลี่ยนแปลงไปเป็น metaplastic chondrocytes การเจริญของ chondrocytes ทำให้ชักนำให้สร้างหลอดเลือดโดยการกระตุ้นของ VEGF (55) และเกิดการตายของเซลล์ชนิด programmed cell death ของ metaplastic hypertrophic chondrocytes ซึ่งอาจมีบทบาทในการพัฒนาเป็นผลึกแคลเซียมสะสมในชั้นเอ็น ligamentum flavum (68)

Moon และคณะในปี 2012 ได้ศึกษาศักยภาพในการเกิดกระบวนการ angiogenesis ของเซลล์จาก ligamentum flavum พบว่าเซลล์แมคโครฟาจและ pro-inflammatory cytokines สามารถชักนำให้ LF cells ผลิต inflammatory cytokines ได้แก่ IL-6, IL-8 และ angiogenesis-related factors รวมทั้ง VEGF ซึ่งสนับสนุนการศึกษานี้ที่พบการแสดงออกของ VEGF ทั้งในระดับยีนและโปรตีนในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่มีการหนาตัว (50) การศึกษาก่อนหน้าโดย Löhrl และคณะในปี 2011 พบการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เสื่อมสภาพ ส่วนใหญ่พบเซลล์แมคโครฟาจ และพบเซลล์ T-lymphocytes เล็กน้อย รวมถึงมีการเกิดหลอดเลือดใหม่ขึ้นภายในชั้นเอ็นที่เกิดรอยโรคซึ่งลักษณะเหล่านี้แสดงถึง

พยาธิสภาพของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่มีการอักเสบเรื้อรังเกิดขึ้น (66) เมื่อก้าวถึงการอักเสบและการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum มีการศึกษาล่าสุดที่น่าสนใจ โดย Kang และคณะในปี 2014 ค้นพบว่า inflammatory cytokines เช่น IL-6, IL-1 α , TNF- α , PGE2 และ nitric oxide (NO) ที่หลังจากหมอนรองกระดูกเสื่อม (herniated/degenerated disc) ส่งผลกระทบต่อ LF cells ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตและมีการสะสมแคลเซียม เซลล์มีลักษณะของ osteogenic phenotype และมีการสร้างกลุ่มเซลล์คล้ายกระดูก (bone nodule formation) อีกทั้งมีการสังเคราะห์คอลลาเจนและ osteocalcin ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ในการสังเคราะห์ fibrogenic collagen และ osteogenic collagen โดยให้เหตุผลว่า inflammatory cytokines ที่เกิดจากหมอนรองกระดูกเสื่อมและกดทับเส้นประสาท (herniated/degenerated disc) อาจออกฤทธิ์ผ่านช่องไขสันหลังไปยังชิ้นเอ็น ligamentum flavum ทำให้เซลล์ภายในชิ้นเอ็น ligamentum flavum มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวน เกิดการแสดงออกของคอลลาเจนและ osteocalcin ซึ่งนำไปสู่การหนาตัวและการสะสมแคลเซียมภายในชิ้นเอ็น ligamentum flavum (69)

การศึกษาตำแหน่งการแสดงออกของ VEGF ด้วยวิธี immunohistochemical staining พบการแสดงออกของ VEGF ซึ่งสามารถพบได้ในเซลล์บุผิวหลอดเลือด, เซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเซลล์อักเสบอื่น ๆ โดยอธิบายได้ว่า VEGF เป็นปัจจัยสำคัญในการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่และเป็นองค์ประกอบสำหรับการเกิดพังผืดในกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่มีการเสื่อมสภาพ จากการศึกษาของ Enzerink และคณะในปี 2010 ได้ศึกษาพบว่าการสร้าง VEGF จากเซลล์ไฟโบรบลาสต์เพื่อการเจริญของเซลล์ต่าง ๆ จึงเป็นไปได้ว่าการยับยั้ง VEGF ซึ่งตรวจพบได้ในเซลล์บุผิวหลอดเลือด เซลล์ไฟโบรบลาสต์และเซลล์อักเสบอื่น ๆ จึงอาจบ่งชี้ได้ว่าการสร้าง VEGF ออกมาจากเซลล์เหล่านั้นเพื่อการซ่อมแซมเนื้อเยื่อภายในชิ้นเอ็น ligamentum flavum การศึกษาในปัจจุบันยังให้ผลสนับสนุนหลายการศึกษาก่อนหน้า (48) โดย Oh และคณะในปี 2013 ได้ศึกษาการแสดงออกของ fractalkine chemokine และตัวรับโดยย้อมด้วยวิธี immunohistochemical staining และพบ vascular proliferation รวมถึงมีเซลล์ไฟโบรบลาสต์กระจายอย่างหนาแน่น (29) Sairyo และคณะในปี 2007 ได้ย้อมชิ้นเนื้อ ligamentum flavum เพื่อศึกษาการแสดงออกของ cyclooxygenase (COX)-2 ได้พบลักษณะของ vascular endothelial cells ภายในเนื้อเยื่อของชิ้นเอ็นที่ศึกษา (45) อีกทั้ง Löhr และคณะในปี 2011 ได้ศึกษาการแสดงออกของ TGF- β ที่สัมพันธ์กับการอักเสบภายในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่มีการหนาตัวพบว่าเมื่อทำ immunostaining สำหรับ CD 31 ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่มีการหนาตัวพบว่ามีหลอดเลือดใหม่จำนวนมาก และพบการยับยั้งเซลล์แมคโครฟาจที่สัมพันธ์กับการอักเสบเช่นกัน (66) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาตำแหน่งการแสดงออกของโปรตีน VEGF ด้วยวิธี immunoblot และ immunohistochemistry

โดยพบว่าตำแหน่งที่อยู่ห่างจากบริเวณที่มีผลึกแคลเซียม (calcium pyrophosphate crystal deposition) ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่มีการหนาตัวมีการแสดงออกของ VEGF น้อยกว่าตำแหน่งที่อยู่ใกล้บริเวณที่มีผลึกแคลเซียมสะสมในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่มีการหนาตัว สำหรับในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่ไม่มีการหนาตัว ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน VEGF (68)

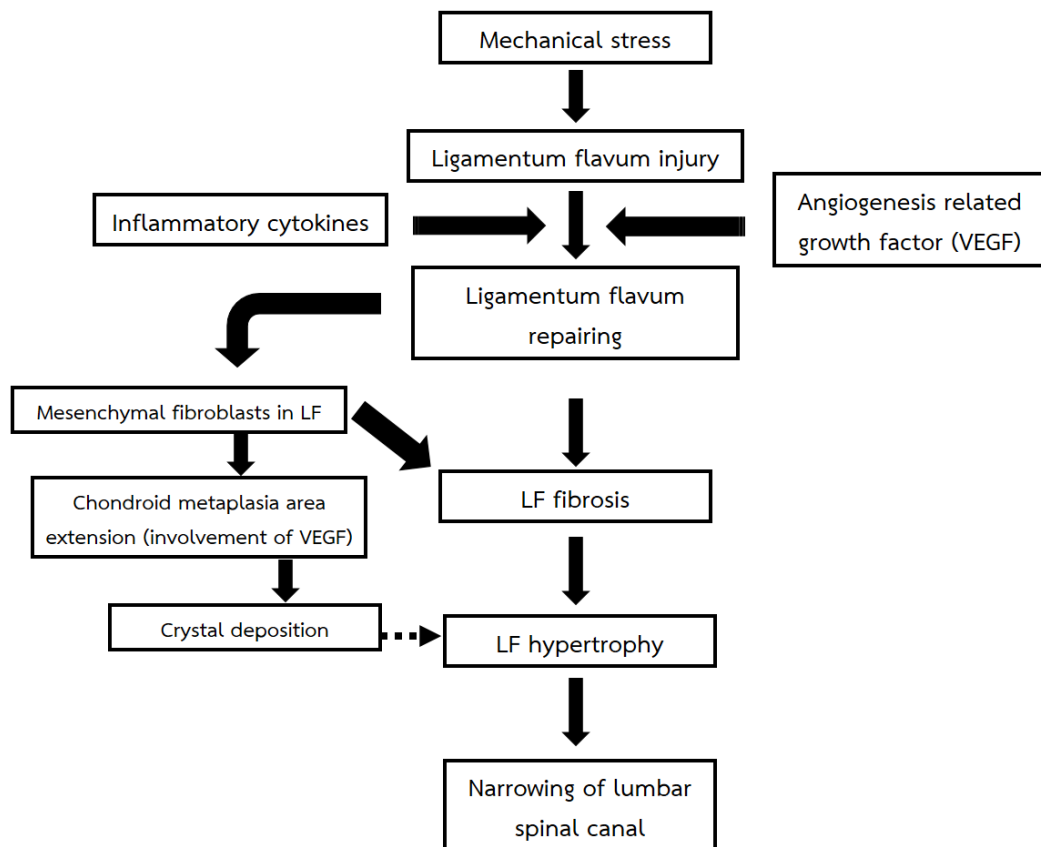
การวิเคราะห์การแสดงออกระดับโปรตีน VEGF จากชั้นเอ็น ligamentum flavum แสดงให้เห็นว่า ปริมาณโปรตีน VEGF ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคและไม่เกิดรอยโรคไม่มีความสัมพันธ์กับอายุ ซึ่งอาจอธิบายได้ว่าการแสดงออกของ VEGF ที่มีต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรค โดยศึกษาระดับโปรตีนแสดงให้เห็นว่าระดับการแสดงออกของโปรตีน VEGF ไม่มีความสัมพันธ์กับอายุ ฉะนั้นอายุจึงไม่ใช่ปัจจัยเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของโปรตีน VEGF

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน VEGF กับเพศของผู้ป่วย การแสดงออกของยีน VEGF:18s rRNA ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเพศชายและหญิง ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณโปรตีน VEGF ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคระหว่างเพศชายและหญิง ที่พบว่ากลุ่มชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคในมีระดับโปรตีน VEGF ระหว่างเพศชายและหญิงไม่แตกต่างกันทางสถิติ

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน VEGF จากชั้นเอ็น ligamentum flavum ในที่เกิดรอยโรค และนำไปศึกษาความสัมพันธ์กับอายุและเพศ แสดงให้เห็นว่า เพศและอายุไม่ได้มีปัจจัยส่งผลต่อการแสดงออกของปริมาณโปรตีน VEGF ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคจากผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบ ซึ่งผลนี้คล้ายกับการศึกษาของ Safak และคณะ ในปี 2010 ที่ศึกษาความสัมพันธ์ของการหนาตัวของชั้นเอ็น ligamentum flavum ในผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบกับอายุและเพศ โดยไม่พบความแตกต่างด้านอายุและเพศของผู้ป่วยกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคซึ่งมีการหนาตัวของชั้นเอ็น ligamentum flavum (70)

สรุปได้ว่าการแสดงออกของ VEGF ในชั้นเอ็น ligamentum flavum ไม่แตกต่างกันระหว่างเพศกับอายุ และมีการแสดงออกของยีน VEGF ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีนในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคมากกว่าชั้นเอ็นที่ไม่เกิดรอยโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งแสดงให้เห็นว่า VEGF มีส่วนเกี่ยวข้องในการเกิดพยาธิสภาพของการหนาตัวของชั้นเอ็น ligamentum flavum โดยระดับ VEGF ที่เพิ่มขึ้นนี้อาจเกี่ยวข้องกับการกระบวนการหลังจากชั้นเอ็นได้รับการบาดเจ็บ

เพื่อซ่อมแซมเนื้อเยื่อในชั้นเอ็น ligamentum flavum และในกระบวนการเกิดผลึกแคลเซียมสะสมในชั้นเอ็นที่เสื่อมสภาพ ดังรูปที่ 38



รูปที่ 38 แสดงสมมุติฐานของ VEGF ที่เกี่ยวข้องกับการหนาตัวของชั้นเอ็น ligamentum flavum (50, 68)

งานวิจัยหลายเรื่องได้ค้นพบการเกิดหลอดเลือดใหม่จากการย้อนขึ้นเนื้อเพื่อศึกษาการ แสดงออกของโมเลกุลต่าง ๆ ที่ก่อพยาธิสภาพของโรครวมถึงมีการศึกษาทดลองระดับเซลล์เกี่ยวกับการ เกิดหลอดเลือดใหม่ในชั้นเอ็น ligamentum flavum อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้สามารถอธิบาย ให้เห็นได้อย่างเด่นชัดของการแสดงออกทั้งระดับยีน ระดับโปรตีน และตำแหน่งการแสดงออกของ VEGF ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสร้างหลอดเลือดใหม่และเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนและโปรตีน อื่น ๆ ภายในชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่มีการหนาตัว ทั้งนี้การศึกษานี้เป็นเพียงการอธิบาย ระดับการแสดงออกของ VEGF ที่เกิดขึ้นในชั้นเอ็น ligamentum flavum ของโรคช่องไขสันหลังส่วน เอวตีบแคบ การศึกษาในระดับวิถีกลไก (pathway) ของการชักนำการแสดงออกของโมเลกุลที่ เกี่ยวข้องกับการเกิดรอยโรคของชั้นเอ็น ligamentum flavum และเป็นเรื่องที่น่าสนใจสำหรับ การศึกษาในอนาคต เนื่องจากการหนาตัวของชั้นเอ็น ligamentum flavum นั้นเกิดจากหลายปัจจัย ที่เกี่ยวเนื่องกัน เช่น การได้รับแรงเค้นเชิงกลเป็นระยะเวลายาวนาน (mechanical stress) และมีการ แสดงออกของโปรตีนต่าง ๆ ที่สัมพันธ์กับการหนาตัวของชั้นเอ็น ซึ่งการศึกษาในอนาคตอาจต้องทำ การทดลองอย่างเป็นระบบทั้งในระดับเซลล์ทดลอง (*in vitro* study) และระดับสัตว์ทดลอง (*in vivo* study) เพื่อสืบค้นหาเหตุและผลที่สัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของโรคที่มีการหนาตัวของชั้นเอ็น ligamentum flavum

การวิจัยศึกษาทดลองในครั้งนี้เป็นการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่ เกี่ยวข้องกับการเกิดรอยโรคและมีการหนาตัวของชั้นเอ็น ligamentum flavum ในผู้ป่วยที่เป็นโรค กระดูกสันหลังเสื่อมโดยมีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบ และมีการศึกษาความสัมพันธ์ของการ แสดงออกของ VEGF กับอายุและเพศ ซึ่งการศึกษานี้ถูกจำกัดโดยปริมาณตัวอย่างที่นำมาศึกษาและ ระยะเวลาของการทำวิจัย หากปริมาณตัวอย่างที่นำมาศึกษาเปรียบเทียบกับมีจำนวนมากขึ้นก็จะทำให้ สามารถประเมินผลได้ชัดเจนยิ่งขึ้น ประการต่อมาคือการเลือกตำแหน่งเฉพาะของชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่นำมาศึกษา ข้อจำกัดนี้คือการคัดเลือกและระบุบริเวณของตัวอย่าง โดยจาก การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ตำแหน่งของชั้นเอ็น ligamentum flavum ด้าน dorsal layer แสดงการ เกิดพังผืดมากที่สุดและเป็นตำแหน่งที่ได้รับ mechanical loading มากกว่าตำแหน่งอื่น ๆ (7, 19, 45) หากมีการคัดเลือกตำแหน่งของชั้นเอ็นที่นำมาศึกษาจะทำให้การวิจัยนี้สามารถศึกษาการ แสดงออกของยีนและโปรตีนที่นำมาศึกษาได้ชัดเจนยิ่งขึ้น อีกทั้งงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ตัวอย่างในกลุ่ม ควบคุมจากผู้ป่วยรายเดียวกันเพื่อจำกัดปัจจัยรบกวนระหว่างกลุ่ม เช่น อายุของผู้ป่วย ทั้งนี้อาจ เลือกใช้กลุ่มควบคุมเหมือนการศึกษาอื่น ๆ เช่น การใช้ชั้นเอ็น ligamentum flavum จากผู้ป่วยที่ เข้ารับการผ่าตัดโรคหมอนรองกระดูกแตกและกดทับเส้นประสาท แต่การใช้ตัวอย่างจากกลุ่มควบคุม นี้้อาจทำให้อายุระหว่างกลุ่มที่เกิดรอยโรคและกลุ่มควบคุมแตกต่างกัน เนื่องจากผู้ป่วยที่เข้ารับการ

ผ่าตัดโรคหมอนรองกระดูกแตกและทับเส้นประสาทมักมีอายุน้อยกว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคกระดูกสันหลังเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบประมาณ 10 ปี (30, 68) งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ VEGF กับการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum เท่านั้น มีอาจทราบได้ว่าการแสดงออกของ VEGF ที่เกิดมากขึ้นนั้นเป็นสาเหตุหรือเป็นผลของการหนาตัวในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ซึ่งระดับการแสดงออกของ VEGF อาจมีระดับสูงเฉพาะบริเวณชิ้นเอ็น (local phenomenon) หรืออาจมีระดับการแสดงออกของ VEGF สูงขึ้นในส่วนอื่น ๆ ของร่างกายด้วย (systemic phenomenon) เช่น การแสดงออกของ VEGF ในเลือดของผู้ป่วยอาจสูงขึ้นสัมพันธ์กับการแสดงออกของ VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum

ข้อเสนอแนะและแนวทางสำหรับการรักษาในอนาคต

การศึกษาในอนาคตควรศึกษาทั้งแบบ systemic และ local study ที่ออกแบบการศึกษาโดยการตรวจวัดระดับของ VEGF หรือ growth factors ในเลือดจากผู้ป่วยก่อนการผ่าตัดและตรวจวัดระดับของ VEGF ในชิ้นเอ็น ligamentum flavum ควบคู่กัน หากผลการศึกษาพบว่า VEGF หรือ growth factors ที่ศึกษานั้นมีปริมาณสูงทั้งในเลือด (systemic phenomenon) และในชิ้นเอ็น ligamentum flavum (local phenomenon) นั้นแสดงให้เห็นว่า VEGF หรือ growth factors ที่ศึกษามีอิทธิพลต่อการหนาตัวของ ligamentum flavum และสัมพันธ์กับการทำงานของระบบอื่นในร่างกาย ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษาดังกล่าวคือ สามารถใช้ VEGF หรือ growth factors นี้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) สำหรับผู้ป่วยที่มีการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum จากโรคกระดูกสันหลังเสื่อมที่มีช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบ นอกจากนี้อาจใช้ VEGF หรือ growth factors ที่ศึกษาในการติดตามการรักษาได้โดยการตรวจวัดระดับ VEGF หรือ growth factors ที่จัดเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในเลือดของผู้ป่วยก็จะพอบ่งชี้ถึงระดับการหนาตัวที่ลดลงหรือเพิ่มขึ้นของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ได้

การศึกษา growth factors และ cytokines ต่าง ๆ ที่สัมพันธ์กับการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum อาจนำไปประยุกต์ใช้สร้างองค์ความรู้และก่อให้เกิดประโยชน์ด้านการรักษาผู้ป่วยในอนาคตได้ เช่น การฉีด growth factors และ cytokines เข้าไปยังบริเวณที่มีการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ช่วยลดความเสี่ยงในการรักษาด้วยวิธีการผ่าตัดปกติที่มีการนำเอาชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่หนาตัวออก สำหรับแนวทางที่อาจเป็นไปได้ในการรักษาโรคช่องไขสันหลังส่วนเอวตีบแคบที่มีการหนาตัวชิ้นเอ็น ligamentum flavum สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้ inhibitor โดยการฉีด anti-growth factor ที่ยับยั้งการหนาตัวของชิ้นเอ็น ligamentum flavum ซึ่งต้องมีการศึกษาว่ามีการแสดงออกของ growth factor นั้น ๆ ทั้ง local และ systemic phenomenon เมื่อมีการตรวจพบการแสดงออกของ growth factor ที่เป็น biomarker สูงในเลือด

ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าอาจมีการหนาตัวของชั้นเอ็น ligamentum flavum เพิ่มขึ้นได้ ฉะนั้น การฉีด anti-growth factor เช่น อาจฉีด anti-VEGF เข้าไปยังบริเวณชั้นเอ็น ligamentum flavum ที่มีการหนาตัวก็อาจช่วยลดการหนาตัวที่จะหนาตัวมากขึ้นได้ อีกทั้งอาจช่วยให้ผู้ป่วยบรรเทาอาการปวดได้ดีขึ้น และไม่ต้องเข้ารับการผ่าตัด นอกจากนี้การยับยั้งการส่งสัญญาณในวิถีกลไกที่ทำให้มีการหนาตัว (block signaling in pathway) ด้วยเทคนิคอื่น ๆ เช่น การใช้ประโยชน์จาก microRNA และ RNA interference เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เป็น up-stream signal ของการหนาตัวในชั้นเอ็น ligamentum flavum ก็อาจเป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนาวิธีการรักษาใหม่ในอนาคต

การศึกษาในงานวิจัยนี้ยังไม่ทราบว่ากระบวนการสร้างหลอดเลือดเป็นสาเหตุหรือเป็นผลของการหนาตัวในชั้นเอ็น ligamentum flavum ฉะนั้นแนวทางสำหรับการศึกษาในอนาคตอาจต้องศึกษาทดลองเพิ่มเติมดังนี้

1. การศึกษาการสร้างหลอดเลือดใหม่เป็นสาเหตุของการหนาตัวในชั้นเอ็น ligamentum flavum หรือไม่ โดยทำการทดลองแบบ *in vivo* study ในสัตว์ทดลอง เช่น กระจ่าง โดยการฉีด VEGF เข้าไปกระตุ้นชั้นเอ็น ligamentum flavum เปรียบเทียบกับกระจ่างกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ฉีด จากนั้นนำชั้นเอ็น ligamentum flavum ของกระจ่างมาศึกษาการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่สัมพันธ์กับการหนาตัว เช่น collagen และเปรียบเทียบระดับการหนาตัวของชั้นเอ็น ligamentum flavum ระหว่างกระจ่างกลุ่มควบคุมและกระจ่างกลุ่มทดลอง

2. การศึกษาการสร้างหลอดเลือดใหม่เป็นผลจากการหนาตัวของชั้นเอ็น ligamentum flavum หรือไม่ โดยทำการทดลองแบบ *in vivo* study ในกระจ่างเช่นเดียวกัน โดยเริ่มแรกจะต้องทำให้บริเวณชั้นเอ็น ligamentum flavum ของกระจ่างมีการอักเสบเรื้อรังเกิดขึ้นโดยการให้ mechanical loading ไปที่บริเวณกระดูกสันหลังของกระจ่าง รวมทั้งให้สารกระตุ้นการอักเสบและการเกิดพังผืด เช่น TNF- α และ TGF- β เป็นต้น และทำการเปรียบเทียบกับกระจ่างกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ mechanical loading, TNF- α และ TGF- β จากนั้นนำชั้นเอ็น ligamentum flavum ของกระจ่างทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมาศึกษาการแสดงออกของ VEGF และการสร้างหลอดเลือดใหม่ภายในเนื้อเยื่อของชั้นเอ็น ligamentum flavum

รายการอ้างอิง

1. ปิยะพันธ์ ธาราณัติ. Spinal stenosis treatment option and outcome. The year book of orthopaedic review 2002:114-23.
2. อนันต์ ทรรศนวิภาส. Lumbar spinal stenosis. The year book of orthopaedic review. 2002:256-73.
3. ก่อภู เชียงทอง. Antomy of the lumbosacral spine. โรคกระดูกสันหลังเสื่อม. 2551:29-57.
4. Szpalski M, Gunzburg R. Lumbar spinal stenosis in the elderly: an overview. European Spine Journal. 2003;12(2):S170-S5.
5. Kalichman L, Hunter DJ. Diagnosis and conservative management of degenerative lumbar spondylolisthesis. European Spine Journal. 2008;17(3):327-35.
6. Siebert E, Prüss H, Klingebiel R, Failli V, Einhäupl KM, Schwab JM. Lumbar spinal stenosis: syndrome, diagnostics and treatment. Nature Reviews Neurology. 2009;5(7):392-403.
7. Kosaka H, Sairyo K, Biyani A, Leaman D, Yeasting R, Higashino K, et al. Pathomechanism of loss of elasticity and hypertrophy of lumbar ligamentum flavum in elderly patients with lumbar spinal canal stenosis. Spine. 2007;32(25):2805-11.
8. Park J-B, Chang H, Lee J-K. Quantitative analysis of transforming growth factor-beta 1 in ligamentum flavum of lumbar spinal stenosis and disc herniation. Spine. 2001;26(21):E492-E5.
9. Watanabe K, Konno S-i, Sekiguchi M, Kikuchi S-i. Spinal stenosis: assessment of motor function, VEGF expression and angiogenesis in an experimental model in the rat. European Spine Journal. 2007;16(11):1913-8.
10. ธเนศ วรธนอภิสิทธิ์. comprehensive spine course. 2549.
11. Levin K, Aminoff MJ, Atlas SJ, Wilterdink JL. Lumbar spinal stenosis: Pathophysiology, clinical features, and diagnosis. UpToDate, Basow, DS (Ed), UpToDate, Waltham, MA. 2011.

12. Benoist M. Natural history of the aging spine. *The Aging Spine*: Springer; 2005. p. 4-7.
13. Botwin KP, Gruber RD. Lumbar spinal stenosis: anatomy and pathogenesis. *Physical medicine and rehabilitation clinics of North America*. 2003;14(1):1-15.
14. Sengupta DK, Herkowitz HN. Degenerative spondylolisthesis: review of current trends and controversies. *Spine*. 2005;30(6S):S71-S81.
15. สูงชัย อังธารารักษ์. โรคโพรงกระดูกสันหลังแคบ. ตำราโรคข้อ. 2548:786-805.
16. Evans J, Nachemson A. Biomechanical study of human lumbar ligamentum flavum. *Journal of anatomy*. 1969;105(Pt 1):188.
17. Nachemson AL, Evans JH. Some mechanical properties of the third human lumbar interlaminar ligament (ligamentum flavum). *Journal of biomechanics*. 1968;1(3):211-20.
18. Yayama T, Baba H, Furusawa N, Kobayashi S, Uchida K, Kokubo Y, et al. Pathogenesis of calcium crystal deposition in the ligamentum flavum correlates with lumbar spinal canal stenosis. *Clinical and experimental rheumatology*. 2005;23(5):637.
19. Zhang Y, Chen J, Zhong Z-M, Yang D, Zhu Q. Is platelet-derived growth factor-BB expression proportional to fibrosis in the hypertrophied lumbar ligamentum flavum? *Spine*. 2010;35(25):E1479-E86.
20. Nakamura T, Okada T, Endo M, Kadomatsu T, Taniwaki T, Sei A, et al. Angiopoietin-Like Protein 2 Induced by Mechanical Stress Accelerates Degeneration and Hypertrophy of the Ligamentum Flavum in Lumbar Spinal Canal Stenosis. *PloS one*. 2014;9(1):e85542.
21. Nakatani T, Marui T, Hitora T, Doita M, Nishida K, Kurosaka M. Mechanical stretching force promotes collagen synthesis by cultured cells from human ligamentum flavum via transforming growth factor- β 1. *Journal of orthopaedic research*. 2002;20(6):1380-6.
22. Park J-B, Lee J-K, Park S-J, Riew KD. Hypertrophy of ligamentum flavum in lumbar spinal stenosis associated with increased proteinase inhibitor concentration. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 2005;87(12):2750-7.

23. Park J-B, Kong C-G, Suhl K-H, Chang E-D, Riew KD. The increased expression of matrix metalloproteinases associated with elastin degradation and fibrosis of the ligamentum flavum in patients with lumbar spinal stenosis. *Clinics in orthopedic surgery*. 2009;1(2):81-9.
24. Zhong ZM, Zha DS, Xiao WD, Wu SH, Wu Q, Zhang Y, et al. Hypertrophy of ligamentum flavum in lumbar spine stenosis associated with the increased expression of connective tissue growth factor. *Journal of Orthopaedic Research*. 2011;29(10):1592-7.
25. Lakemeier S, Schofer MD, Foltz L, Schmid R, Efe T, Rohlfs J, et al. Expression of Hypoxia-inducible Factor-1 α , Vascular Endothelial Growth Factor, and Matrix Metalloproteinases 1, 3, and 9 in Hypertrophied Ligamentum Flavum. *Journal of spinal disorders & techniques*. 2013;26(7):400-6.
26. Honsawek S, Poonpukdee J, Chalermpanpipat C, Payungporn S, Limthongkul W, Yingsakmongkol W, et al. Hypertrophy of the ligamentum flavum in lumbar spinal canal stenosis is associated with increased bFGF expression. *International orthopaedics*. 2013;37(7):1387-92.
27. Park J-O, Lee BH, Kang Y-M, Kim T-H, Yoon JY, Kim H, et al. Inflammatory cytokines induce fibrosis and ossification of human ligamentum flavum cells. *Journal of spinal disorders & techniques*. 2013;26(1):E6-E12.
28. Zhang K, Sun W, Liu X, Zhao C, Li H, Sun X, et al. Hypertrophy and Fibrosis of the Ligamentum Flavum in Lumbar Spinal Stenosis is Associated with Increased Expression of LPA and LPAR1. *Journal of spinal disorders & techniques*. 2013.
29. Oh I-S, Suh D-W, Ha K-Y. Hypertrophy of the ligament flavum in degenerative lumbar stenosis associated with the increased expression of fractalkine (CX3CL1)/CX3CR1 chemokine. *Connective tissue research*. 2013;54(6):380-5.
30. Chen J, Liu Z, Zhong G, Qian L, Li Z, Qiao Z, et al. Hypertrophy of Ligamentum Flavum in Lumbar Spine Stenosis Is Associated with Increased miR-155 Level. *Disease Markers*. 2014;2014.
31. Sakamaki T, Sairyo K, Sakai T, Tamura T, Okada Y, Mikami H. Measurements of ligamentum flavum thickening at lumbar spine using MRI. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2009;129(10):1415-9.

32. Altinkaya N, Yildirim T, Demir S, Alkan O, Sarica FB. Factors associated with the thickness of the ligamentum flavum: is ligamentum flavum thickening due to hypertrophy or buckling? *Spine*. 2011;36(16):E1093-E7.
33. Abbas J, Hamoud K, Masharawi YM, May H, Hay O, Medlej B, et al. Ligamentum flavum thickness in normal and stenotic lumbar spines. *Spine*. 2010;35(12):1225-30.
34. Ha K-Y, Chang C-H, Kim K-W, Kim Y-S, Na K-H, Lee J-S. Expression of estrogen receptor of the facet joints in degenerative spondylolisthesis. *Spine*. 2005;30(5):562-6.
35. Otrrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2007;38(3):258-68.
36. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386(6626):671-4.
37. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983;219(4587):983-5.
38. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. 2003;9(6):669-76.
39. Storkebaum E, Lambrechts D, Carmeliet P. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *Bioessays*. 2004;26(9):943-54.
40. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews*. 2004;25(4):581-611.
41. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews*. 1997;18(1):4-25.
42. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal*. 1999;13(1):9-22.
43. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti P, et al. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *The Journal of experimental medicine*. 1990;172(6):1535-45.

44. Broxmeyer HE, Cooper S, Li Z, Lu L, Song H, Kwon B, et al. Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor. *International journal of hematology*. 1995;62(4):203-15.
45. Sairyo K, Biyani A, Goel VK, Leaman DW, Booth Jr R, Thomas J, et al. Lumbar ligamentum flavum hypertrophy is due to accumulation of inflammation-related scar tissue. *Spine*. 2007;32(11):E340-E7.
46. Sairyo K, Biyani A, Goel V, Leaman D, Booth Jr R, Thomas J, et al. Pathomechanism of ligamentum flavum hypertrophy: a multidisciplinary investigation based on clinical, biomechanical, histologic, and biologic assessments. *Spine*. 2005;30(23):2649-56.
47. Li J, Zhang YP, Kirsner RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microscopy research and technique*. 2003;60(1):107-14.
48. Enzerink A, Rantanen V, Vaheiri A. Fibroblast nemosis induces angiogenic responses of endothelial cells. *Experimental cell research*. 2010;316(5):826-35.
49. Bauer SM, Bauer RJ, Liu Z-J, Chen H, Goldstein L, Velazquez OC. Vascular endothelial growth factor-C promotes vasculogenesis, angiogenesis, and collagen constriction in three-dimensional collagen gels. *Journal of vascular surgery*. 2005;41(4):699-707.
50. Moon HJ, Park Y-K, Ryu Y, Kim J-H, Kwon T-H, Chung H-S, et al. The angiogenic capacity from ligamentum flavum subsequent to inflammation: a critical component of the pathomechanism of hypertrophy. *Spine*. 2012;37(3):E147-E55.
51. Leychenko A, Konorev E, Jijiwa M, Matter ML. Stretch-induced hypertrophy activates NFkB-mediated VEGF secretion in adult cardiomyocytes. *PloS one*. 2011;6(12):e29055.
52. Hou J, Kang YJ. Regression of pathological cardiac hypertrophy: signaling pathways and therapeutic targets. *Pharmacology & therapeutics*. 2012;135(3):337-54.

53. Higashikuni Y, Sainz J, Nakamura K, Takaoka M, Enomoto S, Iwata H, et al. The ATP-Binding Cassette Transporter ABCG2 Protects Against Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy and Heart Failure by Promoting Angiogenesis and Antioxidant Response. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32(3):654-61.
54. Jin L, Zhao J, Jing W, Yan S, Wang X, Xiao C, et al. Role of miR-146a in human chondrocyte apoptosis in response to mechanical pressure injury in vitro. *International journal of molecular medicine*. 2014;34(2):451-63.
55. Maes C, Carmeliet P, Moermans K, Stockmans I, Smets N, Collen D, et al. Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF₁₆₄ and VEGF₁₈₈. *Mechanisms of development*. 2002;111(1):61-73.
56. Zelzer E, McLean W, Ng Y-S, Fukai N, Reginato AM, Lovejoy S, et al. Skeletal defects in VEGF120/120 mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development*. 2002;129(8):1893-904.
57. สัตยชัย พยุงภร. เทคนิคทางเซลล์ชีววิทยาและอณูชีววิทยา. เอกสารประกอบการสอนรายวิชา เซลล์และชีววิทยาโมเลกุลพื้นฐาน. 2556:239-48.
58. Gan SD, Patel KR. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013;133(9):e12.
59. Huang T, Long M, Huo B. Competitive binding to cuprous ions of protein and BCA in the bicinchoninic acid protein assay. *The open biomedical engineering journal*. 2010;4:271.
60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Polymerase Chain Reaction (PCR). NCBI. 2014.
61. ปิยลัมพร หะวานนท์. การพิจารณาขนาดตัวอย่าง. หลักการทำวิจัยให้สำเร็จ. 2550.
62. Avihingsanon Y, Benjachat T, Tassanarong A, Sodsai P, Kittikovit V, Hirankarn N. Decreased renal expression of vascular endothelial growth factor in lupus nephritis is associated with worse prognosis. *Kidney international*. 2009;75(12):1340-8.
63. Eming SA, Krieg T, editors. Molecular mechanisms of VEGF-A action during tissue repair. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*; 2006: Nature Publishing Group.

64. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 2008;16(5):585-601.
65. Suzuma K, Naruse K, Suzuma I, Takahara N, Ueki K, Aiello LP, et al. Vascular endothelial growth factor induces expression of connective tissue growth factor via KDR, Flt1, and phosphatidylinositol 3-kinase-akt-dependent pathways in retinal vascular cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(52):40725-31.
66. Löhr M, Hampl JA, Lee JY, Ernestus R-I, Deckert M, Stenzel W. Hypertrophy of the lumbar ligamentum flavum is associated with inflammation-related TGF- β expression. *Acta neurochirurgica*. 2011;153(1):134-41.
67. Hu Y-L, Tee M-K, Goetzl EJ, Auersperg N, Mills GB, Ferrara N, et al. Lysophosphatidic acid induction of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93(10):762-7.
68. Yayama T, Kobayashi S, Sato R, Uchida K, Kokubo Y, Nakajima H, et al. Calcium pyrophosphate crystal deposition in the ligamentum flavum of degenerated lumbar spine: histopathological and immunohistological findings. *Clinical rheumatology*. 2008;27(5):597-604.
69. Kang Y-M, Suk K-S, Lee BH, Kim H-S, Lee K-I, Park S-Y, et al. Herniated Intervertebral Disc Induces Hypertrophy and Ossification of Ligamentum Flavum. *Journal of Spinal Disorders & Techniques*. 2014.
70. Safak AA, Is M, Sevinc O, Barut C, Eryoruk N, Erdogmus B, et al. The thickness of the ligamentum flavum in relation to age and gender. *Clinical Anatomy*. 2010;23(1):79-83.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียม 10X Tris-acetic EDTA buffer (TAE buffer)
 - 1.1 ชั่ง Tris base 48.4 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ประมาณ 50 มิลลิลิตร
 - 1.2 เติม glacial acetic 11.42 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
 - 1.3 เติม 0.5 M EDTA, pH 8.0 20 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
 - 1.4 เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.6-7.8
2. การเตรียม 2% agarose gel
 - 2.1 ชั่งผง agarose 0.8 กรัม เทลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร
 - 2.2 เติม TAE buffer จนได้ปริมาตร 40 มิลลิลิตร
 - 2.3 อุ่นด้วย microwave จนละลายเข้ากัน และเทลงแบบพิมพ์ (tray)
3. การเตรียม Phosphate Buffered Saline (PBS)
 - 3.1 ชั่งสาร Na_2HPO_4 1.44 กรัม
 - 3.2 ชั่งสาร KH_2PO_4 0.204 กรัม
 - 3.3 ชั่งสาร NaCl 8 กรัม
 - 3.4 ชั่งสาร KCl 0.2 กรัม
 - 3.5 เทสารทั้งหมดลงในขวดแก้วปราศจากเชื้อ และเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงไป 1 ลิตร
 - 3.6 ปรับ pH ให้ได้ 7.4 จากนั้นนำไปกรองผ่าน filter
4. การเตรียม LB agar
 - 4.1 ชั่ง Tryptone 1 กรัม, NaCl 0.5 กรัม, Yeast extract 0.5 กรัม และ Agar 1.5 กรัม
 - 4.2 เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร
 - 4.3 นำทั้งหมดไปเข้าเครื่อง autoclave ที่ 121 °C, 15 pound เป็นเวลา 15 นาที
 - 4.4 เติม ampicillin 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
 - 4.5 เทใส่จานเลี้ยงเชื้อประมาณ 30 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้จนแข็ง
 - 4.6 เติม IPTG 250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 4 มิลลิลิตร และ X-Gal 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

กระจายให้ทั่วจานเลี้ยงจนแห้ง

5. การเตรียม LB broth

- 5.1 ชั่ง Tryptone 1 กรัม, NaCl 0.5 กรัม และ Yeast extract 0.5 กรัม
เติมน้ำกลั่นประมาณ 100 มิลลิลิตร
- 5.2 นำทั้งหมดไป autoclave ที่ 121 °C, 15 pound นาน 15 นาที
- 5.3 เติม ampicillin 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 200 ไมโครลิตร

6. การเตรียม Soc medium

- 6.1 ชั่ง Tryptone 2 กรัม, 1 M NaCl 0.06 กรัม, 1 M KCl 0.25 มิลลิลิตร และ Yeast extract 0.5 กรัม
- 6.2 เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร นำไป autoclave ที่ 121 °C, 15 pound นาน 15 นาที
- 6.3 เติมสารละลาย 2 M Mg^{2+} และ 2 M glucose 1 มิลลิลิตร

การเตรียม positive control และสารละลาย DNA มาตรฐานของยีน VEGF และ 18s rRNA

1. เพิ่มปริมาณ PCR product เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของชิ้น insert มากขึ้น และนำไปตรวจสอบการแสดงออกด้วย agarose gel electrophoresis
2. การสกัดแถบ DNA ออกจาก gel โดยมีขั้นตอนดังนี้
 - 2.1 นำตัวอย่างที่มีการแสดงออกของยีน VEGF ซึ่งได้จากการทำ agarose gel electrophoresis มาตัดเจลในบริเวณที่มีแถบ DNA ขนาดที่ต้องการ
 - 2.2 สกัดแถบ DNA จาก gel ที่ตัดออกมาโดยชุดสกัด GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit ซึ่งมีวิธีการดังนี้
 - นำ gel ที่ตัดได้มาชั่งน้ำหนัก
 - เติมสารละลาย capture buffer 10 ไมโครลิตรต่อน้ำหนัก gel 10 มิลลิกรัม
 - นำไปบ่ม (incubation) ที่อุณหภูมิ 60 °C จน gel ละลายหมด
 - ดูดสารละลาย 600 ไมโครลิตรมาใส่ GFX column ที่อยู่ใน collection tube
 - บ่ม (incubation) ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที
 - ปั่นตกตะกอนที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
 - เติม wash buffer 500 ไมโครลิตร
 - ปั่นตกตะกอนที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที

- เปลี่ยน GFX column ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตรอันใหม่
- เติม elution buffer 50 ไมโครลิตร
- ปั่นตกตะกอนที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- นำสารละลายที่ได้เก็บที่ -20 °C เพื่อรอการ ligation ต่อไป

3. ทำการเชื่อม (ligation) PCR product กับ plasmid (pGEM-T) เพื่อเตรียมรีคอมบิแนนท์ พลาสมิด (recombinant plasmid) โดยเตรียมส่วนผสมดังนี้

- | | | |
|----------------------------|-----|-----------|
| - 2X rapid ligation buffer | 5.0 | ไมโครลิตร |
| - T4 DNA ligase | 1.0 | ไมโครลิตร |
| - pGEM-T | 1.0 | ไมโครลิตร |
| - PCR product | 2.0 | ไมโครลิตร |
| - Distilled water | 1 | ไมโครลิตร |

จากนั้นนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4. Transformation เพื่อนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้า competent cells มีวิธีดังนี้

- เตรียม LB agar plate ที่มี ampicillin โดยการ spread plate ด้วย 100 mM IPTG ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร X-gal ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นตากให้แห้ง
- เตรียม competent cells ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เตรียมได้จากข้อ 1 ปริมาตร 3 ไมโครลิตรลงไป และดีดหลอดทดลองเบา ๆ
- หยด Soc medium ลงไปบน LB agar plate 300 ไมโครลิตร เพื่อช่วยให้กระจายสารบนเพลทได้ง่ายขึ้น
- ดูด competent cells ที่ผสมกับสารละลายรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ไปหยดบนเพลทและกระจาย (spread plate) ให้ทั่วจานที่ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (LB agar plate)
- นำจานเลี้ยงเชื้อไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 °C ซ้ำมคืน

5. ทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (Blue/White colony selection) ดังนี้

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

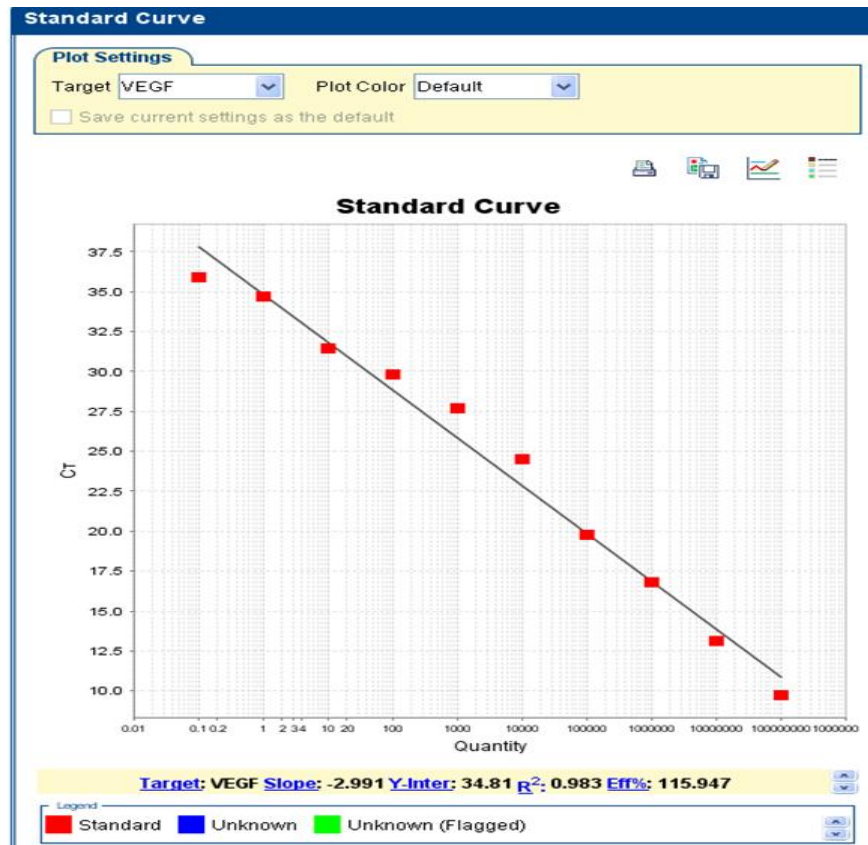
- เชื้อโคลิฟอร์มสีขาวตำแหน่งเดียวกับที่ใช้ทำ colony PCR นำไปใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (LB broth) ที่อยู่ในหลอดทดลองปริมาตร 2 มิลลิลิตร
- นำไปเขย่า (shaking) ที่ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ

6. การสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดออกจากแบคทีเรีย (Plasmid extraction)

- ดูดแบ่ง bacteria culture ที่เตรียมได้จากข้อ 5. จำนวนปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำมาใส่หลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร
- นำไปปั่นตกตะกอนที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- เติมน้ำที่ละลายที่อุ้งบน (supernatant) ทิ้ง จะเหลือแต่ตะกอนของเซลล์ที่กั้นหลอด
- เติม lysis solution ที่เย็นจัดปริมาตร 400 ไมโครลิตร
- Vortex 30 วินาทีและบ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที
- ดูดสารละลายเซลล์ (lysate) ใส่ spin column และปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที
- เติม wash buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที
- เติมน้ำที่ละลายส่วนที่ผ่าน spin column ทิ้งและปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที
- นำ spin column ใส่ลงใน collection tube อันใหม่และเติม elution buffer 50 ไมโครลิตร
- นำไปปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาทีจะได้สารละลายพลาสมิดที่บริสุทธิ์ 50 ไมโครลิตร เพื่อนำไปใช้ทำ positive control และสารละลาย DNA มาตรฐานต่อไป
- รัน agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์ โดยใช้ 1 Kb เป็น marker
- ตรวจสอบความเข้มข้นของ positive control ที่ได้โดยใช้เครื่อง Nanodrop

ภาคผนวก ข

การคำนวณหาปริมาณ DNA ของยีน VEGF



ตัวอย่าง สมมติค่า threshold cycle (Ct) จากการทำ real time RT-PCR ของตัวอย่าง เท่ากับ 28.81

$$y = (-2.991)x + 34.81$$

แทนค่าลงในสมการ

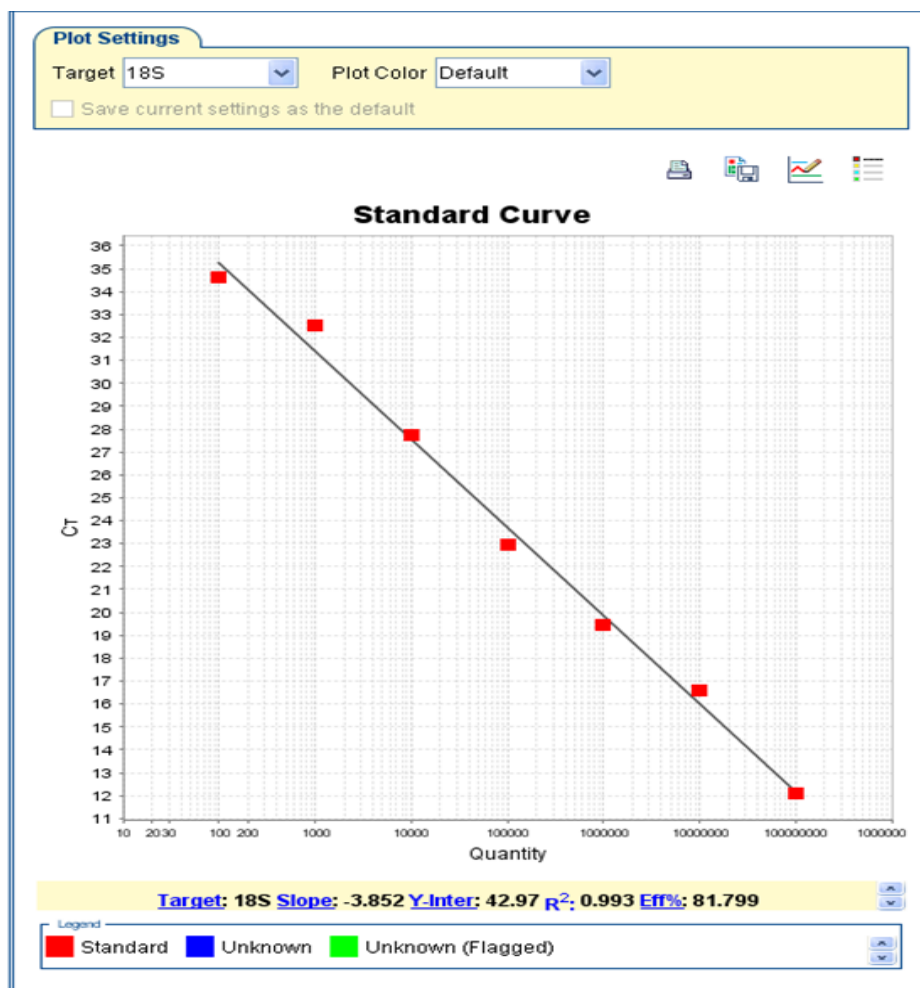
$$28.81 = (-2.991)x + 34.81$$

$$X = 2.006$$

concentration = 10 concentration

concentration = 102.006 = 101.39 copies/ μ L

การคำนวณหาปริมาณ DNA ของยีน 18s rRNA



ตัวอย่าง สมมุติค่า threshold cycle (Ct) จากการทำ real time RT-PCR ของตัวอย่าง เท่ากับ 18.72

$$y = (-3.852)x + 42.97$$

แทนค่าลงในสมการ $18.72 = (-3.852)x + 42.97$

$$X = 6.295$$

concentration = 10 concentration

concentration = $106.295 = 1,972,422.74$ copies/ μ L

การคำนวณหาปริมาณเชิงเปรียบเทียบ (relative quantitation)

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

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

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

ตัวอย่างที่ 1 $\Delta\text{Ct (sample)} = \text{Ct (target gene of sample)} - \text{Ct (reference gene of sample)}$

$$\begin{aligned} \text{แทนค่า } \Delta\text{Ct (patho LF)} &= \text{Ct (VEGF of patho LF)} - \text{Ct (18s rRNA of patho LF)} \\ &= 28.35 - 14.96 \end{aligned}$$

$$\Delta\text{Ct (patho LF)} = 13.39$$

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

แทนค่า $\Delta\text{Ct (non-patho LF)} = \text{Ct (VEGF of non-patho LF)} - \text{Ct (18s rRNA of non-patho LF)}$

$$= 34.41 - 14.37$$

$$\Delta\text{Ct (non-patho LF)} = 20.04$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = 13.39 - 20.04$$

ฉะนั้นอัตราส่วนการแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเนื้อที่เกิดรอยโรค : ชิ้นเนื้อที่ไม่เกิดรอยโรคเท่ากับ

$$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = 2^{-(13.39 - 20.04)} = 100.43$$

ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า ชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคมีการแสดงออกของยีน VEGF ในระดับ mRNA มากกว่ากลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรค ประมาณ 100.43 เท่า

ตัวอย่างที่ 2 ΔCt (sample) = Ct (target gene of sample) – Ct (reference gene of sample)

แทนค่า ΔCt (patho LF) = Ct (VEGF of patho LF) – Ct (18s rRNA of patho LF)

$$= 28.81 - 12.55$$

$$\Delta\text{Ct} (\text{patho LF}) = 16.26$$

ΔCt (calibrator) = Ct (target gene of calibrator) – Ct (reference gene of calibrator)

แทนค่า ΔCt (non-patho LF) = Ct (VEGF of non-patho LF) – Ct (18s rRNA of non-patho LF)

$$= 31.43 - 16.26$$

$$\Delta\text{Ct} (\text{non-patho LF}) = 15.17$$

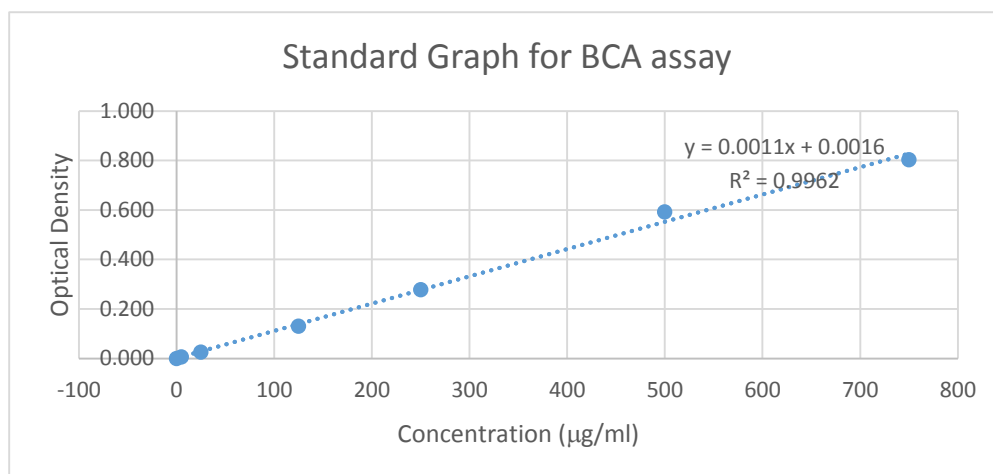
$$\Delta\Delta\text{Ct} = 16.26 - 15.17$$

ฉะนั้นอัตราส่วนการแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเอ็นที่เกิดรอยโรค : ชิ้นเอ็นที่ไม่เกิดรอยโรคเท่ากับ

$$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = 2^{-(16.26 - 15.17)} = 2^{-1.09} = 1/2^{(1.09)} = 1/2.12 = 0.47$$

ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า ชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่เกิดรอยโรคมีการแสดงออกของยีน VEGF ในระดับ mRNA น้อยกว่ากลุ่มชิ้นเอ็น ligamentum flavum ที่ไม่เกิดรอยโรค ประมาณ 2.12 เท่า

การคำนวณหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein)



รูปแสดงค่าสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)

ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 570 นาโนเมตร ของสารละลายตัวอย่าง = 0.511

แทนค่าลงในสมการ

$$y = 0.0011x + 0.0016$$

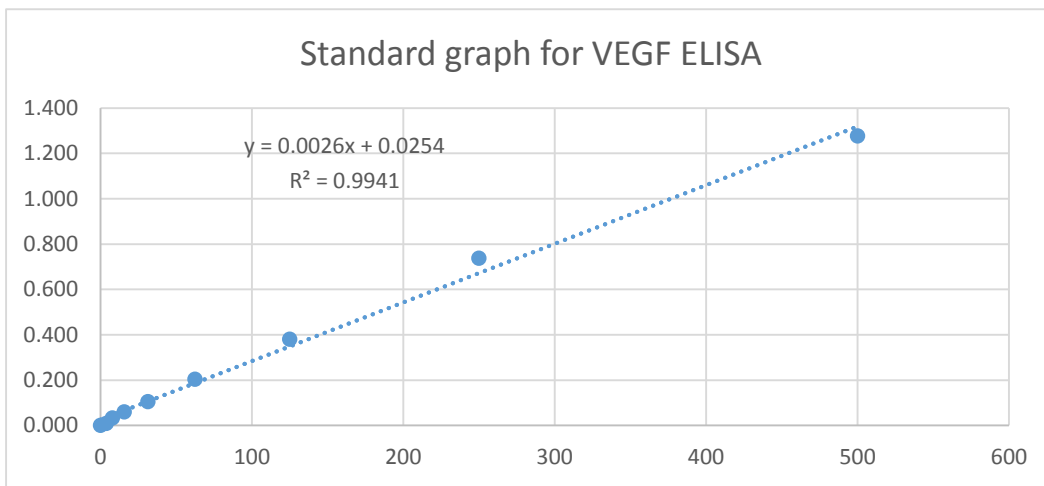
$$0.511 = 0.0011x + 0.0016$$

$$0.511 - 0.0016 = 0.0011x$$

$$x = 463.09$$

ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่มีในสารตัวอย่าง คือ 463.09 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

การคำนวณหาปริมาณโปรตีน VEGF



รูปแสดงค่าสารละลายมาตรฐาน VEGF

ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 570-450 นาโนเมตร ของสารละลายตัวอย่าง = 0.24

แทนค่าลงในสมการ

$$y = 0.0026x + 0.0254$$

$$0.24 = 0.0026x + 0.0254$$

$$0.24 - 0.0254 = 0.0026x$$

$$x = 82.53$$

ปริมาณโปรตีน VEGF ที่มีในสารตัวอย่าง คือ 82.53 พิโคกรัม/มิลลิลิตร

ปริมาณโปรตีน VEGF ที่มีในโปรตีนรวมทั้งหมดของสารตัวอย่างคือ

$$\frac{82.53 \text{ พิโคกรัม/มิลลิลิตร}}{463.09 \text{ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร}} = 0.178 \text{ พิโคกรัม/ไมโครกรัม} = 178 \text{ พิโคกรัม/มิลลิกรัม}$$

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อผู้วิจัยหลัก

(ภาษาไทย)

นางสาว ณปภัช จิรธนธรรนุกุล

(ภาษาอังกฤษ)

Miss Napaphat Jirathanathornnukul

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ 24/10 หมู่ 5 ต.ยายชา อ.สามพราน จ.นครปฐม 73110

โทรศัพท์

085-1724203

การศึกษา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
(พ.ศ. 2551-2554)

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะ
แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ. 2555-2557)

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

นำเสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง การแสดงออกของวาสคูลาร์ เอนโดทีเลียล โกรทแฟคเตอร์ในโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (Expression of vascular endothelial growth factor in degenerative lumbar disease) ในการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 29 (NGRC 29th The National Graduate Research Conference) ระหว่างวันที่ 24-25 ตุลาคม พ.ศ. 2556 ที่มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย