บทบาทของภาวะเครียดออกซิเดชันในโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

Role of Oxidative Stress in Lumbar Degenerative Disease

มนัสนันท์ จิตรจำนงค์[1] และสิทธิศักดิ์ หรรษาเวก[2*]

[1]นิสิตระดับปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

[2]ศ.ดร. ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

[1]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

[2]Prof. Dr. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

บทคัดย่อ

โรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมเป็นโรคที่เกิดจากการเสื่อมสภาพของหมอนรองกระดูกสันหลัง พบได้บ่อยในผู้สูงอายุ ปัจจัยที่เป็นสาเหตุร่วมทำให้เกิดการเสื่อมคือภาวะเครียดออกซิเดชัน และการสะสมของสารอนุมูลอิสระ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาบทบาทของตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชันและสารต้านอนุมูลอิสระ ในเลือดของผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม การศึกษานี้เป็นการศึกษาภาคตัดขวาง (cross-sectional study) แบ่งกลุ่มตัวอย่างเป็นสองกลุ่ม กลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี 75 ราย และกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม 75 ราย ซึ่งใช้ภาพถ่ายคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า MRI เพื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมตามระดับความรุนแรงของโรค โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครทั้งสองกลุ่มเพื่อตรวจวัดระดับพลาสมา protein carbonyl และ nitrite ค่า catalase activity ในเลือด และค่า SOD activity ในเลือด ในเลือด จากการศึกษาพบว่าระดับพลาสมา protein carbonyl และ nitrite กลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.01$ และ $P < 0.001$ ตามลำดับ) จากผลการทดลองพบว่าระดับพลาสมา protein carbonyl และ nitrite อาจเป็นตัวชี้วัดหนึ่งที่ใช้ในโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมได้

คำสำคัญ: ภาวะเครียดออกซิเดชัน, การเสื่อม, โรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

Abstract

Lumbar degenerative disease (LDD) is a chronic degenerative condition which is a major cause of low back pain in elderly. One of the factors which effect to this condition is oxidative stress. This study aimed to investigate the role of oxidative stress biomarkers and antioxidant biomarkers in LDD. This study is cross-sectional study. Whole blood samples were collected from LDD (N = 75) and controls (N = 75). The magnetic resonance imaging (MRI) was used to classify the severity of the disease. Plasma protein carbonyl, plasma nitrite, plasma catalase activity, plasma SOD activity, and plasma GPx activity were determined. The results show that plasma protein carbonyl and plasma nitrite were significantly higher in LDD than controls (P = 0.01 and $P < 0.001$, respectively). Therefore, plasma protein carbonyl and nitrite may have a potential as biomarkers for the assessment of LDD.

Keywords: Oxidative stress, degeneration, lumbar degenerative disease

บทนำ

โรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (lumbar degenerative disease) เป็นโรคที่พบได้บ่อยในผู้สูงอายุ และเป็นสาเหตุของอาการปวดหลังระดับเอวและสะโพก (low back pain) ปวดและชาไปตามรากประสาทที่ถูกกดทับ ทำให้เคลื่อนไหวได้จำกัดและคุณภาพชีวิตลดลง (1) โรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมักเกิดจากการเสื่อมของหมอนรองกระดูกสันหลังโดยวินิจฉัยจากการดูภาพถ่ายคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า MRI จะพบว่าความสูงของหมอนรองกระดูกสันหลังลดลง และมีการลดลงของจำนวนเซลล์ที่อยู่ในหมอนรองกระดูกสันหลัง รวมถึงปัจจัยอื่น ๆ เช่น การยกของหนัก เป็นต้น ปัจจัยที่เป็นสาเหตุร่วมทำให้เกิดการเสื่อมและอาการปวดหลังคือ การเสื่อมของเนื้อเยื่อภายในหมอนรองกระดูกสันหลัง ได้แก่ nucleus pulposus และ annulus fibrosus การเกิด DNA methylation การชราของเซลล์ (cellular senescence) ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เอนไซม์ที่ใช้ในการสลายโปรตีนภายในสารเนื้อพื้นนอกเซลล์ (matrix metalloproteinases in extracellular matrix) และการสะสมของสารอนุมูลอิสระ (free radical) (2)

ภาวะเครียดออกซิเดชันเกิดจากความไม่สมดุลกันระหว่างสารอนุมูลอิสระที่มากเกินไปและสารต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) ที่น้อยเกินไป โดยสารอนุมูลอิสระที่มากเกินไป ได้แก่ reactive nitrogen species (RNS) เช่น nitric oxide ($NO^{\bullet}$) nitric dioxide ($NO_2^{\bullet}$) และ reactive oxygen species (ROS) เช่น superoxide anion (O_2^-), hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$) hydrogen peroxide (H_2O_2) ซึ่งสามารถทำลายโปรตีน ไขมัน กรดนิวคลีอิก และคาร์โบไฮเดรตได้ (3) ตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชัน ได้แก่ protein carbonyl, 8-

hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), malondialdehyde (MDA), inducible nitric oxide synthase (iNOS) สำหรับสารต้านอนุมูลอิสระจะแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่เป็น enzymatic antioxidants เช่น catalase, superoxide dismutase และ glutathione peroxidase อีกกลุ่มคือ nonenzymatic antioxidants เช่น วิตามินอีและวิตามินซี (4) การศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าเนื้อเยื่อ ligamentum flavum ที่หนาตัวมีความสัมพันธ์กับตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชันที่มากขึ้นและความยาวเทโลเมียร์ที่สั้นลง เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อ ligamentum flavum ที่ไม่หนาตัวในผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ (Lumbar spinal stenosis) (5) การศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า ภาวะเครียดออกซิเดชันเร่งการแก่ชราของเซลล์ (cellular senescence) ในหมอนรองกระดูกสันหลัง ซึ่งนำไปสู่การเสื่อมของหมอนรองกระดูกสันหลัง (6)

จากการศึกษาที่ผ่านมายังไม่มีการศึกษาภาวะเครียดออกซิเดชันในโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม จึงเป็นเหตุให้คณะผู้วิจัยมีความสนใจศึกษาบทบาทของตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress biomarkers) ในผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม

วิธีดำเนินการ

ประชากร (population)

อาสาสมัครอายุตั้งแต่ 20 ปีขึ้นไป เป็นกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาคือ ผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่มีอาการปวดหลัง และ/หรืออาการปวดร้าวลงขา ที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีและยินยอมเข้าร่วมงานวิจัย

กระบวนการเก็บตัวอย่าง

ในการวิจัยนี้อาสาสมัครกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมที่ยังไม่ได้เข้ารักษาโดยวิธีผ่าตัดและอาสาสมัครกลุ่มควบคุมได้รับการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อตรวจวัดระดับตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชันและระดับสารต้านอนุมูลอิสระในเลือด โดยเก็บเลือดใส่หลอด ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) แล้วนำมาปั่นเหวี่ยง 100 x g ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้เกิดการตกตะกอน แล้วเก็บตัวอย่างชั้นส่วนใสซึ่งเป็นพลาสมา จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะถึงเวลาทำการทดลอง

การศึกษาตรวจวัดระดับ Protein carbonyl

วัดความเข้มข้นโปรตีน

นำพลาสมาที่ได้จากตัวอย่างเลือดมาวัดความเข้มข้นโปรตีนด้วยชุด PierceTM BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Ohio, USA) โดยอาศัยปฏิกิริยา reduction ของ Cu^{2+} เป็น Cu^{+} โดยโปรตีน ทำให้ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อน bicinchoninic acid:Cu^{+} ที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 562 นาโนเมตร

วัดระดับ Protein carbonyl

เตรียม blank โดยการหยอด 2N HCl ปริมาตร 250 µl ใส่ microtube 1 หลอด เตรียม test โดยการหยอด DNPH ปริมาตร 250 µl ใส่ microtube 3 หลอด เตรียมสารตัวอย่างหยอดใส่ microtube ทั้ง 4 หลอด จากนั้นผสมด้วยเครื่อง vortex แล้วนำไปบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 20% TCA ปริมาตร 300 µl ผสมด้วยเครื่อง vortex แล้วนำไปบ่มบ่นน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 G ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที เทของเหลวใน microtube ทิ้ง แล้วตากตะกอนให้แห้งโดยการเปิดฝาหลอดคว่ำไว้บนกระดาษซับแห้งเป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วยการเติม ethanol : ethyl acetate ปริมาตร 625 µl แล้วนำไป vortex จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 G ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที เทของเหลวใน microtube ทิ้ง แล้วตากตะกอนให้แห้งโดยการเปิดฝาหลอดคว่ำไว้บนกระดาษซับแห้งเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นละลายตะกอนด้วยการเติม GdmCl ปริมาตร 300 µl แล้วนำไปบ่มใน heat box ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที ดูดสารละลาย ใส่ 96-well plate ปริมาตร 200 µl แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 375 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาระดับ protein carbonyl ด้วยสมการ

$$\text{Protein carbonyl (nmol/mg protein)} = \frac{\mathbf{Absorbance_{375} \times 45.45(nmol/ml)}}{\mathbf{Total\ protein\ concentration\ (mg/ml)}}$$

การศึกษาตรวจวัดระดับ Nitrite

นำพลาสมาที่ได้จากตัวเลือดมาตรวจวัดระดับ nitrite ด้วย Griess reaction โดยอาศัยการที่ sulfanilamide สามารถจับกับ nitrite ในสารตัวอย่าง จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ N-1-napthylenediamine dihydrochloride (NED) เตรียม serial dilution ของสารละลายมาตรฐาน nitrite หยอดสารตัวอย่างสารละลายมาตรฐานที่ผ่านการทำ serial dilution ลงใน 96-well plate ปริมาตร 50 µl หยอดสารละลาย sulfanilamide ลงใน 96-well plate หลุมละ 50 µl แล้วบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที หยอดสารละลาย NED ลงใน 96-well plate หลุมละ 50 µl แล้วบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จนกระทั่งสารละลายเริ่มเปลี่ยนเป็นสีม่วง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

การศึกษาตรวจวัด Catalase activity

นำพลาสมาที่ได้จากตัวอย่างเลือดมาทำการศึกษา catalase activity โดยการวัดการสลายตัวของ H_2O_2 อาศัยหลักการที่ catalase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยน H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำและออกซิเจน ซึ่ง H_2O_2 จะสามารถจับกับ probe แล้วเกิดเป็นสารที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 570 นาโนเมตร

การศึกษาตรวจวัด Superoxide dismutase (SOD) activity

พลาสมาที่ได้จากตัวอย่างเลือดมาทำการศึกษา SOD activity โดยการวัดการสลายตัวของ O_2^- ที่สร้างขึ้นจาก xanthine oxidase (XO) อาศัยหลักการที่ SOD เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยน O_2^- ให้กลายเป็น H_2O_2 และออกซิเจน โดยจะใช้ Water-soluble tetrazolium salts (WST) ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาควบคู่กับ O_2^- ได้ formazan ที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 450 นาโนเมตร

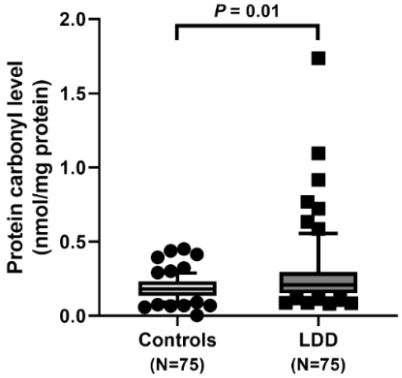
ผลการวิจัย

ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มควบคุม สัดส่วนเพศชายคิดเป็น ร้อยละ 28 และเพศหญิงคิดเป็น ร้อยละ 72 หรืออัตราส่วนระหว่างเพศชายต่อเพศหญิงเท่ากับ 1/2.57 กลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม สัดส่วนเพศชายคิดเป็นร้อยละ 37.33 และเพศหญิงคิดเป็น ร้อยละ 62.67 หรืออัตราส่วนระหว่างเพศชายต่อเพศหญิงเท่ากับ 1/1.68 เมื่อเปรียบเทียบเพศระหว่างสองกลุ่ม พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ สำหรับอายุเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมเท่ากับ 58.07 ± 0.93 ปี อายุเฉลี่ยของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมเท่ากับ 58.53 ± 1.73 ปี เมื่อเปรียบเทียบอายุระหว่างสองกลุ่ม พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ สำหรับดัชนีมวลกาย (BMI) เฉลี่ยของกลุ่มควบคุมเท่ากับ 24.32 ± 0.43 kg/m^2 ดัชนีมวลกายเฉลี่ยของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมเท่ากับ 25.67 ± 0.52 kg/m^2 เมื่อเปรียบเทียบดัชนีมวลกายระหว่างสองกลุ่ม พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

การศึกษาตรวจวัดระดับ Protein carbonyl

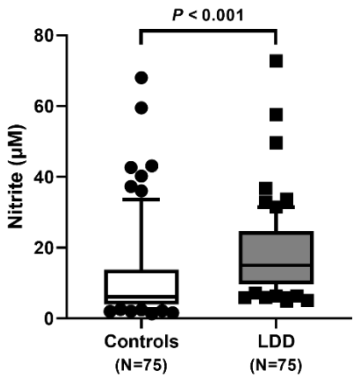
ผลการศึกษาตรวจวัดระดับ protein carbonyl ในพลาสมาพบว่า ระดับ protein carbonyl ในพลาสมาของกลุ่มควบคุมจำนวน 75 รายมีค่าเท่ากับ 0.18 (0.14 – 0.23) nmol/mg protein ระดับ protein carbonyl ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมจำนวน 75 รายมีค่าเท่ากับ 0.21 (0.15 – 0.30) nmol/mg protein พบว่าระดับ protein carbonyl ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.01) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การศึกษาตรวจวัดระดับ protein carbonyl ในเลือด

การศึกษาตรวจวัดระดับ Nitrite

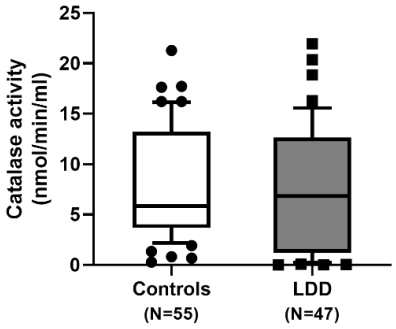
ผลการศึกษาตรวจวัดระดับ nitrite ในพลาสมาพบว่าระดับ nitrite ในพลาสมาของกลุ่มควบคุมจำนวน 75 รายมีค่าเท่ากับ 6.14 (3.98 – 13.80) μM ระดับ nitrite ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมจำนวน 75 รายมีค่าเท่ากับ 15.03 (9.73 – 24.69) μM พบว่าระดับ nitrite ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การศึกษาตรวจวัดระดับ nitrite ในเลือด

การศึกษาตรวจวัด Catalase activity

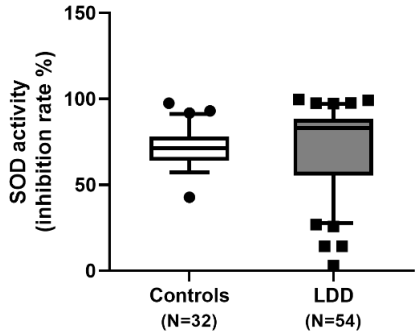
ผลการศึกษาตรวจวัดค่า catalase activity ในเลือดพบว่า กลุ่มควบคุมจำนวน 55 รายมีค่า catalase activity เท่ากับ 5.83 (3.67 – 13.23) nmol/min/ml กลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมจำนวน 47 รายมีค่า catalase activity เท่ากับ 6.83 (1.23 – 12.64) nmol/min/ml พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของค่า catalase activity ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 การศึกษาตรวจวัดค่า catalase activity ในเลือด

การศึกษาตรวจวัด Superoxide dismutase (SOD) activity

ผลการศึกษาตรวจวัด SOD activity ในเลือดพบว่า กลุ่มควบคุมจำนวน 32 รายมีค่า SOD activity เท่ากับร้อยละ 71.26 (64.11 – 78.05) กลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อมจำนวน 54 รายมีค่า SOD activity เท่ากับร้อยละ 83.08 (55.43 – 88.54) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของค่า SOD activity ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคกระดูกสันหลังส่วนเอวเสื่อม (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 การศึกษาตรวจวัดค่า SOD activity ในเลือด

อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาก่อนหน้าพบว่าระดับซีรัม protein carbonyl มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับจำนวนเกล็ดเลือดในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) จึงอาจใช้ระดับ protein carbonyl เพื่อเป็นตัวชี้วัดภาวะออกซิเดชันในโรคข้อเข่าเสื่อมรูมาตอยด์ในอนาคตได้ (7) อีกทั้งการศึกษาก่อนหน้าที่ระบุไว้ว่า nitric oxide ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดการทำลายกระดูกอ่อนและเมทริกซ์ในโรคข้ออักเสบ (8) โดย nitric oxide สลายตัวได้ nitrite เนื่องจาก nitric oxide เป็นสารที่สลายตัว

ไวในสารตัวอย่าง การศึกษานี้จึงทำการตรวจวัดระดับ nitrite ที่เป็นสารที่สเถียรและไม่สลายตัว อีกทั้งยังสามารถบ่งชี้ถึงระดับ nitric oxide ได้โดยตรง

ในการศึกษานี้ไม่พบความแตกต่างของตัวชี้วัดสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่น ๆ คือ TAC FRAP catalase activity และ SOD activity ในปี พ.ศ. 2562 Şeyho Cem Yücetaş และคณะ ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของ catalase ในเนื้อเยื่อ ligamentum flavum ที่หนาตัวจากผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบเทียบกับเนื้อเยื่อ ligamentum flavum ที่ไม่หนาตัวจากผู้ป่วยโรคหมอนรองกระดูกเคลื่อนทับเส้นประสาท (lumbar disc herniation) พบว่าการแสดงออกของ catalase ในเนื้อเยื่อ ligamentum flavum ที่หนาตัวจากผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการแสดงออกของ catalase ในเนื้อเยื่อ ligamentum flavum ที่ไม่หนาตัวจากผู้ป่วยโรคหมอนรองกระดูกเคลื่อนทับเส้นประสาท (lumbar disc herniation) (9) เนื่องจากตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาแตกต่างกัน การศึกษาก่อนหน้าเป็นการศึกษาในชิ้นเนื้อจากผู้ป่วย ในขณะที่การศึกษานี้เป็นการศึกษาในตัวอย่างพลาสมาของมนุษย์ รวมถึงวิธีการศึกษาในการศึกษาก่อนหน้าเป็นการศึกษาการแสดงออกของ catalase ด้วยวิธี immunohistological analysis ในขณะที่การศึกษานี้ใช้วิธี biological assay จึงอาจทำให้ไม่พบความแตกต่างของระดับสารต้านอนุมูลอิสระ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่นร่วมด้วย
2. งานวิจัยในอนาคตควรทำในรูปแบบ prospective cohort หรือ clinical trial study

เอกสารอ้างอิง

Ravindra VM, Senglaub SS, Rattani A, Dewan MC, Hartl R, Bisson E, et al. Degenerative Lumbar Spine Disease: Estimating Global Incidence and Worldwide Volume. Global Spine J. 2018;8(8):784-94.

Rider SM, Mizuno S, Kang JD. Molecular Mechanisms of Intervertebral Disc Degeneration. Spine Surg Relat Res. 2019;3(1):1-11.

Nita M, Grzybowski A. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:3164734.

Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? Am J Clin Nutr. 2000;72(2 Suppl):637S-46S.

Dechsupa S, Yingsakmongkol W, Limthongkul W, Singhatanadgige W, Honsawek S. Relative telomere length and oxidative DNA damage in hypertrophic ligamentum flavum of lumbar spinal stenosis. PeerJ. 2018;6:e5381.

Wang F, Cai F, Shi R, Wang XH, Wu XT. Aging and age related stresses: a senescence mechanism of intervertebral disc degeneration. Osteoarthritis Cartilage. 2016;24(3):398-408.

Khorasani S, Boroumand N, Ghaeni Pasavei A, Sahebari M, Hashemy SI. A Study on Association Between Protein Carbonyl and Anti-cyclic Citrullinated Peptide Antibody in Rheumatoid Arthritis: Introducing a New Supplementary Biomarker. Indian J Clin Biochem. 2020;35(3):347-52.

Ahmad N, Ansari MY, Haqqi TM. Role of iNOS in osteoarthritis: Pathological and therapeutic aspects. J Cell Physiol. 2020;235(10):6366-76.

Yucetas SC, Cakir T. Decreased catalase expression is associated with ligamentum flavum hypertrophy due to lumbar spinal canal stenosis. Medicine (Baltimore). 2019;98(15):e15192.