

RESEARCH ARTICLE

The Comparative Study of Chondroitin Sulfate Epitopes (3B3 and WF6) in Serum of Normal Dogs and Dogs with Osteoarthritis

Pailin Trakulsantirat¹, Peraphan Pothacharoen², Peerapol Sukon³, Naruepon Kampa⁴,
Nillapan Vongsahal⁵, Pakorn Sawatsing⁶, Prawit Butudom^{7*}

Abstract

Objective — To compare the level of chondroitin sulfate epitopes (3B3 and WF6) in serum of normal dogs and dogs with osteoarthritis.

Materials and Methods — Serum samples were collected from 126 dogs in which 100 dogs were normal and 26 dogs had osteoarthritis problems. Laboratory tests included complete blood count and blood chemistry. Concentrations of chondroitin sulfate epitopes (3B3 and WF6) were measured by competitive inhibition ELISA.

Results — That the dogs with osteoarthritis had a significantly higher concentration of WF6 epitope than the normal dogs ($p=0.008$). Not significantly different this epitope in age groups ($p=0.833$). The dogs with osteoarthritis had a significantly lower concentration of 3B3 epitope than the normal dogs ($p=0.034$). But dogs were younger than 2 years and over 5 years had a significantly higher concentration of 3B3 epitope than the age 2–5 years ($p=0.019$).

Conclusion — This study indicated WF6 epitope can be use as cartilage destruction marker in diagnosis osteoarthritis and 3B3 epitope as cartilage anabolism marker in following up osteoarthritic treatment.

KKU Vet J. 2010;20(2):143–153

<http://vet.kku.ac.th/journal/>

Keywords: Osteoarthritis; Chondroitin sulfate epitope; Dogs

¹Master degree of Science, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen university, Thailand 40002

²Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai university, Thailand 50100

³Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen university, Thailand 40002

⁴Department of Surgery&Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen university, Thailand 40002

⁵Veterinary medical teaching hospital, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen university, Thailand 40002

⁶Army War Dogs, Pak-Chong, Nakhonratchasima, Thailand 30130

⁷ Department of Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen university, Thailand 40002

*Corresponding author Email: navichaya@kku.ac.th

การเปรียบเทียบระดับคอนตรอยตินซัลเฟตอิพิโทป (3B3 และ WF6) ในซีรัมสุนัขปกติกับสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อม

ไพลิน ตระกูลสันติรัตน์¹, พีรพรรณ โปธาเจริญ², พีระพล สุขอ้วน³, นฤพนธ์ คำพา⁴, นิลพรรณ วงษาไฮ⁵,
ภากร สวัสดิ์สิงห์⁶, ประวิทย์ บุตรอุดม⁷*

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบระดับคอนตรอยติน ซัลเฟต อิพิโทป (3B3 และ WF6) ในซีรัมสุนัขสายพันธุ์ใหญ่ที่ปกติและสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อม

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ ตัวอย่างซีรัมสุนัขจำนวน 126 ตัวที่ศูนย์การสุนัขทหารเป็นสุนัขปกติจำนวน 100 ตัว (น้ำหนัก 28.85 ± 5.03 กิโลกรัม, อายุ 1.90 ± 1.51 ปี) และสุนัขที่มีภาวะข้อเสื่อมจำนวน 26 ตัว (น้ำหนัก 32.76 ± 5.11 กิโลกรัม, อายุ 2.47 ± 2.53 ปี) โรคข้อเสื่อมได้รับการยืนยันจากการถ่ายภาพทางรังสี นำตัวอย่างมาตรวจค่าโลหิตวิทยา ค่าเคมีคลินิก และวัดปริมาณสารคอนตรอยติน ซัลเฟต (3B3 อิพิโทป WF6 อิพิโทป) โดยวิธี Competitive inhibition ELISA

ผลการศึกษา พบว่าค่าความเข้มข้นของ WF6 อิพิโทป ในสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อม มีระดับสูงกว่าสุนัขปกติ อย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.008$) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p=0.833$) ของอิพิโทปชนิดนี้ในช่วงอายุต่างๆ กัน ในขณะที่ค่าความเข้มข้นของ 3B3 อิพิโทป พบว่าสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อมมีระดับความเข้มข้นของ 3B3 อิพิโทป ต่ำกว่าสุนัขปกติ อย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.034$) แต่พบว่าสุนัขอายุน้อยกว่า 2 ปี และมากกว่า 5 ปี มีระดับ 3B3 อิพิโทป ในซีรัมสูงกว่าสุนัขในช่วงอายุ 2-5 ปี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.019$)

ข้อสรุป การตรวจวัดคอนตรอยติน ซัลเฟตทั้งสองชนิดนี้อาจใช้เพื่อประกอบการวินิจฉัยโรคข้อเสื่อมในสุนัขโดย WF6 อิพิโทป อาจเป็น marker ที่ดีสำหรับการบ่งชี้ถึงการทำลายกระดูกอ่อนผิวข้อ ในขณะที่ 3B3 อิพิโทป อาจเป็น marker สำหรับใช้ติดตามผลการรักษาโรคข้อเสื่อมในสุนัขได้

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2553;20(2):143-153

<http://vet.kku.ac.th/journal/>

คำสำคัญ: โรคข้อเสื่อม; คอนตรอยตินซัลเฟตอิพิโทป; สุนัข

¹สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

²ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50100

³ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

⁴ภาควิชาสัตวศาสตร์และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

⁵โรงพยาบาลสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

⁶ศูนย์การสุนัขทหาร อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

⁷ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

*ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ E-mail: navichaya@kku.ac.th

บทนำ

โรคข้อเสื่อม (osteoarthritis หรือ degenerative joint disease) [1] เป็นภาวะที่เกิดจากการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนที่หุ้มผิวกระดูกข้อต่อ (articular cartilage) และเนื้อเยื่อบริเวณใกล้เคียงได้แก่ เยื่อหุ้มข้อ (synovium) กล้ามเนื้อ (muscle) ถุงหุ้มข้อ (joint capsule) กระดูกใต้กระดูกอ่อน (subchondral bone) เอ็นยึดกระดูก (ligament) และเอ็น (tendon) [2] ข้อเสื่อมเป็นการอักเสบของข้อต่อแบบไม่ติดเชื้อทำให้สัตว์เกิดความเจ็บปวด ไม่สามารถใช้ข้อนั้นได้เป็นปกติ มักจะเกิดกับข้อต่อที่มีการเคลื่อนไหวและรับน้ำหนักมาก เช่น บริเวณข้อศอก ข้อสะโพก และข้อเข่า ส่วนใหญ่พบมากในสัตว์ที่มีอายุมากและใช้ข้อมากกว่าปกติ [3] โรคข้อต่อเสื่อมไม่ใช่โรคที่ร้ายแรงถึงแก่ชีวิตแต่ก็เป็นโรคเรื้อรังที่ส่งผลกระทบต่อการดำเนินชีวิตเป็นอย่างมาก ปัญหาที่สำคัญที่สุดของโรคข้อเสื่อมคืออาการปวดที่เกิดขึ้น และความสามารถในการทำงานของข้อลดลง [4] เป็นแล้วกลับสู่สภาพเดิมไม่ได้ (irreversible diseases) การรักษาโรคข้อเสื่อมโดยทั่วไปเป็นเพียงเพื่อบรรเทาอาการปวด และป้องกันไม่ให้กระดูกอ่อนผิวข้อต่อถูกทำลายมากยิ่งขึ้น

การตรวจวินิจฉัยโรคข้อเสื่อมในสุนัขและมนุษย์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตรวจวินิจฉัยขั้นพื้นฐาน ได้แก่ การตรวจร่างกายทางกายภาพ การถ่ายภาพทางรังสี หรือการตรวจวินิจฉัยขั้นสูง ได้แก่ nuclear scintigraphy, magnetic resonance imaging (MRI) ซึ่งแม้ว่าจะให้ข้อมูลช่วยในการวินิจฉัยได้มากกว่า แต่มีค่าใช้จ่ายสูง และยังไม่เป็นที่แพร่หลายในการตรวจวินิจฉัยโรคของสุนัขและมนุษย์ในประเทศไทย โดยทั่วไปจะอาศัยการตรวจร่างกายทางกายภาพร่วมกับการถ่ายภาพทางรังสีเป็นวิธีที่สะดวก ค่าใช้จ่ายน้อยแต่มีความไวต่ำโดยเฉพาะการตรวจวินิจฉัยภาวะข้อเสื่อมในระยะเริ่มแรก มีการศึกษาพบว่า การเปลี่ยนแปลงทางรอยโรคของโรคข้อเสื่อมไม่มีความสัมพันธ์กับอาการทางคลินิก [5] และการตรวจวินิจฉัยด้วยการถ่ายภาพทางรังสี จะสามารถบ่งชี้ถึงความผิดปกติภายในข้อต่อได้ก็ต่อเมื่อกระบวนการของโรคและรอยโรคได้มีการดำเนินไปมากจนยากที่จะทำการรักษาให้กลับมามีสภาพเดิมได้ [6] ดังนั้นนักวิจัยจึงพยายามที่จะหาสารบ่งชี้ทางชีวภาพ (biological markers) ซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลที่สามารถบ่งบอกถึงรอยโรคที่เกิดขึ้นภายในข้อต่อของสุนัขและมนุษย์ได้ การศึกษาในมนุษย์แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงระดับสารบ่งชี้ทางชีวภาพบางชนิดช่วยให้การวินิจฉัยโรคทำได้เร็วขึ้น [7]

คอนดรอยติน ซัลเฟต (CS) เป็นไกลโคซามิโนไกลแคนที่พบมากที่สุดในร่างกาย มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของเซลล์กระดูกอ่อน พบว่าโปรติโอไกลัยแคนที่ถูกสร้างขึ้นใหม่เพื่อซ่อมแซมส่วนที่ถูกทำลายไปจะมีการเปลี่ยนแปลง และสามารถตรวจสอบได้โดยแอนติบอดี (Ab) ที่จับได้อย่างจำเพาะกับสายคอนดรอยติน ซัลเฟตที่สร้างขึ้นใหม่ (neo-epitope) เช่น โมโนโคลนอลแอนติบอดี ชนิด 3B3 ที่มีความจำเพาะต่อปลายสายคอนดรอยติน ซัลเฟต โปรติโอไกลัยแคนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ chondroitinase ABC โดยคอนดรอยติน ซัลเฟต ชนิด 3B3 เพิ่มสูงขึ้นในระยะแรกของการเกิดโรคข้อเสื่อม แต่จะลดลงในระยะที่โรคมีความรุนแรงหรือเรื้อรัง [8] และพบมากในสัตว์ที่ยังไม่เจริญเติบโตเต็มที่ [9] สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดี ชนิด WF6 เป็นแอนติบอดี

ที่พัฒนาขึ้นจากห้องปฏิบัติการวิจัยโรคข้อและกระดูก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งพบว่ามีความจำเพาะต่อสาย chondroitin-6-sulfate และ chondroitin 2, 6 disulfate ซึ่งโมโนโคลนอล แอนติบอดี ชนิด WF6 บนสายคอนตรอยติน ซัลเฟต นี้ไม่ต้องผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ เพื่อเผยอีพิโทป (native chondroitin sulfate epitope) จะพบสูงขึ้นเมื่อมีความผิดปกติของกระบวนการสลายสายคอนตรอยติน ซัลเฟต ในภาวะที่เกิดโรคข้อเสื่อมแบบเรื้อรัง [10]

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับคอนตรอยติน ซัลเฟต WF6 อีพิโทป และ 3B3 อีพิโทปของสุนัขปกติกับสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อม ที่พบการเปลี่ยนแปลงทางรังสีที่ข้อสะโพกเปรียบเทียบกับสุนัขปกติที่ไม่พบรอยโรคดังกล่าวเปรียบเทียบในชวงอายุต่างๆ กัน เพื่อเป็นแนวทางใหม่ในการวินิจฉัยโรค และประเมินระดับความรุนแรงของโรครวมทั้งนำไปใช้ติดตามการรักษาโรคข้อเสื่อมได้

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

สุนัขสายพันธุ์ใหญ่อายุแรกเกิดถึงมากกว่า 5 ปีจำนวน 126 ตัว คณะแพศ แบ่งเป็นสองกลุ่ม โดยกลุ่มแรกเป็นสุนัขที่ปกติโดยสุนัขทั้งหมดได้ผ่านการซักประวัติ การตรวจร่างกายทางกายภาพ และการตรวจวินิจฉัยอาการขากระเผลก และพบว่าไม่มีอาการผิดปกติทางคลินิกและไม่มีอาการของโรคข้อจำนวน 100 ตัว สำหรับกลุ่มที่สองเป็นสุนัขที่มีอาการของโรคข้อเสื่อมจำนวน 26 ตัว โดยพบรอยโรคข้อเสื่อมจากการถ่ายภาพทางรังสีในส่วนของข้อสะโพก (hip joint) สุนัขทดลองทั้งหมดได้มาจาก ศูนย์การสุนัขทหาร อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา โดยแบ่งเป็นกลุ่มดังนี้

1. กลุ่มสุนัขปกติ (Normal group) จำนวน 100 ตัว
 - 1.1 อายุแรกเกิดถึง 2 ปี จำนวน 70 ตัว
 - 1.2 อายุ 2 - 5 ปี จำนวน 18 ตัว
 - 1.3 อายุมากกว่า 5 ปี จำนวน 12 ตัว
2. กลุ่มสุนัขที่มีภาวะข้อเสื่อม (Abnormal group) จำนวน 26 ตัว

การเจาะเก็บเลือด

สุนัขทุกตัวจะถูกเก็บเลือด 5 มิลลิลิตร จากหลอดเลือดดำบริเวณขาหน้า (cephalic vein) โดยตัวอย่างเลือด 1 มิลลิลิตร เก็บในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เพื่อตรวจค่าโลหิตวิทยา ส่วนเลือดที่เหลือทำการเก็บในหลอดที่ไม่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด และนำไปปั่นแยกซีรัม และเก็บแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาตรวจวิเคราะห์

ตรวจหาค่าทางโลหิตวิทยาและค่าเคมีคลินิก

เลือด 1 มิลลิลิตร เก็บในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เพื่อตรวจค่าโลหิตวิทยาหาปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (PCV) และตรวจค่าเคมีในเลือด (blood chemistry) ได้แก่ creatinine และ ALT หากสุนัขทดลองมีค่า ALT และหรือ creatinine สูงกว่าค่ามาตรฐาน จะถูก

คัดออกจากการศึกษา ซีรัมที่เหลือเก็บไว้สำหรับนำไปตรวจหาปริมาณคอนทรอยดีติน ซัลเฟต อีพีโทป

ตรวจหาปริมาณคอนทรอยดีติน ซัลเฟต อีพีโทป

ตรวจหาปริมาณคอนทรอยดีติน ซัลเฟต อีพีโทป ชนิด WF6 (WF6 อีพีโทป) และ ชนิด 3B3 (3B3 อีพีโทป) ในซีรัมด้วยวิธี ELISA โดยใช้หลักการ competitive ELISA ตรวจหา WF6 อีพีโทป และ 3B3 อีพีโทป จากตัวอย่างซีรัม ตามวิธีของพีระพรรณ โปธาเจริญ [14] ในการวิเคราะห์ WF6 อีพีโทป จะใช้โปรตีนโกลบูลินแคนที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนของปลาฉลามเป็น coating antigen และ competitor, mAb WF6 เป็น primary antibody และ HRP - conjugated anti mouse - IgM เป็น secondary antibody ส่วนการวิเคราะห์ 3B3 อีพีโทป จะใช้ chondroitinase ABC ย่อยคอนทรอยดีติน ซัลเฟตในซีรัมก่อนทำการวิเคราะห์ ใช้ proteoglycan core protein ที่สกัดจากกระดูกอ่อนของหมูเป็น coating antigen และ competitor ใช้ mAb 3B3 เป็น primary antibody และ HRP - conjugated anti mouse - IgM เป็น secondary antibody

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS for Windows version 17 และเลือกระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p < 0.05$) เปรียบเทียบความเข้มข้นของคอนทรอยดีติน ซัลเฟต WF6 และ 3B3 อีพีโทป ในซีรัมสุนัขกลุ่มปกติและผิดปกติด้วย student T-test และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของระดับคอนทรอยดีติน ซัลเฟต WF6 และ 3B3 อีพีโทป กับปัจจัยต่างๆ โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ซึ่งค่าที่วัดได้จะอยู่ในหน่วยนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ng/ml)

ผลการศึกษา

ประชากรสุนัขที่ศึกษา

จากผลการตรวจค่า creatinine และ ALT ในซีรัมของสุนัขทั้งหมด พบว่าสุนัขปกติจำนวน 11 ตัวและสุนัขที่มีภาวะข้อเสื่อมจำนวน 2 ตัว ถูกคัดออกจากการศึกษา เนื่องจากมีค่า creatinine และหรือ ALT สูงกว่าค่ามาตรฐาน ดังนั้นการตรวจหาปริมาณคอนทรอยดีติน ซัลเฟต อีพีโทป ในซีรัมจึงวิเคราะห์จากสุนัขในจำนวนทั้งสิ้น 126 ตัว เป็นสุนัขปกติ 100 ตัว และสุนัขที่มีภาวะข้อเสื่อม 26 ตัว ซึ่งแต่ละกลุ่มมีลักษณะเฉพาะตามรายละเอียดใน **Table 1** และพบว่าสุนัขในกลุ่มที่มีภาวะข้อเสื่อมมีลักษณะทางพยาธิสภาพที่รุนแรงต่างกัน แต่ในการศึกษารั้งนี้ไม่ได้ทำการแบ่งระดับความรุนแรงของโรคออกเป็นกลุ่ม

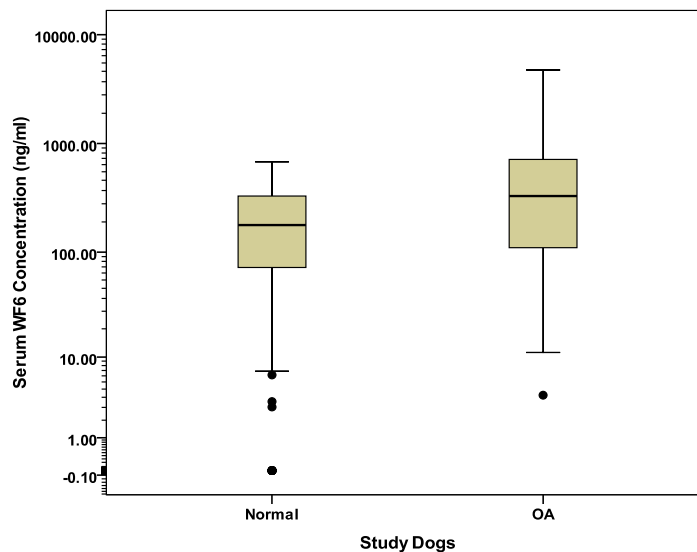
Table 1. Baseline Characteristics of Study Dogs

Groups	N	Age	Weight	Sex	
		Mean±SD	Mean±SD	Male	Female
Normal dogs	100	1.90 ± 1.51	28.85 ± 5.03	40	60
Dogs with osteoarthritis	26	2.47 ± 2.53	32.76 ± 5.11	13	13

เปรียบเทียบระดับคอนครอยติน ซัลเฟต อิพิโทป ในสุนัขกลุ่มปกติและสุนัขกลุ่มที่เป็นโรคข้อเสื่อม

การวัดระดับความเข้มข้นของคอนครอยติน ซัลเฟต WF6 อิพิโทป ในซีรัมของสุนัขกลุ่มปกติ เปรียบเทียบกับสุนัขกลุ่มที่เป็นโรคข้อเสื่อม พบว่า ความเข้มข้นของ WF6 อิพิโทป (มัธยฐาน, เปอร์เซ็นไทล์ที่ 25, 75) ในซีรัมสุนัขกลุ่มที่เป็นโรคข้อเสื่อม (332.60, (108.72, 761.01)) มีระดับสูงกว่าสุนัขกลุ่มปกติ (177.88, (71.13, 329.72)) อย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.008$) (**Figure 1**) ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของ 3B3 อิพิโทป ในซีรัมของสุนัขกลุ่มปกติเปรียบเทียบกับสุนัขกลุ่มที่เป็นโรคข้อเสื่อม พบว่า สุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อม (39.60, (12.95, 58.65)) มีระดับความเข้มข้นของ 3B3 อิพิโทป ในซีรัมต่ำกว่า สุนัขปกติ (50.31, (26.80, 99.62)) อย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.034$) (**Figure 2**)

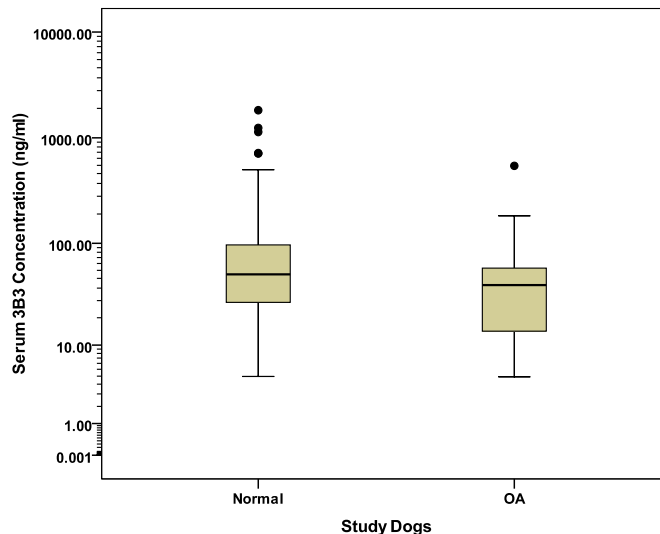
Figure 1. Comparison of Serum WF6 Concentration Between Normal and Dogs with Osteoarthritis



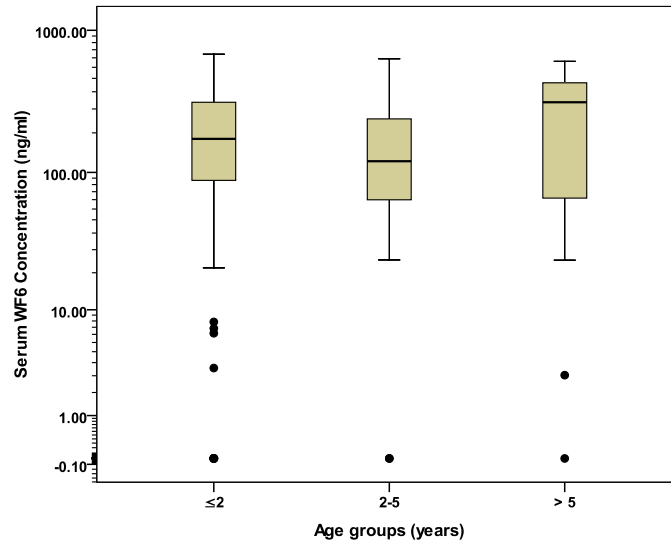
Lines in the boxes show median value. The lower and the upper edge of the boxes show value at percentile 25 and 75. And between the lines outside the boxes show the maximum and minimum values. Circles show outlier values.

เมื่อดูการเปลี่ยนแปลงของระดับคอนทรอยติน ซัลเฟต อีพิโทป ในซีรัมของสุนัขกลุ่มปกติ เปรียบเทียบใน ช่วงอายุต่างๆ กันพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p=0.822$) ของระดับความเข้มข้น WF6 อีพิโทป สุนัขที่มีอายุน้อยกว่า 2 ปี (185.96, (87.88, 360.91)), อายุ 2-5 ปี (165.87, (70.16, 368.26)) และอายุมากกว่า 5 ปี (264.70, (39.37, 427.63)) (Figure 3) ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของ 3B3 อีพิโทป ในซีรัมของสุนัขกลุ่มปกติ เปรียบเทียบใน ช่วงอายุต่างๆ กัน พบว่าสุนัขอายุน้อยกว่า 2 ปี (56.19, (28.78, 116.83)) และมากกว่า 5 ปี (45.69, (18.54, 60.70)) มีระดับ 3B3 อีพิโทป ในซีรัมสูงกว่าสุนัขในช่วงอายุ 2-5 ปี (34.43, (20.01, 46.60)) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.019$) (Figure 4)

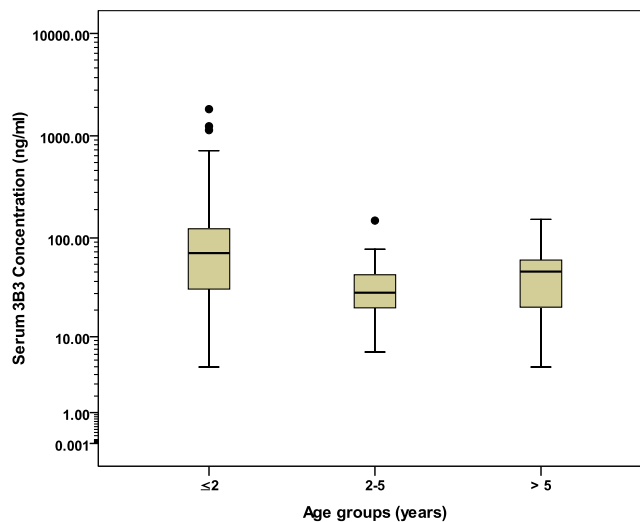
Figure 2. Comparison of Serum 3B3 Concentration Between Normal and Dogs with Osteoarthritis.



Lines in the boxes show median value. The lower and the upper edge of the boxes show value at percentile 25 and 75. And between the lines outside the boxes show the maximum and minimum values. Circles show outlier values.

Figure 3. Comparison of Serum WF6 Concentration Among Normal Dogs Categorized by Age

Lines in the boxes show median value. The lower and the upper edge of the boxes show value at percentile 25 and 75. And between the lines outside the boxes show the maximum and minimum values. Circles show outlier values.

Figure 4. Comparison of Serum 3B3 Concentration Among Normal Dogs Categorized by Age

Lines in the boxes show median value. The lower and the upper edge of the boxes show value at percentile 25 and 75. And between the lines outside the boxes show the maximum and minimum values. Circles show outlier values.

วิจารณ์

โมโนโคลนอล แอนติบอดี ชนิด WF6 เป็นโมโนโคลนอล แอนติบอดี ที่ผลิตและพัฒนาขึ้นจากห้องปฏิบัติการวิจัยโรคกระดูกและข้อ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งมีความจำเพาะต่อคอนดรอยติน ซัลเฟตชนิด chondroitin-6-sulfate (CS-C) และ chondroitin 2,6 disulfate (CS-D) ที่พบได้ทั่วไปในกระดูกอ่อนหุ้มผิวข้อต่อ จากการศึกษาค้นคว้าพบว่า ความเข้มข้นของคอนดรอยติน ซัลเฟต WF6 อีพิโทปในสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อมมีระดับสูงกว่าสุนัขปกติ อย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.008$) สอดคล้องกับปริมาณความเข้มข้นของ WF6 อีพิโทป ในซีรัมของผู้ป่วยที่เป็นโรคข้อเสื่อมสูงกว่าในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ [14,15] เนื่องจากการสลายของสายคอนดรอยติน ซัลเฟต ออกสู่ซีรัมในภาวะที่เกิดโรคข้อเสื่อม ทำให้พบคอนดรอยติน ซัลเฟต ชนิดนี้ในระดับสูง นอกจากนี้ความรุนแรงของโรคก็อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ระดับคอนดรอยติน ซัลเฟต ในซีรัมแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าปริมาณคอนดรอยติน ซัลเฟต WF6 อีพิโทป มีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนข้อต่อ [11] ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p=0.822$) ของอีพิโทป ชนิดนี้เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละช่วงอายุของสุนัข ซึ่งสอดคล้องกับ ศิริวรรณ และคณะ พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) ของระดับ WF6 อีพิโทป ในซีรัมของม้าปกติที่ช่วงอายุต่างๆ กัน กรกฎ และคณะ พบว่า น้ำหนักร่างกายไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับคอนดรอยติน ซัลเฟต ชนิด WF6 ทำให้สามารถยืนยันว่า การเปลี่ยนแปลงระดับคอนดรอยติน ซัลเฟตชนิด WF6 ในซีรัมที่มีระดับเพิ่มสูงขึ้นในภาวะโรคข้อเสื่อมน่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะโรคข้อเสื่อมในสัตว์โดยตรง

มีรายงานการตรวจวัดคอนดรอยติน ซัลเฟต โปรตีนโอกลัยแคนโดยใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดีหลายชนิดแต่ที่ได้รับความนิยมมากที่สุดและมีการผลิตออกมาในเชิงพาณิชย์ด้วยคือ mAb 3B3 ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีตัวนี้จะจำเพาะต่อสายคอนดรอยติน ซัลเฟต ที่สร้างใหม่โดยเซลล์กระดูกอ่อน [12] และมีรายงานว่าความเข้มข้นของ 3B3 อีพิโทป มีค่าสูงมากในกลุ่มลูกม้าแรกเกิดถึงสองปี [9] และมีปริมาณต่ำลงในสุนัขกลุ่มที่พรอยโรคข้อสะโพกเจริญผิดปกติ [11] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของกรกฎ และคณะ ได้ทำการเหนี่ยวนำให้สุนัขเป็นโรคข้อเสื่อม และพบว่าระดับ 3B3 อีพิโทป ลดลงในช่วงที่โรคกำลังพัฒนาเป็นแบบเรื้อรัง คอนดรอยตินซัลเฟต 3B3 อีพิโทป นี้จะมีปริมาณสูงขึ้น ในระยะเริ่มแรกของภาวะข้อเสื่อม เนื่องจากกระดูกอ่อนได้มีการปรับตัวซ่อมแซมตัวเองโดยผลิตสายคอนดรอยตินซัลเฟต เพิ่มมากขึ้นเพื่อสร้างเป็นแอกลิแคนและซดเซยส่วนที่ถูกทำลายไป แต่หากการทำลายมีมากหรือเป็นลักษณะของโรคเรื้อรัง เซลล์กระดูกอ่อนเองก็จะถูกทำลายไม่สามารถผลิตสายคอนดรอยติน ซัลเฟต ใหม่ออกมาได้อีก [13] การทดลองครั้งนี้พบว่า ปริมาณของ 3B3 อีพิโทป ในสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อม มีระดับความเข้มข้นของ 3B3 อีพิโทป ในซีรัมต่ำกว่าสุนัขปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.034$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของศิริพร และคณะ พบว่าปริมาณของ 3B3 อีพิโทป ของม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อมต่ำกว่าม้าปกติอย่างมีนัยสำคัญ อาจเป็นเพราะกลุ่มตัวอย่างของสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อมที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้ตัดสินจากภาพรังสี ซึ่งจะมองเห็นพยาธิสภาพของกระดูกอ่อนผิวข้อก็เมื่อเกิดความเสียหายไปมากแล้วจนทำให้อัตราการสร้างสายคอนดรอยตินซัลเฟต โปรตีนโอกลัยแคนมีน้อยกว่าการสลาย ระดับ 3B3 อีพิโทป จึงลดต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับสุนัขปกติ นอกจากนี้ยังมีการ

ศึกษา ความเข้มข้นของคอนตรอยดินซัลเฟต 3B3 อีพีโทป ในซีรัมระหว่างสุนัขปกติในแต่ละช่วงอายุ พบว่า สุนัขอายุน้อยกว่า 2 ปี และมากกว่า 5 ปี มีระดับคอนตรอยดิน ซัลเฟต 3B3 อีพีโทป ในซีรัมสูงกว่า สุนัขในช่วงอายุ 2-5 ปีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.019$) นอกจากนี้ความรุนแรงของโรคก็อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ระดับคอนตรอยดิน ซัลเฟต ในซีรัมแตกต่างกัน ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการแบ่งระดับความรุนแรงของโรคข้อเสื่อมจากข้อสะโพกว่ามีความรุนแรงระดับใดบ้างจากภาพถ่ายทางรังสี ดังนั้นอาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ความเข้มข้นของ 3B3 อีพีโทป มีความแตกต่างของอีพีโทปชนิดนี้ในสุนัขปกติอายุมากกว่า 5 ปีสูงกว่าสุนัขช่วงอายุ 2-5 ปี เนื่องจากอาจมีสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อมในระยะแรกแฝงอยู่ในกลุ่มอายุมากกว่า 5 ปี ทำให้มีกระบวนการสร้างแอกทิลแคนเพื่อรักษาสมดุลเกิดขึ้นภายในข้อ จึงพบความแตกต่างของความเข้มข้นของ 3B3 อีพีโทป สูงขึ้นในช่วงอายุดังกล่าว การพบปริมาณ 3B3 อีพีโทป สูงในสุนัขอายุน้อยกว่า 2 ปีซึ่งเป็นวัยที่กระดูกอ่อนกำลังมีการเจริญเติบโต เป็นยืนยันอีกครั้งว่า 3B3 อีพีโทป น่าจะเป็น marker ที่ดีของภาวะ anabolism ของกระดูกอ่อน

อย่างไรก็ตาม การศึกษาในครั้งนี้มีข้อจำกัดหลายประการ จึงทำให้มีจำนวนตัวอย่างไม่มากนัก และไม่ได้แบ่งกลุ่มช่วงอายุสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อม ควรมีวิธีการแบ่งกลุ่มสุนัขปกติและสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อมอย่างละเอียด การแบ่งกลุ่มสุนัขจากการถ่ายภาพรังสีเพียงครั้งเดียวอาจไม่สามารถทำการแบ่งกลุ่มสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อมออกจากสุนัขปกติได้ เนื่องจากภาพถ่ายรังสีสามารถตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของข้อเมื่อเกิดโรคข้อเสื่อมระยะเรื้อรังหรือมีการพัฒนาของโรคข้อไปมากแล้ว และไม่สามารถตรวจพบโรคข้อเสื่อมในระยะแรกได้ ในการจะวินิจฉัยให้ถูกต้องและเพิ่มความแม่นยำในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างสุนัขควรมีการถ่ายภาพทางรังสีในสุนัขซ้ำ (ทุก 6 เดือน) จะทำให้สามารถเปรียบเทียบภาพถ่ายรังสี และประเมินการเปลี่ยนแปลงของข้อต่อที่มีการพัฒนาขึ้น ซึ่งจะเห็นได้ถ้าสุนัขนั้นมีความผิดปกติจริง และควรมีการศึกษาต่อไปถึงการเปลี่ยนแปลงของระดับคอนตรอยดิน ซัลเฟต ในซีรัมสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อมในช่วงอายุต่างๆกัน และควรมีการวัดระดับความรุนแรงของสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อมร่วมด้วย และควรมีการศึกษาน้ำไขข้อร่วมกับสารบ่งชี้ทางชีวภาพชนิดอื่นๆ เช่น เคอราแตน ซัลเฟต หรือ ไฮยาลูโรแนน ในจำนวนสุนัขที่มากขึ้น และศึกษาระดับความรุนแรงของโรค รวมถึงการติดตามการรักษาโรคข้อในระยะยาวต่อไป เพื่อเพิ่มพูนความรู้ความเข้าใจในการดำเนินไปของโรคหรือการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพและเพื่อช่วยวินิจฉัยรวมทั้งวางแผนในการรักษาโรคข้อเสื่อมในสุนัขได้อย่างเหมาะสม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณพระคุณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และดูแลเอาใจใส่ตลอดระยะเวลาของการศึกษา และการสนับสนุนจากภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีต่างๆในการทำวิจัย รวมทั้งบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์ (รหัสทุน 52111115) ครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Wenhua L, Nancy B, Tibor T, Scott T, Dale R, Rajesh V, et al. Spontaneous and experimental osteoarthritis in dog: similarities and differences in proteoglycan levels. *J. Orthopaedic Res.* 2003; 21:730-737.
2. Marijnissen AC, Roermund PM, TeKoppele JW, Bijlsma J, Lafeber FP. The canine 'groove' model, compared with the ACLT model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;10:145-155.
3. Ngavongpanit K. Medical Management in osteoarthritic dogs. *Chiang Mai Vet J* 2006; 4:63-72.
4. Sunthornwipart K, Chuthatep S. Diagnosis of lameness in dogs and cats. *J Thai Vet Practitioners.* 2002; 14:27-39.
5. McIlwraith CW, Vachon AM. Review of pathogenesis and treatment of degenerative joint disease. *Equine Vet J.* 1998;6:3-11
6. Todhunter RJ, Fubini SL, Freeman KP and Lust G. Concentrations of keratin sulfate in plasma and synovial fluid from clinically normal horses and horses with joint disease. *J Am Vet Med Assoc.* 1997; 210(3):369-374.
7. Uesaka S, Nakayama Y, Shirai Y and Yoshihara K. Serum and synovial fluid levels of chondroitin sulfate in patients with osteoarthritis of the knee joint. *J Nippon Med Sch.* 2001;68:165-170.
8. Goldberg RL and Rubin AS. Serum hyaluronate as a marker for disease severity in the Lactobacillus casei model of arthritis in the rat. *J Rheumatol.* 1989;16:92-96.
9. Peansukmanee S, Trinarong C, Kongtawelert P, Ong-chai S. Chondroitin sulfate epitope in sera of normal and osteoarthritic horses. *Chiang Mai Vet J.* 2003;1:3-10.
10. Ngavongpanit K, Ong-Chai S. Biological marker for canine osteoarthritis diagnosis. *Chiang Mai Vet J.* 2004;2:39-49.
11. Ngavongpanit K, Ong-Chai S, Itthiarbha A, Kongtawelert P. Comparative study of serum chondroitin sulfate WF6 and 3B3 epitope in serum of non and hip dysplastic dogs. *J Thai Vet Med Assoc.* 2005; 56:1-12.
12. Caterson BJ, Griffin Mahmoodian F, Sorrell JM. Monoclonal antibodies against chondroitin sulphate isomers: their use as probes for investigating proteoglycan metabolism. *Biochem Soc Trans.* 1990; 18:820-823.
13. Hardingham TE. Change in chondroitin sulphate structure induced by joint disease. *Acta Scand.* 1995; 226:107-110.
14. Pothacharoen P. The Quantitative analysis of chondroitin sulfate epitopes and hyaluronan as diagnostic markers for degenerative joint disease by ELISA technique [dissertation]. Chiang Mai: Graduate School, Chiang Mai University, 2002:86.
15. Pothacharoen P, Teekachunhatean S, Louthrenoo W. Raised chondroitin sulfate epitopes and hyaluronan in serum from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;4:299-301.

