บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

สุนัขสายพันธุ์ใหญ่อายุแรกเกิดถึงมากกว่า 5 ปีจำนวน 126 ตัว คละเพศ แบ่งเป็นสองกลุ่ม โดยกลุ่มแรกเป็นสุนัขที่ปกติโดยสุนัขทั้งหมดได้ผ่านการซักประวัติ การตรวจร่างกายทางกายภาพ และการตรวจวินิจฉัยอาการขากระเผลก (lameness) และพบว่าไม่มีอาการผิดปกติทางคลินิกและไม่มีอาการของโรคข้อ จำนวน 100 ตัว สำหรับกลุ่มที่สองเป็นสุนัขที่ผิดปกติ คือมีอาการของโรคข้อเสื่อม จำนวน 26 ตัว โดยพบรอยโรคข้อเสื่อมจากการถ่ายภาพทางรังสีในส่วนข้อสะโพก สุนัขทดลองทั้งหมดจะได้มาจาก ศูนย์การสุนัขทหาร อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา โดยแบ่งเป็นกลุ่มดังนี้

1. กลุ่มสุนัขปกติ (Normal group) จำนวน 100 ตัว
   - 1.1 อายุ 6 เดือนถึง 2 ปี จำนวน 70 ตัว
   - 1.2 อายุ 2 – 5 ปี จำนวน 18 ตัว
   - 1.3 อายุมากกว่า 5 ปี จำนวน 12 ตัว
2. กลุ่มสุนัขผิดปกติ (Abnormal group) จำนวน 26 ตัว

2. สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1 สารเคมี

1. TRIZMA-hydrocholride (Tris[hydroxymethyl]-aminomethane hydrochloride)
2. *o*-phenylenediamine
3. Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20)
4. Bovine Serum Albumin (BSA)
5. Di-sodium hydrogen phosphate anhydrous
6. Potassium sulfate
7. Sodium chloride
8. Sodium-dihydrogen phosphate
9. Sodium acetate trihydrate
10. Sodium hydrogen carbonate
11. Sodium carbonate anhydrous

12. Citric monohydrate
13. Potassium chloride
14. Sodium acetate trihydrate
15. Tri-sodium citrate dihydrate
16. Chondroitin sulfate C
17. 3B3 mAb
18. WF6 mAb
19. IgM-specific peroxidase conjugated anti-mouse immunoglobulin

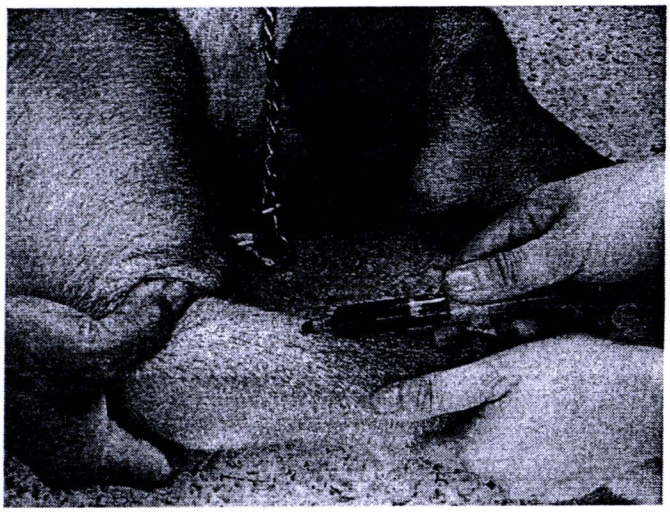
2.2 อุปกรณ์

1. Maxisorb plate
2. Vortex-mixture
3. Spectrophotometer
4. Micro Pipette
5. Pipette Tip
6. Incubater 37 ^{o}C
7. Centrifuge
8. Micro Centrifuge
9. AU400 (Olympus)
10. EDTA tube
11. Serum tube
12. Microtube
13. Heparinized capillary tube

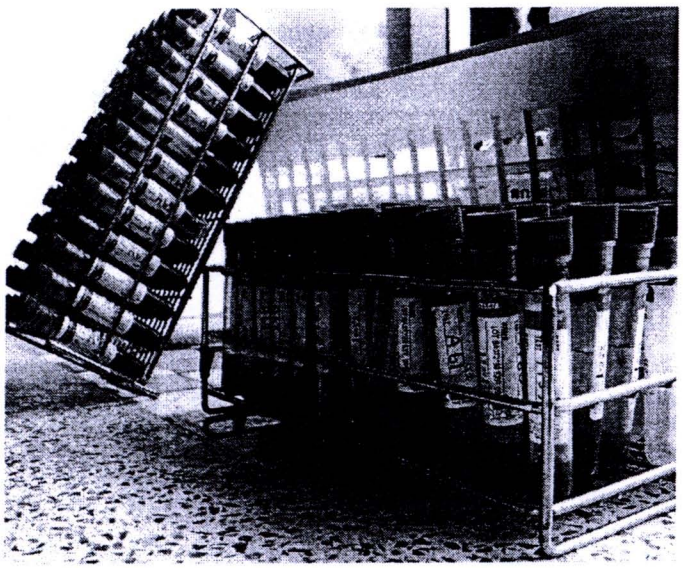
3. วิธีการทดลอง

3.1 การเก็บเลือด

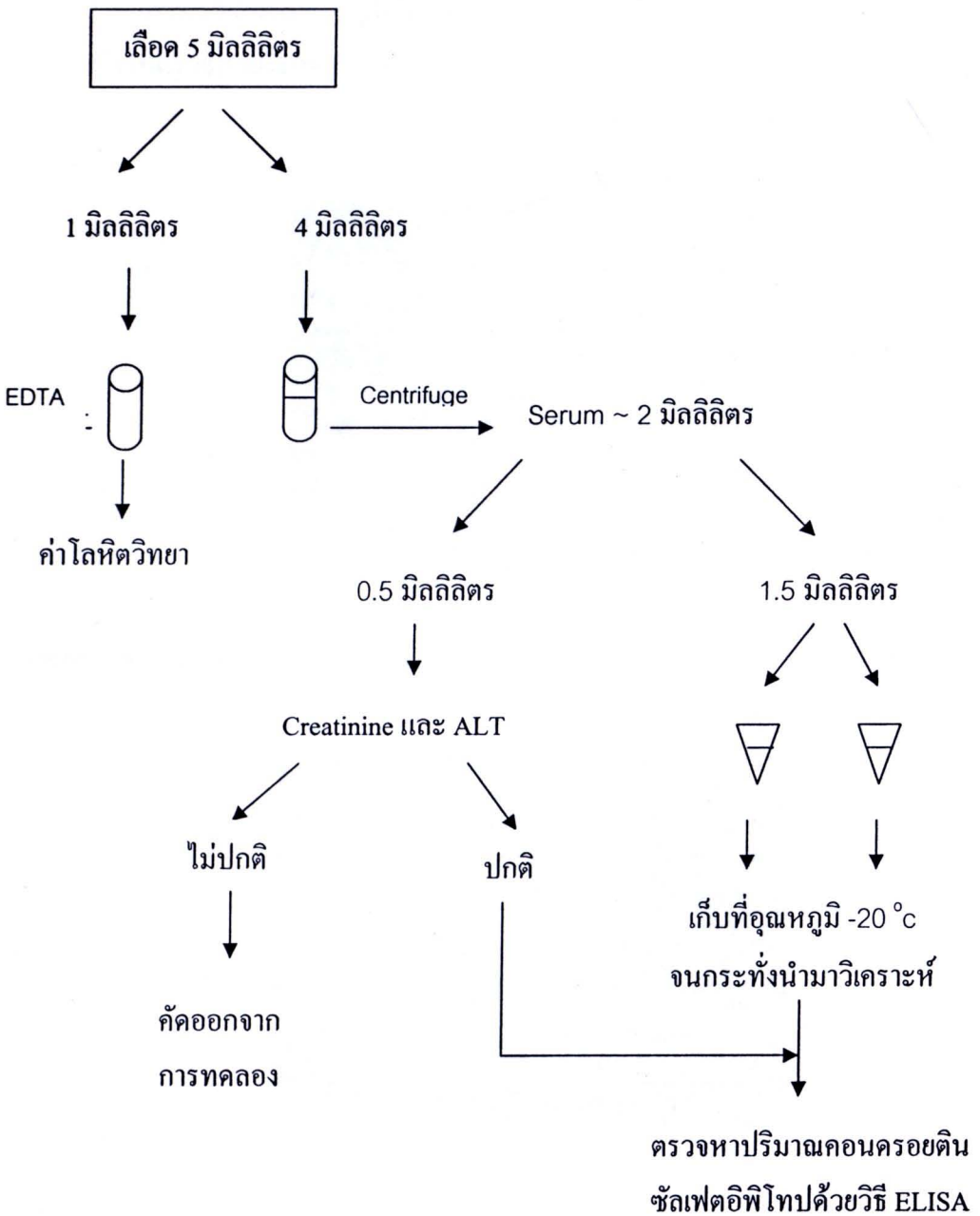
สุนัขทุกตัวจะถูกเก็บเลือดประมาณ 5 มิลลิลิตร จากหลอดเลือดดำบริเวณขาหน้า (cephalic vein) โดยตัวอย่างเลือด 1 มิลลิลิตร เก็บในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Ethylene Diaminetetraacetate: EDTA) เพื่อตรวจค่าโลหิตวิทยา ส่วนเลือดที่เหลือทำการเก็บในหลอดที่ไม่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด และนำไปปั่นแยกซีรั่ม และเก็บแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาตรวจวิเคราะห์



ภาพที่ 7 แสดงการเก็บเลือดสุนัขเส้นเลือดบริเวณขาหน้า (cephalic vein)



ภาพที่ 8 แสดงการเก็บเลือดในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) และหลอดที่ไม่มีการแข็งตัวของเลือด

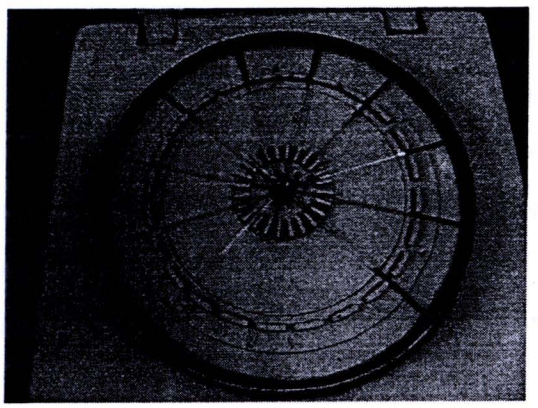


ภาพที่ 9 แผนภาพแสดงขบวนการคัดเลือกตัวอย่างเลือด

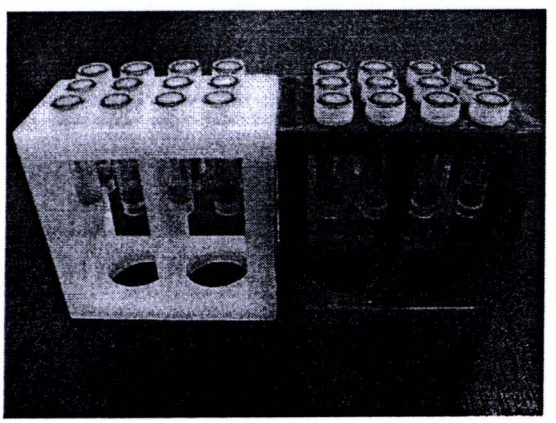
3.2 ตรวจหาค่าทางโลหิตวิทยาและค่าเคมีคลินิก

เลือด 1 มิลลิลิตร เก็บในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) เพื่อตรวจค่าโลหิตวิทยา หาปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Packed Cell Volume: PCV) และตรวจค่าเคมีในเลือด (Blood chemistry) ได้แก่ creatinine และ Alanine aminotransferase (ALT) หากสุนัขทดลอง

มีค่า ALT และหรือ Creatinine สูงกว่าค่ามาตรฐาน จะถูกคัดออกจากการทดลอง ซีรั่มที่เหลือเก็บไว้สำหรับนำไปตรวจหาปริมาณคอนครอยอิตินซัลเฟตอิพิโทป



ภาพที่ 10 แสดงการตรวจค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (PCV) ด้วยเครื่องMicro Centrifuge



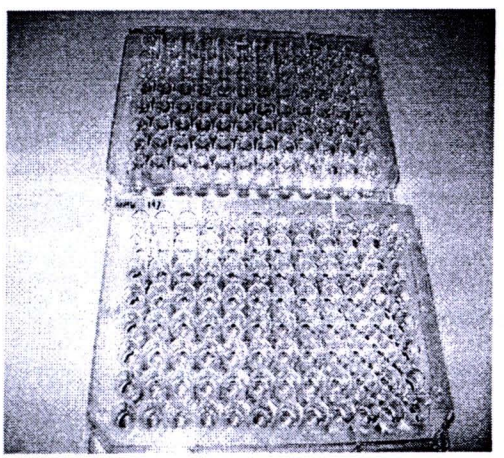
ภาพที่ 11 ซีรั่มที่ใช้ในการค่าเคมีในเลือด (Blood chemistry) และตรวจหาปริมาณคอนครอยติน ซัลเฟต อิพิโทป

3.3 ตรวจหาปริมาณคอนดรอยตินซัลเฟตอิพิโทป

ตรวจหาปริมาณคอนดรอยตินซัลเฟต อิพิโทป ชนิด WF6 (WF6 อิพิโทป) และ ชนิด 3B3 (3B3 อิพิโทป) ในซีรั่มด้วยวิธี ELISA โดยใช้หลักการ competitive ELISA ตรวจหา WF6 อิพิโทป และ 3B3 อิพิโทป จากตัวอย่างซีรั่ม ตามวิธีของพีระพรรณ โปธาเจริญ (Peerapan, 2000)ในการวิเคราะห์ WF6 อิพิโทป จะใช้โปรตีโอกลัยแคนที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนของปลาฉลามเป็น

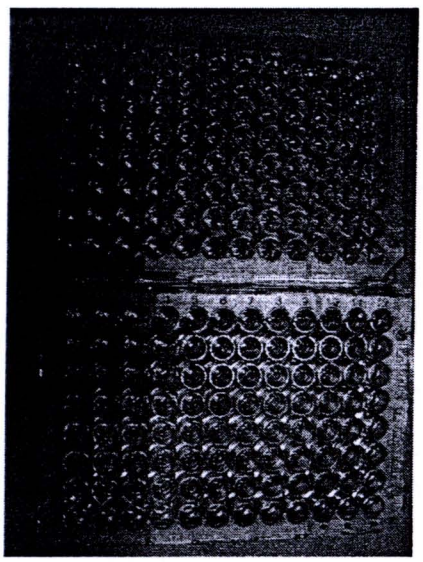
coating antigen และ competitor, mAb WF6 เป็น primary antibody และ HRP – conjugated anti mouse - IgM เป็น secondary antibody ส่วนการวิเคราะห์ 3B3 อิพิโทป จะใช้ chondroitinase ABC ย่อยคอนดรอยตินซัลเฟตในซีรั่มก่อนทำ การวิเคราะห์ ใช้ proteoglycan core protein ที่สกัดจากกระดูกอ่อนของหมูเป็น coating antigen และ competitor ใช้ mAb 3B3 เป็น primary antibody และ HRP – conjugated anti mouse - IgM เป็น secondary antibody

การตรวจหาระดับคอนดรอยตินซัลเฟต WF6 อิพิโทป และ 3B3 อิพิโทป ด้วยวิธี ELISA โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492, 620 nm (โดยที่ 492 nm เป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสีที่เกิดขึ้น ส่วน 620 nm เป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสิ่งรบกวน) โดยสีที่เกิดขึ้นจะแปรผกผันกับปริมาณคอนดรอยตินซัลเฟตอิพิโทปในซีรั่มสุนัข และนำค่าที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาปริมาณคอนดรอยตินซัลเฟตอิพิโทปโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ค่าที่ได้มีหน่วยเป็นนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ng/ml) ดังแสดงในภาพที่ 14 และ 15



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ภาพที่ 12 การตรวจหาระดับคอนดรอยตินซัลเฟต WF6 อิพิโทป ด้วยวิธี ELISA



ภาพที่ 13 การตรวจหาระดับคอนดรอยตินซัลเฟต 3B3 อิพิโทป ด้วยวิธี ELISA

3.4 ประชากรสุนัขที่ศึกษา

สุนัขทุกตัวที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับการวินิจฉัยโรคข้อเสื่อม จากการถ่ายภาพทางรังสีของข้อสะโพก (hip) เพื่อใช้เป็นตัวแทนของโรคข้อเสื่อม ตรวจค่าโลหิตวิทยา และค่าเคมีในเลือด จากผลการตรวจค่า creatinine และ ALT ในซีรั่มของสุนัขทั้งหมด พบว่าสุนัขปกติจำนวน 11 ตัว และสุนัขที่มีภาวะข้อเสื่อมจำนวน 2 ตัวถูกคัดออกจากการศึกษา เนื่องจากมีค่า ALT และหรือ Creatinine สูงกว่าค่ามาตรฐาน ดังนั้นการตรวจหาปริมาณคอนดรอยตินซัลเฟต อิพิโทปในซีรั่มจึงวิเคราะห์จากสุนัขในจำนวนทั้งสิ้น 126 ตัว เป็นสุนัขปกติ 100 ตัว และสุนัขที่มีภาวะข้อเสื่อม 26 ตัว (ตารางที่ 4-1) และพบว่าสุนัขในกลุ่มที่มีภาวะข้อเสื่อมมีลักษณะทางพยาธิสภาพที่รุนแรงต่างกัน แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการแบ่งระดับความรุนแรงของโรคออกเป็นกลุ่ม

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนตัวอย่าง (N), อายุ (ปี), น้ำหนัก (กก.) และเพศของสุนัข ในกลุ่มประชากรสุนัขที่ศึกษา

กลุ่มตัวอย่าง	N	อายุ (ปี)	น้ำหนัก (กก.)	เพศ	
		Mean±SD	Mean±SD	ผู้	เมีย
สุนัขปกติ	100	1.90 ± 1.51	28.85 ± 5.03	40	60
สุนัขโรคข้อเสื่อม	26	2.47 ± 2.53	32.76 ± 5.11	13	13

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS for Windows version 17 และเลือกระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p<0.05$) เปรียบเทียบความเข้มข้นเฉลี่ยของคอนดรอยติน ซัลเฟต WF6 และ 3B3 อิพิโทป ในซีรั่มสุนัขกลุ่มปกติและผิดปกติด้วย student T-test และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของระดับคอนดรอยติน ซัลเฟต WF6 และ 3B3 อิพิโทป กับปัจจัยต่างๆ โดยใช้ analysis of variance (ANOVA) ซึ่งค่าที่วัดได้จะอยู่ในหน่วยนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ng/ml)