



246818



การเปรียบเทียบระดับคอนดรอยตินซัลเฟตอีพิโทป (3B8 และ WF6) ในซีรัมสุนัขปกติ
กับสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อม

THE COMPARATIVE STUDY OF CHONDROITIN SULFATE EPITOPES
(3B8 AND WF6) IN SERUM OF NORMAL DOGS AND DOGS WITH
OSTEOARTHRITIS

นางสาวไพณีน กระจุกตัญญีรัตน์

วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

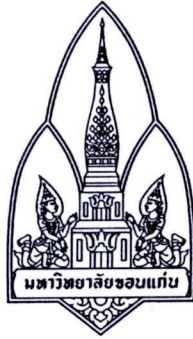
พ.ศ. 2553

600251287

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



246818



การเปรียบเทียบระดับคอนดรอยตินซัลเฟตอีพิโทป (3B3 และ WF6) ในซีรัมสุนัขปกติ
กับสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อม

THE COMPARATIVE STUDY OF CHONDROITIN SULFATE EPITOPES
(3B3 AND WF6) IN SERUM OF NORMAL DOGS AND DOGS WITH
OSTEOARTHRITIS



นางสาวไพลิน ตระกูลสันติรัตน์

วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

พ.ศ. 2553

**การเปรียบเทียบระดับคอนครอยตินซัลเฟต อีพีโทป (3B3 และ WF6) ในซีรัมสุนัขปกติ
กับสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อม**

นางสาวไพลิน ตระกูลสันติรัตน์

**วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การสัตวแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น**

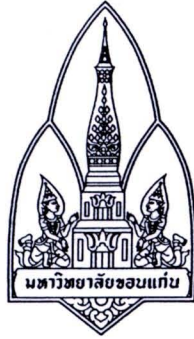
พ.ศ. 2553

**THE COMPARATIVE STUDY OF CHONDROITIN SULFATE EPITOPES
(3B3 AND WF6) IN SERUM OF NORMAL DOGS AND DOGS WITH
OSTEOARTHRITIS**

MISS PAILIN TRAKULSANTIRAT

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN VETERINARY SCIENCE GRADUATE
SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY**

2010



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
หลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การสัตวแพทย์

ชื่อวิทยานิพนธ์: การเปรียบเทียบระดับคอนครอยตินซัลเฟต อีพีโทป (3B3 และ WF6) ในซีรัม
สุนัขปกติกับสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อม

ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์: นางสาวไพลิน ตระกูลสันติรัตน์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. บัณฑิตย์ เต็งเจริญกุล	ประธานกรรมการ
	อ.ดร. พิรพรรณ โปธาเจริญ	กรรมการ
	ผศ.ดร. พิระพล สุขอ้วน	กรรมการ
	อ.ดร. นฤพนธ์ คำพา	กรรมการ
	ผศ.ดร. ประวิทย์ บุตรอุดม	กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์:

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประวิทย์ บุตรอุดม)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิระพล สุขอ้วน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร. นฤพนธ์ คำพา)

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ลำปาง แม่นมาคย์)

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุณิรัตน์ เอี่ยมละมัย)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยขอนแก่น

ไพลิน ตระกูลสันติรัตน์. 2553. การเปรียบเทียบระดับคอนครอยตินซัลเฟต อีพิโทป (3B3 และ WF6) ในซีรัมสุนัขปกติกับสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อม. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การสัตวแพทย์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ผศ.ดร.ประวิทย์ บุตรอุดม,

ผศ.ดร.พีระพล สุขอ้วน,

อ.ดร.นฤพนธ์ คำพา

บทคัดย่อ

246818

โรคข้อเสื่อม เกิดจากการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนที่หุ้มผิวข้อต่อ (articular cartilage) การวินิจฉัยโรคข้อเสื่อมในสุนัขทำได้โดย การตรวจร่างกายทางกายภาพ อาการทางคลินิก และการถ่ายภาพทางรังสี ในปัจจุบันยังไม่มี การวินิจฉัยที่จำเพาะกับระยะเริ่มแรกของโรคข้อเสื่อม ซึ่งการตรวจพบการเปลี่ยนแปลงจากภาพถ่ายรังสี จะเกิดขึ้นเมื่อมีการทำลายของกระดูกอ่อนไปมาก คอนครอยติน ซัลเฟต โปรติโอไกลัยแคน เป็นสารชีวโมเลกุลสำคัญของกระดูกอ่อน จะสลายออกมา มากกว่าปกติเมื่อกระดูกอ่อนผิวข้อถูกทำลาย สามารถตรวจวัดได้ในซีรัมของสุนัขที่อยู่ในภาวะข้อเสื่อม ซึ่งสามารถตรวจโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยาจึงถูกนำมาใช้ในการศึกษา โดยทำการเปรียบเทียบระดับคอนครอยตินซัลเฟต อีพิโทปชนิด (3B3 และ WF6) ในซีรัมสุนัขสายพันธุ์ใหญ่ที่ปกติและสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อม นอกจากนั้นยังมีการเปรียบเทียบระดับคอนครอยตินซัลเฟตในซีรัม สุนัขปกติสายพันธุ์ใหญ่ในช่วงอายุต่าง ๆ กัน ตัวอย่างซีรัมสุนัขจำนวน 126 ตัว ณ ศูนย์การสุนัขทหาร เป็นสุนัขปกติจำนวน 100 ตัว และสุนัขที่มีภาวะข้อเสื่อมจำนวน 26 ตัว ถูกนำมาใช้ในการทดลอง ทำการวิเคราะห์สารคอนครอยตินซัลเฟต อีพิโทป (3B3 และ WF6) ในซีรัม โดยวิธี Competitive inhibition ELISA ผลการศึกษาพบว่าค่าความเข้มข้นของ WF6 อีพิโทป ในสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อม มีระดับสูงกว่าสุนัขปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.008$) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p=0.833$) ของอีพิโทปชนิดนี้ในช่วงอายุต่าง ๆ กัน ในขณะที่ค่าความเข้มข้นของ 3B3 อีพิโทป พบว่าสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อม มีระดับ 3B3 อีพิโทป ต่ำกว่าสุนัขปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.034$) แต่พบว่าสุนัขอายุ 6 เดือนถึง 2 ปี และมากกว่า 5 ปี มีระดับ 3B3 อีพิโทป ในซีรัมสูงกว่าสุนัขในช่วงอายุ 2-5 ปีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.019$) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการตรวจวัดคอนครอยตินซัลเฟตทั้งสองชนิดนี้อาจนำมาใช้เพื่อประกอบการวินิจฉัยและรักษาโรคข้อเสื่อมในสุนัข โดย WF6 อีพิโทป แสดงคุณสมบัติเป็นสารบ่งชี้ที่ดีเมื่อเกิดการทำลายกระดูกอ่อนผิวข้อ ในขณะที่ 3B3 อีพิโทปอาจใช้เป็นสารบ่งชี้สำหรับใช้ติดตามผลการรักษาโรคข้อเสื่อมในสุนัขได้

Pailin Trakulsantirat. 2010. **The Comparative Study of Chondroitin Sulfate Epitopes (3B3 and WF6) in Serum of Normal Dogs and Dogs with Osteoarthritis.** Master of Science Thesis in Veterinary Science, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisors: Assist.Prof.Dr.Prawit Butudom,
Assist.Prof.Dr.Peerapol Sukon,
Dr.Naruepon Kampa

ABSTRACT

246818

Osteoarthritis (OA) is defined as a disease of diarthrodial joint comprising destruction of articular cartilage. Generally, the diagnosis of OA are based on physical examination, clinical signs and radiography. However, the radiograph is not sensitive for early detection of OA, the changes in radiograph can only be seen in the late phase of OA. Chondroitin sulfate proteoglycan, a major biomolecular substance in cartilage, is released when deterioration of articular cartilage occurred and can be detected by immunoassay technique in serum. Objective of this study was to evaluate the level of serum chondroitin sulfate epitopes (3B3 and WF6) as a diagnostic biomarker for osteoarthritis in large breed dogs. Serum samples were collected from 126 dogs in which 100 dogs were normal and 26 dogs had osteoarthritis problems. Osteoarthritis dogs were diagnosed based on the radiographic evaluation. The level of chondroitin sulfate epitopes (3B3 and WF6) in serum were analyzed by competitive inhibition ELISA. The results showed that the dogs with osteoarthritis had a significantly higher concentration of WF6 epitope than the normal dogs ($p=0.008$). There were no significant different of this epitope in age groups ($p=0.833$). The dogs with osteoarthritis had a significantly lower concentration of 3B3 epitope than the normal dogs ($p=0.034$). 6 month to 2 years dogs and over 5 years dogs had a significantly higher concentration of 3B3 epitope than 2-5 years dogs ($p=0.019$). It can be concluded that WF6 epitope may be use as cartilage destruction marker in diagnosis of osteoarthritis and 3B3 epitope may be used as cartilage anabolism marker in following up osteoarthritic treatment.

ขอขอบส่วนดีของงานวิทยานิพนธ์นี้
แด่บุพการี คณาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เพราะได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจากอาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประวิทย์ บุตรอุดม ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำและ
ดูแลเอาใจใส่ตลอดระยะเวลาของการศึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิระพล สุขอ้วน ที่ได้ให้
แนวความคิด คำปรึกษาและคำแนะนำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ข้อมูล ทำให้วิทยานิพนธ์นี้มี
ความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และ ดร. นฤพนธ์ คำพา ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกใน
การเก็บตัวอย่างและภาพถ่ายทางรังสี พร้อมทั้งให้คำแนะนำที่ดีและมีประโยชน์มาโดยตลอด ผู้วิจัย
ขอกราบขอบพระคุณอย่างยิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ และ ดร. พิรพรรณ โปธาเจริญ ภาควิชา
ชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีต่างๆ
ในการทำวิจัย และขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ นักศึกษาปริญญาโท และปริญญาเอก ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่คอยให้คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกทุกในการทำ
วิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาอายุรศาสตร์และภาควิชาอื่นๆ
รวมถึงห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นทุกท่านที่คอย
ช่วยเหลือ สนับสนุนและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา และขอขอบคุณทุกท่านที่ไม่ได้กล่าว
นามในที่นี้ที่มีส่วนในการวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณ ร้อยเอกนายสัตวแพทย์ ภากร สวัสดิ์สิงห์ และเจ้าหน้าที่ศูนย์การสุนัขทหารทุก
ท่าน ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง และภาพถ่ายทางรังสี

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำ
วิทยานิพนธ์ครั้งนี้

และที่สำคัญที่สุด ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณอนุชา และคุณกาญจนา ตระกูลสันติรัตน์
บิดามารดา ตลอดจนญาติพี่น้องทุกท่านที่ให้ความรัก ให้กำลังใจ ความห่วงใย และให้ความ
ช่วยเหลือเรื่องต่างๆ เสมอมา ทำให้การศึกษาและวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วง ผู้วิจัยขอระลึกถึงไว้ ณ
โอกาสนี้ด้วย

ไพลิน ตระกูลสันติรัตน์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
คำอุทิศ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฅ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
3. สมมติฐานของการวิจัย	3
4. ขอบเขตและข้อจำกัดของการทำวิจัย	3
5. สถานที่ทำการวิจัย	4
6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
1. ลักษณะทางโครงสร้างและคุณสมบัติทางชีวเคมีของข้อ	5
2. พยาธิกำเนิดในโรคข้อเสื่อม	10
3. อาการทางคลินิกของโรคข้อเสื่อม	12
4. สาเหตุของการเกิดโรคข้อเสื่อม	13
5. การวินิจฉัยโรคข้อเสื่อม	14
6. การรักษาโรคข้อเสื่อม	16
7. คอนครอยติน ซัลเฟต	19
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	23
1. สัตว์ทดลอง	23
2. สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	23
3. วิธีการทดลอง	24
4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	30

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย	31
เปรียบเทียบระดับคอนครอยดินซัลเฟต อีพีโทป	31
บทที่ 5 การอภิปรายผลและสรุปผลการวิจัย	37
1. การอภิปรายผล	37
2. สรุปผลการวิจัย	39
เอกสารอ้างอิง	41
ภาคผนวก	46
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี	47
ภาคผนวก ข สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยและแหล่งที่มา	50
ภาคผนวก ค ขั้นตอนการตรวจปริมาณเมล็ดเลือดแดงอัดแน่น	
ปริมาณคอนครอยดิน ซัลเฟต อีพีโทป และการเก็บชีร้่ม	52
ภาคผนวก ง ตารางแสดงเกณฑ์การแบ่งกลุ่มอายุสุนัข	55
ภาคผนวก จ ภาพถ่ายทางรังสีสะโพก (Hip joint)	58
ภาคผนวก ฉ ทดสอบความเหมาะสมของ WF6 และ 3B3 อีพีโทป	61
ประวัติผู้เขียน	64

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงจำนวนตัวอย่าง (N), อายุ (ปี), น้ำหนัก (กก.) และเพศของสุนัข ใน กลุ่มประชากรสุนัขที่ศึกษา	30
ตารางที่ 2 แสดงระดับคอนครอยดินซัลเฟต อีพิโทป (WF6 และ 3B3) ในสุนัขปกติ และสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อม	36
ตารางที่ 3 แสดงระดับคอนครอยดินซัลเฟต อีพิโทป (WF6 และ 3B3) ในสุนัขปกติ ช่วงอายุต่าง ๆ กัน	36

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างและส่วนประกอบของกระดูกอ่อนผิวข้อ	6
ภาพที่ 2 แสดงลักษณะการแทรกตัวของโปรติโอไกลัยแคนในโครงสร้างของเส้นใย คอลลาเจน	8
ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างของแอกกลีแคน และการจัดเรียงตัวเข้ากับไฮนาลูโรนิก แอซิก เป็น proteoglycan aggregate	9
ภาพที่ 4 แสดงการเปลี่ยนแปลงข้อในโรคข้อเสื่อม	11
ภาพที่ 5 แสดงลักษณะ โครงสร้างของคอนดรอยติน ซัลเฟต	20
ภาพที่ 6 แสดงแสดงตำแหน่งบนสายคอนดรอยติน ซัลเฟตที่จำเพาะต่อโมโน โคลนอล แอนติบอดี	21
ภาพที่ 7 แสดงการเก็บเลือดสุนัขเส้นเลือดบริเวณขาหน้า	25
ภาพที่ 8 แสดงการเก็บเลือดในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) และหลอดที่ไม่มีการแข็งตัวของเลือด	25
ภาพที่ 9 แผนภาพแสดงขบวนการคัดเลือกตัวอย่างเลือด	26
ภาพที่ 10 แสดงการตรวจค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (PCV) ด้วยเครื่องMicro Centrifuge	27
ภาพที่ 11 ซีรัมที่ใช้ในการค่าเคมีในเลือด (Blood chemistry) และตรวจหาปริมาณ คอนดรอยตินซัลเฟต อีพีโทป	27
ภาพที่ 12 การตรวจหาระดับคอนดรอยตินซัลเฟต WF6 อีพีโทป ด้วยวิธี ELISA	28
ภาพที่ 13 การตรวจหาระดับคอนดรอยตินซัลเฟต 3B3 อีพีโทป ด้วยวิธี ELISA	29
ภาพที่ 14 ความเข้มข้นของคอนดรอยติน ซัลเฟต WF6 อีพีโทป ในซีรัมของสุนัข กลุ่มปกติ เปรียบเทียบกับสุนัขกลุ่มที่เป็นโรคข้อเสื่อม เส้นกลางกรอบ สีเหลืองแสดงค่ามัธยฐาน เส้นขอบล่างและขอบบนของกรอบสีเหลือง แสดงค่าที่เปอร์เซนไทล์ที่ 25 และ 75 ตามลำดับ เส้นขีดแนวนอนด้านล่าง และด้านบนนอกกรอบสีเหลืองแสดงค่าต่ำสุดและสูงสุดที่ยังไม่ผิดปกติ ตามลำดับ	32

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างและส่วนประกอบของกระดูกอ่อนผิวข้อ	6
ภาพที่ 2 แสดงลักษณะการแทรกตัวของโปรติโอไกลัยแคนใน โครงสร้างของเส้นใย คอลลาเจน	8
ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างของแอกกลีแคน และการจัดเรียงตัวเข้ากับไฮนาลูโรนิก แอซิด เป็น proteoglycan aggregate	9
ภาพที่ 4 แสดงการเปลี่ยนแปลงข้อใน โรคข้อเสื่อม	11
ภาพที่ 5 แสดงลักษณะโครงสร้างของคอนดรอยติน ชัลเฟต	20
ภาพที่ 6 แสดงตำแหน่งบนสายคอนดรอยติน ชัลเฟตที่จำเพาะต่อโมโน โคลนอล แอนติบอดี	21
ภาพที่ 7 แสดงการเก็บเลือดสุนัขเส้นเลือดบริเวณขาหน้า	25
ภาพที่ 8 แสดงการเก็บเลือดในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) และหลอดที่ไม่มีการแข็งตัวของเลือด	25
ภาพที่ 9 แผนภาพแสดงขบวนการคัดเลือกตัวอย่างเลือด	26
ภาพที่ 10 แสดงการตรวจค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (PCV) ด้วยเครื่องMicro Centrifuge	27
ภาพที่ 11 ซีรัมที่ใช้ในการค่าเคมีในเลือด (Blood chemistry) และตรวจหาปริมาณ คอนดรอยตินชัลเฟต อิพีโทป	27
ภาพที่ 12 การตรวจหาระดับคอนดรอยตินชัลเฟต WF6 อิพีโทป ด้วยวิธี ELISA	28
ภาพที่ 13 การตรวจหาระดับคอนดรอยตินชัลเฟต 3B3 อิพีโทป ด้วยวิธี ELISA	29
ภาพที่ 14 ความเข้มข้นของคอนดรอยติน ชัลเฟต WF6 อิพีโทป ในซีรัมของสุนัข กลุ่มปกติ เปรียบเทียบกับสุนัขกลุ่มที่เป็นโรคข้อเสื่อม เส้นกลางกรอบ สีเหลืองแสดงค่ามัธยฐาน เส้นขอบล่างและขอบบนของกรอบสีเหลือง แสดงค่าที่เปอร์เซนไทล์ที่ 25 และ 75 ตามลำดับ เส้นขีดแนวนอนด้านล่าง และด้านบนนอกกรอบสีเหลืองแสดงค่าต่ำสุดและสูงสุดที่ยังไม่ผิดปกติ ตามลำดับ	32