

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาเปรียบเทียบระดับคอนดรอยตินซัลเฟตในซีรัมสุนัขปกติ  
กับสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อม

Comparative of serum chondroitin sulfate epitope in serum of normal  
and osteoarthritis canine.

โดย

กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์

หน่วยงานที่สังกัด

สาขาวิชาฟิสิกส์คลินิกทางสัตวแพทย์  
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

รายงานฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้คณะสัตวแพทยศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปี 2546

## คำนำ

โรคข้อเสื่อมในสัตว์เลี้ยงจัดได้ว่าเป็นโรคที่มีความสำคัญมากโรคหนึ่ง ซึ่งโรคนี้ไม่ทำให้สัตว์เสียชีวิตแต่ทว่าก่อให้เกิดความทรมานแก่สัตว์เป็นอย่างมาก ทำให้สัตว์เกิดความเจ็บ ปวด บริเวณข้อ ไม่สามารถใช้งานได้เป็นปกติ หากโรคมีความรุนแรงมากอาจส่งผลให้สัตว์ไม่สามารถใช้งานได้และพิการในที่สุด การวินิจฉัยโรคนับว่าเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งในการช่วยมิให้โรคมีความรุนแรงมากขึ้น หากสามารถวินิจฉัยโรคนี้ได้เร็วตั้งแต่ระยะแรกของการเกิดโรคก็จะทำให้สามารถรักษาโรคได้ทัน่วงที่ทำให้โอกาสที่สัตว์จะพิการจากโรคน้อยลง ในทางตรงข้ามหากวินิจฉัยโรคนี้ได้ช้าทำให้โรคเกิดอย่างรุนแรง โอกาสในการรักษาให้หายก็น้อยลง

ในการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยโรคข้อเสื่อมในสุนัข ด้วยการตรวจระดับของสารบ่งชี้ (marker) โดยใช้สาร คอนดรอยทินซัลเฟต (chondroitin sulfate) ที่สามารถตรวจพบได้ในซีรัมของสุนัข โดยใช้วิธี ELISA ซึ่งการตรวจการเปลี่ยนแปลงของระดับสารบ่งชี้ในซีรัมจะทำให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในข้อต่อได้รวดเร็ว ทำให้ช่วยในการวินิจฉัยการเกิดโรคข้อเสื่อมได้เร็วขึ้น

กรกฎ งานวงศ์พานิชย์  
สาขาวิชาพรีคลินิกทางสัตวแพทย์  
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และห้องปฏิบัติการวิจัยโรค  
กระดูกและข้อ ที่ให้การสนับสนุนทุนในการวิจัย และคณาจารย์ นักศึกษา และเจ้าหน้าที่ห้อง  
ปฏิบัติการวิจัยโรคกระดูกและข้อ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้  
ความอนุเคราะห์วิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลสัตว์เล็ก นัก  
ศึกษาคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ช่วยให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง

คณะสัตวแพทยศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การศึกษาเปรียบเทียบระดับคอนดรอยตินซัลเฟตในซีรัมสุนัขปกติ  
กับสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อม

กรกฎ งานวงศ์พานิชย์<sup>1</sup> และ ศิริวรรณ องค์กรไชย<sup>2</sup>

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบระดับคอนดรอยตินซัลเฟตในซีรัมของสุนัขปกติกับสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อม โดยในการศึกษานี้จะใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อสายคอนดรอยตินซัลเฟตชนิด WF6 ซึ่งพบมากในกระดูกอ่อนที่มีปกติ และจะพบมากเมื่อกระดูกอ่อนนั้นเกิดการสลาย ในการศึกษาได้เก็บเลือดสุนัขที่ได้รับการวินิจฉัยว่าปกติจำนวน 52 ตัว และสุนัขที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคข้อสะโพกห่าง ซึ่งถือว่าเป็นโรคข้อเสื่อมเช่นกัน และได้รับการวินิจฉัยยืนยันจากภาพถ่ายทางรังสี เป็นจำนวน 18 ตัว จากนั้นนำซีรัมของสุนัขทั้งหมดมาวิเคราะห์สารคอนดรอยตินซัลเฟตชนิด WF6 โดยวิธี ELISA ผลการศึกษาพบว่าสารคอนดรอยตินซัลเฟตชนิด WF6 ในสุนัขกลุ่มที่เป็นโรคข้อเสื่อมสูงกว่ากลุ่มปกติอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.01$ ) แสดงให้เห็นว่าในสุนัขที่เป็นโรคข้อเสื่อมจะสามารถตรวจพบสารคอนดรอยตินซัลเฟตชนิด WF6 ได้ในปริมาณสูง ในขณะที่สุนัขปกติจะพบในระดับต่ำ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาการตรวจระดับของคอนดรอยตินซัลเฟตชนิด WF6 มาใช้ประกอบการวินิจฉัยโรคข้อเสื่อมเพื่อช่วยให้สามารถวินิจฉัยโรคได้เร็วขึ้น

คำสำคัญ คอนดรอยตินซัลเฟต โรคข้อเสื่อม โรคข้อสะโพกห่าง

<sup>1</sup> สาขาวิชาพรีคลินิกทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50100

<sup>2</sup> ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

Comparative of serum chondroitin sulfate epitope in serum of normal  
and osteoarthritis canine.

Korakot Nganvongpanit<sup>1</sup> Siriwan Ong-Chai<sup>2</sup>

Abstract

Aim of this study was to comparative levels of serum chondroitin sulfate epitope in serum of normal and osteoarthritis canines. Monoclonal antibody which recognizes native chondroitin sulfate epitope (WF6) was used. Dogs (n=70) were separated into 2 groups. The first group (n=52) is healthy dogs and second group (n=18) is hip dysplasia dogs which is osteoarthritis dogs. The disease confirmed by radiographic image. The blood was collected to analyzed for the chondroitin sulfate epitope by ELISA technique. It was found that the chondroitin sulfate WF6 epitope in osteoarthritis group was higher than normal group ( $p < 0.01$ ). Therefore, it is likely that chondroitin sulfate epitope will be able to be developed as marker of osteoarthritis for early diagnosis.

Key words ; chondroitin sulfate, octeoarthritis, hip dysplasia

---

<sup>1</sup> Pre-Veterinary Medicine Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50100.

<sup>2</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200.

## สารบัญ

บทนำ	
ลักษณะทางโครงสร้างและชีวเคมีของกระดูกอ่อนบริเวณข้อต่อ	1
เซลล์กระดูกอ่อน	2
คอลลาเจน	3
โปรตีโอไกลัยแคน	3
คอนดรอยตินซัลเฟต	4
คุณสมบัติและหน้าที่ของคอนดรอยตินซัลเฟต	4
เมตาบอลิซึมของคอนดรอยตินซัลเฟต	5
เมตาบอลิซึมของกระดูกอ่อนที่ปกติ	6
โรคข้อเสื่อม	7
สาเหตุ	7
การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี	8
การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา	10
การวินิจฉัย	11
การตรวจระดับคอนดรอยตินซัลเฟตโปรตีโอไกลัยแคน	12
ระเบียบวิธีการวิจัย	
สัตว์ทดลอง	14
การเก็บตัวอย่าง	14
การวินิจฉัยยืนยันโรคข้อเสื่อม	14
การวิเคราะห์การหาปริมาณคอนดรอยตินซัลเฟต WF6 อีพีโทป	16
การวิเคราะห์ข้อมูล	17
ผลการวิเคราะห์	17
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	20
บรรณานุกรม	21

## สารบัญรูป

รูปที่ 1	แสดงส่วนประกอบของเซลล์ต่างที่อยู่ในกระดูกอ่อนข้อต่อ	1
รูปที่ 2	แสดงภาพแสดงชั้นต่างๆของกระดูกอ่อนข้อต่อ	2
รูปที่ 3	แสดงโครงสร้าง proteoglycan-hyaluronate	4
รูปที่ 4	ไดอะแกรมแสดงการสังเคราะห์และการสลายของโปรตีโอไกลัยแคน ในกระดูกอ่อน	7
รูปที่ 5	แสดงลักษณะของข้อที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อเกิดภาวะข้อต่อเสื่อม	9
รูปที่ 6	ปัจจัยที่มีผลต่อขบวนการสลายของกระดูกอ่อนผิวหน้าข้อต่อในภาวะ โรคข้อเสื่อม	10
รูปที่ 7	แสดงตำแหน่งของสารบ่งชี้ (Markers) ที่จำเพาะต่อตำแหน่งต่างๆ บนสายของ Proteoglycan monomer	13
รูปที่ 8	แสดงภาพถ่ายทางรังสีของข้อสะโพกที่สมบูรณ์ดีมาก (excellent)	14
รูปที่ 9	แสดงภาพถ่ายทางรังสีของข้อสะโพกที่สมบูรณ์ดี (good)	15
รูปที่ 10	แสดงภาพถ่ายทางรังสีของข้อสะโพกที่ต้องให้ความระวัง (fair)	15
รูปที่ 11	แสดงภาพถ่ายทางรังสีของข้อสะโพกที่ต้องให้ความระวัง (fair)	15
รูปที่ 12	แสดงภาพถ่ายทางรังสีของข้อสะโพกที่มีความผิดปกติในระดับ ไม่มาก (mide)	16
รูปที่ 13	แสดงภาพถ่ายทางรังสีของข้อสะโพกที่เกิดโรคในระดับรุนแรง (severe)	16
รูปที่ 14	กราฟเปรียบเทียบระดับคอนดรอยทินซัลเฟตชนิด WF6 ใน สุนัขกลุ่มปกติ (normal) และกลุ่มที่เป็นโรคข้อเสื่อม (OA)	19

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ปริมาณคอนดรอยตินซัลเฟตชนิด WF6 ในซีรัมสุนัขปกติ	18
ตารางที่ 2 ปริมาณคอนดรอยตินซัลเฟตชนิด WF6 ในซีรัมสุนัขโรคข้อเสื่อม	18
ตารางที่ 3 แสดงค่าทางสถิติของระดับคอนดรอยตินซัลเฟตในซีรัมสุนัข กลุ่มปกติ (normal) และ สุนัขกลุ่มที่เป็นโรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis)	19
ตารางที่ 4 แสดงค่าทางสถิติของน้ำหนักร่วมกลุ่มปกติ (normal) และสุนัขกลุ่มที่ เป็นโรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis)	19

## บทนำ

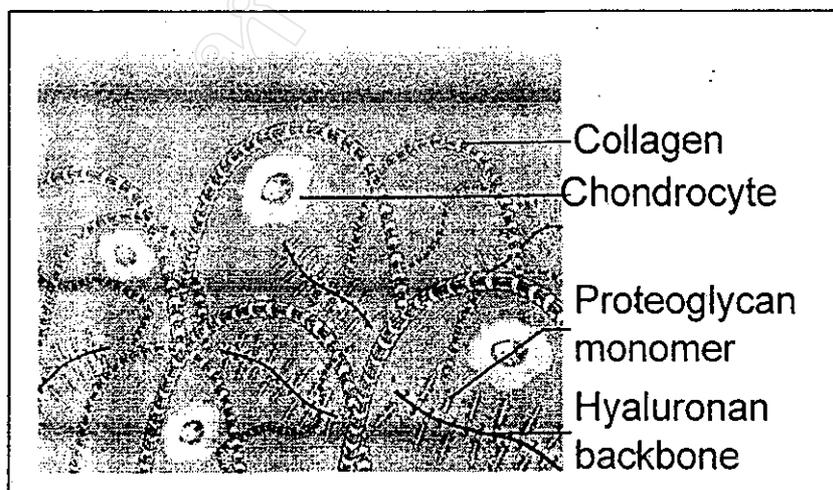
### ลักษณะทางโครงสร้างและชีวเคมีของกระดูกอ่อนบริเวณข้อต่อ

กระดูกอ่อนเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) ที่ห่อหุ้มอยู่ปลายกระดูกบริเวณข้อต่อต่างๆ ไม่มีเส้นประสาทและเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยง มีลักษณะเรียบ มันวาว มีสีขาว ใสแต่พบว่าเมื่อมีอายุมากขึ้นกระดูกอ่อนนี้จะมีการเปลี่ยนสีเป็นสีเหลือง รวมทั้งความเรียบและมันก็จะค่อยๆ หายไป นอกจากนี้พบว่ากระดูกอ่อนเป็นเนื้อเยื่อที่มีอัตราเมตาบอลิซึม (Metabolism) สูงมาก โดยจะมีขบวนการสร้าง (Anabolism) และขบวนการทำลาย (Catabolism) อยู่ตลอดเวลา

กระดูกอ่อนที่หุ้มบริเวณปลายกระดูกของข้อต่อนี้ส่วนมากจะเป็นชนิด Hyaline cartilage ประกอบด้วยเซลล์กระดูกอ่อนที่เรียกว่า คอนโดโรไซต์ (Chondrocyte) และ เมทริกซ์ (Matrix) ซึ่งประกอบด้วย คอลลาเจน (Collagen) และโปรติโกลัยแคน (Proteoglycan) ที่ทำหน้าที่เป็นร่างแหเพื่อสร้างความแข็งแรงแก่เนื้อเยื่อ (รูปที่ 1) รวมทั้งทำหน้าที่เป็นตัวส่งผ่านสารอาหาร ของเสีย สารสื่อข้อมูล (Chemical messengers) และฮอร์โมน (Hormone) ให้แก่เซลล์กระดูกอ่อน สามารถแบ่งกระดูกอ่อนที่ผิวข้อได้เป็น 3 ชั้นดังแสดงในรูปที่ 2 คือ

1. Superficial Tangenital zone เป็นชั้นที่อยู่นอกสุด ประกอบไปด้วยเซลล์กระดูกอ่อนที่มีรูปร่าง ยาว เรียงตัวขนานกับผิวกระดูก เป็นชั้นที่บางที่สุด ในส่วนของคอลลาเจนที่พบในชั้นนี้ก็พบในปริมาณที่บางและเรียงตัวขนาดกกับผิวกระดูกเช่นกัน
2. Middle zone เป็นชั้นที่มีความหนาที่สุด ประกอบด้วยเซลล์ที่มีรูปร่างกลม และเรียงตัวกันเป็นแถว คอลลาเจนมีการเรียงตัวในแนวตั้งเฉียงกับผิวข้อต่อ
3. Deep zone เป็นชั้นที่อยู่ใตสุด ประกอบด้วยเซลล์ที่เสื่อมสภาพและตายแล้ว มีการเกิดขบวนการสะสมแคลเซียม (Calcification) เกิดขึ้นที่ชั้นนี้ นอกจากนี้ยังพบเส้นที่เรียกว่า Tide make อยู่ในชั้นนี้ด้วย

รูปที่ 1 แสดงส่วนประกอบของเซลล์ต่างๆที่อยู่ในกระดูกอ่อนข้อต่อ<sup>38</sup>

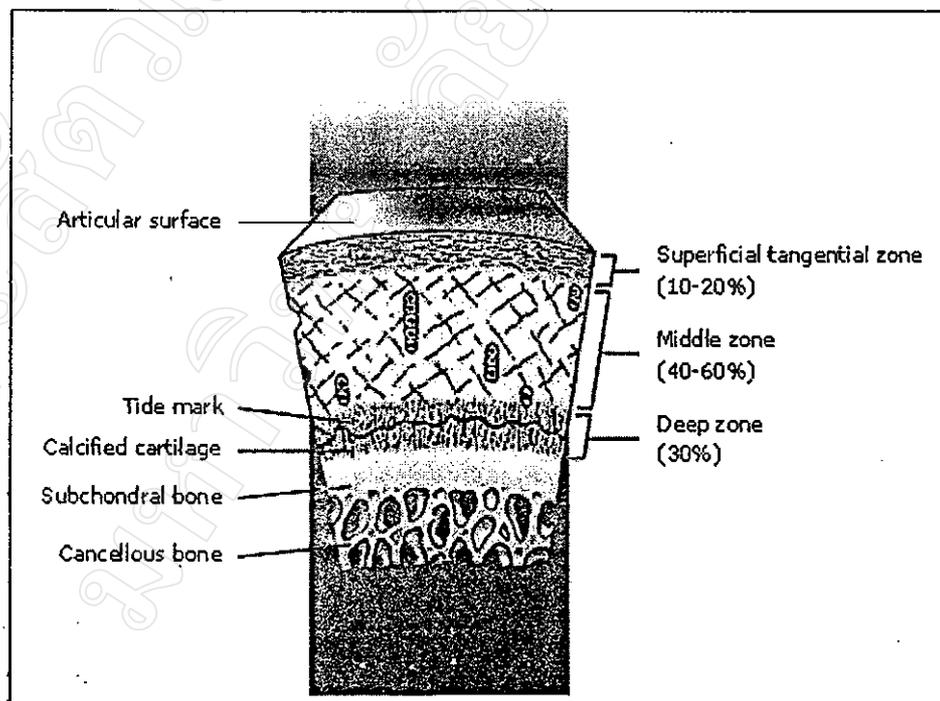


## เซลล์กระดูกอ่อน

เซลล์กระดูกอ่อน (Chondrocyte) ทำหน้าที่สร้างสารชีวโมเลกุลต่างๆที่เป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญของกระดูกอ่อน เพื่อรักษาสภาพแวดล้อมสำหรับกระดูกอ่อนไว้ให้คงที่ เซลล์กระดูกอ่อนมีรูปร่างเป็นรูปไข่ แต่พบว่าบางครั้งสามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นทรงกลม หรือรูปร่างแบนๆ บริเวณผิวของเซลล์จะมีลักษณะไม่เรียบ ซึ่งมากหรือน้อยนั้นเป็นไปตามขบวนการพัฒนาและเจริญเติบโตของเซลล์

เซลล์กระดูกอ่อนจะทำหน้าที่เกี่ยวกับเมตาบอลิซึมของสารต่างๆที่อยู่ในเมทริกซ์ ทั้งขบวนการสร้างและขบวนการสลาย โดยในด้านขบวนการสร้างจะทำหน้าที่สร้างสารชีวโมเลกุลต่างๆเช่น คอลลาเจน โปรตีโอไกลัยแคน ฮัยาลูโรเนท (Hyaluronan) และ โปรตีนเชื่อมต่อ (Linked protein) เมื่อเซลล์กระดูกอ่อนสร้างสารเหล่านี้แล้วก็จะทำการปล่อยออกมานอกเซลล์ไปอยู่ในส่วนของเมทริกซ์ ในทางตรงกันข้าม ขบวนการสลายจะพบว่าเซลล์กระดูกอ่อนจะสร้างและหลั่งเอ็นไซม์ต่างๆอันได้แก่ เอ็มไซม์โปรตีเอส (Proteases) ที่ทำหน้าที่ในการสลายโปรตีน เอ็มไซม์คอลลาจีเนส (Collagenases) ซึ่งมีหน้าที่ย่อยสลายคอลลาเจน หรือ เอ็มไซม์เมทาโลโปรตีเอส (Metalloprotenase) ที่สลายส่วนของโปรตีโอไกลัยแคนต่างๆ

รูปที่ 2 แสดงภาพแสดงชั้นต่างๆของกระดูกอ่อนข้อต่อ<sup>39</sup>



## คอลลาเจน

คอลลาเจน (Collagen) เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีโครงสร้างคล้ายแท่ง (Rod-like molecule) ประกอบด้วยสายโปรตีน (Polypeptide) สามสายพันกันเองเป็นโครงสร้างแบบเป็นเกลียวสามสายที่เรียกว่า Triple helix สายของคอลลาเจนในกระดูกอ่อนส่วนมากเป็นชนิดที่ 2 (Collagen type II) พบว่าคอลลาเจน ทำหน้าที่สร้างความแข็งแรงแก่กระดูกอ่อน ช่วยให้กระดูกอ่อนทนทานต่อการยืดและหดตัว ดังนั้นจึงทำหน้าที่ปกป้องไม่ให้กระดูกอ่อนเกิดการฉีกขาด พบว่าร่างแหของคอลลาเจนในกระดูกอ่อนมีทั้งแบบที่อยู่ในแนวอน (Radial direction) ซึ่งจะเป็นโครงสร้างที่คงตัวมาก ในขณะที่อีกแนวหนึ่งที่เป็นแนวตั้ง ( Transverse direction) เป็นร่างแหที่ช่วยในการยืดหดได้ตามแรงดึงหรือแรงกด เส้นใยคอลลาเจนในกระดูกอ่อนจะเรียงตัวประสานกันแน่นและมีโปรตีโอไกลัยแคนช่วยยึดให้คงรูป

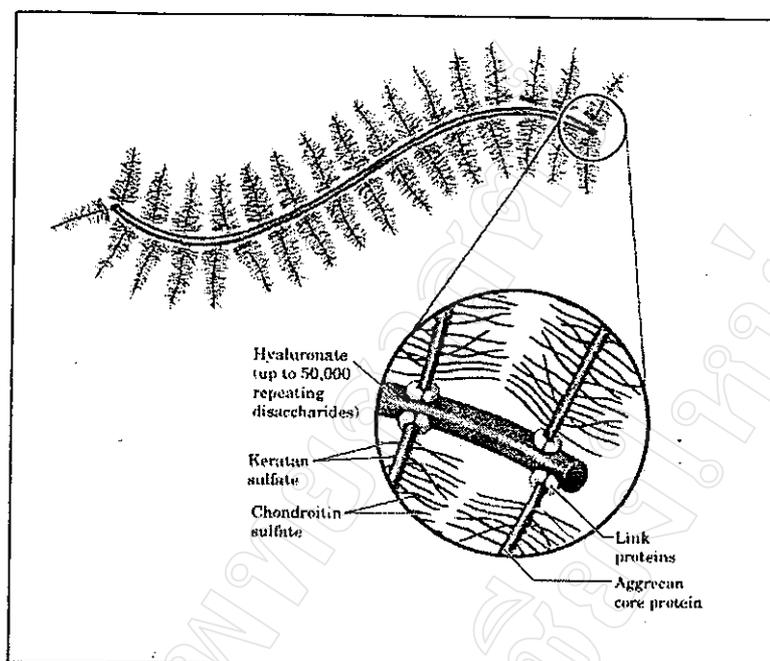
## โปรตีโอไกลัยแคน

โปรตีโอไกลัยแคน (Proteoglycan) เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ น้ำหนักโมเลกุลมาก ( $5 \times 10^4 - 10^7$  kDa ) สามารถพบได้ในเมทริกซ์ของเนื้อเยื่อแทบทุกชนิดเช่นในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) เช่น ในกระดูกอ่อน เป็นต้น

โปรตีโอไกลัยแคนเป็นสารประกอบที่ประกอบด้วยโปรตีนแกนกลาง (Protein core) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 300,000 ดาลตัน และมีสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่เรียกว่า สายไกลโคซามิโนไกลัยแคน (Glycosaminoglycan ; GAG) มาเกาะติดกับโปรตีนแกนกลางนั้นด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent bond) รวมเรียกว่า โปรตีโอไกลัยแคนหน่วยย่อย (Proteoglycan monomer) ในโปรตีโอไกลัยแคนหน่วยย่อย 1 โมเลกุล นั้นจะประกอบด้วยสาย (Chain) ของ คอนดรอยตินซัลเฟต ( Chondroitin sulfate : CS) และ เคอราแทนซัลเฟต (Keratan sulfate : KS) (รูปที่ 3)

ในกระดูกอ่อนที่ปกติโปรตีโอไกลัยแคนหน่วยย่อยแต่ละหน่วยจะอยู่ในรูป Proteoglycan aggregate ซึ่งประกอบด้วยโปรตีโอไกลัยแคนหน่วยย่อยหลายๆ หน่วยเรียงตัวเกาะกับสายฮัยาลูโรเนท โดยมีโปรตีนเป็นตัวเชื่อมทำให้โปรตีโอไกลัยแคนยึดเกาะกับฮัยาลูโรเนท ได้ดี พบว่าใน Proteoglycan aggregate หนึ่งโมเลกุลจะประกอบด้วยโปรตีโอไกลัยแคนหน่วยย่อยประมาณ 25-150 หน่วยย่อย (รูปที่ 3)

รูปที่ 3 แสดงโครงสร้าง Proteoglycan - Hyaluronate ซึ่งเป็นการรวมตัวของ โปรตีโกลัยแคน กับ ฮัยยาลูโรเนท รวมเรียกว่า Aggregate<sup>38</sup>



### คอนดรอยตินซัลเฟต

คอนดรอยตินซัลเฟต (Chondroitin sulfate) เป็นสารจำพวกโพลีแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลหน่วยย่อย โมโนแซ็กคาไรด์ (Monosaccharide) เพียง 2 ชนิด วางสลับโมเลกุลกันไม่แตกแขนง และน้ำตาล 2 ชนิดนี้ตัวหนึ่งเป็น amino sugar ส่วนอีกตัวนั้นเป็น acid sugar จึงจัดคอนดรอยตินซัลเฟตเป็นสารในกลุ่มกลัยโคซามิโนกลัยแคนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5,000 ถึง 50,000 ดาลตัน (รูปที่ 3)

คอนดรอยตินซัลเฟตเป็นกลัยโคซามิโนกลัยแคนชนิดที่พบมากที่สุดในร่างกายโดยพบมากในกระดูกอ่อน กระดูก หนังแท้ กระจุกตา และผนังเส้นเลือด นอกจากนี้ยังมีผู้พบว่าโปรตีโกลัยแคนชนิดที่มีคอนดรอยตินซัลเฟตจำนวนหลายๆ โมเลกุลมาจับรวมกันกับฮัยยาลูโรเนท 1 โมเลกุลได้เป็น aggregate ขนาดใหญ่

### คุณสมบัติและหน้าที่ของคอนดรอยตินซัลเฟต

คอนดรอยตินซัลเฟต จะอยู่ร่วมกับกับสารประกอบโครงสร้างอื่นๆ ที่มีในเมทริกซ์ เช่น คอลลาเจน และ อีลาสติน (Elastin) โดยการจับกันแบบค่อนข้างจำเพาะ คอนดรอยตินซัลเฟตที่พบในโปรตีโกลัยแคนจะมีประจุลบเป็นจำนวนมาก โดยมันจะมีการผลัดซึ่งกันและกันเพราะต่างก็มีประจุชนิดเดียวกัน ทำให้มันอยู่ในลักษณะค่อนข้างเหยียดตรง ส่งผลให้โปรตีโกลัยแคนมี

ลักษณะเหมือนแปรงล้างขวด (รูปที่ 3) นอกจากนี้ คอนดรอยตินซัลเฟตยังมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้สูง โดยผ่านทางแรงดันออสโมติกเข้าสู่ช่องว่างระหว่างเซลล์ (Extracellular matrix) และเนื่องจากคอนดรอยตินซัลเฟตจะมีลักษณะคล้ายวุ้นและลักษณะตามธรรมชาติเป็นโพลีแซ็กคาไรด์สายยาวจึงทำให้คอนดรอยตินซัลเฟตโปรตีนโกลัยแคน มีลักษณะเหมือนตะแกรง คอยช่วยในการยับยั้งไม่ให้สารที่มีขนาดใหญ่ผ่านจนเข้าสู่ช่องว่างระหว่างเซลล์ได้ แต่สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กยังคงสามารถแพร่เข้าไปได้ และเนื่องจากคอนดรอยตินซัลเฟตมีโครงสร้างที่มีลักษณะยาว จึงมีบ่อยครั้งที่พบว่ามีการจับกับสารอื่นกลายเป็น Aggregate ขนาดใหญ่มาก เป็นปริมาตรส่วนใหญ่ของเมทริกซ์ไว้ ในส่วนของหน้าที่ที่จำเพาะของคอนดรอยตินซัลเฟตคือ ทำให้กระดูกอ่อนมีคุณสมบัติทนแรงกดได้สูง และเชื่อว่าคอนดรอยตินซัลเฟตมีบทบาทสำคัญในการตกผลึกแร่ธาตุไปเป็นกระดูกของกระบวนการสร้างกระดูก (Mineralization process) ซึ่งการจับกันระหว่างคอนดรอยตินซัลเฟตโปรตีนโกลัยแคน กับฮัย알ูโรเนนนั้น จะจับกันด้วยพันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ (Non-covalent bond) แต่อาศัยความจำเพาะกันของส่วน G1 domain ที่แกนโปรตีนของโปรตีนโกลัยแคนและโปรตีนที่ทำหน้าที่เชื่อมต่อ ซึ่งจะจับได้อย่างจำเพาะกับสายฮัยาลูโรเนน ซึ่งเราเรียกส่วนของโปรตีนที่สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับสายฮัยาลูโรเนนนี้ว่า Hyaluronan binding proteins (HABPs)

#### เมตาบอลิซึมของคอนดรอยตินซัลเฟต

การสังเคราะห์สายคอนดรอยตินซัลเฟต เริ่มจากการสังเคราะห์ โปรตีนที่เป็นแกนกลาง เกิดขึ้นบนไรโบโซม (Ribosome) ในไซโทพลาซึม (Cytoplasm) ของเซลล์เช่นเดียวกันกับการสังเคราะห์โปรตีนทั่วไป จากนั้นจะมีการนำน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ 3 หน่วยแรกที่ไม่ใช่ของค์ประกอบสายคอนดรอยตินซัลเฟตไปเชื่อมติดกับโปรตีนแกนกลางเพื่อทำหน้าที่สะพานเชื่อม (Trisaccharide bridge) ระหว่างโปรตีนแกนกลางกับคอนดรอยตินซัลเฟตที่กำลังจะสร้างต่อไป โดยน้ำตาลตัวแรกที่นำมาต่อคือ น้ำตาลไซโลส (Xylose) ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนเซอรีน (Serine) บนแกนโปรตีน จากนั้นก็จะนำน้ำตาล กาแลคโตส (Galactose) อีก 2 ตัว มาต่อ น้ำตาลที่นำมาต่อนี้จะอยู่ในรูปอนุพันธ์ของนิวคลีโอไทด์ โดยมีเอ็นไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา คือ กลัยโคซิลทรานเฟอร์เลส (Glycosyltransferase) ต่อมาจะเป็นการสร้างสายคอนดรอยตินซัลเฟตโดยนำน้ำตาล UDP-glycuronic acid กับ UDP-N-acetylgalactosamine เข้ามาเชื่อมต่อกับสะพานเชื่อมในลักษณะสลับกันไปเรื่อย ซึ่งเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาก็จัดเป็นพวกกลัยโคซิลทรานเฟอร์เลส และ เอ็น อะเซตทิวกาแลคโตซามินิวทรานเฟอร์เลส (N-acetyl galactosaminyl transferase) ตามลำดับ แล้วจึงมีการเติมหมู่ซัลเฟต ( $-SO_3$ ) ในขณะที่มีการสร้างสายคอนดรอยตินซัลเฟตให้ยาวขึ้นเรื่อยๆ

สำหรับการสลายคอนดรอยตินซัลเฟตโปรตีโอไกลัยแคน ในร่างกายนั้นพบว่าจะมีการทำลายตลอดเวลา เพียงแต่มีค่าครึ่งชีวิตค่อนข้างนาน ซึ่งคอนดรอยตินซัลเฟตโปรตีโอไกลัยแคน ในหนูทดลองอายุ 9 สัปดาห์ มีค่าครึ่งชีวิตนานถึง 7-9 วัน โดยการสลายจะเริ่มจากการมีเอ็นไซม์มา ย่อยส่วนที่เป็นโปรตีนก่อน โดยเอ็นไซม์ที่พบว่ามีค่าสำคัญมากในการสลายคือ เอ็มไซม์โปรตีเนส และ เอ็มไซม์เมทาโลโปรตีเนส ซึ่งจะทำหน้าที่ตัดส่วนที่เป็นแกนโปรตีนออกเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ และจะมีการตัดเอาหมู่ซัลเฟตออก โดยเอ็นไซม์ซัลฟาเตส (Sulfatase) จากนั้นบางส่วนจะถูกย่อย ด้วยเอ็นไซม์พวก กลัยโคซิเดส (Glycosidase) ซึ่งมีอยู่ในไลโซโซม (Lysosome) ของแกนโปรตีน และเซลล์อื่นๆ ที่อยู่ในบริเวณนั้น และมีคอนดรอยตินซัลเฟต โปรตีโอไกลัยแคน ชิ้นส่วนเล็กๆ ที่ เหลือจากการตัดบางส่วนที่ไม่ถูกย่อยจะถูกปลดปล่อยออกมาในกระแสเลือด

#### เมตาบอลิซึมของกระดูกอ่อนที่ปกติ

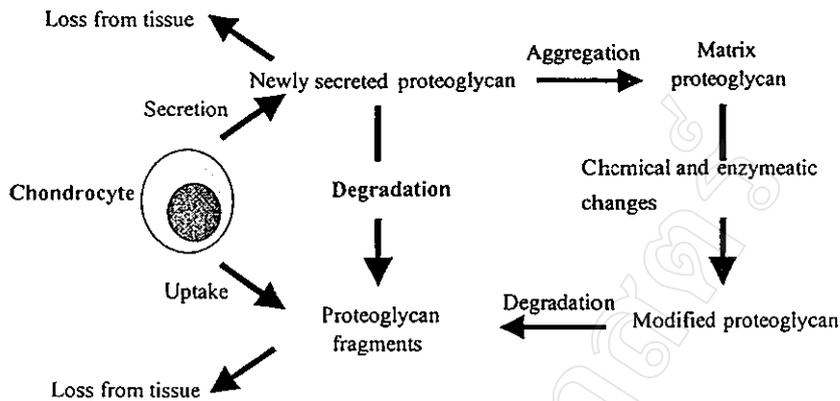
ในขบวนการเมตาบอลิซึมของกระดูกอ่อนที่ปกติ นั้น พบว่าเซลล์กระดูกอ่อนจะทำหน้าที่เกี่ยวกับขบวนการสร้างและ และขบวนการสลายของกระดูกอ่อน คือสร้าง คอลลาเจน โปรตีโอ-ไกลัยแคน ฮัยอาลูโรเนท และ โปรตีนเชื่อมต่อ นอกจากนี้ยังสร้างและหลั่งเอ็นไซม์ เช่น โปรตีเอส และ คลอลาจีเนส ซึ่งทำให้เกิดการย่อยสลายของคอลลาเจนและโปรตีโอไกลัยแคน

จากคุณสมบัติทางชีวเคมีของคอลลาเจน โปรตีโอไกลัยแคน และส่วนประกอบอื่นๆ ที่อยู่ในเมทริกซ์ และการเรียงตัวประสานกันของสารเหล่านี้ทำให้กระดูกอ่อนทนต่อแรงกด ทนต่อแรงกระแทก และลดแรงเสียดทานในขณะที่เคลื่อนไหว ข้อ ถ้าปราศจากกระดูกอ่อนซึ่งทำหน้าที่คล้ายเป็นเบาะรองรับปลายกระดูกที่ข้อนี้แล้ว ปลายกระดูกที่ข้อก็จะสึกกร่อนไปได้เร็ว เนื่องจากแรงต่างๆที่กระทำต่อข้อนั้น

ในภาวะปกติเมทริกซ์ของกระดูกอ่อนจะมีการสร้างทดแทนส่วนที่ถูกสลายไปอยู่เสมอ โดยที่เมื่อมีบางส่วนของคอลลาเจนและโปรตีโอไกลัยแคนถูกสลายไปเซลล์กระดูกอ่อนจะสร้างทดแทนด้วยอัตราการสังเคราะห์และการสลายที่เท่ากันทำให้การสร้างและการสลายสมดุลกันเสมอ

กระดูกอ่อนผิวข้อเป็นเนื้อเยื่อที่ไม่มีหลอดเลือดและเส้นประสาทมาเลี้ยง เซลล์กระดูกอ่อนได้อาหารและออกซิเจนจากของเหลวในข้อโดยการซึมผ่านเมทริกซ์เข้าไป ของเสียต่างๆที่เกิดจากเซลล์กระดูกอ่อนก็จะซึมผ่านเมทริกซ์ออกมายังของเหลวในข้อเช่นเดียวกัน รวมทั้งส่วนของโปรตีโอไกลัยแคนที่ถูกย่อยสลายโดยเอ็นไซม์ต่างๆที่สร้างโดยเซลล์กระดูกอ่อน ซึ่งในการย่อยสลายของโปรตีโอไกลัยแคนนี้จะทำให้โปรตีนแกนกลางถูกตัดเป็นชิ้นเล็กๆ โดยมีส่วนของสายคอนดรอยตินซัลเฟตเชื่อมติดอยู่ หรือสายของโปรตีโอไกลัยแคนอาจจะโดนตัดโดยตรงได้เป็นชิ้นเล็ก จะมีการแพร่ออกจากเมทริกซ์ของกระดูกอ่อนเข้าสู่ของเหลวในข้อ จากนั้นของเสียทั้งหมดจะโดนดูดซึมเข้าสู่ระบบนำเหลืองแล้วเข้าสู่ระบบกระแสเลือดเพื่อไปทำลายต่อไป

## รูปที่ 4 ไตอะแกรมแสดงการสังเคราะห์และการสลายของโปรตีโอไกลัยแคนในกระดูกอ่อน



### โรคข้อเสื่อม

โรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis; OA) มีหรือ Degenerative Joint Disease ; DJD จัดเป็นกลุ่มอาการที่เกิดกับข้อต่อที่มีการเคลื่อนไหว เป็นภาวะที่เกิดจากมีการเสื่อมของกระดูกอ่อนที่คลุมบนผิวข้อต่ออย่างช้าๆรวมทั้งมีการเสื่อมของเนื้อเยื่อบริเวณใกล้เคียงได้แก่เยื่อหุ้มข้อ (Synovium) กล้ามเนื้อ (Muscle) ถุงหุ้มข้อต่อ (Joint capsule) กระดูกใต้กระดูกอ่อน (Subchondral bone) เอ็นยึดกระดูก (Ligament) และ เอ็นยึดกล้ามเนื้อ (Tendon) ซึ่งความผิดปกติที่กล่าวมานั้นจะส่งผลทำให้สัตว์เกิดอาการเจ็บ (Pain) และไม่ใช้ขา (Lameness) จากรายงานสุนัขป่วยในปี 1994 โดย May พบว่ามีสุนัขที่ป่วยด้วยอาการข้อต่ออักเสบ (Arthritis) จำนวน 2,730 ตัว ซึ่ง 78 % เป็นสุนัขป่วยด้วย โรคข้อเสื่อม จากรายงานดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโรคข้อเสื่อมเป็นโรคเกี่ยวกับข้อที่พบมากในสุนัข และพบว่าในสุนัขบางรายที่เกิดอาการแบบเรื้อรัง (Chronic osteoarthritis) จะส่งผลให้เกิดภาวะภูมิคุ้มกันไว (Hypersensitivity) ได้ด้วย

### สาเหตุ

การเกิดโรคข้อเสื่อมมีหลายสาเหตุ อาจเกิดจากมีความเสียหายที่เกิดขึ้นกับกระดูกอ่อนที่ผิวข้อต่อ ขบวนการเมตาบอลิซึมของคอลลาเจน หรือ เนื้อเยื่อต่างๆที่อยู่รอบข้อต่อนั้น (รูปที่ 6) โดยสรุปแล้วสามารถแบ่งสาเหตุของการเกิดโรคข้อเสื่อมได้เป็น 2 สาเหตุคือ

1. เกิดจากการที่มีแรงที่ผิดปกติมากระทำต่อข้อปกติ ตัวอย่างเช่นในรายที่กระดูกต้นขา (Femur) ของสัตว์หักแล้วไม่ได้รับการแก้ไขอย่างถูกต้องส่งผลให้การรับน้ำหนักตัวของขาข้างนั้นผิดปกติ จึงเกิดแรงกดที่ผิดปกติลงบนข้อต่อหัวเข่า (Stifle joint) ทำให้ข้อนั้นเกิดการเสื่อม ได้

2. เกิดจากมีแรงที่ปกติตกลงบนข้อต่อที่ผิดปกติเช่นในกรณีเอ็นยึดข้อ (Anterior cruciate ligament) ฉีกขาดทำให้ข้อต่อมีลักษณะที่ผิดปกติไปในขณะที่ต้องรับน้ำหนักปกติ ก็ทำให้เกิดการเสื่อมได้ หรืออาจเกิดจากข้อนั้นมีความผิดปกติเช่นเกิดภาวะอักเสบติดเชื้อ (Septic arthritis) ก็ได้

นอกจากสาเหตุที่กล่าวมานั้นอาจได้มีการจัดจำแนกโรคข้อเสื่อมได้เป็นสองกลุ่มคือ

1. โรคข้อเสื่อมแบบปฐมภูมิ (Primary osteoarthritis) เป็นโรคข้อเสื่อมที่เกิดขึ้นมาเอง โดยไม่มีสาเหตุเด่นชัดซึ่งมักพบในสัตว์ที่มีอายุมาก ซึ่งภาวะการเกิดโรคข้อเสื่อมนี้ อาจเกิดเฉพาะที่หรือเกิดทั่วร่างกาย
2. โรคข้อเสื่อมแบบทุติยภูมิ (Secondary osteoarthritis) เป็นโรคข้อเสื่อมที่เกิดจากสาเหตุต่างๆเช่น อันตรายจากอุบัติเหตุ ความผิดปกติของกระดูกและข้อที่มีมาแต่กำเนิด หรือโรคข้อชนิดอื่นๆที่ทำให้เกิดโรคข้อเสื่อมตามมา

### การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี

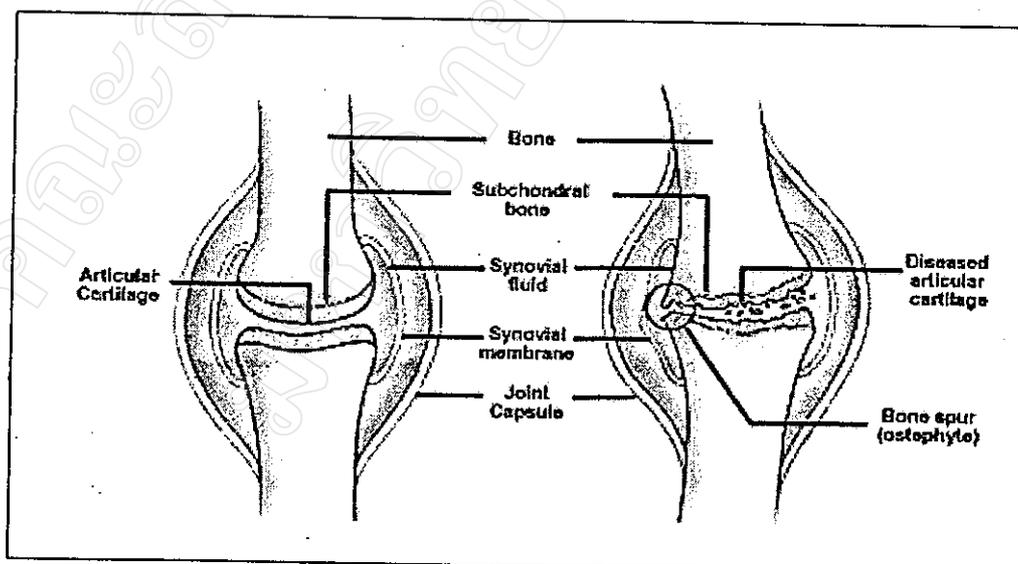
การเกิดโรคข้อเสื่อม เริ่มจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์กระดูกอ่อน หรือ สารชีวโมเลกุลต่างๆที่อยู่ในเมทริกซ์ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงปัจจัยทางกายภาพ (Physical factor) เช่น การบาดเจ็บ (Injury) หรือเกิดจากปัจจัยจากสารเคมี (Chemical factor) เช่น สารสเตียรอยด์ (Steroid) ทำให้เซลล์กระดูกอ่อน มีการสังเคราะห์โปรตีนโอกลัยแคน ลดน้อยลงในขณะที่มีการสร้าง เอ็มไซม์เมทาโลโปรตีเอส คอลลาจีเนส โปรตีเอส และเอ็มไซม์อื่นๆเพิ่มมากขึ้น โดยเอ็มไซม์เหล่านี้จะไปทำหน้าที่สลายโครงสร้างของโปรตีนโอกลัยแคน คอลลาเจิน และ โปรตีน ต่างๆ ในเมทริกซ์ ส่งผลให้เมทริกซ์ที่อยู่บริเวณกระดูกอ่อนผิวข้อต่อบางลง มีความแข็งแรงลดลง มีการปล่อยส่วนของ คอลลาเจิน และ โปรตีนโอกลัยแคน อิสระเข้าสู่ของเหลวในข้อ ซึ่งส่วนของคอลลาเจินและโปรตีนโอกลัยแคนอิสระเหล่านี้ ถูกกำจัดออกจากของเหลวในข้อ โดยการดูดซึมเข้าระบบน้ำเหลืองที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มข้อแล้วจึงเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิตเพื่อไปทำลายต่อไป

การที่มีชิ้นส่วนต่างๆของคอลลาเจินและโปรตีนโอกลัยแคนเข้าไปอยู่ในของเหลวในข้อนั้นจะเหนี่ยวนำให้เกิดขบวนการอักเสบ (Inflammation) ขึ้น ซึ่งในขบวนการอักเสบนั้นเซลล์ที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับเซลล์เม็ดเลือดขาว จะมีการปล่อยสารตัวกลางระหว่างเซลล์ (Intercellular messengers) ต่างๆ เช่น ไซโตไคน์ (Cytokines) หรือ อินเตอร์ลิวคิน วัน (Interleukin 1) ซึ่งสารเหล่านี้จะไปกระตุ้นให้เซลล์กระดูกอ่อนมีการสร้างเอ็มไซม์ต่างๆ ออกมามากขึ้น ซึ่งเอ็มไซม์เหล่านี้เองจะไปทำลายเมทริกซ์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ เมทริกซ์ ที่อยู่บริเวณกระดูกอ่อนบางลง ส่วน โปรตีนโอกลัยแคน ที่มีการสร้างออกมาก็พบว่าจะมีขนาดสั้นกว่าปกติ นอกจากนั้นยังพบการเปลี่ยนแปลงโครง

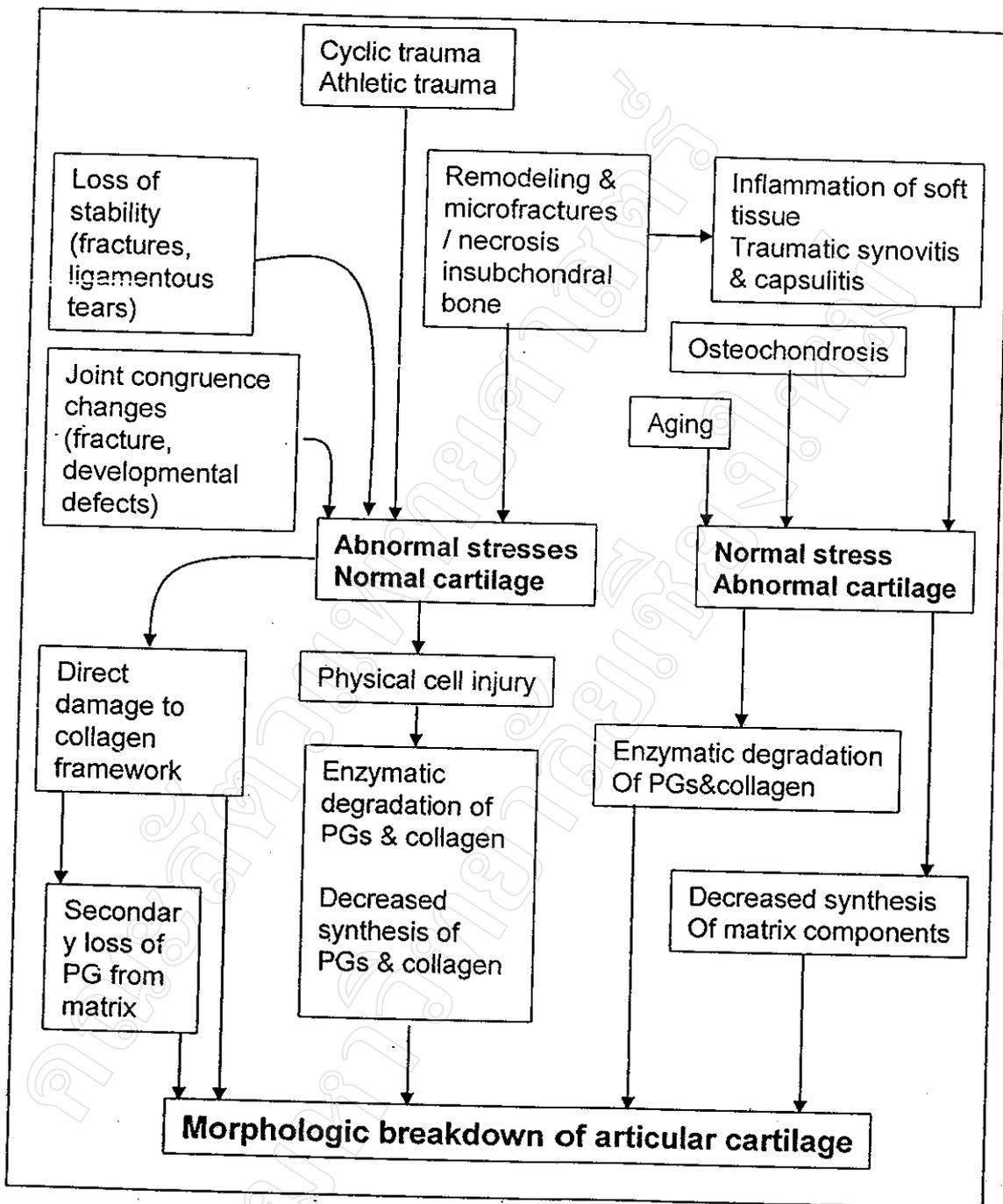
สร้างของ กลัยโคซามิโนไกลัยแคนด้วยเช่น คอนดรอยตินซัลเฟต จะอยู่ในรูปของ Chondroitin 4-sulfate (C4S) แทนที่จะอยู่ในรูปของ Chondroitin 6-sulfate (C6S) ซึ่งพบในกระดูกอ่อนปกติโปรตีโอไกลัยแคนที่ผิดปกติที่สร้างออกมานั้นเมื่อไปจับกับฮัยอาลูโรเนทที่ปกติก็ทำให้ไม่สามารถทำหน้าที่ได้เหมือนกับเอกกรีแคน (Aggrecan) ปกติ

การสูญเสียโปรตีโอไกลัยแคนจากกระดูกอ่อนที่ผิวข้อต่อมีความสำคัญมากเนื่องจากโปรตีโอไกลัยแคนมีหน้าที่หลักในการรักษาความสมบูรณ์ของกระดูกอ่อน ซึ่งโปรตีโอไกลัยแคนที่จะจับอยู่กับ ฮัยอาลูโรเนท ในรูปของ Proteoglycan- Hyaluronate Aggregate ซึ่งจะมีน้ำหนักโมเลกุลสูง มีคุณสมบัติชอบน้ำ อยู่ร่วมกับคอลลาเจน ภายในเมทริกซ์ช่วยในการรักษาปริมาณน้ำภายในกระดูกอ่อน รักษาความแข็งแรง และยืดหยุ่นของคอลลาเจนและกระดูกอ่อน ช่วยให้ผิวกระดูกอ่อนที่อยู่บนกระดูกข้อต่อมีความลื่นและยืดหยุ่นสามารถรับน้ำหนักและแรงกระแทกได้ อีกทั้งการที่โปรตีโอไกลัยแคน ถูกย่อย จะส่งผลให้ Proteoglycan - Hyaluronate Aggregates เสียหน้าที่ไป ทำให้ความสามารถในการรักษาปริมาณของน้ำภายในเมทริกซ์ของกระดูกอ่อนเสียไป ส่งผลให้ความแข็งแรง ความยืดหยุ่น และความลื่นของกระดูกอ่อนลดลง นอกจากนี้ ฮัยอาลูโรเนท ยังมีหน้าที่เป็นสารป้องกันขบวนการอักเสบ (Anti-inflammation) โดยมีนจะไปทำการกำจัดสารจำพวกอนุมูลอิสระ (Free radicals) ที่มีอยู่ในกระดูกอ่อนและน้ำเลี้ยงข้อต่อ และกีดการสร้างสารพรอสตาแกลนดิน (Prostaglandins) จากเซลล์ต่างๆในข้อต่อ

รูปที่ 5 แสดงลักษณะของข้อที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อเกิดภาวะข้อต่อเสื่อม<sup>41</sup>



รูปที่ 6 ปัจจัยที่มีผลต่อขบวนการสลายของกระดูกอ่อนผิวหน้าข้อต่อในภาวะโรคข้อเสื่อม (PG=proteoglycan)



การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นที่กระดูกอ่อนผิวข้อต่อพบว่าในระยะเริ่มแรก พยาธิสภาพมักเกิดขึ้นกับบางส่วนของกระดูกอ่อนโดยเฉพาะจุดที่รับน้ำหนัก พบว่ากระดูกอ่อนที่จากเดิมเป็นสีขาว ใส และเรียบจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ขุ่นและไม่เรียบ อาจมีการแตกเป็นร่อง (Fissure) หรือในกรณีที่มีความรุนแรงมากอาจเกิดเป็นแผลหลุม (Ulcer) หรือมีการหลุด ลึกกร่อนของเนื้อกระดูกอ่อนจน

ถึงขั้นกระดูกใต้กระดูกอ่อน นอกจากนั้นยังพบว่าถุงหุ้มข้อก็จะมีกระดูกงอกตัวขึ้นมาด้วย เกิดภาวะ Sclerosis ขึ้นกับกระดูกที่อยู่ใต้กระดูกอ่อน นอกจากนั้นอาจมีการพบ Subchondral bone cyst ร่วมด้วย ในรายที่มีความรุนแรงอย่างมากอาจพบว่าการลอกหลุดของเนื้อกระดูกอ่อนที่ปกคลุม บริเวณผิวข้อต่อออกไปจนหมดคงเหลือแต่เนื้อกระดูก อีกทั้งอาจพบการงอกของกระดูก (Osteophyte) จากบริเวณขอบของข้อต่อ

เมื่อตรวจลักษณะทางพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยการย้อมสีกระดูกอ่อนด้วย Safenanin-O หรือ Toluidine blue พบว่าส่วนของเมทริกซ์ ที่เกิดพยาธิสภาพจะติดสีจางลงในกรณีที่ยังเกิดพยาธิสภาพที่ไม่รุนแรง แต่เมื่อเกิดพยาธิสภาพที่รุนแรงแล้วจะพบว่ามีการแตกของผิวกระดูกอ่อนเป็นร่องหรือเป็นร้าว สำหรับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์กระดูกอ่อนนั้นในช่วงแรกของการเกิดพยาธิสภาพจะมีจำนวนเซลล์กระดูกอ่อนเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งพบว่าเซลล์กระดูกอ่อนเหล่านี้จะมีการจับตัวกันเป็นกลุ่ม (Clone) ต่อมาเมื่อเกิดความรุนแรงเพิ่มมากขึ้นจะพบว่าปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนจะเริ่มลดลง มีการหนาตัวของกระดูกใต้กระดูกอ่อนมากขึ้น

#### การวินิจฉัย

ในปัจจุบันการวินิจฉัยโรคข้อต่อเสื่อมมี 3 วิธีได้แก่ การตรวจอาการที่สัตว์แสดงออก (Clinical signs) การตรวจทางภาพถ่ายรังสี (Radiography) หรือการตรวจของเหลวในข้อ พบว่าการวินิจฉัยโรคจากอาการที่สัตว์แสดงออก หรือการตรวจโดยอาศัยภาพถ่ายทางรังสีนั้น จะสามารถตรวจพบได้ก็เมื่อสัตว์มีรอยโรค (Lesion) ค่อนข้างรุนแรงจนเกิดความผิดปกติกับตัวสัตว์ ทำให้สัตว์แสดงอาการที่เด่นชัดจนสามารถวินิจฉัยได้ ซึ่งไม่สามารถใช้วินิจฉัยโรคในระยะแรกได้ อาการที่แสดงออกส่วนมากพบว่า สัตว์จะมีอาการเจ็บปวด และ ไม่ใช้ขา ซึ่งความรุนแรงของการไม่ใช้ขาที่ขึ้นกับระดับความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นนอกจากนี้ก็อาจจะสามารถสังเกตเห็นข้อที่เกิดการเสื่อม มีการบวม

การถ่ายภาพทางรังสี นับได้ว่าเป็นวิธีการวินิจฉัยที่ให้ผลได้ถูกต้องและแม่นยำที่สุดสำหรับการวินิจฉัยโรคข้อเสื่อมในปัจจุบันแต่ก็มีปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องอีกมากมายเช่น ท่าที่ใช้ในการถ่ายภาพ (Position) หรือระดับความรุนแรงของโรค (Severity) อีกทั้งในการวินิจฉัยบางครั้งจำเป็นต้องใช้สารทึบแสง (Contrast medium) ฉีดเข้าข้อ (Intra-articular injection) เพื่อให้ได้ผลการวินิจฉัยที่แม่นยำมากขึ้น การเปลี่ยนแปลงของภาพถ่ายทางรังสีนั้นจะขึ้นกับระดับความรุนแรงของโรค การเปลี่ยนแปลงแรกสุดที่สามารถวินิจฉัยได้โดยอาศัยภาพถ่ายรังสีคือการเกิดภาวะการสึกกร่อนของกระดูกอ่อนที่ผิวข้อต่อ (Cartilaginous erosion) มีมากขึ้น โดยจะพบว่าช่องว่างในข้อต่อ (Joint space) กว้างกว่าปกติซึ่งการที่ข้อเกิดพยาธิสภาพได้ในขนาดนี้ก็แสดงว่าได้มีการเกิดโรคข้อเสื่อมมาเป็นระยะเวลาหนึ่งแล้ว และต่อมาเมื่ออาการของโรครุนแรงมากขึ้นก็อาจจะพบ มีการ

สร้างถุงน้ำบริเวณกระดูกใต้กระดูกอ่อนข้อต่อ (Subchondral bone cyst) การตายของกระดูกใต้กระดูกอ่อน (Subchondral sclerosis) หรือ เนื้ออกของกระดูกบริเวณรอบกระดูกอ่อน (Perichondral osteophytes) เป็นต้น สำหรับการตรวจของเหลวในข้อ ที่ได้จากการเจาะดูด (Aspiration) สามารถทำได้ในสุนัขที่มีขนาดกลางถึงใหญ่ พบว่าในรายที่เกิดโรคข้อต่อเสื่อม จะมีจำนวนเซลล์ที่มีนิวเคลียส (Nucleated cells) เช่น นิวโตรฟิล (Neutrophil) หรือโปรตีนเพิ่มขึ้น

#### การตรวจระดับคอนดรอยตินซัลเฟตโปรติโอไกลัยแคน

ในปัจจุบันได้มีงานวิจัยเพื่อศึกษาถึงสารบ่งชี้ (Markers) ต่างๆ ที่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเกิดโรคข้อเสื่อม การศึกษาในมนุษย์พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของระดับสารบ่งชี้ต่างๆช่วยให้สามารถทำการวินิจฉัยโรคได้เร็วขึ้น ซึ่งรายงานนี้สอดคล้องกับรายงานที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับของสารบ่งชี้ต่างๆ ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อต่อเสื่อม ในม้า หนู สุนัข และกระต่าย โดยสารบ่งชี้ที่ใช้ในการตรวจเพื่อบ่งบอกความเปลี่ยนแปลงหรือความผิดปกติของข้อต่อ ได้แก่ สารชีวโมเลกุลต่างๆที่เป็นองค์ประกอบของกระดูกอ่อน เช่น เคอราแตนซัลเฟต (Keratan sulfate;KS), คอนดรอยตินซัลเฟต ฮัยอาลูโรเนท และ คอลลาเจน ชนิด 2

ตั้งแต่ปี ค.ศ.1981 เป็นต้นมาได้มีการรายงานการผลิตแอนติบอดี (antibody) ที่มีความจำเพาะต่อสายคอนดรอยตินซัลเฟตโปรติโอไกลัยแคนมากมายหลายชนิด ซึ่งแอนติบอดีเหล่านี้มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง (epitope) บนสายคอนดรอยตินซัลเฟตที่แตกต่างกัน โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ

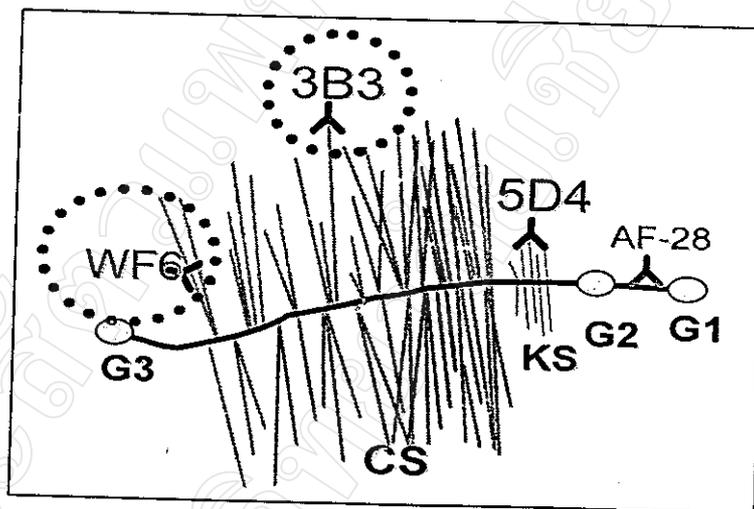
1. โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสายคอนดรอยตินซัลเฟตชนิดที่ไม่ถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ใดๆ ตัวอย่างเช่น S54C,CS-56,MO-225,MC21C,.6C3,7D4 และWF6
2. โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสายคอนดรอยตินซัลเฟตชนิดที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ ตัวอย่างเช่น 2B6,9A2และ3B3

จากการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมของเซลล์กระดูกที่มีการสร้างสายโปรติโอไกลัยแคนใหม่ขึ้นมาซ่อมแซมส่วนที่ถูกทำลายไป ซึ่งพบว่า สายโปรติโอไกลัยแคนที่ถูกสร้างขึ้นใหม่นั้นมีการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีของกระดูก ซึ่งสารนี้สามารถตรวจสอบได้จากแอนติบอดีที่สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับคอนดรอยตินซัลเฟตชนิดที่สร้างใหม่เนื่องจากขบวนการสลาย (Anabolic neopitope) ซึ่งคอนดรอยตินชนิดใหม่ (Neopitope) ที่ค้นพบนี้สร้างขึ้นจากโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตที่มีการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการสร้างหรือขบวนการสลายและแอนติบอดีที่สามารถตรวจสอบการสร้างใหม่ที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่า 3B3 mAb ซึ่งพบว่าจำเพาะต่อปลาย เดลต้า 4,5

unsaturated glucuronic acid ซึ่งต่อปลาย 6- sulfate N-acetylgalactosamine ของสายคอนดรอยตินซัลเฟต โปรติโอไกลัย-แคนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Chondroitinase ABC แล้ว

สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด WF6 เป็นแอนติบอดีที่ถูกพัฒนาขึ้นจากห้องปฏิบัติการวิจัยโรคกระดูกและข้อ ( Bone and Joint Reserch Laboratory) คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดนี้มีความจำเพาะต่อสาย Chondroitin-6-sulfate และ Chondroitin 2,6 disulfate และยังสามารถจับได้อย่างจำเพาะกับ Shark-A1D1 อีกด้วย ซึ่ง ตำแหน่งที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดนี้จะไปจับบนสายคอนดรอย-ซัลเฟตที่พบนี้ไม่ต้องผ่านการย่อยสายคอนดรอยตินซัลเฟตด้วยเอนไซม์ เรียกตำแหน่งดังกล่าวของสายคอนดรอยตินนี้ว่า Native chondroitin sulfate epitope จะพบสูงขึ้นเมื่อมีความผิดปกติทาง ขบวนการสลายของสายคอนดรอยตินซัลเฟต มีการทำลายมากเกินไป

รูปที่ 7 แสดงตำแหน่งของสารบ่งชี้ (Markers) ที่จำเพาะต่อตำแหน่งต่างๆบนสายของ Proteoglycan monomer



การศึกษานี้จะทำการศึกษาระดับคอนดรอยตินซัลเฟต ชนิด WF6 ซึ่งสามารถใช้เป็น สารบ่งชี้ปริมาณหรือระดับการสลายของสารชีวโมเลกุลในข้อต่อได้เป็นอย่างดี โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างสุนัขที่ปกติกับสุนัขที่ป่วยเป็นโรคข้อต่อเสื่อม เพื่อที่จะศึกษาวาระดับของคอนดรอยตินซัลเฟตชนิด WF6 ในสุนัขทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างไร สำหรับใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการตรวจระดับสารนี้เพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรคข้อต่อเสื่อมได้เร็วขึ้น

## ระเบียบวิธีการวิจัย

### สัตว์ทดลอง

สุนัขพันธุ์ผสมอายุระหว่าง 2-5 ปี จำนวน 70 ตัว แบ่งเป็นสองกลุ่ม โดยกลุ่มแรกเป็นสุนัขที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยแล้วว่าไม่เกิดภาวะโรคข้อเสื่อมโดยอาศัยแนวทางในการตรวจอันประกอบไปด้วย การซักประวัติ ( History taking ) การตรวจทางกายภาพ ( Physical examination ) และการตรวจท่าในการเดิน ( Gait analysis ) จำนวน 52 ตัว สำหรับกลุ่มที่สองเป็นสุนัขที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยว่าเกิดภาวะโรคข้อต่อเสื่อม และทำการยืนยันด้วยภาพถ่ายทางรังสี ( Radiographic image ) จำนวน 18 ตัว

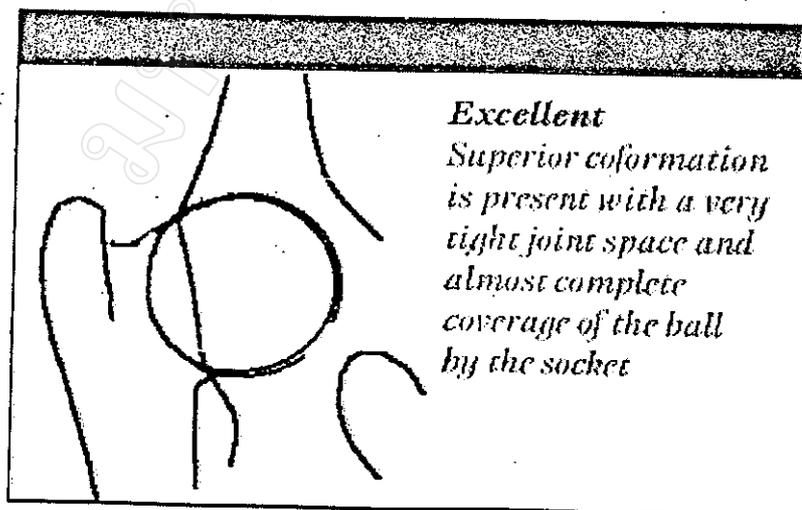
### การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดสุนัขจำนวน 5 มล./ตัว นำไปปั่นแยกเอาซีรัมเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปตรวจหาระดับคอนดรอยตินซัลเฟตที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี WF6 โดยวิธี Competitive inhibition ELISA assay

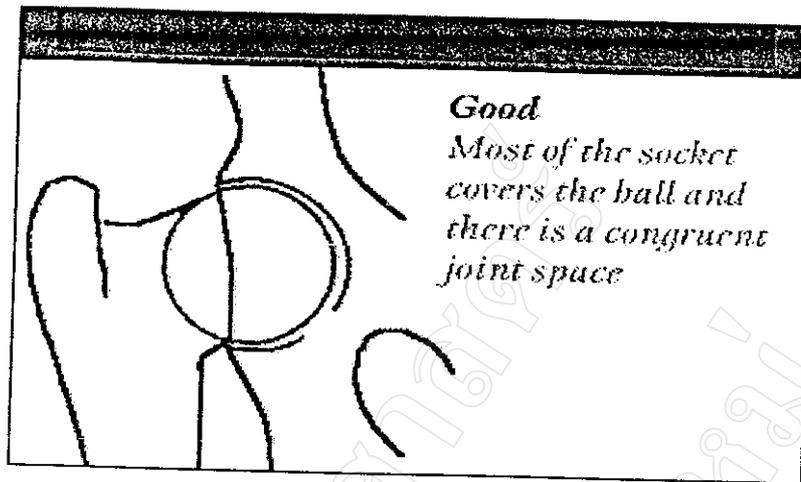
### การวินิจฉัยยืนยันโรคข้อเสื่อม

ในการศึกษานี้ใช้สุนัขที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคข้อสะโพกเสื่อม ( Hip dysplasia ) เป็นตัวแทนของสุนัขที่เกิดภาวะโรคข้อเสื่อมโดยอาศัยผลจากการตรวจทางกายภาพและยืนยันผลการเกิดโรคข้อสะโพกเสื่อมด้วยภาพถ่ายทางรังสี ในท่า Ventrodorsal โดยอาศัยการแบ่งระดับความรุนแรงของโรคตามวิธีของ Orthopedic Foundation for Animal ดังแสดงในรูปที่ 8, 9, 10, 11, 12 และ 13 โดยในการศึกษานี้จะเลือกเฉพาะสุนัขที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเกิดโรคข้อสะโพกห่างในระดับรุนแรง ( severe ) ดังแสดงในรูปที่ 13

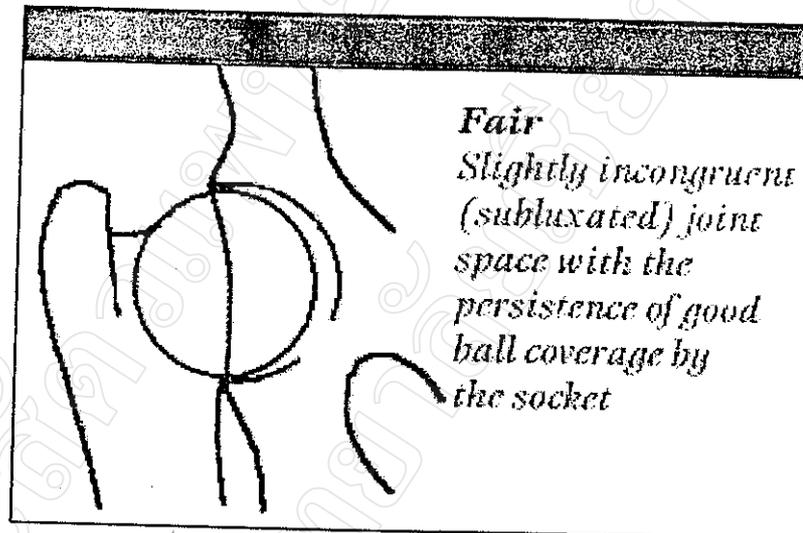
รูปที่ 8 แสดงภาพถ่ายทางรังสีของข้อสะโพกที่สมบูรณ์ดีมาก ( excellent )



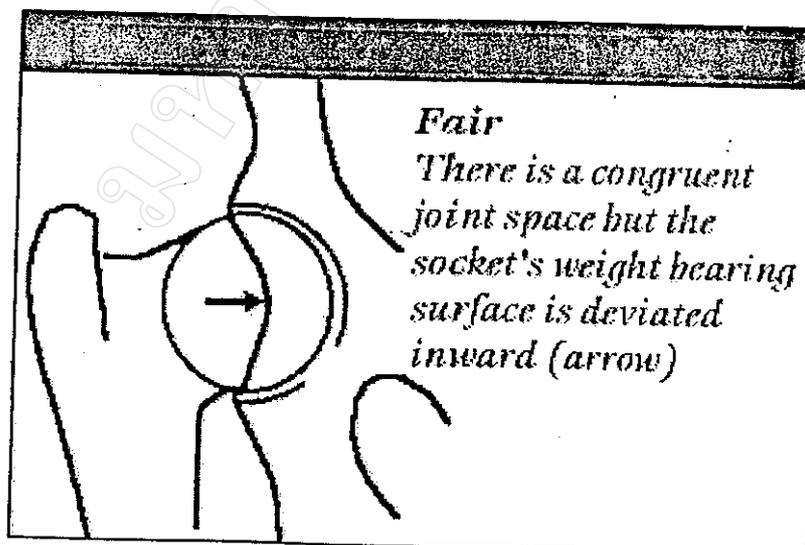
รูปที่ 9 แสดงภาพถ่ายทางรังสีของข้อสะโพกที่สมบูรณ์ดี (good)



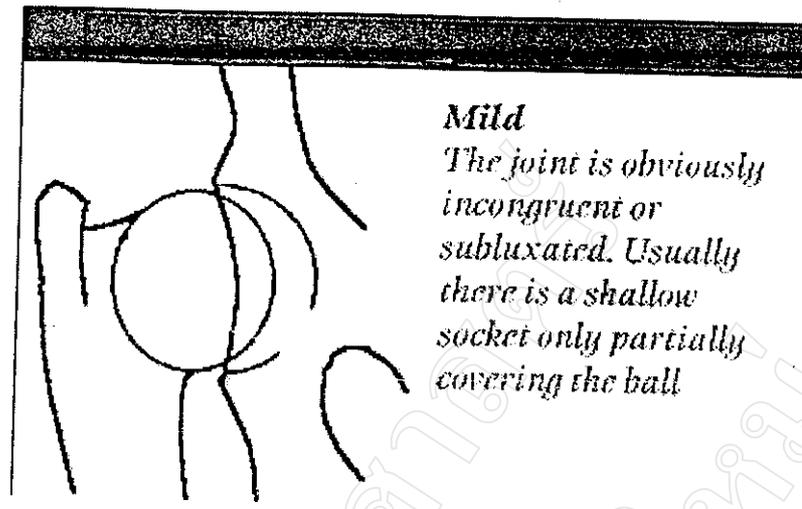
รูปที่ 10 แสดงภาพถ่ายทางรังสีของข้อสะโพกที่ต้องให้ความระวัง (fair)



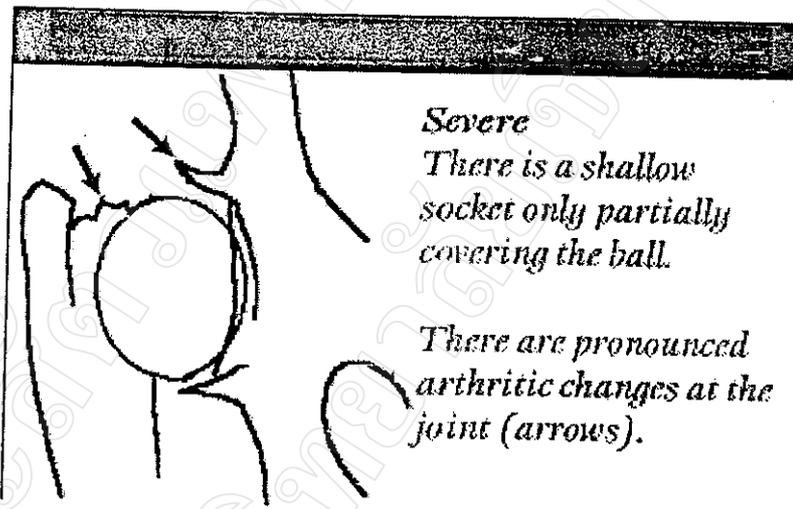
รูปที่ 11 แสดงภาพถ่ายทางรังสีของข้อสะโพกที่ต้องให้ความระวัง (fair)



รูปที่ 12 แสดงภาพถ่ายทางรังสีของข้อสะโพกที่มีความผิดปกติในระดับไม่มาก (mild)



รูปที่ 13 แสดงภาพถ่ายทางรังสีของข้อสะโพกที่เกิดโรคในระดับรุนแรง (severe)



การวิเคราะห์การหาปริมาณคอนตรอยดินซัลเฟต WF6 อีพีโทป

- เคลือบเพลตด้วย Shark PG-A1 fraction ที่เข้มข้น 10  $\mu\text{g/ml}$  ใน Coating buffer ปริมาณ 100  $\mu\text{l}$ /หลุม ที่ 25 C เป็นเวลา 1 คืน
- ล้างเพลตด้วย TRIS-IB (150 $\mu\text{l}$ /หลุม) 3 ครั้งแล้วทำการ Block บริเวณ Uncoated ด้วย 1% (w/v) BSA ใน Tris-IB (150 $\mu\text{l}$ /หลุม)อบเพลตไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 60 นาที
- เตรียม inhibition mixture , ซีรัม หรือ Standard competitor [Shark PG A1D fraction : ความเข้มข้นตั้งแต่ 19.5-10000 ng/ml ใน 6% (w/v) BSA] ทำปฏิกิริยากับ WF6 mAb ( 1:120000 ใน Tris-IB) อัตราส่วน 1:1,ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 60 นาที

4. เมื่อครบเวลา ล้างเพลต แล้วเติม Mixture ลงไป ปริมาณ 100  $\mu$ l/หลุม อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 60 นาที
5. ภายหลังจากล้างเพลตแล้วจึงทำการเติม IgM-specific peroxidase conjugated anti-immunoglobulin ที่ความเข้มข้น 1:1000 ใน 1%(w/v) BSA ลงไป ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 60 นาที
6. ล้างเอา Conjugate ส่วนเกินออก จากนั้นเติม Peroxidase substrate ปริมาณ 100  $\mu$ l/หลุม ลงไป นำเพลตไปไว้ในที่มืด ทิ้งไว้ให้เกิดสี ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
7. จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 4  $MH_2SO_4$  ปริมาณ 50  $\mu$ l/หลุม
8. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 492/690 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader
9. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณคอนครอยตินซัลเฟต WF6 Epitope ในซีรัมตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Delta Soft II

#### การวิเคราะห์ข้อมูล

สุนัขแต่ละกลุ่มจะหาค่าสูงสุด (maximum) ค่าต่ำสุด (minimum) ค่าเฉลี่ย (mean) และค่าความแปรปรวน (standard variation) ของระดับคอนครอยตินซัลเฟต ชนิด WF6 และทำการเปรียบเทียบระดับคอนครอยตินซัลเฟต ชนิด WF6 ระหว่างสุนัขกลุ่มปกติกับสุนัขกลุ่มที่เป็นโรคข้อต่อเสื่อม ด้วยวิธี student -T test

#### ผลการวิเคราะห์

ในตารางที่ 1 แสดงระดับคอนครอยตินซัลเฟตชนิด WF6 ของสุนัขปกติจำนวน 52 ตัว โดยมีหน่วยเป็น ng/dl สำหรับระดับคอนครอยตินซัลเฟตชนิด WF6 ของสุนัขที่ป่วยด้วยโรคข้อต่อเสื่อมจำนวน 18 ตัว แสดงในตารางที่ 2 จากนั้นจึงนำค่าของระดับคอนครอยตินซัลเฟต ในสุนัขทั้งสองกลุ่มมาเขียนกราฟเพื่อดูค่าความแตกต่างซึ่งแสดงในรูปที่ 14 จากผลการศึกษาจะเห็นว่าในซีรัมของสุนัขที่โรคข้อต่อเสื่อม มีระดับคอนครอยตินซัลเฟตชนิด WF6 ที่สูงกว่าในสุนัขกลุ่มปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ดังแสดงในตารางที่ 3. โดยน้ำหนักของสุนัขทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 4

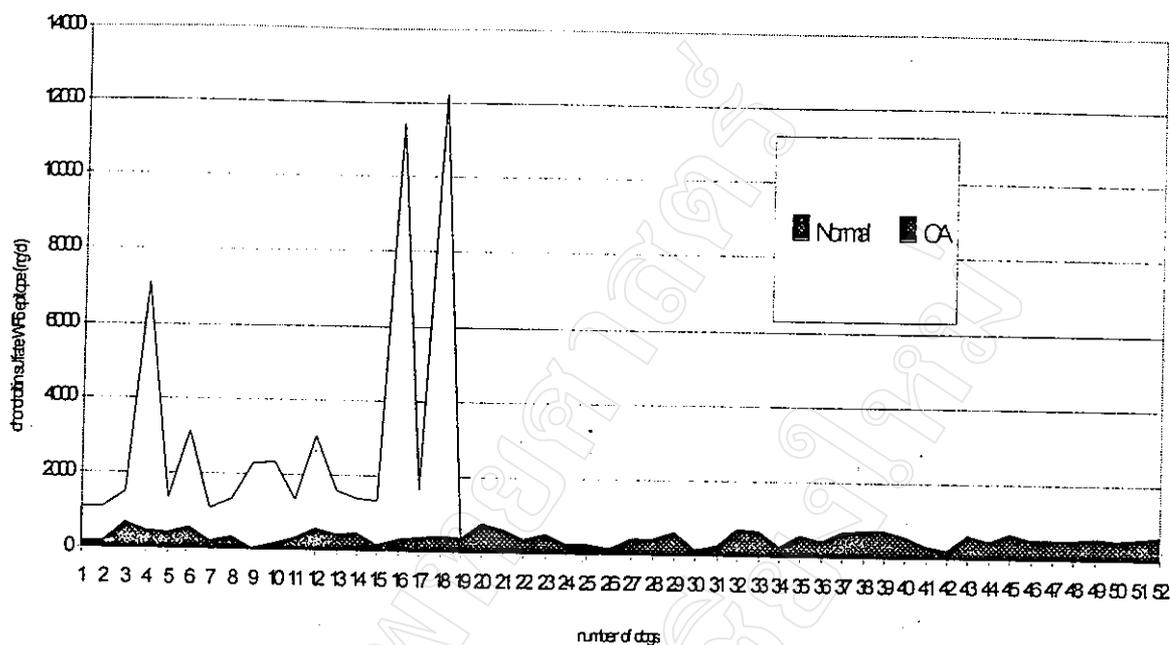
ตารางที่ 1 ปริมาณคอนครอยทีนซัลเฟตชนิด WF6 ในซีรัมสุนัขปกติ

id	WF6 (ng/dl)								
1	202.73	12	609.84	23	530.20	34	313.17	45	685.15
2	201.62	13	449.61	24	275.65	35	609.29	46	544.45
3	676.97	14	485.77	25	282.87	36	464.57	47	562.12
4	483.23	15	221.96	26	217.93	37	688.96	48	560.57
5	458.32	16	352.74	27	461.48	38	748.25	49	618.23
6	607.75	17	375.78	28	455.20	39	732.38	50	566.10
7	258.06	18	448.56	29	634.84	40	620.72	51	587.33
8	361.79	19	415.86	30	213.73	41	365.13	52	640.86
9	37.64	20	788.83	31	274.51	42	249.08		
10	175.28	21	631.11	32	767.64	43	668.40		
11	349.71	22	405.56	33	689.00	44	489.37		

ตารางที่ 2 ปริมาณคอนครอยทีนซัลเฟตชนิด WF6 ในซีรัมสุนัขโรคข้อเสื่อม

id	WF6 (ng/dl)	id	WF6 (ng/dl)
1	899.58	11	974.00
2	895.51	12	2449.43
3	810.37	13	1134.09
4	6650.29	14	933.11
5	911.42	15	1105.01
6	2518.94	16	11121.72
7	836.43	17	1278.84
8	977.26	18	11816.38
9	2243.88		
10	2158.93		

รูปที่ 14 กราฟเปรียบเทียบระดับคอนดรอยตินซัลเฟตชนิด WF6 ในสุนัขกลุ่มปกติ (normal) และกลุ่มที่เป็นโรคข้อเสื่อม (OA)



ตารางที่ 3 แสดงค่าทางสถิติของระดับคอนดรอยตินซัลเฟตในซีรัมสุนัขกลุ่มปกติ (normal) และสุนัขกลุ่มที่เป็นโรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis) (n=number of sample, max=maximum, min=minimum, Std= standard deviation) ( $P < 0.01$ )

Group	n	max	min	mean	Std
normal	52	788.834	37.641	471.46	182.62
Osteoarthritis	18	11,816.4	810.369	2,761.95	3,455.52

ตารางที่ 4 แสดงค่าทางสถิติของน้ำนํกสุนัขกลุ่มปกติ (normal) และสุนัขกลุ่มที่เป็นโรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis) (n=number of sample, max=maximum, min=minimum, Std= standard deviation) ( $P < 0.05$ )

Group	n	max	min	mean	Std
normal	52	26	3.5	16.20	5.29
Osteoarthritis	18	40	10	18.28	6.44

## บทสรุปและข้อเสนอแนะ

ในภาวะปกติขบวนการเมตาโบลิซึมของกระดูกอ่อนทั้งขบวนการสร้างและขบวนการทำลายจะมีในระดับต่ำเพื่อรักษาภาวะความสมดุลภายในข้อต่อให้คงที่ดังเห็นได้จากระดับคอนดรอยตินซัลเฟตชนิด WF6 ซึ่งเป็นคอนดรอยตินซัลเฟตชนิดที่ตอบสนองต่อการสลายสายกลัยโคซามีโนกลัยแคนที่เป็นกลุ่มคอนดรอยตินซัลเฟตในกระดูกอ่อนในกลุ่มของสุนัขปกติมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 471.46 ng/dl (ตารางที่ 3) แต่เมื่อมีความผิดปกติเกิดกับกระดูกอ่อนในข้อต่อ เช่นภาวะโรคข้อต่อเสื่อม กระดูกอ่อนจะมีขบวนการเมตาโบลิซึมที่ผิดปกติไปจากเดิมคือจะพบว่าในช่วงแรกของการเกิดภาวะข้อต่อเสื่อมจะมีขบวนการสร้างสารชีวเคมีต่างๆเพิ่มมากขึ้นเพื่อเป็นการทดแทนเซลล์ แมทริกซ์ และสารต่างๆที่เกิดความเสียหาย หากกระบวนการสร้างสามารถผลิตสารชีวเคมีต่างๆ ขึ้นมาทดแทนได้เพียงพอ ขบวนการเมตาโบลิซึมจะกลับสู่ภาวะปกติอีกครั้ง สัตว์ก็จะมีภาวะโรคข้อต่อเสื่อม แต่หากขบวนการสร้างสารต่างๆ มีไม่เพียงพอกับขบวนการสลายที่เกิดขึ้น ขบวนการสร้างสารต่างๆ ก็จะค่อยๆ ลดลง เกิดขบวนการทำลายสารต่างๆก็เพิ่มขึ้น ส่งผลให้กระดูกอ่อนมีความเสียหายเกิดมากขึ้นจนพัฒนากลายเป็นโรคข้อเสื่อม ซึ่งจากผลการศึกษาจะเห็นว่าในสุนัขกลุ่มที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเกิดโรคข้อเสื่อมจะพบระดับของคอนดรอยตินซัลเฟตสูงกว่ากลุ่มที่เป็นปกติ โดยค่าเฉลี่ยในกลุ่มของสุนัขโรคข้อเสื่อมสูงถึง 2,761 ng/dl นอกจากนั้นจะเห็นว่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสุนัขในกลุ่มนี้มีค่าสูงถึง 3,455.52 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระดับความรุนแรงในการเกิดโรคข้อเสื่อมที่ไม่เท่ากันในสุนัขแต่ละตัวทำให้ระดับของคอนดรอยตินซัลเฟต ที่ตรวจพบได้ในซีรัมแตกต่างกันมาก โดยพบว่าค่าสูงสุดที่สามารถตรวจพบได้ในการศึกษารุ่นนี้เท่ากับ 11,816.40 ng/dl ในขณะที่ค่าต่ำสุดของสุนัขในกลุ่มนี้คือ 810.369 ng/dl (ตารางที่ 3)

ผลจากการศึกษาเป็นข้อมูลพื้นฐานเบื้องต้นที่สำคัญเพื่อที่ชี้ให้เห็นแนวโน้มความเป็นไปได้ในการนำเอาระดับของคอนดรอยตินซัลเฟตในซีรัม มาใช้ช่วยประกอบการวินิจฉัยโรคข้อเสื่อมในสุนัข เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวัดระดับสารคอนดรอยตินซัลเฟตในซีรัมสำหรับใช้เป็นสารบ่งชี้ ใช้ประกอบการวินิจฉัยโรคข้อเสื่อมซึ่งในปัจจุบันทำได้เพียงการตรวจทางกายภาพ และการตรวจทางภาพถ่ายรังสีซึ่งมักตรวจพบเมื่อโรคอยู่ในระยะลุกลามมากแล้ว และนอกจากจะเป็นประโยชน์ต่อการตรวจวินิจฉัยโรคเพื่อทำการรักษาแล้ว ยังอาจมีประโยชน์ต่อการตรวจคัดเลือกสัตว์ในเชิงพานิชอีกด้วยเมื่อสามารถทำการวินิจฉัยโรคได้เร็วขึ้น อย่างไรก็ตามก็ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของสารบ่งชี้ที่ใช้บอกถึงกระบวนการสร้างสารชีวเคมีต่างๆในข้อ เพื่อใช้ประกอบการพิจารณาขบวนการเมตาโบลิซึมต่างๆที่เกิดในข้อของสัตว์ อีกทั้งควรมีการศึกษาเปรียบเทียบปัจจัยอื่นๆที่จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสารบ่งชี้เหล่านี้เช่น น้ำหนัก เพศ และอายุของสัตว์เป็นต้น

บรรณานุกรม

1. กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์, ศิริวรรณ องค์ไชย์. การเปลี่ยนแปลงระดับคอนดรอยตินซัลเฟตในซีรัมสุนัขที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคข้อต่อเสื่อมโดยการตัดเอ็นข้อเข่า. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มช. 2547; 14 (1) : 94 – 103.
2. จิตรวดี สุภาพันธุ์. การศึกษาระดับของไฮยาลูโรแนน และคอนดรอยตินซัลเฟต อีพิโทปในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ (ภาคนิพนธ์). เชียงใหม่. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2544.
3. อธิธญากรณ์ พรหมพุทธา. การเปลี่ยนแปลงระดับคอนดรอยตินซัลเฟตอีพิโทปในซีรัมคนปกติที่ช่วงอายุต่างๆ (ภาคนิพนธ์). เชียงใหม่. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2544.
4. Allan G. Radiographic Signs of joint disease. In : Textbook of veterinary diagnostic radiology. 2<sup>nd</sup>. Thrall D.E. W.B.saunders. Philadelphia. 1994; 130 – 150.
5. Belcher C, Yaqub R, Fawthrop F, Bayliss-M. and Doherty M. Synovial fluid chondroitin and keratan sulphate epitopes, glycosaminoglycans, and hyaluronan in arthritic and normal knees. Ann-Rheum-Dis. 1997; 56(5): 299-307.
6. Bjork J, Kleinau S, Tengblad A, Smedegard G. Elevated levels of serum hyaluronate and correlation with disease activity in experimental models of arthritis. Arthritis Rheum. 1989; 32(3): 306-11.
7. Brandt KD. Enhanced extractability of articular proteoglycans in osteoarthritis. Biochem. J. 1974; 143(2): 475 - 478.
8. Brandt KD, Palmoski M, Perricone E. Aggregation of cartilage proteoglycans. II Evidence for the presence of a hyaluronate-binding region on proteoglycans from osteoarthritic cartilage. Arthritis Rheum. 1976; 19(6): 1308-1314.
9. Brandt KD, Palmoski M. Organization of ground substance proteoglycans in normal and osteoarthritic knee cartilage. Arthritis Rheum. 1976; 19(2): 209-215.
10. Brandt KD, Thonar EJ-MA. Lack of association between serum keratan sulfate concentrations and cartilage changes of osteoarthritis after transection of the anterior cruciate ligament in the dog. Arthritis Rheum. 1989; 32(5): 647-651.
11. Fuller CJ, Barr AR, Sharif M, Dieppe PA. Cross-sectional comparison of synovial fluid biochemical markers in equine osteoarthritis and the correlation of these markers with articular cartilage damage. Osteoarthritis Cartilage. 2001; 9(1): 49-55.

12. Goldberg RL, Rubin AS. Serum hyaluronate as a marker for disease severity in the *Lactobacillus casei* model of arthritis in the rat. *J. Rheumatol.* 1989; 16(1): 92-96.
13. Hegemann N, Kohn B, Brunnberg L, Schmidt M.F. 2002. Biomarker of joint tissue metabolism in canine osteoarthritic and arthritic joint disorders. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002; (10)9: 714-21
14. Hollander AH, Heathfield TF, Webber C, Iwata Y, Bourne R, Rorabeck C, Poole AR. Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay. *J. Clin. Invest.* 1994; 93(4): 1722-1732.
15. Johnston SA . Osteoarthritis: joint anatomy, physiology and pathobiology, *Vet Clin N Am: Small Ani. Prac.* 1997; 27(4): 699-723.
16. Johnston SA . Osteoarthritis: Pathophysiology and expectations of treatment, A Pfizer symposium XXIII, WSAVA, 1998.
17. Kikuchi T, Yamada H, Shimmei M. Effect of high molecular weight hyaluronan on cartilage degeneration in a rabbit model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1996; 4(2): 99-110.
18. Leipold HR, Goldberg RL, Lust G. Canine serum keratan sulfate and hyaluronate concentrations. *Arthritis Rheum.* 1989; 32(3): 312-21.
19. Lohmander LS, Dahlberg L, Eyre D, Lark M, Thonar EJ, Ryd L. Longitudinal and cross-sectional variability in markers of joint metabolism in patients with knee pain and articular cartilage abnormalities. *Osteoarthritis Cartilage.* 1998; 6 (5): 351-61.
20. Lohmander LS, Ionescu M, Jugessur H, Poole AR. Changes in joint cartilage aggrecan after knee injury and in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1999; 42 (3): 534-44.
21. Macfarlane PS, Reid R, Callander R. 2000. *Pathology illustrated.* 5<sup>th</sup> ed. Churchill livingstone. London. 2000; 633-636.
22. Malesud CJ. Markers of osteoarthritis and cartilage research in animal models. *Curr. Opin. Rheumatol.* 1993; 5(4): 494-502 .
23. May S.A. Degenerative joint disease(osteoarthritis), osteoartrosis, secondary joint disease. In : *Manual of small animal arthrology.* Houlton, J.E.F. and Collinson,

- R.W (eds). BSAVA(Bristish Small Animal Veterinary Association). Bournemouth. 1994; 62-74.
24. Malemud CJ. Markers of osteoarthritis and cartilage research in animal models. *Curr. Opin. Rheumatol.* 1993; 5(4): 494-502 .
  25. McIlwraith CW, Trotter G.W. Joint disease in the horse. W.B.saunders. Pennsylvania. 1996.
  26. Okumura M, Tagami M and Fujinaga T. Measurement of serum and synovial fluid keratan sulphate and antibody to collagen type II in equine osteoarthritis. *Zentralbl-Veterinarmed-A.* 1998; 45(8): 513-6.
  27. Owens JM, Biery Dn. Radiographic interpretation for the small animal clinician. 2<sup>nd</sup> ed. Pennsylvania. Williams & Wilkins. 1999.
  28. Petersson IF, Boegard T, Svensson B, Heinegard D, Saxne T. Changes in cartilage and bone metabolism identified by serum markers in early osteoarthritis of the knee joint. *Br. J. Rheumatol.* 1998; Jan; 37(1): 46-50 .
  29. Price JS, Till SH, Bickerstaff DR, Bayliss MT, Hollander AP. Degradation of cartilage type II collagen precedes the onset of osteoarthritis following anterior cruciate ligament rupture. *Arthritis Rheum.* 1999; 42(11): 2390-8
  30. Pond MJ, Nuki G. Experimentally induced osteoarthritis in the dog. *Ann. Rheum. Dis.* 1973; 32(4): 387-388.
  31. Ratcliffe A, Beauvais PJ, Saed-Nejad F. Differential levels of synovial fluid aggrecan aggregate components in experimental osteoarthritis and joint disease. *J. Orthop. Res.* 1994; 12(4): 464-73.
  32. Ratcliffe A, Billingham MEJ, Saed-Nejad F, Muir H, Hardingham TE. Increased release of matrix components from articular cartilage in experimental canine osteoarthritis. *J. Orthop. Res.* 1992; 10(3): 350-58.
  33. Rosenberg A. Bone joints and soft tissue. In: *Pathologic basis of disease.* 6<sup>th</sup> ed. Cotran RS, Kumar V, Collins T. (eds). W.B.saunders, Philadelphia. 1999; pp.1246-1248
  34. Roush JK, McLAUGHLIN RM, Radlinsky MAG. Understanding the pathophysiology of osteoarthritis. *J. Vet. Med.* 2002; 97(2): 108-112

35. Sharif M, Osborne DJ, Meadows K, Woodhouse SM, Colvin EM, Shepstone L and Dieppe PA. The relevance of chondroitin and keratan sulphate markers in normal and arthritic synovial fluid. *Br-J-Rheumatol.* 1996; 35(10): 951-7.
36. Thonar EJ, Shinmei M and Lohmander LS. Body fluid markers of cartilage changes in osteoarthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 1993; 19(3): 635-657.
37. 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(2): 165-170
38. <http://www.md-supply.ch/viscoseal/pictures/cell5.jpg>
39. <http://www.geistlich.com/biomaterials/images/products/chondrogide/scheme.jpg>
40. [http://www.oceanhealth.com/newsletter\\_unveil2.html](http://www.oceanhealth.com/newsletter_unveil2.html)