

## APPENDIX A

## Preparation of reagents used in the study

## 1. Phosphate buffer saline (PBS)

NaCl	8.00 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.23 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15 g
KCl	0.20 g

All reagents were dissolved in distilled water and made up volume to 1 L.

## 2. Tris-Incubating buffer

BSA	1.00 g
Tween-20	1.00 ml
Tris HCl	1.21 g
NaCl	8.77 g

All reagents were dissolved in 900 ml of distilled water, adjusted pH to 7.4 and made up volume to 1 L. Store at 4°C.

## 3. Alkaline buffer (for dissolving b-HABP)

Tris HCl	3.94 g
Tris Base	3.0275 g
Tween-20	250 µl

All reagents were dissolved in distilled water and made up volume to 500 ml.

## 4. Chondroitinase ABC buffer

Tris HCl	6.00 g
Sodium acetate dihydrate	14.70 g

All reagents were dissolved in 450 ml of distilled water adjusted pH to 7.3 and made up volume to 500 ml

## 5. Citrate phosphate buffer

Citric acid monohydrate	10.30 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	18.16 g

All reagents were dissolved in 900 ml of distilled water, adjusted pH to 5.0 and made up volume to 1 L. Stored reagent at 4°C.

## 6. Substrate solution

OPD	8.00 mg
Citrate phosphate buffer	12.00 ml
35% $\text{H}_2\text{O}_2$	7.00 $\mu\text{l}$

Prepare reagent fresh for 1 plate. Keep in dark before use.

APPENDIX B

Output of thesis study

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Chiang Mai University



ขอรับรองว่าผลงานวิจัย

เรื่อง

คอนตรอยตินซัลเฟตอิพิโทปในซีรัมของม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อม

โดย

ศิริพร เพ็ชรสมณี ชำนาญ ตรีณรงค์ ปรัชญา คงทวีเลิศ  
และ ศิริวรรณ องค์กรไชย

ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ สาขาสัตวแพทยศาสตร์  
และได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 40  
ระหว่างวันที่ 4-7 กุมภาพันธ์ 2545

(ศาสตราจารย์ ต่อกุล กาญจนาลัย)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

ประธานคณะกรรมการดำเนินการจัดการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 40



# เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 40

## มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

### The Proceedings of 40<sup>th</sup> Kasetsart University Annual Conference

สาขาสัตว์ (Animals)

สาขาสัตวแพทยศาสตร์ (Veterinary Medicine)

สาขาประมง (Fisheries)

4-7 กุมภาพันธ์ 2545

ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

จัดโดย

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ร่วมกับ

ทบวงมหาวิทยาลัย

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

กระทรวงศึกษาธิการ

สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



## สาขาสัตวแพทยศาสตร์

## ภาคบรรยาย

1. สพ.3/O129 การศึกษาฟีโนไทป์และคุณสมบัติทางเคมีของฮีโมโกลบินโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสน.....297  
Studies of phenotypes and chemical properties of Kamphaengsaen  
beef hemoglobins  
โดย อรพรรณ สังข์สัมฤทธิ์ วิรัช นิมิตรสันติวงศ์  
สมหมาย หอมสวาท และอาภัสสร ชูเทศะ
2. สพ.5/O192 อุณหภูมิและสารละลายน้ำเชื้อที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อต่าง  
จากการรีดเก็บด้วยวิธี manual collection.....305  
Optimum temperature and extenders for preservation of asian  
elephant semen collected by manual collection  
โดย นิกร ทองทิพย์ มาโนชญ์ ยินดี มังกร ดำยั้ง  
ปิยวรรณ สุธรรมมาภินันท์ สิทธิเดช มหาสารวิงกุล  
ทวีโชค อังควาณิช ศรัณย์ จันทร์สิทธิเวช วุฒ วงศ์กาฬสิน  
รติกร บุตรชา ดารกา ทองไทยนันท์ และ อภิเชก คงศิลา
3. สพ.6/O193 คอนดรอยตินซัลเฟตอีพิโทปในซีรัมของม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อม.....312  
Chondroitin sulfate epitope in sera of osteoarthritic horses  
โดย ศิริพร เพียรสุมนี ชำนาญ ตรีนรงค์ ปรัชญา คงทวีเลิศ  
และศิริวรรณ องค์กรชัย
4. สพ.7/O194 การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับประสิทธิภาพการดูดซึมซีลีเนียมในสุกรขุนที่ได้รับ  
อาหารเสริมซีลีเนียมโดยการวัดความเข้มข้นของซีลีเนียมในอุจจาระ.....317  
A preliminary study on absorption capacity of selenium in fattening  
pigs fed selenium supplemented diet by determination of fecal selenium  
concentrations  
โดย ถิระ รักความสุข กิตติศักดิ์ ชัยสวัสดิ์ พิเชษฐ พักบัว  
ประหยัด แข่งคำ วีรวงศ์ ประยูรฉัตรพันธุ์ และ  
จรรย์ ปาน้ำกำเหน็ด



คอนดรอยตินซัลเฟตอีพิโทปในซีรัมของม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อม  
Chondroitin Sulfate Epitope in Sera of Osteoarthritic Horses

ศิริพร เพียรสมณณ์<sup>1</sup> ชำนาญ ตรินารอง<sup>2</sup> ประชญา คงทวีเลิศ<sup>3</sup> และ ศิริวรรณ องค์กรไชย<sup>3</sup>

Siriporn Peansukmanee<sup>1</sup>, Chumnan Trinarong<sup>2</sup>, Prachya Konglaweter<sup>3</sup>, Siriwan Ong-chai<sup>3</sup>

บทคัดย่อ

โรคข้อเสื่อมในม้าคือโรคที่เกิดจากการเสื่อมของกระดูกอ่อนผิวข้อ คอนดรอยตินซัลเฟตซึ่งเป็นไกลโคสะมิโนไกลแคนตัวหนึ่งที่สำคัญและพบได้มากที่สุดในการเสื่อมของกระดูกอ่อนจะสลายออกมามากกว่าปกติเมื่อกระดูกอ่อนผิวข้อถูกทำลาย คอนดรอยตินซัลเฟตที่ถูกปล่อยออกมาจะเข้ามาสู่ซีรัมและสามารถตรวจพบได้จากวิธีทางอิมมูโนวิทยา โดยใช้ specific monoclonal antibody (mAb WF6) วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือการเปรียบเทียบคอนดรอยตินซัลเฟต (WF6 epitope) ระหว่างม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อมและม้าที่ไม่มีอาการของโรคนี้ ตัวอย่างซีรัมเก็บจากม้าที่ไม่มีอาการ 54 ตัวอย่าง และม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อม 24 ตัวอย่าง นำไปตรวจหาคอนดรอยตินซัลเฟต ด้วยวิธี competitive ELISA และวิเคราะห์สถิติด้วย unpaired-*t*-test พบว่าม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อมมีค่าความเข้มข้นของ WF6 epitope มากกว่าในม้าปกติอย่างมีนัยสำคัญ โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างอายุของม้าทั้ง 2 กลุ่ม แสดงว่า WF6 epitope สามารถเป็น marker ที่ใช้ตรวจหาความผิดปกติของข้อได้ และอาจเป็น marker ที่ดีสำหรับการตรวจหาโรคข้อเสื่อมในม้า

ABSTRACT

Equine osteoarthritis, also called degenerative joint disease, may be define as a disease of diarthrodial joint comprising destruction of articular cartilage. Chondroitin sulfate, a major glycosaminoglycan in cartilage matrix, is released when deterioration of articular cartilage occurred. The released chondroitin sulfate in serum can be detected by immunoassay using specific monoclonal antibody, mAb WF6. Objective of this study is to compare serum chondroitin sulfate (WF6 epitope) between osteoarthritic horses and non-osteoarthritic horses. Serum collected from 54 non-osteoarthritic horses and 24 osteoarthritic horses. Then WF6 epitope was measured by competitive ELISA. Unpaired-*t*-test was applied as a statistical analysis of this study. The result showed the significantly higher of WF6 epitope in osteoarthritic horses than in non-osteoarthritic horses. The average ages of horses in both groups were not significantly different. This suggested that WF6 epitope is a sensitive marker in response to the destruction of articular cartilage. Therefore, it is likely that this condroitin sulfate epitope could be able to be the one of effective marker for degenerative joint diseases.

<sup>1</sup> บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

<sup>2</sup> สาขาวิชาคลินิกม้า กลุ่มวิชาคลินิกสัตว์เลี้ยงเป็นเพื่อน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

<sup>3</sup> ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

## คำนำ

โรคข้อเสื่อมในม้าเกิดจากการทำลายและสลายตัวของกระดูกอ่อนผิวข้อ (McIlwraith, 1982) เป็นสาเหตุให้ม้าไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ และก่อให้เกิดความสูญเสียทั้งต่อตัวม้าเองและต่อเจ้าของม้าเป็นอย่างมาก การตรวจวินิจฉัยโรคข้อในปัจจุบันโดยทั่วไปจะอาศัยการตรวจทางกายภาพและการถ่ายภาพรังสีซึ่งจะสามารถบ่งชี้ถึงความผิดปกติในข้อได้ก็ต่อเมื่อโรคดำเนินไปมากจนบางครั้งยากที่จะทำการรักษา (Widmer and Blevins, 1994) จึงเกิดความพยายามในกลุ่มนักวิจัยที่จะหาสารชีวโมเลกุลที่สามารถบ่งบอกถึงพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นภายในข้อของม้า เพื่อนำมาใช้ร่วมกับวิธีการตรวจทางกายภาพและการถ่ายภาพรังสีซึ่งจะทำให้สามารถวินิจฉัยโรคได้เร็วและแม่นยำมากขึ้น

คอนดรอยตินซัลเฟต เป็นไกลโคสะมิโนไกลแคนที่สำคัญและมีอยู่มากที่สุดในแมทริกซ์ของกระดูกอ่อนเมื่อเกิดโรคข้อเสื่อม คอนดรอยตินซัลเฟตจะถูกทำลายหลุดออกจากเนื้อกระดูกอ่อนมากกว่าปกติซึ่งสามารถตรวจพบได้ทั้งที่ตัวกระดูกอ่อนเอง (Todhunter, et al., 1996, Lillich and Weisbrode, 1997), ในน้ำไขข้อ (Belcher, et al., 1997, Hazell, et al., 1995, Frisbie, et al., 1999) และในซีรัม (Frisbie, et al., 1999, Middleton, et al., 1999) จากวิธีทางอิมมูโนวิทยา โดยใช้ specific monoclonal antibody ที่จำเพาะต่ออีพิโทปของคอนดรอยตินซัลเฟต

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาคอนดรอยตินซัลเฟตในซีรัมของม้าที่มีอาการของโรคข้อเสื่อม โดยใช้ monoclonal antibody WF6 ซึ่งมีความจำเพาะต่อ native chondroitin sulfate chain เปรียบเทียบกับม้าที่ไม่มีอาการของโรคข้อเสื่อม

## อุปกรณ์และวิธีการ

### ตัวอย่างซีรัม

เก็บจากม้าที่วินิจฉัยแล้วว่าเป็นโรคข้อเสื่อมโดยใช้การตรวจทางกายภาพและการถ่ายภาพรังสี (Widmer and Blevins, 1994) จำนวน 24 ตัวอย่าง และม้าที่ไม่พบอาการของโรคข้อเสื่อมจำนวน 54 ตัวอย่าง ซึ่งทั้ง 2 กลุ่มเป็นม้าที่อยู่ในช่วงอายุ 2-8 ปี ตัวอย่างซีรัมถูกเก็บรักษาที่  $-20^{\circ}\text{C}$  ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์

### วิธีการ

ใช้ competitive ELISA ตรวจหา WF6 epitope จากตัวอย่างซีรัม ตามวิธีของ พิระพรรณ ไปธาเจริญ (Pothacharoen, 2000) โดยใช้ shark proteoglycan (A1-fraction) เป็น coating antigen, shark proteoglycan (A1D1-fraction) เป็น competitor, WF6 monoclonal Antibody (mAb WF6) เป็น primary antibody และ Anti IgM เป็น secondary antibody

ความเข้มข้นของ WF6 epitope ที่ตรวจได้ นำมาหาค่าทางสถิติ และทดสอบสมมติฐานโดยใช้ student-t-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



## ผลการทดลอง

พบว่าความเข้มข้นของ WF6 epitope ในกลุ่มม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อมสูงกว่าม้าที่ไม่เป็นโรคนี้อย่างมีนัยสำคัญ ( $p=0.00005$ ) โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของช่วงอายุในม้าทั้งสองกลุ่ม ค่าทางสถิติของระดับ WF6 epitope ในม้าทั้งสองกลุ่มแสดงในรูปที่ 1

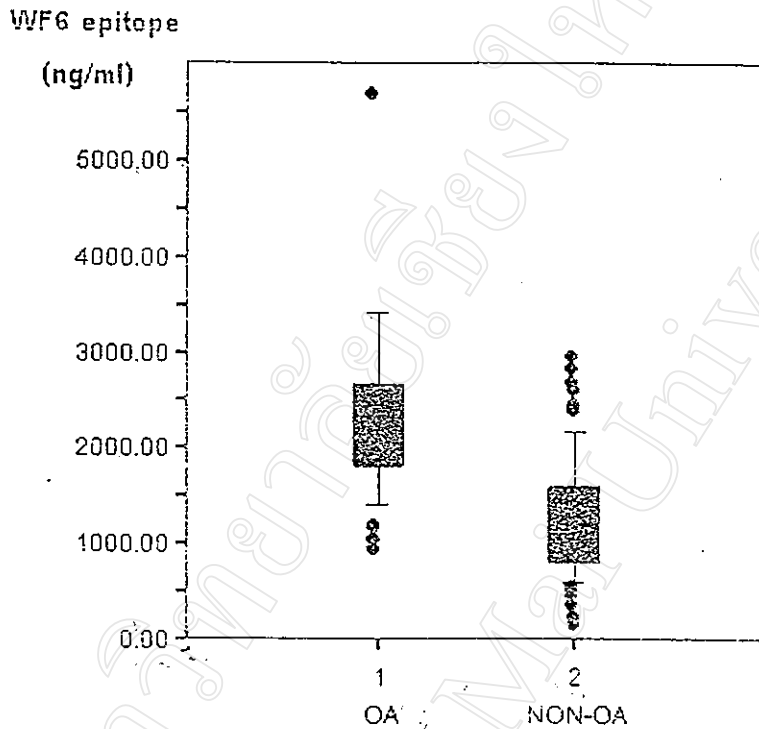


Figure 1 Comparison of serum WF6-epitope concentration between osteoarthritic horse (OA) and non-osteoarthritic horse (NON-OA). Lines in the boxes show median value. Between the upper edge and the lower edge of the boxes show value at percentile 25-75. And between the line outside the boxes show value at percentile 10-90. Spots show outlier values that were excluded in median calculation. There was significance between 2 groups ( $p=0.00005$ ).

## วิจารณ์และสรุปผล

การศึกษานี้พบว่าม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อมจะมีระดับ WF6 epitope ในซีรัม มากกว่าม้าที่ไม่เป็นโรคข้อเสื่อมอย่างมีนัยสำคัญ โดยไม่มีความแตกต่างของช่วงอายุในม้าทั้งสองกลุ่ม ค่าที่ได้จึงไม่มีปัจจัยกวนจากอายุของม้า และสอดคล้องกับรายงานของพีระพรรณ (2543) ซึ่งทำการศึกษาวิจัยในผู้ป่วยที่เป็นโรคข้อเสื่อมและโรคข้อ

อีกเสบรุมมาตอยด์ พบว่าผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มมีความเข้มข้นของ WF6 epitope สูงกว่าในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ (Poitacharoen, 2000) เช่นเดียวกับที่พบในม้าจากการศึกษาครั้งนี้

การศึกษานาคอนดรอยตินซัลเฟตอิพิโทปที่สัมพันธ์กับโรคข้อของม้าที่ผ่านมามีอยู่หลายรายงาน เช่นการศึกษาคอนดรอยตินซัลเฟตอิพิโทป (3-B-3 epitope) จากกระดูกอ่อนนิ้วข้อของ (hird carpal bone) ในม้าที่ถูกเหนี่ยว นำให้เกิดข้ออักเสบ (Todhunter, et al.,1996) และจากกระดูกอ่อนที่แตกออกมาในม้าที่เป็น distal tibial osteochondrosis (Lillich and Weisbrode,1997) พบว่ามีปริมาณของอิพิโทปตัวนี้สูงกว่าในกระดูกอ่อนที่ได้จากม้าที่มีข้อปกติ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ตรวจหาคอนดรอยตินซัลเฟตอิพิโทป (846 epitope) ในน้ำไขข้อ และในซีรัมของม้าที่เป็น osteochondral fragmentation ซึ่งก็พบว่ามีปริมาณของสารนี้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในม้าที่เป็นโรคดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบกับม้าปกติ และความเข้มข้นของอิพิโทปนี้ในน้ำไขข้อยังสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคด้วย (Frisbie, et al.,1999)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าคอนดรอยตินซัลเฟตอิพิโทปสามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรคข้อของม้าได้เป็นอย่างดี และอาจมีประโยชน์สำหรับการติดตามการรักษาในม้าที่เป็นโรคข้อ หรือในงานวิจัยเกี่ยวกับยาที่ใช้รักษาโรคข้อในม้าก็ได้ และจากผลการศึกษาที่ได้ในครั้งนี้จะพบว่า WF6 epitope อาจจะเป็น marker ที่มีประสิทธิภาพอีกตัวหนึ่งที่ใช้วินิจฉัยโรคข้อเสื่อมในม้า แต่อย่างไรก็ตามยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมอีกมากเพื่อให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในทางปฏิบัติจริง

#### เอกสารอ้างอิง

- Belcher,C., R. Yaqub, F. Fawthrop, M. Bayliss and M. Doherty,1997. Synovial fluid chondroitin and keratan sulfate epitopes, glycosaminoglycans, and hyaluronan in arthritic and normal knees.56:299-307
- Frisbie,D.D., C. S. Ray, M. Ionescu, A. R. Poole, P. L. Chapman and C. W. McIlwraith,1999. Measurement of synovial fluid and serum concentration of the 846 epitope of chondroitin sulfate and of carboxy propeptides of type II procollagen for diagnosis of osteochondral fragmentation in horses.60:306-309
- Hazell,P.K., C. Dent, J. A. Fairclough, M. T. Bayliss, and T. E. Hardingham,1995. Changes in glycosaminoglycan epitope levels in knee joint fluid following injury.38:1-7
- Lillich,J.D. and S. E. Weisbrode,1997. Biochemical, histochemical, and immunohistochemical characterization of distal tibial osteochondrosis in horses.58:89-98
- McIlwraith,C.W.1982. Current concepts in equine degenerative joint disease.180:239-250



Middleton, J., S. White, E. Parry, C. Jackson, J. Dixey, and B. Ashton, 1999. Changes in serum chondroitin sulfate epitopes 3-B-3 and 7-D-4 in early rheumatoid arthritis. 38:837-840

Pothacharoen, P. 2000. The quantitative analysis of chondroitin sulfate epitopes and hyaluronan as diagnostic markers for degenerative joint diseases by ELISA technique. M.S. Thesis. Chiang Mai University. 86 p

Todhunter, P.G., J.R. Kammermann, and J.M. Wright, 1996. Immunohistochemical analysis of an equine model of synovitis-induced arthritis. 57:1080-1093

Widmer, W.R. and W. E. Blevins, 1994. Radiographic evaluation of degenerative joint disease in horse: interpretive principle. 16:907-918

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
Chiang Mai University



# สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยฯ ในพระบรมราชูปถัมภ์

69/26 ซอยปทุมวันริสอร์ท ถนนพญาไท กรุงเทพฯ 73 โทร : 252-8773, 255-1309 แฟกซ์ : 252-8773

The Thai Veterinary Medical Association Under Royal Patronage

69/26 Soi Patumwan Resort, Phayatai Road, Bangkok 10400 Tel : 252-8773, 255-1309 Fax : 252-8773

สพสท (พิเศษ) / ๒๕๔๕

๒๖ เมษายน ๒๕๔๕

เรื่อง แจ้งผลการพิจารณาดันฉบับ

เรียน สพ.ญ. ศิริพร เพียรสุขมณี

สิ่งที่มาด้วย ดันฉบับที่แก้ไขครั้งที่ ๑ เรื่อง "การศึกษาคอนตรอยดินซัลเฟตโปรติโอกลัยแคนในซีรัมของม้าปกติและม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อม"

ตามที่ท่านได้ให้ความสนใจส่งดันฉบับที่แก้ไขครั้งที่ ๑ เรื่อง "การศึกษาคอนตรอยดินซัลเฟตโปรติโอกลัยแคนในซีรัมของม้าปกติและม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อม" ให้พิจารณาอีกครั้งเพื่อพิมพ์เผยแพร่ในวารสารสัตวแพทยสารนั้น บัดนี้ผู้ทรงคุณวุฒิของสัตวแพทยสารได้พิจารณาดันฉบับดังกล่าวแล้ว มีความเห็นว่า "สามารถพิมพ์เผยแพร่ได้ แต่ต้องแก้ไขมาก" โดยมีข้อแนะนำดังนี้

เรียบเรียงเรื่องใหม่ทั้งหมด โดยลำดับเหตุและผลให้ชัดเจน และใช้ภาษาเขียนที่สละสลวยสามารถเข้าใจได้ง่าย

- ๑) แก้ไขรูปแบบดันฉบับให้เป็นรูปแบบของสัตวแพทยสาร เช่น
  - เอกสารอ้างอิงในเรื่อง
  - ระบุผู้เขียนผู้รับผิดชอบ
- ๒) อื่นๆ ตามที่ได้เขียนไว้ในดันฉบับแล้ว

จึงเรียนมาเพื่อพิจารณาแก้ไข หากท่านมีข้อคิดเห็นที่แตกต่างกรุณาเขียนชี้แจง เมื่อแก้ไขดันฉบับเรียบร้อยแล้ว กรุณาส่งดันฉบับเป็น paper copy จำนวน ๓ ชุด พร้อมดันฉบับเดิมที่ดูอ่านแล้ว ให้สาราณียกรฯ พิจารณาอีกครั้งหนึ่ง

ขอแสดงความนับถือ

(สพ.ญ. ดร. ดรุนี ทันตสุวรรณ)

สาราณียกร ฯ

การศึกษาคอนดรอยตินซัลเฟตโปรตีโอไกลัยแคนในซีรัมของม้าปกติและม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อม

ศิริพร เพียรสุขมณี<sup>1</sup> ชำนาญ ตรีนรงค์<sup>2</sup> ปรัชญา คงทวีเลิศ<sup>3</sup> และ ศิริวรรณ อองค์ไชย<sup>3</sup>  
siriporn peansukmanee<sup>1</sup> Chumnun Trinarong<sup>2</sup> Prachya Kongtawelert<sup>3</sup> Siriwan Ong-chai<sup>3</sup>

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200 โทร 01-5954764

<sup>2</sup>คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50100 โทร 053-948003 โทรสาร 053-274710

<sup>3</sup>ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200 โทร 053-945322 โทรสาร 053-894031

#### บทคัดย่อ

โรคข้อเสื่อมในม้าคือโรคที่เกิดจากการเสื่อมของกระดูกอ่อนผิวข้อ คอนดรอยตินซัลเฟตโปรตีโอไกลัยแคนซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลที่สำคัญและพบได้มากที่สุดในกระดูกอ่อนจะสลายออกมามากกว่าปกติเมื่อกระดูกอ่อนผิวข้อถูกทำลาย คอนดรอยตินซัลเฟตโปรตีโอไกลัยแคนที่ถูกปล่อยออกมาจะเข้าสู่ซีรัมและสามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยา โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสายคอนดรอยตินซัลเฟต (mAb WF6 และ mAb 3B3) วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือการเปรียบเทียบคอนดรอยตินซัลเฟตโปรตีโอไกลัยแคน (WF6 epitope และ 3B3 epitope) ในซีรัมของม้าในช่วงอายุต่างๆกัน นอกจากนั้นยังมีการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อมและม้าที่ไม่มีอาการของโรคนี้ การตรวจหาคอนดรอยตินซัลเฟตใช้วิธี competitive ELISA พบว่าม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อมมีค่าความเข้มข้นของ WF6 epitope ซึ่งอยู่บนสายคอนดรอยตินซัลเฟตที่เป็น native form มากกว่าในม้าปกติอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.0001$ ) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของอิพิโทปชนิดนี้เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละช่วงอายุของม้า ส่วน 3B3 epitope ซึ่งพบมากบนสายคอนดรอยตินซัลเฟตที่สังเคราะห์ใหม่ พบว่าม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อมจะมีปริมาณของอิพิโทปตัวนี้ต่ำกว่าม้าปกติอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.001$ ) แต่กลับพบมีปริมาณมากในลูกม้าช่วงอายุแรกเกิดถึงสองปี ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงคอนดรอยตินซัลเฟตในซีรัมมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเสื่อม ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ที่จะใช้การตรวจวัดคอนดรอยตินซัลเฟตอิพิโทปทั้งสองชนิดเพื่อประกอบการวินิจฉัยและรักษาโรคข้อเสื่อมในม้าโดย WF6 epitope อาจเป็น marker ที่ดีสำหรับการบ่งชี้ถึงการทำลายกระดูกอ่อนผิวข้อ ในขณะที่ 3B3 epitope อาจเป็น marker สำหรับใช้ติดตามผลการรักษาโรคข้อเสื่อมในม้าได้

คำสำคัญ : โรคข้อเสื่อม ม้า คอนดรอยตินซัลเฟตอิพิโทป อายุ

#### คำนำ

โรคข้อเสื่อมในม้าเกิดจากการทำลายและสลายตัวของกระดูกอ่อนผิวข้อ เป็นสาเหตุให้ม้าไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ และก่อให้เกิดความสูญเสียทั้งต่อตัวม้าเองและต่อเจ้าของม้าเป็นอย่างมาก การตรวจวินิจฉัยโรคข้อในปัจจุบันโดยทั่วไปจะอาศัยการตรวจทางกายภาพและการถ่ายภาพรังสีซึ่งจะสามารถบ่งชี้ถึงความผิดปกติในข้อได้ก็ต่อเมื่อโรคดำเนินไปมากจนบางครั้งยากที่จะทำการรักษา (Widmer and Blevins, 1994) จึงเกิดความพยายามในกลุ่มนักวิจัยที่จะหาสารชีวโมเลกุลที่สามารถบ่งบอกถึงพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นภายในข้อของม้า เพื่อนำมาใช้ร่วมกับวิธีการตรวจทางกายภาพและการถ่ายภาพรังสีซึ่งจะทำให้สามารถวินิจฉัยโรคได้เร็วและแม่นยำมากขึ้น

คอนดรอยตินซัลเฟตโปรตีโอไกลัยแคน (chondroitin sulfate proteoglycan) เป็นสารชีวโมเลกุลที่สำคัญที่ถูกสร้างโดยเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) และมีอยู่มากที่สุดในแมทริกซ์ของกระดูกอ่อน และเมื่อเกิดโรคข้อเสื่อม

คอนดรอยตินซัลเฟตโปรตีโอไกลัยแคนจะถูกทำลายหลุดออกจากเนื้อกระดูกอ่อนมากกว่าปกติซึ่งสามารถตรวจพบการเปลี่ยนแปลงได้ทั้งที่เนื้อกระดูกอ่อนเอง (Lillich and Weisbrode, 1997 และ Todhunter *et al.*, 1996) ในน้ำไขข้อ (Belcher *et al.*, 1997 และ Hazell *et al.*, 1995) และในซีรัม (Middleton *et al.*, 1999)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาคอนดรอยตินซัลเฟตโปรตีโอไกลัยแคนในซีรัมของม้าปกติเปรียบเทียบกับในแต่ละช่วงอายุและม้าที่มีอาการของโรคข้อเสื่อมเปรียบเทียบกับม้าที่ไม่มีอาการของโรคข้อเสื่อมโดยใช้ โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody:mAb) ที่มีความจำเพาะต่อสายคอนดรอยตินซัลเฟตสองชนิดคือ mAb WF6 ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ mAb 3B3 ซึ่งมีผลผลิตออกมาในเชิงพาณิชย์

### อุปกรณ์และวิธีการ

#### สัตว์ทดลอง

ได้ทำการเก็บตัวอย่างซีรัมจากกลุ่มม้าปกติจำนวนทั้งหมด 149 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นกลุ่มช่วงอายุแรกเกิด-2 ปี 25 ตัวอย่าง, 2-4 ปี 25 ตัวอย่าง, 5-8 ปี 29 ตัวอย่าง, 9-14 ปี 33 ตัวอย่าง และ 15-25 ปี 37 ตัวอย่าง โดยม้าทั้งหมดได้ผ่านการตรวจทางกายภาพแล้วว่าไม่มีอาการของโรคข้อ ส่วนตัวอย่างจากกลุ่มม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อมเก็บจากม้าช่วงอายุ 2-8 ปีที่วินิจฉัยแล้วว่า เป็นโรคข้อเสื่อมโดยใช้การตรวจทางกายภาพและการถ่ายภาพรังสี (Widmer & Blevins, 1994) จำนวน 23 ตัวอย่าง ตัวอย่างซีรัมทั้งหมดถูกเก็บรักษาที่  $-20^{\circ}\text{C}$  ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ วิธีการตรวจวัดคอนดรอยตินซัลเฟตอิพิโทปในซีรัม

ให้หลักการ competitive ELISA ตรวจหา WF6 epitope และ 3B3 epitope จากตัวอย่างซีรัม ตามวิธีของ พีระพรณ โปธาเจริญ (Pothacharoen, 2000) โดยในการวิเคราะห์ WF6 epitope จะใช้โปรตีโอไกลัยแคนที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนของปลาฉลามเป็น coating antigen และ competitor, mAb WF6 เป็น primary antibody และ Anti IgM เป็น secondary antibody ส่วนการวิเคราะห์ 3B3 epitope จะใช้ chondroitinase ABC ย่อยคอนดรอยตินซัลเฟตในซีรัมก่อนทำการวิเคราะห์ ใช้ proteoglycan core protein ที่สกัดจากกระดูกอ่อนของหมูเป็น coating antigen และ competitor ให้ mAb 3B3 เป็น primary antibody และ Anti IgM เป็น secondary antibody

ความเข้มข้นของ chondroitin sulfate epitope ที่ตรวจได้ จะนำมาหาค่าทางสถิติ และทดสอบสมมติฐานโดยใช้ Analysis of variance (ANOVA) ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบในแต่ละกลุ่มช่วงอายุ และใช้ student-t-test ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบกลุ่มม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อมกับม้าที่ไม่เป็นโรคข้อเสื่อมที่มีอายุ 2-8 ปีทั้งสองกลุ่ม โดยใช้โปรแกรม SPSS version 10.0

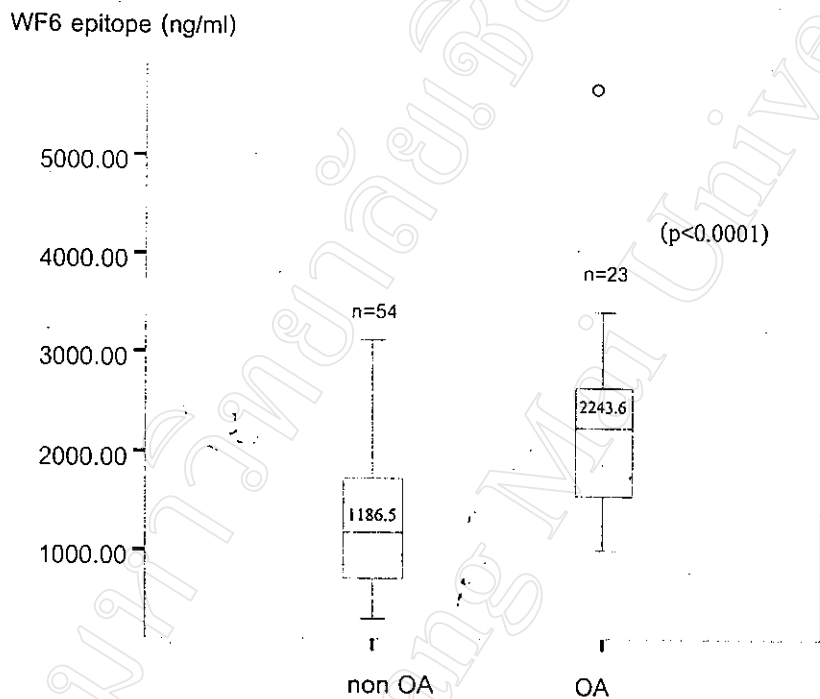
#### ผลการทดลอง

ค่าความเข้มข้นของ WF6 epitope ในซีรัมของม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อม เปรียบเทียบกับม้าปกติในกลุ่มอายุเดียวกัน คือ 2-8 ปี พบว่าความเข้มข้นของ WF6 epitope ในกลุ่มม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อมสูงกว่าม้าที่ไม่เป็นโรคข้อเสื่อมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.0001$ ) ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของช่วงอายุในม้าทั้งสองกลุ่ม ซึ่งต่างจากความเข้มข้นของ 3B3 epitope ที่พบว่ากลุ่มม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อมมีปริมาณของอิพิโทปตัวนี้ต่ำกว่าในม้าปกติอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.001$ ) ดังแสดงในรูปที่ 2

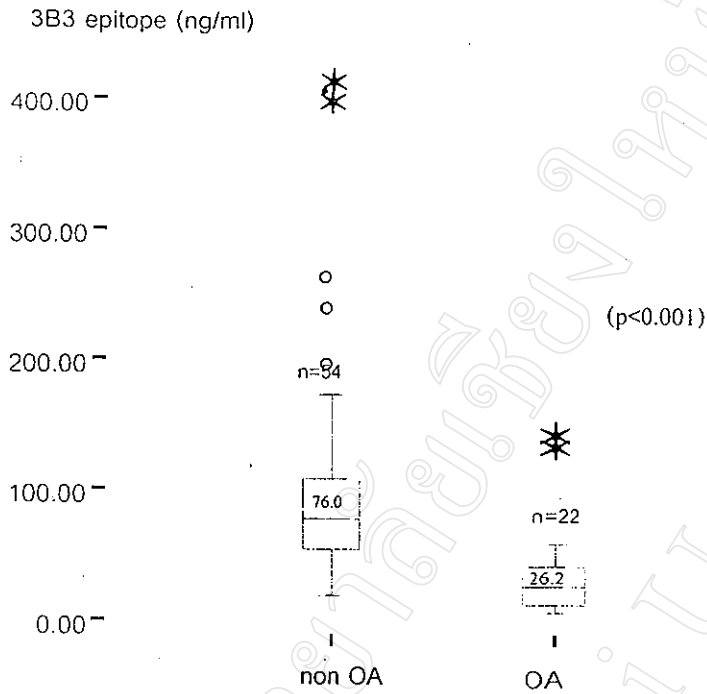
เมื่อดูการเปลี่ยนแปลงของคอนดรอยตินซัลเฟตในซีรัมของม้าปกติที่ช่วงอายุต่างๆ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับความเข้มข้นของ WF6 epitope ( $p = 0.433$ ) ของม้าตั้งแต่แรกเกิดจนถึงอายุมากกว่า 15 ปี ดังแสดงในรูปที่ 3 แต่พบว่าความเข้มข้นของ 3B3 epitope มีค่าสูงมากอย่างเด่นชัดในกลุ่มลูกม้าอายุแรกเกิดถึงสองปี ซึ่งแตกต่างจากม้าในช่วงอายุอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.0001$ ) ดังแสดงในรูปที่ 4 และเมื่อดูความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของ

3B3 epitope และ WF6 epitope ในซีรัมของม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อมก็พบว่ามีความสัมพันธ์กันน้อยมาก (ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ = 0.013)

รูปที่ 1 ความเข้มข้นของ WF6 chondroitin sulfate epitope ในซีรัมของม้าปกติ (non OA) เปรียบเทียบกับม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อม (OA) เส้นกลางกรอบสี่เหลี่ยมแสดงค่ามัธยฐาน เส้นขอบล่างและขอบบนของกรอบสี่เหลี่ยมแสดงค่าที่เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25 และ 75 ตามลำดับ เส้นขีดแนวนอนข้างล่างและข้างบนนอกกรอบสี่เหลี่ยมแสดงค่าต่ำสุดและสูงสุดที่ยังไม่ผิดปกติดังตามลำดับ วงกลมแสดงค่าที่สูงหรือต่ำผิดปกติ ดอกจันแสดงค่าที่สูงหรือต่ำผิดปกติมาก n = จำนวนตัวอย่าง

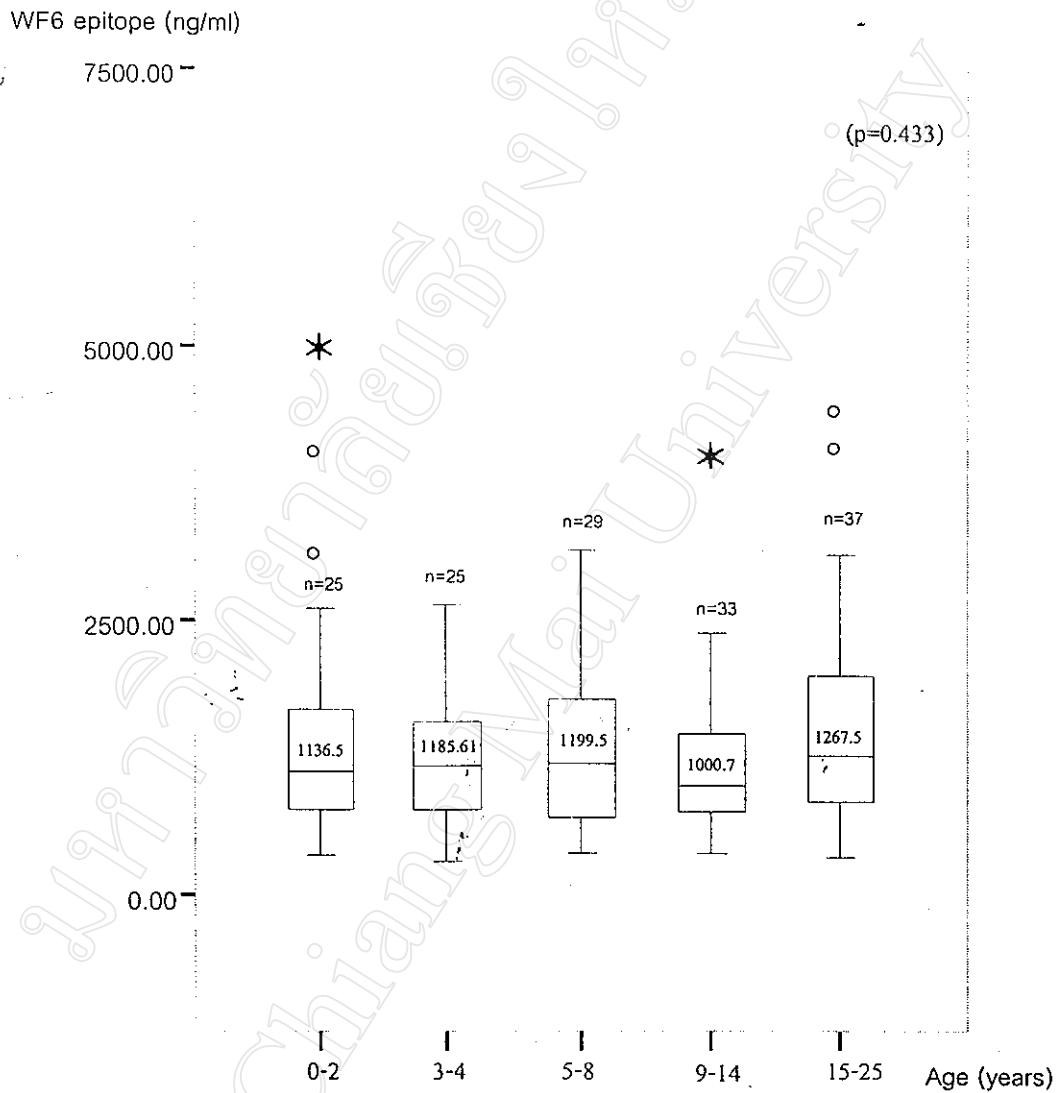


รูปที่ 2 ความเข้มข้นของ 3B3 chondroitin sulfate epitope ในซีรัมของม้าปกติ (non OA) เปรียบเทียบกับม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อม (OA) เส้นกลางกรอบสี่เหลี่ยมแสดงค่ามัธยฐาน เส้นขอบล่างและขอบบนของกรอบสี่เหลี่ยมแสดงค่าที่เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25 และ 75 ตามลำดับ เส้นขีดแนวนอนข้างล่างและข้างบนนอกกรอบสี่เหลี่ยมแสดงค่าต่ำสุดและสูงสุดที่ยังไม่ผิดปกติตามลำดับ วงกลมแสดงค่าที่สูงหรือต่ำผิดปกติ ดอกจันแสดงค่าที่สูงหรือต่ำผิดปกติมาก n= จำนวนตัวอย่าง

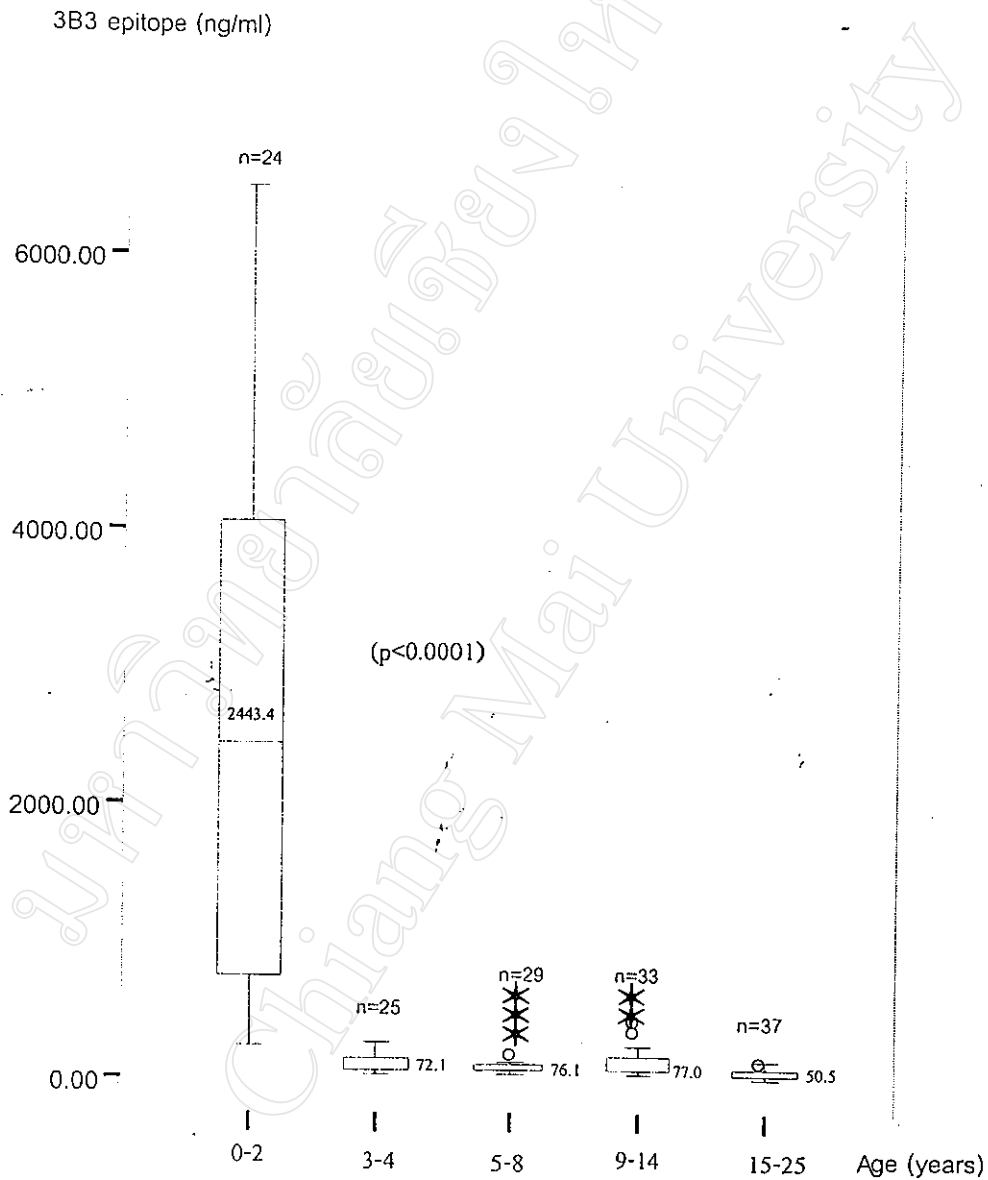




รูปที่ 3 ความเข้มข้นของ WF6 chondroitin sulfate epitope ในซีรัมของม้าปกติเปรียบเทียบกันในแต่ละกลุ่มช่วงอายุ เส้นกลางกรอบสี่เหลี่ยมแสดงค่ามัธยฐาน เส้นขอบล่างและขอบบนของกรอบสี่เหลี่ยมแสดงค่าที่เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25 และ 75 ตามลำดับ เส้นขีดแนวนอนข้างล่างและข้างบนนอกกรอบสี่เหลี่ยมแสดงค่าต่ำสุดและสูงสุดที่ยังไม่มีผิดปกติตามลำดับ วงกลมแสดงค่าที่สูงหรือต่ำผิดปกติ ดอกจันแสดงค่าที่สูงหรือต่ำผิดปกติมาก  $n$  = จำนวนตัวอย่าง



รูปที่ 4 ความเข้มข้นของ 3B3 chondroitin sulfate epitope ในซีรัมของม้าปกติเปรียบเทียบกันในแต่ละกลุ่มช่วงอายุ เส้นกลางกรอบสี่เหลี่ยมแสดงค่ามัธยฐาน เส้นขอบล่างและขอบบนของกรอบสี่เหลี่ยมแสดงค่าที่เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25 และ 75 ตามลำดับ เส้นขีดแนวนอนข้างล่างและข้างบนนอกกรอบสี่เหลี่ยมแสดงค่าต่ำสุดและสูงสุดที่ยังไม่มีผิดปกติตามลำดับ วงกลมแสดงค่าที่สูงหรือต่ำผิดปกติ ดอกจันแสดงค่าที่สูงหรือต่ำผิดปกติมาก n = จำนวนตัวอย่าง



### วิจารณ์และสรุปผล

คอนดรอยตินซัลเฟตโปรตีโอไกลัยแคนที่พบเป็นองค์ประกอบสำคัญของเนื้อกระดูกอ่อนผิวข้อ ถูกสร้างขึ้นโดยเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) ซึ่งตามปกติกระดูกอ่อนผิวข้อจะมีขบวนการสร้างและสลายสารเหล่านี้อย่างสมดุล แต่เมื่อเกิดพยาธิสภาพใดๆก็ตามที่ทำให้กระดูกอ่อนถูกทำลาย จะมีการสลายคอนดรอยตินซัลเฟตโปรตีโอไกลัยแคนนี้ออกมาอยู่ในน้ำไขข้อมากขึ้นและเข้าไปสู่วีรุ่มได้มากขึ้นเช่นเดียวกัน จึงเป็นไปได้ว่าการสลายคอนดรอยตินซัลเฟตโปรตีโอไกลัยแคนออกมาในวีรุ่มนั้นน่าจะมีความสัมพันธ์กับโรคข้อเสื่อมซึ่งเป็นภาวะของการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนผิวข้ออย่างหนึ่ง การตรวจวัดระดับคอนดรอยตินซัลเฟตโปรตีโอไกลัยแคนจึงน่าจะสามารถบอกระดับเมตาบอลิซึมหรือพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นภายในกระดูกอ่อนผิวข้อได้

มีรายงานที่กล่าวถึงการตรวจวัดคอนดรอยตินซัลเฟตโปรตีโอไกลัยแคนโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีหลายชนิด แต่ที่ได้รับความนิยมมากที่สุดและมีการผลิตออกในเชิงพาณิชย์ด้วยคือ mAb 3B3 ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีตัวนี้จะจำเพาะต่อสายคอนดรอยตินซัลเฟตที่สร้างใหม่โดยเซลล์กระดูกอ่อน (Carterson, 1990) และมีรายงานว่าอิพิโทปตัวนี้มีปริมาณสูงขึ้นเมื่อตรวจวัดในเนื้อกระดูกอ่อนผิวข้อของ third carpal bone ในม้าที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดข้ออักเสบ (Todhunter *et al.*, 1996) และจากเนื้อกระดูกอ่อนที่แตกออกมาในม้าที่เป็น distal tibial osteochondrosis (Lillich & Weisbrode, 1997) อย่างไรก็ตาม จากรายงานของ Hardingham และคณะ (1995) พบว่าอิพิโทปตัวนี้จะมีความเข้มข้นในระยะเริ่มแรกของภาวะข้อเสื่อม ทั้งนี้เนื่องจากกระดูกอ่อนได้มีการปรับสร้างซ่อมแซมตัวเองโดยผลิตสายคอนดรอยตินซัลเฟตเพิ่มมากขึ้นเพื่อชดเชยในส่วนที่ถูกทำลายไป แต่หากการทำลายมีมาก หรือเป็นลักษณะของโรคเรื้อรัง เซลล์กระดูกอ่อนเองก็ถูกทำลายไม่สามารถผลิตสายคอนดรอยตินซัลเฟตใหม่ออกมาได้อีก จะพบว่าปริมาณของ 3B3 epitope ลดต่ำลง ซึ่งผลการทดลองในครั้งนี้ก็พบว่าปริมาณของ 3B3 epitope ของม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อมต่ำกว่าม้าปกติอย่างมีนัยสำคัญ อาจเป็นเพราะกลุ่มตัวอย่างของม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อมที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้ตัดสินจากภาพรังสี ซึ่งจะมองเห็นพยาธิสภาพของกระดูกอ่อนผิวข้อก็เมื่อเกิดความเสียหายไปมากแล้วจนทำให้อัตราการสร้างสายคอนดรอยตินซัลเฟตโปรตีโอไกลัยแคนมีน้อยกว่าการสลาย ระดับ 3B3 epitope จึงลดต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับม้าปกติ นอกจากนั้นการพบปริมาณ 3B3 epitope สูงมากในม้าแรกเกิดจนถึงสองปีซึ่งเป็นวัยที่กระดูกอ่อนกำลังมีการเจริญเติบโตเป็นการยืนยันอีกครั้งว่า 3B3 epitope น่าจะเป็น marker ที่ดีของภาวะ anabolism ของกระดูกอ่อน

ส่วน mAb WF6 เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากห้องปฏิบัติการวิจัยโรคกระดูกและข้อ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พบว่ามีความจำเพาะต่อสายคอนดรอยตินซัลเฟตที่พบได้ทั่วไปในกระดูกอ่อนผิวข้อ ซึ่งพีระพรรณได้ทำการศึกษาไว้ในคนและรายงานไว้ว่า WF6 epitope จะเพิ่มสูงขึ้นในวีรุ่มของคนที่เป็นโรคข้อเสื่อมอย่างมีนัยสำคัญ (Pothacharoen, 2000) สอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ซึ่งพบว่าม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อมก็จะพบปริมาณอิพิโทปชนิดนี้ในวีรุ่มสูงกว่าม้าปกติอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน โดยไม่พบปัจจัยกวนจากอายุของม้าเลย แสดงให้เห็นว่าปริมาณของอิพิโทปชนิดนี้ในวีรุ่มมีความสัมพันธ์กับการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อน (catabolic marker) ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญที่พบในโรคข้อเสื่อมด้วย

แม้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองชนิด จะมีความจำเพาะต่อสายคอนดรอยตินซัลเฟตเหมือนกัน แต่อิพิโทปของมันก็มีความแตกต่างกัน โดย mAb 3B3 จะจำเพาะต่อสายคอนดรอยตินซัลเฟตที่สร้างใหม่ (neo-epitope) จึงบ่งบอกถึงสภาวะที่กระดูกอ่อนมีกระบวนการสร้างหรือซ่อมแซมตัวเองได้ดี ในขณะที่ mAb WF6 จะจำเพาะต่อสายคอนดรอยตินซัลเฟตที่พบอยู่ทั่วไปในกระดูกอ่อน (native epitope) ซึ่งถูกสลายได้โดยเอนไซม์ chondroitinase ABC และหากมีการสลายคอนดรอยตินซัลเฟตโปรตีโอไกลัยแคนนี้ออกมาจากกระดูกอ่อนผิวข้อมากก็จะพบปริมาณของอิพิโทปตัวนี้มากขึ้นใน biological fluids เช่นในน้ำไขข้อหรือในวีรุ่มได้

การทดลองนี้ใช้การตรวจวัดปริมาณอิพิโทปทั้งสองชนิดในซีรัม ซึ่งสามารถเก็บตัวอย่างจากม้าได้ง่ายและปลอดภัยกว่าการเจาะน้ำไขข้อหรือตรวจวัดจากชิ้นส่วนเนื้อกระดูกอ่อนโดยตรง และยังไม่เคยมีผู้ทำการศึกษาเรื่องนี้ในม้าในประเทศไทยมาก่อน จึงมีแนวโน้มที่จะสามารถพัฒนาวิธีการนี้ในการตรวจวินิจฉัยหรือติดตามการรักษาโรคข้อซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของม้าในประเทศไทยได้ในอนาคต โดย WF6 epitope น่าจะเป็น marker ที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคข้อเสื่อม เนื่องจากสามารถบ่งบอกถึงการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อได้ดี ส่วน 3B3 epitope อาจนำไปใช้ในการติดตามการรักษา หรืองานทดลองที่เกี่ยวกับยาหรือวิธีการรักษาโรคข้อ เพื่อดูถึงการตอบสนองต่อการรักษาของกระดูกอ่อนผิวข้อในม้าได้

#### เอกสารอ้างอิง

- Belcher, C., Yaqub, R., Fawthrop, F., Bayliss, M. and Doherty, M. 1997. Synovial fluid chondroitin and keratan sulfate epitopes, glycosaminoglycans, and hyaluronan in arthritic and normal knees. *Ann Rheum dis*, 56, 299-307.
- Hardingham, T.E. 1995. Changes in chondroitin sulphate structure induced by joint disease. *Acta. Scand.*, 226 (suppl), 107-10.
- Hazell, P.K., Dent, C., Fairclough, J.A., Bayliss, M.T. and Hardingham, T.E. 1995. Changes in glycosaminoglycan epitope levels in knee joint fluid following injury. *Arth. Rheum.*, 38, 1-7.
- Lillich, J.D. and Weisbrode, S.E. 1997. Biochemical, histochemical, and immunohistochemical characterization of distal tibial osteochondrosis in horses. *Am J Vet Res*, 58, 89-98.
- Middleton, J., White, S., Parry, E., Jackson, C., Dixey, J. and Ashton, B. 1999. Changes in serum chondritin sulfate epitopes 3-B-3 and 7-D-4 in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 38, 837-40.
- Pothacharoen, P. 2000. The quantitative analysis of chondroitin sulfate epitopes and hyaluronan as diagnostic markers for degenerative joint diseases by ELISA technique. In Graduate school pp. 86. Chiang Mai University: Chiangmai.
- Todhunter, P.G., Kammermann, J.R. and Wright, J.M. 1996. Immunohistochemical analysis of an equine model of synovitis-induced arthritis. *Am J Vet Res*, 57, 1080-1093.
- Widmer, W.R. and Blevins, W.E. 1994. Radiographic evaluation of degenerative joint disease in horse: interpretive principle. *The compendium*, 16, 907-918.

## Chondroitin sulfate epitopes in sera of normal and osteoarthritic horses

Siriporn Peansukmanee<sup>1</sup>, Chumnarn Trinarong<sup>2</sup>, Prachya Kongtawetert<sup>3</sup>, Siriwan Ong-chai<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Graduate School Chiang Mai University, Chiangmai 50200 Tel. 01-5954764

<sup>2</sup> Faculty of Veterinary Medicine Chiang Mai University, Chiangmai 50100 Tel. 053-948003 Fax 053-274710

<sup>3</sup> Department of Biochemistry Faculty of Medicine Chiang Mai University, Chiangmai 50200 Tel. 053-945322  
Fax 053-894031

## ABSTRACT.

Equine osteoarthritis, also called degenerative joint disease, may be defined as a disease of diarthrodial joint comprising destruction of articular cartilage. Chondroitin sulfate proteoglycan, a major biomolecular substance in cartilage matrix, is released when deterioration of articular cartilage occurred. Immunoassay using specific monoclonal antibodies, mAb WF6 and 3B3 can detect the released chondroitin sulfate in serum. Objective of this study is to compare serum chondroitin sulfate proteoglycan (WF6 and 3B3 epitopes) among each age group of horses and between osteoarthritic horses and non-osteoarthritic horses. These epitopes were measured by competitive ELISA. The result showed the significantly higher ( $p < 0.0001$ ) of WF6 epitope that was native epitope in osteoarthritic horses than in non-osteoarthritic horses while there was no different significance of this epitope among each age group of horses. Contrary to 3B3 epitope that was neo-epitope, there was significantly lower ( $p < 0.001$ ) 3B3 epitope level in osteoarthritic horses but higher in new borned to two-year-old foals when compare with other age groups. This suggested that WF6 epitope can be use as cartilage destruction marker in diagnosis osteoarthritis and 3B3 epitope as cartilage anabolism marker in following up osteoarthritic treatment.

Keywords: osteoarthritis, horse, chondroitin sulfate epitope, age

## VITA

Name	Miss Siriporn Peansukmanee
Birth Date	13 July 1976
Academic history	1994, certificate of Mathayom VI from St. Joseph Bangna school, Samut Prakan, Thailand 2000, Doctor of Veterinary Medicine (first class honor) from Kasetsart University, Bangkok, Thailand
Scholarship	Scholarship from Ministry of University Affair (2000-2002)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Chiang Mai University