บทที่ 3
ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

สัตว์ทดลอง

สุนัขพันธุ์ผสม ไม่จำกัดเพศ อายุ 3- 5 ปี น้ำหนัก 12-16 กิโลกรัม จากกองควบคุมโรคระบาด กรุงเทพมหานคร มีสุขภาพสมบูรณ์ ไม่มีอาการเจ็บขา และไม่มีอาการของโรคข้อต่างๆ จำนวน 12 ตัว นำมาเลี้ยงที่ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นเวลา 3 สัปดาห์ก่อนเริ่มทำการทดลอง ทำการตรวจสุขภาพ ตรวจเลือดรวมทั้งฉีดวัคซีนป้องกันโรคต่างๆ อาหารที่สุนัขได้รับคือ อาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดและจัดน้ำสะอาดให้อย่างเพียงพอตามความต้องการของสุนัขทดลอง

วิธีการดำเนินการทดลอง

นำสุนัขมาเลี้ยงเพื่อเป็นการปรับสภาพให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่และเป็นการลดความเครียดเป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้นสุ่มแบ่งสุนัขออกเป็น 2 กลุ่มโดยแบ่งเป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่เกิดภาวะข้อเข่าเสื่อมจำนวน 4 ตัว และกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะข้อเข่าเสื่อมจำนวน 8 ตัว เจาะเก็บตัวอย่างน้ำไขข้อของสุนัขทุกตัว เพื่อใช้เป็นข้อมูลค่าปกติของ sulfated glycosaminoglycans และประเมินอาการเจ็บขาที่แสดงออกทางคลินิกโดยใช้ผู้ทำการประเมินที่ไม่ทราบกลุ่มของสัตว์ทดลองว่าเป็นกลุ่มใด จำนวน 1 คนตามตารางที่ 1

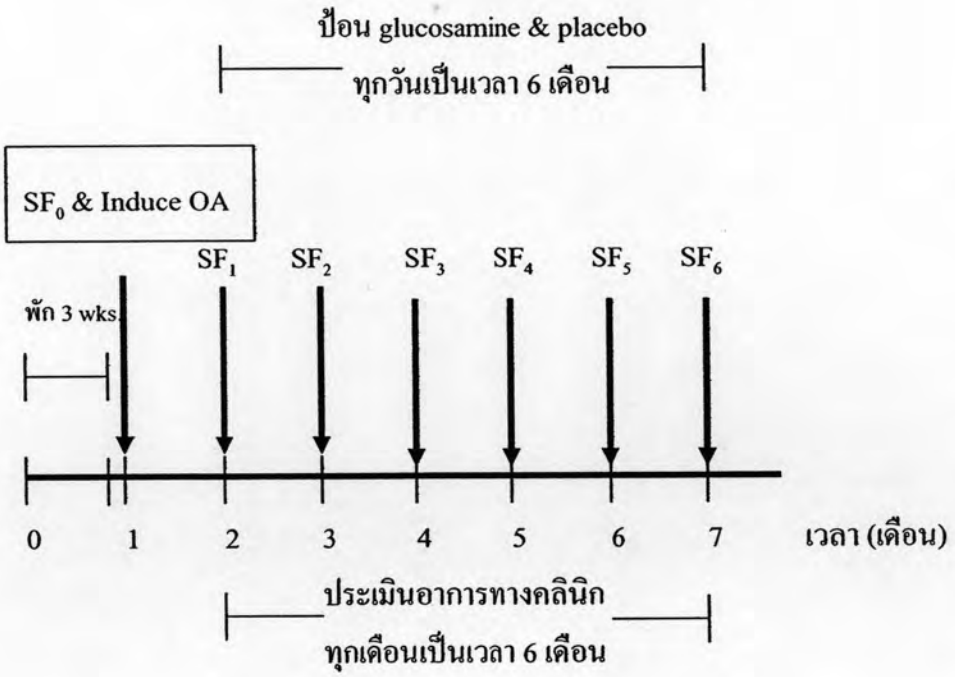
ตารางที่ 1 การประเมินอาการเจ็บขา

เกรด	อาการ
0	สุนัขปกติ ไม่มีอาการเจ็บปวดบริเวณข้อและกระดูก
1	สุนัขแสดงอาการเจ็บขาเพียงเล็กน้อย และใช้ขารับน้ำหนัก แต่จะแสดงอาการเจ็บปวดบริเวณข้อเมื่อคลำตรวจ
2	สุนัขแสดงอาการเจ็บขา แต่สามารถลงน้ำหนักได้บ้างมากกว่า 50 % บางครั้งไม่ใช้ขารับน้ำหนัก
3	สุนัขแสดงอาการเจ็บขา ใช้ขาลงน้ำหนักน้อย มักไม่ใช้ขาข้างที่เจ็บ
4	สุนัขไม่ใช้ขาข้างที่เจ็บรับน้ำหนักเลย

(ดัดแปลงจาก Johnston, 1997)

สุนัขทดลองจำนวน 8 ตัวถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะข้อเข่าเสื่อมโดยการตัด cranial cruciate ligament ขาหลังขวาร่วมกับการทำ lateral retinacular imbrication technique ตามวิธีของ Flo และ Piermattei (1997) หลังผ่าตัดสุนัขทั้ง 8 ตัวจะได้รับยาปฏิชีวนะ cephalexin ขนาด 22 มก./กก. และ carprofen ขนาด 2.2 มก./กก. วันละ 2 ครั้งทุกวัน ติดต่อกันเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นแบ่งสุนัขทั้ง 8 ตัวออกเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 4 ตัวโดยวิธีการสุ่ม กลุ่มที่ 1 จะได้รับการป้อน glucosamine hydrochloride ขนาด 500 มก./ตัว/วัน ติดต่อกันทุกวัน วันละครั้งเป็นระยะเวลา 6 เดือน ส่วนอีกกลุ่มจะได้รับการป้อนอาหารเม็ดสำเร็จรูปแทนการป้อน glucosamine hydrochloride สุนัขในกลุ่มควบคุมได้รับการป้อนอาหารเม็ดแทนการได้รับ glucosamine hydrochloride เช่นเดียวกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ glucosamine hydrochloride

จากนั้นเจาะเก็บตัวอย่างน้ำไขข้อนำมาหาค่า sulfated glycosaminoglycans (sGAG) โดยวิธี direct dimethylmethylene blue assay (Oke et al., 2003a, b) เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างค่าของ sulfated glycosaminoglycans กับการเกิดภาวะข้อเข่าเสื่อมและผลของ glucosamine hydrochloride ต่อระดับของ sulfated glycosaminoglycans รวมทั้งประเมินอาการเจ็บขาที่แสดงออกทางคลินิกทุก ๆ เดือนติดต่อกันจนสิ้นสุดการทดลอง



การเจาะเก็บตัวอย่างน้ำไขข้อ

เจาะเก็บตัวอย่างน้ำไขข้อ (arthrocentesis) จากบริเวณข้อเข่าของสุนัขแต่ละตัว โดยให้สุนัขอดอาหารก่อนการให้ยาสลบเป็นระยะเวลา 8-12 ชั่วโมง ทำให้สุนัขหมดความรู้สึกด้วย (Zoletil® ขนาด 10 มก./กก. เข้าทางกล้ามเนื้อ หลังจากสุนัขหมดความรู้สึกเตรียมบริเวณที่จะเจาะโดยใช้ aseptic technique จากนั้นใช้เข็มเบอร์ 21 ทำการเจาะเก็บ synovial fluid จากด้าน median ของ patella ligament ทำการแทงเข็มลงไปตรงๆ จากนั้นค่อยๆ ดึง plunger กลับจะพบว่ามี synovial fluid ตามขึ้นมาในปริมาณ 0.1-0.5 มล.ในสุนัขปกติ หากไม่พบว่ามี synovial fluid ในกระบอกฉีดยาให้ขยับปลายเข็มเล็กน้อย เนื่องจากอาจไปถูกบริเวณที่เรียกว่า fat pad ทำให้ไม่สามารถเจาะเก็บส่วนของ synovial fluid ได้ ข้อควรระวังในการเจาะเก็บตัวอย่างน้ำไขข้อคือ การระมัดระวังไม่ให้ปลายเข็มไปทำอันตรายต่อส่วนของกระดูกอ่อนผิวข้อ meniscus รวมทั้ง caudal cruciate ligament เพราะจะทำให้สุนัขเกิดอาการเจ็บขาและอาจพัฒนาไปสู่ภาวะข้อเสื่อมต่อไป หลังจากเจาะเก็บตัวอย่างน้ำไขข้อแล้ว จะนำไปใส่ในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) และนำมาเตรียมตัวอย่างน้ำไขข้อต่อไป

การเตรียมตัวอย่างน้ำไขข้อ

นำตัวอย่างน้ำไขข้อที่เจาะเก็บไว้ในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปั่นแยกส่วนประกอบอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการออกไปโดยใช้เครื่อง centrifuge (Universal 16R Hettich , Germany) ที่ความเร็ว 20,000 G เป็นเวลา 15 นาทีภายใต้อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นนำน้ำไขข้อที่ปั่นแยกแล้วมาดูดเก็บเฉพาะส่วนของ supernatant เก็บไว้ใน microcentrifuge tube ที่อุณหภูมิ – 80 °C

เมื่อต้องการนำมาวัดระดับของ sulfated glycosaminoglycans จะนำ synovial fluid มาละลายและย่อยด้วยเอนไซม์ papain ความเข้มข้น 1 มก./มล. โดยเอนไซม์ papain จะละลายอยู่ใน buffer อัตราส่วนระหว่าง synovial fluid และ papain buffer ใช้อัตราส่วน 1 : 1 ภายใต้อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการตรวจวัดค่า sulfated glycosaminoglycans

การเตรียมสี 1,9 dimethylmethylene blue (DMMB dye)

เริ่มจากการเติม 1,9 dimethylmethylene blue จำนวน 16 มก.ลงใน 5 มล.ของ 95% ethanol ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ไม่ให้ถูกแสงนาน 30 นาทีที่อุณหภูมิ 20 °C หลังจากนั้นเติม formate buffer ลงไป 2 มล. จากนั้นทำการเติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มล. ตรวจสอบความเข้มของสีโดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 nm โดยเครื่อง spectrophotometer ต้องได้ค่าเท่ากับ 0.34 ทำการเก็บไว้ในภาชนะสีชาและเก็บไว้ให้พ้นแสงที่อุณหภูมิ 20 °C (Oke et al., 2003 a,b)

การหาค่าของ sulfated glycosaminoglycans ในน้ำไขข้อของสุนัขโดยใช้วิธี direct spectrophotometric DMMB assay

นำตัวอย่างน้ำไขข้อที่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ papain มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 5 ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex (Germmy industrial , Taiwan) จากนั้นดูดตัวอย่างน้ำไขข้อที่เจือจางแล้วปริมาณ 250 µl ใส่ลงใน disposable cuvette ขนาด 4 ml เติม DMMB dye ลงไป 2.5 ml ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิก cuvette กลับไปกลับมา 2-3 ครั้ง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 525 nm โดยใช้เครื่อง spectrophotometer (UV-160A Shimadzu , Japan) นำค่าที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับ standard curve ที่ใช้ chondroitin sulfated C ในขนาดความเข้มข้นตั้งแต่ 0-25 µg (Oke et al., 2003 a,b) โดยแต่ละตัวอย่างจะทำ 2 - 5 ซ้ำซึ่งจำนวนซ้ำจะขึ้นอยู่กับปริมาณของน้ำไขข้อที่เจาะเก็บได้

การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical data analysis)

วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างข้อมูลของระดับ sGAG ในแต่ละกลุ่มทดลองโดยใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD ส่วนระดับของคะแนนจากการประเมินอาการเจ็บขาที่แสดงออกทางคลินิก (lameness score) ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ Mann-Whitney test จากนั้นรายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± standard error of mean) กำหนดค่าความเชื่อมั่นทางสถิติเท่ากับ 95%