

## การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางจุลกายวิภาคของกระดูกอ่อนผิวข้อ ระหว่างข้อต่างๆในสุนัข

กรกฎานวงศ์พาณิชย์<sup>1,\*</sup> และ ศิริวรรณ้องคำไชย<sup>2</sup>

<sup>1</sup> สาขาวิชาฟิสิกส์คลินิกทางสัตวแพทยศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

<sup>2</sup> ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

\* ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail: korakot@chiangmai.ac.th

### บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ เพื่อศึกษาปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนในกระดูกอ่อนผิวข้อ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างในชั้นต่างๆ ของกระดูกอ่อนผิวข้อภายในข้อเดียวกัน ความแตกต่างระหว่างตำแหน่งภายในข้อเดียวกัน ความแตกต่างระหว่างข้อ และความแตกต่างระหว่างเพศ โดยใช้กระดูกอ่อนผิวข้อของสุนัขจำนวน 6 ตัว แบ่งเป็นเพศผู้ และเมียอย่างละ 3 ตัว ผลการศึกษาพบว่ากระดูกอ่อนผิวข้อในชั้นผิวมีปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนน้อยกว่าชั้นกลางและลึกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อระหว่างตรงกลางและขอบของกระดูกอ่อนผิวข้อชั้นเดียวกัน ( $p > 0.05$ ) ปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนในกระดูกอ่อนผิวข้อสะโพกของสุนัขเพศเมียน้อยกว่าสุนัขเพศผู้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) จากการเปรียบเทียบปริมาณกระดูกอ่อนผิวข้อระหว่างข้อต่างๆ ในร่างกายพบว่า ข้อเข่ามีปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนน้อยที่สุด และจากผลการย้อมสี safranin-O เพื่อศึกษาปริมาณของโปรติโอไกลแคนไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม จากผลการศึกษาสรุปว่า ปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อภายในข้อเดียวกัน ระหว่างข้อ และระหว่างเพศไม่มีความแตกต่างกัน

**คำสำคัญ:** เซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อ โปรติโอไกลแคน กระดูกอ่อนผิวข้อ สุนัข

## บทนำ

กระดูกอ่อนผิวข้อปกคลุมปลายกระดูกที่มาประกบกันเป็นข้อ โดยพบว่าเป็นกระดูกอ่อนไฮสอลิน (hyaline cartilage) สีขาว ใส และเรียบเป็นมันวาว แต่สัตว์ที่มีอายุมากสามารถพบรอยที่เรียกว่า wear lines หรือ linear grooving ที่มีลักษณะคล้ายเส้นทอดตามแนวตั้งระนาบขนานตามยาว (sagittal plane) ของกระดูก สำหรับความหนาของกระดูกอ่อนแต่ละชนิดในสัตว์ไม่เท่ากัน จากการศึกษาพบว่า กระดูกอ่อนผิวข้อในกระต่ายมีความหนา 300 ถึง 400 ไมโครเมตร ในมนุษย์กระดูกอ่อนผิวข้อมีความหนา 1.65 ถึง 2.65 มิลลิเมตร ในสุนัขมีความหนา 0.6 ถึง 1.3 มิลลิเมตร ในสุกรมีความหนา 1.0 ถึง 2.0 มิลลิเมตร ในม้ามีความหนา 1.5 ถึง 2.0 มิลลิเมตร ในแพะและแกะมีความหนา 0.7 ถึง 1.5 มิลลิเมตร (Chang *et al.*, 2005) นอกจากนี้ลักษณะที่สำคัญของ กระดูกอ่อนผิวข้อคือไม่มีหลอดเลือด หลอดน้ำเหลือง และเส้นประสาท (Portor *et al.*, 1997; Rosenberg, 1999)

ในปัจจุบันวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสร้างเนื้อเยื่อของร่างกายขึ้นมาใหม่ในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) โดยใช้เนื้อเยื่อจากร่างกายเป็นต้นแบบ จากนั้นจึงนำเนื้อเยื่อเหล่านั้นกลับไปปลูกถ่ายให้กับอวัยวะที่เกิดความเสียหาย (autograft) ซึ่งมีประโยชน์อย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเนื้อเยื่อที่มีความสามารถในการหาย (healing process) คำโดยหนึ่งในเนื้อเยื่อเหล่านี้คือ กระดูกอ่อนผิวข้อ การคัดเลือกตำแหน่งเพื่อทำการเก็บกระดูกอ่อนผิวข้อจากร่างกาย (harvest) นำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการให้มีปริมาณมากเพียงพอ ก่อนที่จะนำกลับไปปลูกถ่ายในส่วนที่ได้รับ ความเสียหายมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากตำแหน่งของกระดูกอ่อนผิวข้อที่เก็บมานั้นจะต้องมีปริมาณของเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocytes) มากเพียงพอ รวมทั้งการเก็บต้องไม่ส่งผลให้กระดูกอ่อนบริเวณนั้นได้รับความเสียหายมาก และพัฒนาต่อไปเป็นโรคข้อเสื่อม (osteoarthritis)

อย่างไรก็ตามปัจจุบันเทคโนโลยีทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อยังคงเป็นการศึกษาทางห้องปฏิบัติการเป็นส่วนใหญ่ เพื่อให้ได้มาซึ่งวิธีที่ดีและเหมาะสมที่จะนำไปใช้จริงทางคลินิก จึงควรมีการศึกษาที่มุ่งหาคำตอบต่างๆ ตัวอย่างเช่น ตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับใช้เก็บกระดูกอ่อน สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน โครงร่าง (scaffold) ที่เหมาะสมสำหรับการเกาะยึดของเซลล์กระดูกอ่อน ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลองก่อนนำกลับไปปลูกถ่ายในร่างกาย ปัจจัยหนึ่งที่อยู่ใจจะศึกษาในครั้งนี้คือ ตำแหน่งที่ใช้ในการเก็บกระดูกอ่อนผิวข้อ โดยที่ตำแหน่งที่เก็บต้องไม่ทำให้กระดูกอ่อนผิวขอนั้นเสียหายและพัฒนาต่อไปเป็นโรคข้อเสื่อมได้ การศึกษานี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางจุลกายวิภาคของกระดูกอ่อนผิวข้อปกติ ที่ตำแหน่งแตกต่างกันในกระดูกอ่อนชิ้นเดียวกัน ในกระดูกอ่อนต่างชิ้น และในกระดูกอ่อนที่มาจากข้อตำแหน่งต่างๆ ในร่างกายและกระดูกอ่อนผิวข้อจากเพศผู้และเพศเมีย เพื่อศึกษาถึงลักษณะและปริมาณของเซลล์กระดูกอ่อน การกระจายตัวของคอลลาเจน และโปรติโอไกลแคนภายในเนื้อกระดูกอ่อน เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญในการพิจารณาเลือกตำแหน่งสำหรับการเก็บกระดูกอ่อนผิวข้อ

โดยการศึกษาครั้งนี้ ใช้กระดูกอ่อนผิวข้อของสุนัขเป็นตัวแทนในการศึกษา เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปสำหรับการศึกษาในสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่น ม้า หรือคน

## วัสดุและวิธีการ

### ตัวอย่างทางการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ใช้กระดูกอ่อนผิวข้อจากสุนัขโตเต็มที่ อายุระหว่าง 2-3 ปี จำนวน 6 ตัว แบ่งเป็นเพศผู้ 3 และเพศเมีย 3 สุนัขทั้งหมด เป็นสุนัขที่ส่งมาชันสูตรซาก ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เก็บกระดูกอ่อนผิวข้อจาก ข้อไหล่ ข้อศอก ข้อสะโพก และข้อเข่า ใน 10% formaline สุนัขทุกตัวไม่มีประวัติการเกิดโรคข้อเสื่อม หรือการได้รับบาดเจ็บที่เกี่ยวข้องกับข้อ ก่อนการเก็บตัวอย่างมีการสังเกตลักษณะทางพยาธิวิทยาของข้อและกระดูกอ่อนผิวข้อในทุกข้อว่าไม่มีอาการของการบาดเจ็บหรือการเสื่อมของกระดูกอ่อนผิวข้อ

### การเตรียมตัวอย่างสำหรับการย้อมสี

สำหรับกระบวนการทำสไลด์ทางจุลกายวิภาคในการศึกษาครั้งนี้อ้างอิงวิธีจาก (Young *et al.*, 2005) อธิบายโดยย่อ คือ ทำการดองเนื้อเยื่อ (fixation) ในน้ำยาดองเนื้อเยื่อ (10% formalin) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเอาแคลเซียมออกจากกระดูก (decalcified) โดยแช่ตัวอย่างในสารละลาย 10% formic acid และ 5% formalin เป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงนำตัวอย่างมาผ่านกระบวนการต่างๆ คือ การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) การทำให้ใส (clearing) และการกำซาบ (infiltration) ตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการกำซาบแล้ว จะนำมาทำการฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน (embedding) แล้วมาทำการตัดเนื้อเยื่อ (sectioning) ให้มีความหนาประมาณ 4 ไมโครเมตรและติดบนสไลด์ (affix) จากนั้นจึงนำสไลด์เนื้อเยื่อที่ได้มาย้อมสี (staining) ซึ่งในการศึกษานี้ย้อมสีสองชนิดคือ hematoxylin & eosin เพื่อใช้ศึกษาลักษณะของเซลล์ นิวเคลียส และโครงสร้างที่มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบหลัก และ safranin-O เพื่อใช้ศึกษาลักษณะโครงสร้างที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลักได้แก่ โปรติโอไกลแคน และไฮยาลูโรแนน (hyaluronan)

### การนับปริมาณเซลล์กระดูกอ่อน

นำสไลด์มาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของลักษณะทางจุลกายวิภาคของกระดูกอ่อนผิวข้อในหัวข้อดังนี้ ความแตกต่างระหว่างชั้นต่างๆ ของกระดูกอ่อนผิวข้อภายในข้อเดียวกัน ความแตกต่างระหว่างตำแหน่งต่างๆ ของกระดูกอ่อนในกระดูกอ่อนผิวข้อเดียวกัน ความแตกต่างของกระดูกอ่อนผิวข้อระหว่างข้อต่างๆ ในร่างกาย และความแตกต่างของกระดูกอ่อนผิวข้อระหว่างเพศผู้และเมีย นับปริมาณของเซลล์กระดูกอ่อนในชั้นผิว (superficial layer) ชั้นกลาง (middle layer) และชั้นลึก (deep layer) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างในหัวข้อต่างๆ โดยในแต่ละตัวอย่างจะสุ่มถ่ายรูป 5 ตำแหน่ง โดยใช้กำลังขยาย 20 เท่า จากนั้นนำมานับจำนวนเซลล์กระดูกอ่อน ทั้งหมดแล้วหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

## การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณเซลล์กระดูกอ่อน โดยใช้ student t-test

## ผลการศึกษา

### ผลการย้อมสี hematoxylin & eosin

การย้อมสี hematoxylin & eosin เพื่อศึกษาลักษณะของเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อและนับจำนวนเซลล์กระดูกอ่อน เปรียบเทียบในเงื่อนไขต่างๆ ได้แก่ ความแตกต่างระหว่างชั้นต่างๆ ในกระดูกอ่อน ผิวข้อ ความแตกต่างระหว่างตำแหน่งบนกระดูกอ่อนชั้นเดียวกัน ความแตกต่างระหว่างข้อ และความแตกต่างระหว่างเพศ

#### ปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนระหว่างชั้นของกระดูกอ่อนผิวข้อ

จำนวนเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อในชั้นผิว ชั้นกลาง และชั้นลึก ของข้อต่างๆ ในสุนัขเพศผู้และเพศเมีย แสดงในตารางที่ 1 พบว่าปริมาณเซลล์กระดูกอ่อน ในกระดูกอ่อนผิวข้อชั้นผิวมีปริมาณน้อยกว่าชั้นกลาง และชั้นลึกอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.01$ ) แต่ไม่พบความแตกต่างของจำนวนเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อระหว่างชั้นกลางและลึก ผลจากการศึกษาเปรียบเทียบในข้อที่ตำแหน่งเดียวกันระหว่างทั้งสองเพศพบว่า ส่วนมากเพศผู้มีปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนมากกว่าเพศเมีย แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

#### ปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนขอบและตรงกลางของกระดูกอ่อนผิวข้อ

ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของจำนวนเซลล์กระดูกอ่อนระหว่างขอบและตรงกลางของกระดูกอ่อนผิวข้อทั้งในเพศผู้และเมีย ในทุกข้อที่ทำการศึกษา (ตารางที่ 2) แต่พบว่ามีแนวโน้มที่ปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนบริเวณตรงกลางจะน้อยกว่าบริเวณขอบ

#### ปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนระหว่างเพศ

พบความแตกต่างทางสถิติของจำนวนเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อระหว่างเพศผู้และเมียในข้อสะโพก โดยพบว่าเพศผู้จะมีปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อ ของข้อสะโพกมากกว่าเพศเมีย ( $p < 0.01$ ) ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติในข้ออื่นๆ ( $p > 0.05$ ) (ตารางที่ 3)

#### ปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนระหว่างข้อ

พบว่าปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนในข้อเข่า ( $90.4 \pm 4.8$  เซลล์) มีปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อน้อยกว่าข้อไหล่ ( $95.3 \pm 5.4$ ) ข้อศอก ( $99.0 \pm 6.0$ ) และข้อสะโพก ( $96.9 \pm 5.6$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) โดยไม่พบความแตกต่างระหว่างข้อไหล่ ข้อศอก และข้อสะโพก

### ผลการย้อมด้วย safranin-O

ความเข้มของสีแดงที่เกิดจาก safranin-O เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อในสุนัขเพศผู้และเพศเมีย พบว่าไม่มีความแตกต่าง แต่เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างข้อต่างๆ ในร่างกายในสุนัขเพศเดียวกัน พบว่าความเข้มของสีแดงในข้อสะโพกน้อยที่สุด ในขณะที่ความเข้มของสีแดงที่ติดในข้อไหล่ ข้อศอก และข้อเข่าไม่แตกต่างกันมาก (รูปที่ 1)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์กระดูกอ่อนระหว่างชั้นผิว กลาง และลึก

ชื่อ	จำนวนเซลล์ (ต่อกำลังขยาย 20 เท่า)					
	เพศผู้			เพศเมีย		
	ชั้นผิว	ชั้นกลาง	ชั้นลึก	ชั้นผิว	ชั้นกลาง	ชั้นลึก
<b>ไหล่</b>						
ตรงกลาง	13.6±2.3 <sup>a</sup>	37.0±4.5 <sup>b</sup>	45.2±5.9 <sup>b</sup>	10.8±1.3 <sup>a</sup>	36.6±2.1 <sup>b</sup>	46.8±5.1 <sup>b</sup>
ขอบ	12.2±2.6 <sup>a</sup>	40.0±3.6 <sup>b</sup>	45.8±5.8 <sup>b</sup>	11.4±1.9 <sup>a</sup>	36.4±2.3 <sup>b</sup>	45.2±4.3 <sup>b</sup>
<b>ศอก</b>						
ตรงกลาง	13.4±2.1 <sup>a</sup>	38.8±4.8 <sup>b</sup>	47.4±3.6 <sup>b</sup>	10.6±3.4 <sup>a</sup>	36.6±4.6 <sup>b</sup>	49.8±3.1 <sup>b</sup>
ขอบ	12.8±2.4 <sup>a</sup>	40.2±4.4 <sup>b</sup>	49.8±2.6 <sup>b</sup>	11.2±3.7 <sup>a</sup>	37.0±4.0 <sup>b</sup>	48.2±3.0 <sup>b</sup>
<b>สะโพก</b>						
ตรงกลาง	11.8±1.9 <sup>a</sup>	40.2±4.6 <sup>b</sup>	47.0±4.1 <sup>b</sup>	15.0±2.0 <sup>a</sup>	39.4±2.7 <sup>b</sup>	39.4±2.8 <sup>b</sup>
ขอบ	12.0±1.9 <sup>a</sup>	41.4±3.6 <sup>b</sup>	45.2±3.3 <sup>b</sup>	14.4±2.7 <sup>a</sup>	39.2±1.9 <sup>b</sup>	40.2±3.7 <sup>b</sup>
<b>เข่า</b>						
ตรงกลาง	10.6±2.1 <sup>a</sup>	37.2±3.3 <sup>b</sup>	42.2±4.0 <sup>b</sup>	11.2±1.2 <sup>a</sup>	39.3±3.8 <sup>b</sup>	38.2±2.2 <sup>b</sup>
ขอบ	11.0±1.2 <sup>a</sup>	38.6±2.9 <sup>b</sup>	39.1±2.6 <sup>b</sup>	11.4±2.6 <sup>a</sup>	41.0±4.5 <sup>b</sup>	39.1±4.5 <sup>b</sup>

ตัวอักษรที่ต่างกัน (<sup>a,b</sup>) แถวเดียวกันและเพศเดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

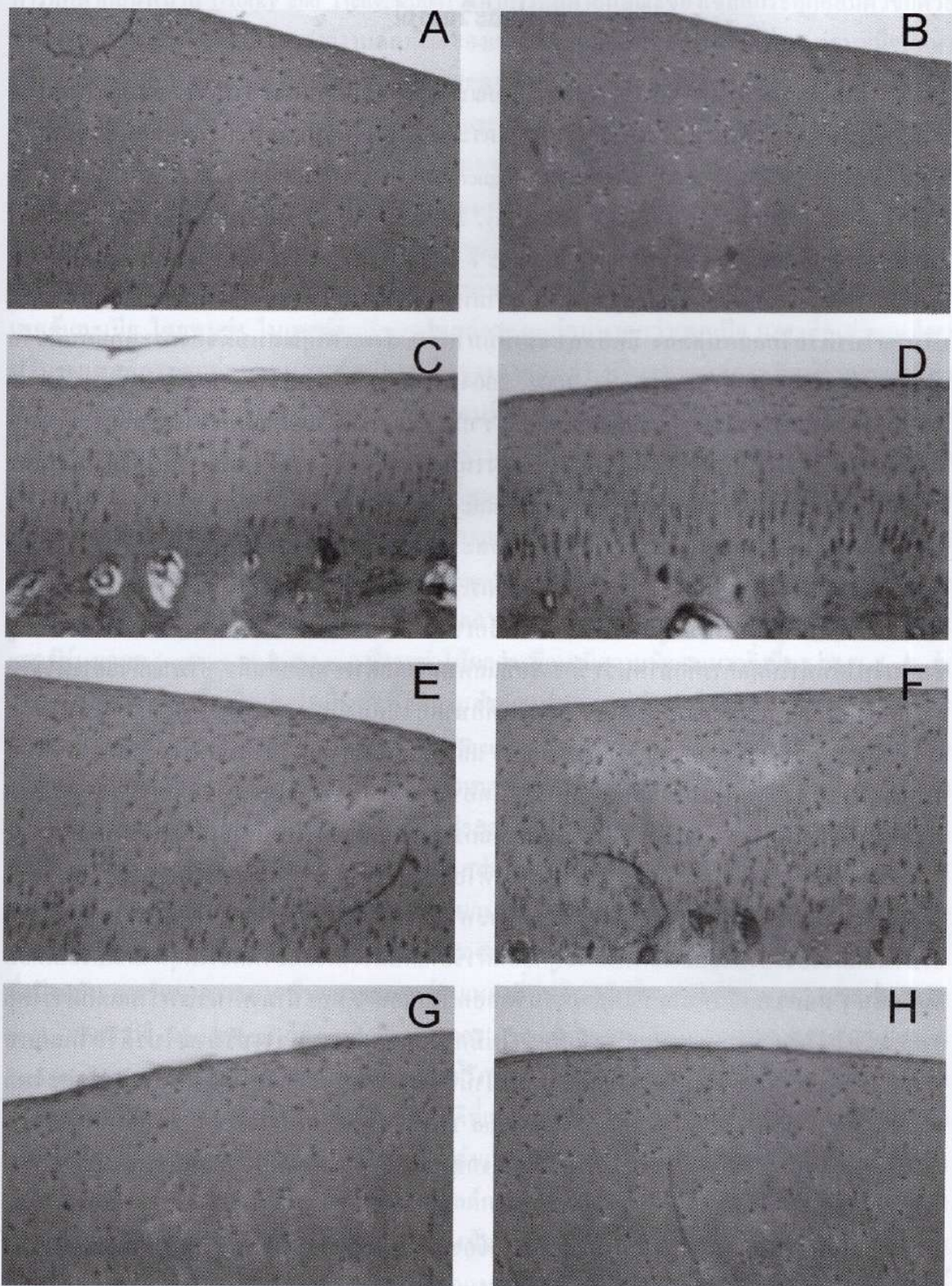
ตารางที่ 2 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์กระดูกอ่อนระหว่างข้อ ระหว่างตรงกลางและขอบ ในเพศผู้และเมีย

ชื่อ	จำนวนเซลล์			
	เพศผู้		เพศเมีย	
	ตรงกลาง	ขอบ	ตรงกลาง	ขอบ
<b>ไหล่</b>				
	95.8±9.2	98.0±4.0	94.2±3.0	93.0±3.3
<b>ศอก</b>				
	99.6±5.8	102.8±6.9	97.0±5.6	96.4±5.3
<b>สะโพก</b>				
	99.0±5.3	100.4±4.7	93.8±5.6	94.2±5.1
<b>เข่า</b>				
	90.0±4.2	91.8±5.4	89.2±4.4	90.6±6.2

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์กระดูกอ่อนระหว่างเพศผู้และเมีย

ชื่อ	จำนวนเซลล์	
	เพศผู้	เพศเมีย
<b>ไหล่</b>		
	96.0±6.8	93.6±3.1
<b>ศอก</b>		
	101.2±6.2	96.7±5.2
<b>สะโพก</b>		
	99.7±4.8 <sup>a</sup>	94.0±5.1 <sup>b</sup>
<b>เข่า</b>		
	90.9±4.1	89.9±5.1

ตัวอักษรที่ต่างกัน (<sup>a,b</sup>) แถวเดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติ ( $p < 0.01$ )



รูปที่ 1 กระดูกอ่อนผิวข้อในเพศผู้ (A, C, E, G) เปรียบเทียบกับเพศเมีย (B, D, F, H) ในข้อไหล่ (A, B) ข้อศอก (C, D) ข้อสะโพก (E, F) และข้อเข่า (G, H) เมื่อย้อมด้วยสี safranin-O (กำลังขยาย 10 เท่า)

## สรุปและวิจารณ์

นับแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน การศึกษาลักษณะของกระดูกอ่อนผิวข้อในสัตว์ รวมถึงในมนุษย์ ส่วนใหญ่มุ่งเน้นการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างกระดูกอ่อนผิวข้อปกติและกระดูกอ่อนผิวข้อที่เกิดพยาธิสภาพ (Bank *et al.*, 2000; Sandell and Aigner, 2001) หรือการเปรียบเทียบระหว่างกระดูกอ่อนผิวข้อในสัตว์อายุที่แตกต่างกัน (Horky and Tichy, 2004; Longmore and Gardner, 1978) การศึกษาลักษณะกระดูกอ่อนผิวข้อสุนัขที่มีอายุ 1, 4, 5 และ 8 ปี ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (scanning and transmission electron microscopy) พบว่า ความหนาของกระดูกอ่อนผิวข้อมีการเปลี่ยนแปลงไป ปริมาณโปรติโอไกลแคนลดลง มีคอลลาเจนเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้คุณสมบัติของกระดูกอ่อนผิวข้อเปลี่ยนแปลงไป (Horky and Tichy, 2002, 2004) แต่ทว่ายังไม่พบรายงานเปรียบเทียบปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อระหว่างเพศผู้และเพศเมีย รวมทั้งไม่มีการเปรียบเทียบปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนในแต่ละข้อ โดยการศึกษาเป็นครั้งแรกที่รายงานผลการศึกษาดังกล่าว ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนในสุนัขเพศผู้และเพศเมียในข้อไหล่ ข้อศอก และข้อเข่าไม่มีความแตกต่างกัน แต่ปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนในข้อสะโพกของเพศผู้มากกว่าเพศเมียอย่างมีนัยสำคัญ รวมทั้งพบว่า ไม่มีความแตกต่างของจำนวนเซลล์กระดูกอ่อนระหว่าง ข้อไหล่ ข้อศอก และข้อสะโพก แต่พบว่า ปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อในข้อเข่ามีปริมาณน้อยกว่าข้ออื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นไปได้ที่ทำให้ผลการศึกษาพบว่า มี 1 ข้อที่แสดงผลแตกต่างจากข้ออื่นคือ ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษามีน้อยเกินไป (ทั้งหมด 6 ตัว) ซึ่งการศึกษาต่อไปต้องมีการเพิ่มปริมาณตัวอย่างให้มากขึ้น และหากพบว่าเมื่อมีปริมาณตัวอย่างที่มากขึ้นแล้ว แล้วการศึกษายังเป็นไปในทิศทางนี้ ก็มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องวางแผนการวิจัยเพื่อค้นหาคำตอบว่าทำไมปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนข้อสะโพกในเพศเมียจึงน้อยกว่าเพศผู้ และเหตุใดปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อในข้อเข่าจึงน้อยกว่าข้ออื่นๆ

พบว่า ความเข้มข้นหรือปริมาณของโปรติโอไกลแคนที่สามารถมองเห็นได้จากการย้อมด้วยสี safranin-O ในกระดูกอ่อนไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเพศผู้และเพศเมีย แม้ว่าการศึกษานี้พบปริมาณสีแดงของโปรติโอไกลแคนในกระดูกอ่อนผิวข้อที่เก็บมาจากข้อสะโพกจากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับข้ออื่นๆ แต่ความเข้มข้นนี้ไม่สามารถวัดออกเป็นตัวเลข และนำมาคำนวณความแตกต่างโดยอาศัยสถิติไม่ได้ แต่จากการประเมินนี้เชื่อว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างปริมาณโปรติโอไกลแคนระหว่างข้อต่างๆ สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่รายงานว่ากระดูกอ่อนผิวข้อระหว่างข้อสะโพกและข้อศอกๆ ไม่มีความแตกต่างกัน (Horky and Tichy, 2004) อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น ตัวแทนที่ใช้เพียงกลุ่มละ 3 ตัว (เพศผู้ 3 ตัวและเพศเมีย 3 ตัว) จึงมีข้อมูลค่อนข้างน้อย

เมื่อพิจารณาจำนวนเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อระหว่างชั้นต่างๆ (ผิว กลาง และลึก) พบว่าเซลล์กระดูกอ่อนในชั้นผิวมีปริมาณน้อยที่สุด โดยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ชั้นกลางและลึกมีปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนที่ใกล้เคียงกัน โดยพบลักษณะของเซลล์กระดูกอ่อนที่อยู่ในชั้นผิวมีรูปร่างรี ยาว ในขณะที่เซลล์กระดูกอ่อนที่อยู่ในชั้นกลางและลึกมีลักษณะกลม สอดคล้องกับ

การศึกษาก่อนหน้านี้ (Horky and Tichy, 2004) ที่ทำการศึกษาลักษณะของเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและรายงานลักษณะของเซลล์กระดูกอ่อนที่อยู่ในชั้นต่างๆ ต่อมาเมื่อศึกษาถึงปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนระหว่างขอบของกระดูกอ่อนและตรงกลางพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อมีความสม่ำเสมอ เมื่อสังเกตลักษณะของเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อจะพบว่า มีลักษณะค่อนข้างกลม โดยในกระดูกอ่อนผิวข้อชั้นกลางจะพบเซลล์กระดูกอ่อนอยู่กันเป็นคู่ และในกระดูกอ่อนผิวข้อชั้นลึกจะพบลักษณะการเรียงเป็นแถวเดียวในแนวตั้งฉากกับผิวกระดูกอ่อน และเมื่อพิจารณาปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อระหว่างเพศผู้และเมียพบว่า มีเพียงข้อสะโพกเท่านั้นที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนระหว่างเพศผู้และเมีย โดยพบว่า ในเพศผู้มีปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนมากกว่าเพศเมีย และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนระหว่างข้อต่างๆ ในร่างกายพบว่า ปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนของข้อเข่ามีน้อยที่สุด สำหรับปริมาณของโปรตีนโอไกลแคนที่สามารถเห็นได้จากการย้อมสี safranin-O นั้น ไม่มีความแตกต่างกันอย่างเด่นชัดระหว่างข้อต่างๆ แม้ว่าจากการสังเกตจะพบว่ากระดูกอ่อนผิวข้อสะโพกจะมีความเข้มของสี safranin-O น้อยที่สุด ดังนั้นการศึกษาครั้งต่อไปควรจะใช้วิธีที่สามารถบอกความแตกต่างในเชิงปริมาณได้เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องด้วยวิธีทาง อนุชีววิทยา เช่น เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction; PCR) เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ เสมือนจริง (real-time polymerase chain reaction; real-time PCR) หรือการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค เช่น เวสเทิร์นบลอต (western blot analysis) ซึ่งจะช่วยให้ผลการศึกษามีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น

วิศวกรรมเนื้อเยื่อนับว่าเป็นสิ่งที่มีความสำคัญมากต่อการรักษาโรคในปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะที่มีกลไกการหาย (healing process) ต่ำ อย่างเช่น กระดูกอ่อนผิวข้อ นักวิทยาศาสตร์ได้มีความพยายามในการพัฒนาเทคนิคทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมาใช้ในการรักษาการบาดเจ็บของกระดูกอ่อนผิวข้อ โดยมีวัตถุประสงค์ให้กระดูกอ่อนผิวข้อนั้นมีคุณสมบัติเช่นเดิม และสามารถกลับมาทำหน้าที่เช่นเดียวกับกระดูกอ่อนผิวข้อ แต่ปัญหาที่สำคัญของการรักษาอาการบาดเจ็บที่เกิดบริเวณกระดูกอ่อนผิวข้อคือ กระบวนการหายของแผลที่ช้า หรืออาจไม่เกิดเลย เนื่องจากกระดูกอ่อนผิวข้อเป็นโครงสร้างที่ไม่มีหลอดเลือด หลอดน้ำเหลืองและเส้นประสาทมาเลี้ยง ซึ่งปัจจุบัน การรักษาภาวะบาดเจ็บของกระดูกอ่อนเหล่านี้ที่ปฏิบัติกันคือ (Bentley *et al.*, 2003; Menche *et al.*, 1998) วิธี debridement วิธี microfracture และ abrasion และ วิธี osteochondral autograft/allograft (mosaicplasty) แต่ข้อเสียที่เกิดขึ้นจากการรักษาด้วยวิธีการในปัจจุบันทั้งหมดที่กล่าวมาคือ กระดูกอ่อนที่มีการสร้างขึ้นใหม่นั้นมีคุณสมบัติที่เปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นการรักษาทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนเข้าสู่ตำแหน่งที่ได้รับบาดเจ็บจึงน่าจะเป็นวิธีการที่ดีที่สุด โดยการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อในส่วนต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก ทั้งภายในข้อเดียวกันและระหว่างข้อ ซึ่งทำให้สามารถเลือกเก็บกระดูกอ่อนผิวข้อไปใช้เพาะเลี้ยงได้ตามความเหมาะสมซึ่งตำแหน่งในการเก็บไม่น่าจะมีผลต่อปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนที่จะได้



## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ทุนสนับสนุนในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิจัยโรคกระดูกและข้อในสัตว์เลี้ยง สาขาวิชาพรีคลินิกทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์วัสดุและอุปกรณ์ สำหรับใช้ในการศึกษา

## เอกสารอ้างอิง

- Bank, R.A., Soudry, M., Maroudas, A., Mizrahi, J., TeKoppele, J.M. 2000. The increased swelling and instantaneous deformation of osteoarthritic cartilage is highly correlated with collagen deg. *Arthritis Rheum.* 43: 2202-2210.
- Bentley, G., Biant, L.C., Carrington, R.W., Akmal, M., Goldberg, A., Williams, A.M., Skinner, J.A., Pringle, J. 2003. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J. Bone Joint Surg. Br.* 85: 223-230.
- Chang, C.H., Lin, F.H., Kuo, T.F., Lin, H.C. 2005. Cartilage tissue engineering. *Biomed. Eng. Appl. Basic Comm.* 17: 1-11.
- Horky, D., Tichy, F. 2002. Submicroscopic structure of equine articular cartilage. *ACTA Vet. Brno.* 71: 151-157.
- Horky, D., Tichy, F. 2004. Submicroscopic structure of canine articular cartilage. *Vet. Med.* 49: 207-216.
- Longmore, R.B., Gardner, D.L. 1978. The surface structure of ageing human articular cartilage: a study by reflected light interference microscopy (RLIM). *J. Anat.* 126: 535-365.
- Menche, D.S., Vangness, C.T., Pitman, M.J., Gross, A.E., Peterson, L. 1998. The treatment of isolated articular cartilage lesions in the young individual. *Instr. Course. Lect.* 47: 505-515.
- Portor, G.A., Gurley, A.M., Roth, S.I. 1997. Bone, In: Portor, G.A., Gurley, A.M., Roth, S.I. (Eds.) *Histology for pathology.* Mosby, St Louis, p. 85-106.
- Rosenberg, A. 1999. Bone, joint and soft tissue tumor, In: Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T. (Eds.) *Robbins pathologic basic of disease.* WB saunders, Philadelphia, p. 1215-1268.
- Sandell, L.J., Aigner, T. 2001. Articular cartilage and changes in arthritis: Cell biology of arthritis. *Arthritis Res.* 3: 107-113.
- Young, A.A., Smith, M.M., Smith, S.M., Cake, M.A., Ghosh, P., Read, R.A., Melrose, J., Sonnabend, D.H., Roughley, P.J., Little, C.B. 2005. Regional assessment of articular cartilage gene expression and small proteoglycan metabolism in an animal model of osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 7: 852-861.

## Comparative histological study of canine articular cartilage between joints

Korakot Nganvongpanit<sup>1,\*</sup> and Siriwan Ong-Chai<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Veterinary Preclinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University

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

\* Corresponding author E-mail: korakot@chiangmai.ac.th

---

### Abstract

The aims of this study were to determine the number of chondrocyte cells between articular cartilage layer, the difference within the region, the difference between joint and the difference between sex. Articular cartilage was collected from 6 dogs, 3 males and 3 females. The number of chondrocyte cells in the superficial zone was significantly lower than in the middle and deep zone ( $p < 0.01$ ). No significant difference was observed between the region ( $p > 0.05$ ), but the number of chondrocyte cells from female hip joint was significantly lower than male ( $p < 0.01$ ). The number of chondrocyte cells from stifle joint was significantly lowest ( $p < 0.01$ ). The result of safranin-O staining was not different between groups. In conclusion, the number of chondrocyte cells was not different between cartilage region, joint and sex.

**Key words:** chondrocyte, proteoglycan, articular cartilage, dog