

ผลของ nandrolone laurate ต่อการเชื่อมของกระดูกหักในสุนัข

นายภาคภูมิ อษา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์ ภาควิชาเภสัชวิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF NANDROLONE LAURATE ON FRACTURE HEALING IN DOGS

Mr. Phakphum Asa

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Pharmacology

Department of Pharmacology

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

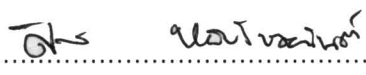
หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของ nandrolone laurate ต่อการเชื่อมกระดูกหักในสุนัข  
โดย นายภาควุมิ อาษา  
สาขาวิชา เกษษวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.ศิรินทร หยิบไชคอนันต์  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.สุมิตร ดุรงค์พงษ์ธร


คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย  
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

  
..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.มงคล เตชะกำพ)


คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.วรา พานิชเกรียงไกร)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.ศิรินทร หยิบไชคอนันต์)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.สุมิตร ดุรงค์พงษ์ธร)

  
..... กรรมการ  
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.มาริชค์กร์ กัลล์ประวิทย์)

  
..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.มนชนก วิจารสรณ์)

ภาคภูมิ อาษา : ผลของ nandrolone laurate ต่อการเชื่อมของกระดูกหักในสุนัข.  
 (Effects of nandrolone laurate on bone fracture healing in dogs) อ.ที่ปรึกษา  
 วิทยานิพนธ์หลัก : รศ.สพ.ญ.ดร.ศิรินทร หยิบโชคอนันต์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม :  
 ผศ.น.สพ.ดร.สุมิตร ดุรงค์พงษ์ธร, 95 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ nandrolone laurate (NL) ในการเสริมการรักษาการ  
 เชื่อมกระดูกหัก ภายหลังจากแก้ไขภาวะกระดูกหักด้วยวิธีการผ่าตัดในสุนัข สุนัขที่เข้าร่วมการศึกษานี้เป็นสุนัขที่มี  
 ภาวะกระดูกท่อนยาวขาหน้าหรือขาหลังหักไม่เกิน 1 สัปดาห์ และเข้ารับการแก้ไขภาวะกระดูกหักด้วยวิธีการผ่าตัดที่  
 โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวนทั้งสิ้น 16 ตัว อายุเฉลี่ย  $2.13 \pm 0.72$   
 ปี แบ่งสุนัขทั้งหมดออกเป็น 2 กลุ่มแบบสุ่ม คือ กลุ่มควบคุม และกลุ่มศึกษา จำนวนกลุ่มละ 8 ตัว สุนัขกลุ่มศึกษา  
 ได้รับการฉีด NL ขนาด 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อตัว) เข้าใต้ผิวหนังทันทีภายหลังจากผ่าตัด  
 แก้ไขภาวะกระดูกหัก และได้รับการฉีด NL อีก 2 ครั้งในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 หลังการผ่าตัดแก้ไขภาวะกระดูกหัก  
 ตรวจวัดระดับ bone alkaline phosphatase (BALP), osteocalcin (OC), total calcium ( $Ca^{2+}$ ) และ inorganic  
 phosphorus (P) ในซีรัม ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 4, 8 และ 12 ภายหลังจากผ่าตัดแก้ไขภาวะกระดูกหัก รวมทั้งตรวจนับ  
 จำนวนเม็ดเลือดแดงในสัปดาห์ที่ 0, 4, 8 และ 12 และค่าเอนไซม์ตับ ในสัปดาห์ที่ 0 และ 8 ของการศึกษา ร่วมกับ  
 การประเมินการหายของกระดูกด้วยภาพถ่ายรังสีวินิจฉัย ณ สัปดาห์ที่ 4, 8 และ 12 รวมระยะเวลาการศึกษาทั้งสิ้น  
 12 สัปดาห์

จากผลการศึกษาพบว่า ระดับ BALP เฉลี่ยในซีรัมของสุนัขกลุ่มศึกษาสูงกว่าสุนัขกลุ่มควบคุมตลอด  
 ระยะเวลาการศึกษา โดยพบระดับที่สูงกว่าสุนัขกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ณ สัปดาห์ที่ 8  
 และ 12 และเมื่อเปรียบเทียบระดับ BALP เฉลี่ยในซีรัมของสุนัขกลุ่มศึกษากับสัปดาห์ที่ 0 ภายในกลุ่มเดียวกัน  
 พบว่าระดับ BALP เฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 1 และ 12 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) สำหรับระดับ  
 OC เฉลี่ยในซีรัมของสุนัขทั้งสองกลุ่มเพิ่มขึ้น แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อ  
 เทียบกับสัปดาห์ที่ 0 อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบระดับ OC ในซีรัมระหว่างสุนัขกลุ่มศึกษาและสุนัขกลุ่มควบคุม ณ เวลา  
 เดียวกัน พบว่า ระดับ OC เฉลี่ยในซีรัมของสุนัขกลุ่มศึกษาสูงกว่ากลุ่มควบคุมตลอดระยะเวลาการศึกษา ระดับ  
 total  $Ca^{2+}$  และ inorganic P ในซีรัมของสุนัขกลุ่มควบคุมอยู่ในระดับปกติ และถึงแม้ระดับ total  $Ca^{2+}$  และ  
 inorganic P ในซีรัมของสุนัขกลุ่มศึกษาดำกว่าระดับปกติในสัปดาห์ที่ 12 ของการศึกษา แต่ไม่มีสุนัขตัวใดแสดง  
 อาการผิดปกติทางคลินิก ค่าเอนไซม์ที่แสดงการทำงานของตับในสุนัขทั้งสองกลุ่มอยู่ในระดับปกติ และผลจากการ  
 ประเมินภาพถ่ายรังสีวินิจฉัย พบว่า ในสัปดาห์ที่ 4 สุนัขกลุ่มศึกษามีปริมาณกระดูกซ่อมที่มาพอกบริเวณกระดูกหัก  
 มากกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากผลการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่า การฉีด NL ขนาด 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้า  
 ใต้ผิวหนัง ทุก 2 สัปดาห์ ติดต่อกัน 3 ครั้ง มีผลทำให้ระดับ OC และ BALP ในซีรัมเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นการบ่งชี้การ  
 ทำงานของเซลล์ osteoblast ที่เพิ่มขึ้นระหว่างมีการเชื่อมของกระดูกหักในสุนัข

ภาควิชา เกษัตริย์วิทยา.....  
 สาขาวิชา. เกษัตริย์วิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์.....  
 ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนิสิต..... รศ.ดร. อาษา.....  
 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..... รศ.ศิรินทร.....  
 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม..... ผศ.สุมิตร.....

# # 5075570131 : MAJOR VETERINARY PHARMACOLOGY

KEYWORDS : NANDROLONE LAURATE / OSTEOCALCIN / BONE ALKALINE PHOSPHATASE / FRACTURE HEALING / DOGS

PHAKPHUM ASA : EFFECTS OF NANDROLONE LAURATE ON FRACTURE HEALING IN DOGS. THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF.SIRINTORN YIBCHOK-ANUN, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASST.PROF.SUMIT DURONGPHONGTORN, Ph.D., 95 pp.

The aim of this study was to investigate the effects of nandrolone laurate (NL) on healing formation of bone fracture in dogs. Sixteen client-owned dogs (2.13 ± 0.72 years old) with less than a week fracture of long bone forelimb or hindlimb were divided into two groups; control (n=8) and study groups (n=8). All the fractured bones were fixed with intramedullary pin and/or plate and screws. NL (5 mg/kg, maximum of 50 mg/dog) was injected subcutaneously immediately after correction of bone fracture, and then at the 2<sup>nd</sup> and the 4<sup>th</sup> week of the study. Serum bone alkaline phosphatase (BALP), osteocalcin (OC), total calcium (Ca<sup>2+</sup>) and inorganic phosphorus (P) concentrations were measured before (week 0) and after surgery at the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> week. Red blood cell count were evaluated in week 0, 4, 8 and 12. Liver function enzyme concentrations were evaluated in week 0 and 8. In addition, radiographs were taken in week 4, 8 and 12 to monitor bone healing formation. The entire period of this study was 12 weeks.

The results showed that, average serum BALP concentrations in dogs of the study group were higher than those of the control group for the entire period of the study. However, the statistical difference (p<0.05) was observed only in week 8 and 12 compared to those of the control group. In addition, the serum BALP concentrations in dogs of the study group in week 1 and 12 were significantly increased (p<0.05) compared to those in week 0. Average serum OC concentrations in dogs of the study group tended to be higher than those of the control group with no statistical difference (p>0.05) for the entire period of the study. Total serum Ca<sup>2+</sup> and inorganic P concentrations in dogs of the control group were in normal range. In the study group, although the concentration of total serum Ca<sup>2+</sup> in week 12 was lower than normal range, none of the dog showed clinical signs of hypocalcemia. The liver function enzyme concentrations were also normal in both groups. At the 4<sup>th</sup> week, more callus between the fractured gap was observed in the treated group compared to that in the control group. Taken together, our findings suggested that nandrolone laurate (5 mg/kg, SC) every 2 weeks for 3 injections increased serum BALP and OC concentrations, indicating an increased activity of osteoblast during bone healing process.

Department : ..Pharmacology..... Student's Signature Phakphum Asa  
Field of Study : Veterinary Pharmacology... Advisor's Signature S. Yibchok-anun  
Academic Year : ..2009..... Co-Advisor's Signature Al Suda

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.ศิรินทร หยิบโชคนันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและแนะแนวทางการค้นหาข้อมูล ตลอดจนให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่าง ๆ และวิธีการแก้ปัญหา ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.สุมิตร ดวงค์พงษ์ธร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และ อาจารย์ น.สพ.สิริพงษ์ เกียรติกิตติคุณ อาจารย์ผู้ประสานงานหน่วยศัลยกรรม โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำปรึกษา และแนะแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.วรา พานิชเกรียงไกร ศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.มาริษศักร์ กัลล์ประวิทย์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.มนชนก วิจารณ์ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลา และให้คำแนะนำต่าง ๆ ซึ่งทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีคุณค่าและมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ สัตวแพทย์หน่วยศัลยกรรม และเจ้าหน้าที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำปรึกษา และข้อคิดเห็นเพิ่มเติม ตลอดจนอำนวยความสะดวกในการคัดเลือกสุนัขเพื่อทำการศึกษา การเก็บตัวอย่าง ที่เป็นประโยชน์ต่อการดำเนินการวิจัย และการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่กรุณาให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นเพิ่มเติม ตลอดจนให้คำปรึกษา และคำแนะนำการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการ ทำให้การดำเนินการวิจัยอันเป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้

ขอขอบพระคุณ บริษัท อินเทอร์เน็ต (ประเทศไทย) จำกัด ที่เลือกเพื่อผลิตภัณฑ์ และให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ บัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา และบุคคลอันเป็นที่รัก ซึ่งให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจเสมอมา ขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณร่างกายที่แข็งแรง กำลังใจที่เข้มแข็ง และความพยายามของตัวเองจนเกิดวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ขึ้นมา

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฐ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
1. การเชื่อมกระดูกหัก (fracture healing).....	4
2. การสร้างกระดูก (bone formation) เพื่อเชื่อมกระดูกหัก.....	10
3. วงจรการสร้างกระดูก (bone remodeling) และสารชีวเคมีที่ออกมาจากกระดูก (biochemical bone marker).....	15
4. ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารชีวเคมีของกระดูก.....	17
5. Formation marker ของกระดูก.....	19
6. Bone alkaline phosphatase (BALP).....	20
7. Osteocalcin (OC).....	25
8. Amino- และ Carboxy-terminal procollagen I extension peptide (PINP และ PICP) และ Amino-terminal extension peptide (PIIINP).....	31
9. Nandrolone laurate.....	33
10. การประเมินการเชื่อมของกระดูก.....	36
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	37
วัสดุและอุปกรณ์.....	37
วิธีดำเนินการทดลอง.....	38
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	42

บทที่	หน้า
4. ผลการวิจัย.....	43
ผลของ nandrolone laurate ต่อระดับ BALP ในซีรัมของสุนัขกระดูกหัก.....	43
ผลของ nandrolone laurate ต่อระดับ OC ในซีรัมของสุนัขกระดูกหัก.....	45
ผลของ nandrolone laurate ต่อระดับ total calcium, inorganic phosphorus ในซีรัม และ Ca/P ratio.....	47
การประเมินผลของ nandrolone laurate ต่อการเชื่อมกระดูกของสุนัข โดยใช้ภาพถ่ายรังสีวินิจฉัย.....	49
ผลของ nandrolone laurate ต่อการเปลี่ยนแปลงค่าทางโลหิตของสุนัขกระดูกหัก	60
ผลของ nandrolone laurate ต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเม็ดเลือดแดง ค่าฮีโมโกลบิน และค่าฮีมาโตคริตของสุนัขกระดูกหัก.....	62
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	67
1. อภิปรายผล.....	67
2. สรุปผลการวิจัย.....	82
3. ข้อเสนอแนะ.....	82
รายการอ้างอิง.....	83
ภาคผนวก.....	89
ภาคผนวก ก.....	90
ภาคผนวก ข.....	91
ภาคผนวก ค.....	92
ภาคผนวก ง.....	93
ภาคผนวก จ.....	94
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	95



## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2 – 1	ระยะเวลาในการเชื่อมของกระดูกหักในการแก้ไขกระดูกหักด้วยเครื่องมือชนิดต่างๆ ของแต่ละช่วงอายุของสัตว์.....	10
2 – 2	สารชีวเคมีที่ออกมาจากกระดูก (biochemical bone marker).....	17
3 – 1	การแบ่งกลุ่มของสุนัข สายพันธุ์ และเพศของสุนัขในแต่ละกลุ่ม.....	38
4 – 1	ระดับ total calcium และ inorganic phosphorus ในซีรัมของสุนัขกระดูกหักกลุ่มควบคุมและกลุ่มศึกษา ก่อนและหลังได้รับ nandrolone laurate.....	48
4 – 2	ตำแหน่งของกระดูกหัก และวิธีการผ่าตัดแก้ไขกระดูกหักของสุนัขกลุ่มควบคุมและกลุ่มศึกษา.....	49
5 – 1	สาเหตุของการเกิดภาวะแคลเซียมในเลือดต่ำของสุนัข.....	74
1	ระดับ BALP ในซีรัมของสุนัขกระดูกหักกลุ่มควบคุมและกลุ่มศึกษา ก่อนและหลังได้รับ nandrolone laurate.....	90
2	ระดับ OC ในซีรัมของสุนัขกระดูกหักกลุ่มควบคุมและกลุ่มศึกษา ก่อนและหลังได้รับ nandrolone laurate.....	91
3	ระดับ alanine transaminase (ALT) และ alkaline phosphatase (ALP) ของสุนัขกระดูกหักกลุ่มควบคุม และกลุ่มศึกษาในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 8 ของการศึกษา.....	92
4	จำนวนเม็ดเลือดแดงเฉลี่ย ค่าฮีโมโกลบิน และค่าฮีมาโตคริตของสุนัขกระดูกหักกลุ่มควบคุม และกลุ่มศึกษาในสัปดาห์ที่ 0 – 12 ของการศึกษา.....	93

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2 – 1	เนื้อเยื่อ 4 กลุ่มใหญ่ คือ กระดูกเนื้อแน่น (cortical bone) เยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) เนื้อเยื่ออ่อนบริเวณรอบ ๆ กระดูกหัก (external soft tissue) และไขกระดูก (bone marrow).....	4
2 – 2	กระบวนการซ่อมแซมกระดูกหักในวันที่ 7.....	7
2 – 3	กระบวนการซ่อมแซมกระดูกหักในวันที่ 14.....	8
2 – 4	กระบวนการซ่อมแซมกระดูกหักในวันที่ 21.....	9
2 – 5	กระบวนการซ่อมแซมกระดูกหักในวันที่ 28 – 35.....	10
2 – 6	กระบวนการสร้างกระดูกเนื้อแน่นโดยตรง (direct bone healing).....	11
2 – 7	ขนาดของช่องว่างระหว่างปลายกระดูกหักทั้งสองด้าน อัตราส่วนระหว่างความกว้างของขนาดช่องว่างที่เปลี่ยนไปต่อความกว้างเริ่มต้น เรียกว่า “strain”.....	13
2 – 8	การสร้างกระดูกจากกระดูกอ่อน (indirect bone healing) และการลดลงของ “strain” .....	13
2 – 9	ภาพถ่ายทางรังสีวินิจฉัยการเชื่อมกระดูกหัก.....	14
2 – 10	วงจรการสร้างกระดูก (bone remodeling cycle) จากการทำงานของเซลล์ 2 ชนิด คือ เซลล์ osteoclasts และเซลล์ osteoblasts.....	16
2 – 11	ไคอะแกรมของโครงสร้าง osteocalcin (OC) รวมถึงแสดง $\gamma$ -carboxylglutamyl (Gla) residues ที่ตำแหน่งที่ 17 21 และ 24 และการเชื่อมกันของตำแหน่งที่ 23 และ 29 ด้วยพันธะ disulphide.....	26
2 – 12	การเกิดกระบวนการ $\gamma$ -carboxylation ของ glutamyl (Glu) residues ให้ได้ เป็น $\gamma$ -carboxylglutamyl (Gla) residues โดยมีวิตามินเคเป็น co-factor.....	26
2 – 13	Intact osteocalcin และชิ้นส่วนต่าง ๆ ของ OC.....	27
2 – 14	ระดับ OC ในซีรัมของคนในภาวะปกติ ภาวะที่เกี่ยวข้องกับกระดูกหัก และภาวะที่ไม่เกี่ยวกับกระดูก.....	29
2 – 15	โครงสร้างทางเคมีที่คล้ายคลึงกันของ anabolic steroids (nandrolone ester) และฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน.....	33

ภาพที่	หน้า	
4 – 1	ระดับ BALP ในซีรัมของสุนัขกระดูกหักกลุ่มควบคุม และกลุ่มศึกษาก่อนและหลังได้รับ nandrolone laurate.....	44
4 – 2	ระดับ OC ในซีรัมของสุนัขกระดูกหักกลุ่มควบคุม และกลุ่มศึกษาก่อนและหลังได้รับ nandrolone laurate.....	46
4 – 3	ภาพรังสีวินิจฉัยของกระดูก radius และ ulna ที่หักในสุนัขกลุ่มควบคุมหลังการผ่าตัดแก้ไขโดยการใส่ plate และ screws.....	50
4 – 4	ภาพรังสีวินิจฉัยของกระดูก radius และ ulna ที่หักในสุนัขกลุ่มควบคุมหลังการผ่าตัดแก้ไขโดยการใส่ plate และ screws.....	51
4 – 5	ภาพรังสีวินิจฉัยของกระดูก femur ที่หักในสุนัขกลุ่มควบคุมหลังการผ่าตัดแก้ไขโดยการใส่ plate และ screws.....	52
4 – 6	ภาพรังสีวินิจฉัยของกระดูก femur ที่หักในสุนัขกลุ่มควบคุมหลังการผ่าตัดแก้ไขโดยการใส่ crosspins.....	53
4 – 7	ภาพรังสีวินิจฉัยของกระดูก humerus ที่หักในสุนัขกลุ่มควบคุมหลังการผ่าตัดแก้ไขโดยการใส่ pin.....	54
4 – 8	ภาพรังสีวินิจฉัยของกระดูก radius และ ulna ที่หักในสุนัขกลุ่มศึกษาที่ได้รับ nandrolone laurate หลังการผ่าตัดแก้ไขโดยการใส่ plate และ screws.....	55
4 – 9	ภาพรังสีวินิจฉัยของกระดูก radius และ ulna ที่หักในสุนัขกลุ่มศึกษาที่ได้รับ nandrolone laurate หลังการผ่าตัดแก้ไขโดยการใส่ plate และ screws.....	56
4 – 10	ภาพรังสีวินิจฉัยของกระดูก radius และ ulna ที่หักในสุนัขกลุ่มศึกษาที่ได้รับ nandrolone laurate หลังการผ่าตัดแก้ไขโดยการใส่ plate และ screws.....	57
4 – 11	ภาพรังสีวินิจฉัยของกระดูก tibia ที่หักในสุนัขกลุ่มศึกษาที่ได้รับ nandrolone laurate หลังการผ่าตัดแก้ไขโดยการใส่ plate และ screws.....	58
4 – 12	ภาพรังสีวินิจฉัยของกระดูก tibia และ fibular ที่หักในสุนัขกลุ่มศึกษาที่ได้รับ nandrolone laurate หลังการผ่าตัดแก้ไขโดยการใส่ external fixators.....	59
4 – 13	ระดับ ALT และ ALP ในซีรัมของสุนัขกระดูกหักกลุ่มควบคุมและกลุ่มศึกษาในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 8 ของการศึกษา.....	61

ภาพที่		หน้า
4 – 14	จำนวนเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยของสุนัขกระดูกหักกลุ่มควบคุม และกลุ่มศึกษา ก่อนและหลังได้รับ nandrolone laurate.....	64
4 – 15	ค่าฮีโมโกลบินของสุนัขกระดูกหักกลุ่มควบคุม และกลุ่มศึกษา ก่อนและหลังได้รับ nandrolone laurate.....	65
4 – 16	ค่าฮีมาโตคริตของสุนัขกระดูกหักกลุ่มควบคุม และกลุ่มศึกษา ก่อนและหลังได้รับ nandrolone laurate.....	66

### คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

$\alpha$	=	Alpha
$\gamma$	=	Gamma
$10^6/\mu\text{L}$	=	$10^6$ per microliter
ALP	=	Alkaline phosphatase
BALP	=	Bone alkaline phosphatase
$\text{Ca}^2$	=	Calcium ion
CALP	=	Corticosteroid-induced alkaline phosphatase
CT	=	Computed tomography
DPD, Dpd	=	Deoxypyridinoline
EIA	=	Enzyme immunoassay
ELISA	=	Enzyme-linked immunoabsorbent assay
fL	=	Femtoliters
g/dL	=	Grams per deciliter
Gla	=	Glutamic acid
GnRH agonist	=	Gonadotropin releasing hormone Agonist
Hb	=	Hemoglobin
HPLC	=	High-performance liquid chromatograph
$\text{H}_2\text{SO}_4$	=	Sulfuric acid, Sulphuric acid
IALP	=	Intestinal alkaline phosphatase
iBALP	=	Immunoreactive BALP
ICTP	=	C-terminal pyridinoline cross-linked telopeptide or C-telopeptide
IgG	=	Immunoglobulin G
IRMA	=	Immunoradiometric assay
KCl	=	Potassium chloride
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	=	Potassium dihydrogen phosphate
LALP	=	Liver alkaline phosphatase

mo	=	Month
MRI	=	Magnetic resonance imaging
MCH	=	Mean corpuscular hemoglobin
MCHC	=	Mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV	=	Mean corpuscular volume
NaCl	=	Sodium chloride
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	=	Disodium hydrogen phosphate Dodecahydrate
NaOH	=	Sodium hydroxide
OC	=	Osteocalcin
P	=	Phosphorous ion
PBS	=	Phosphate buffered saline
PCV	=	Packed cell volume, haematocrit
Pg	=	picograms
$\text{PGE}_2$	=	Prostaglandin E2
PICP	=	Carboxy-terminal Procollagen I Extension Peptides
PIIINP	=	Amino-terminal procollagen III extension Peptide
PINP	=	Amino-terminal Procollagen I Extension Peptides
pNPP	=	<i>p</i> -nitro-phenyl phosphate
PYD, Pyd	=	Pyridinoline
RBC	=	Red blood cell
RIA	=	Radioimmunoassay
SGPT	=	Serum glutamic pyruvic transaminase
Tc-MDP	=	Tc-Methyl diphosphonate
TRACP, TRAP	=	Tartrate-resistant acid phosphatase
U/L	=	Unit per liter

wk	=	Week
yr	=	Year
>	=	มากกว่า
<	=	น้อยกว่า
น.	=	นาฬิกา

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การเชื่อมของกระดูกหัก เป็นการซ่อมแซมส่วนของกระดูกที่หัก โดยอาศัยการทำงานของระบบต่าง ๆ ในร่างกาย และปัจจัยเฉพาะที่ เพื่อให้กระดูกส่วนที่หัก กลับมามีลักษณะโครงสร้าง และการทำงานตามปกติมากที่สุด เมื่อมีการหักของกระดูกเกิดขึ้น ร่างกายจะมีการตอบสนองในระยะต่าง ๆ โดยแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอน ซึ่งในแต่ละขั้นตอนจะเกิดซ้อนกัน (overlapping stages) คือ กระบวนการอักเสบ (inflammatory stage) กระบวนการซ่อมแซม (reparative stage) และกระบวนการปรับรูปกระดูก (remodeling stage)

กระบวนการอักเสบจะเกิดขึ้นภายหลังการหักของกระดูก เริ่มจากเกิดการคั่งของเลือดบริเวณนั้น เพื่อนำเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory cells) เข้ามา ร่วมกับการสร้างเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน (granulation tissues) เพื่อยึดรอยต่อของกระดูกที่หัก จากนั้นอาศัยกระบวนการซ่อมแซม เพื่อหลั่งสารพิน (osteoids) จากเซลล์ osteoblast มาพอกเป็นกระดูกซ่อม (callus) บริเวณกระดูกที่หัก และมีการเติมแร่ธาตุ (mineralization) เพื่อให้เกิดความแข็งแรง และมีการเชื่อมกันของกระดูกหักอย่างสมบูรณ์ เมื่อกระดูกที่หักเชื่อมกันแล้ว จะเกิดกระบวนการปรับรูปกระดูก โดยเซลล์ osteoclast เพื่อให้กระดูกบริเวณนั้นกลับมามีลักษณะ โครงสร้าง และการทำงานได้ตามปกติ จากขั้นตอนต่าง ๆ ดังกล่าวมานี้ การเชื่อมของกระดูกที่หัก จะใช้เวลาแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับหลาย ๆ ปัจจัย เช่น อายุของสุนัข ลักษณะการหักของกระดูก รวมถึงวิธีการที่ใช้ในการแก้ไขกระดูกหัก ซึ่งนอกจากให้การเชื่อมของกระดูกเกิดขึ้นตามกระบวนการของร่างกายแล้ว ในบางกรณีอาจต้องอาศัยปัจจัยเพิ่มเติมจากภายนอกเพื่อให้การเชื่อมของกระดูกเกิดได้เร็วมากยิ่งขึ้น เช่น การให้แคลเซียมเสริมโดยการกิน หรือการฉีดสารในกลุ่มของ anabolic steroids ซึ่งอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เพื่อช่วยเร่งการเชื่อมของกระดูกที่หักได้

Nandrolone laurate หรือ 19-nor-testosterone based steroid เป็น anabolic steroids สังเคราะห์ที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน แต่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างอะตอมของคาร์บอนตำแหน่งที่ 19 โดยการแทนที่ด้วย dodecanoic ester (laurate) ของ nandrolone ทำให้มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการสร้าง (anabolic effect) เพิ่มขึ้น และฤทธิ์ที่เกี่ยวกับลักษณะความเป็นชาย (androgenic effect) ลดลง ส่งผลให้ฤทธิ์ที่เกี่ยวกับลักษณะความเป็นชายต่ำกว่าฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (Plumb, 2005) ได้มีการศึกษาผลของ nandrolone



decanoate ต่อมวลกระดูก (bone mineral content) และความหนาแน่นของกระดูก (bone mineral density) ร่วมกับการได้รับแคลเซียมเสริมชนิดกินในผู้หญิงที่มีภาวะกระดูกบาง (osteoporosis) หลังวัยหมดประจำเดือน (post-menopausal) พบว่า nandrolone decanoate มีประสิทธิภาพในการเพิ่มมวลกระดูกโดยไปยับยั้งการสลายของมวลกระดูก ซึ่งสอดคล้องกับการลดลงของ bone resorption marker ที่วัดได้จากปัสสาวะ (Gennari et al, 1989) ในขณะที่ bone formation marker ชนิด osteocalcin มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นอีกด้วย (Passeri et al, 1993) ในสัตว์สปีชีส์อื่น ๆ มีการศึกษาผลของ nandrolone ester พบว่า nandrolone phenylpropionate มีผลทำให้กะโหลกศีรษะ ขากรรไกรบนและล่างของหนูขาวเพศเมียมีความยาวเพิ่มขึ้น (Noda et al, 1994) และ nandrolone decanoate มีผลต่อการเจริญเติบโตของกระดูกขากรรไกรล่างของหนูขาววัยเด็ก (juvenile) และหนูขาวที่โตเต็มวัย (adult) (Gebhardt and Pancherz, 2003) อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะมีการศึกษาผลของ nandrolone ester ต่อกระดูก และมีการแนะนำให้ใช้ nandrolone ester ในการเสริมการเชื่อมของกระดูกหักทางคลินิกในสุนัข แต่ยังไม่มียารายงานการศึกษาผลของ nandrolone ester ต่อการเชื่อมกระดูกหักของสุนัขที่แน่นอน จึงเป็นที่มาของการศึกษา เพื่อยืนยันผลของ nandrolone laurate ต่อการเชื่อมของกระดูกหักในสุนัข ซึ่งเป็น nandrolone ester ชนิดที่มีจำหน่าย และได้รับการขึ้นทะเบียนให้ใช้สำหรับสัตว์ในประเทศไทย

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของ nandrolone laurate ต่อการเชื่อมของกระดูกหัก โดยเปรียบเทียบผลการใช้ nandrolone laurate เสริมการรักษาการเชื่อมของกระดูกหักในสุนัขที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัด กับสุนัขที่ไม่ได้รับ nandrolone laurate เสริมการรักษาการเชื่อมของกระดูกหัก เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการตัดสินใจของสัตวแพทย์ในการเลือกใช้ nandrolone laurate

### คำสำคัญ (Keywords)

Nandrolone laurate, osteocalcin, bone alkaline phosphatase, การเชื่อมของกระดูกหัก, สุนัข

Nandrolone laurate, osteocalcin, bone alkaline phosphatase, fracture healing, dog

## คำถามสำหรับการวิจัย

1. Nandrolone laurate มีประสิทธิภาพในการเร่งการเชื่อมของกระดูกหักหรือไม่ โดยเปรียบเทียบจากผลในสุนัขที่ได้รับ nandrolone laurate เสริมการรักษาภาวะกระดูกหักด้วยการผ่าตัด กับสุนัขที่ไม่ได้รับ nandrolone laurate

2. การใช้ formation marker ของกระดูก (osteocalcin และ bone alkaline phosphatase) เป็นตัวประเมินผลของ nandrolone laurate ต่อการเชื่อมของกระดูกหัก ว่ามีความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ต่อการเชื่อมของกระดูกหักในสุนัขหรือไม่ ร่วมกับการใช้รังสีวินิจฉัยประกอบในการประเมิน

## สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis)

Nandrolone laurate มีผลช่วยเร่งการเชื่อมของกระดูกหักในสุนัขได้ดีขึ้น โดยมีผลเพิ่ม osteocalcin และ bone alkaline phosphatase เมื่อเปรียบเทียบกับการเชื่อมของกระดูกหักในกรณีที่ไม่ได้รับ nandrolone laurate ภายหลังจากแก้ไขภาวะกระดูกหักด้วยวิธีทางศัลยกรรมแล้ว

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

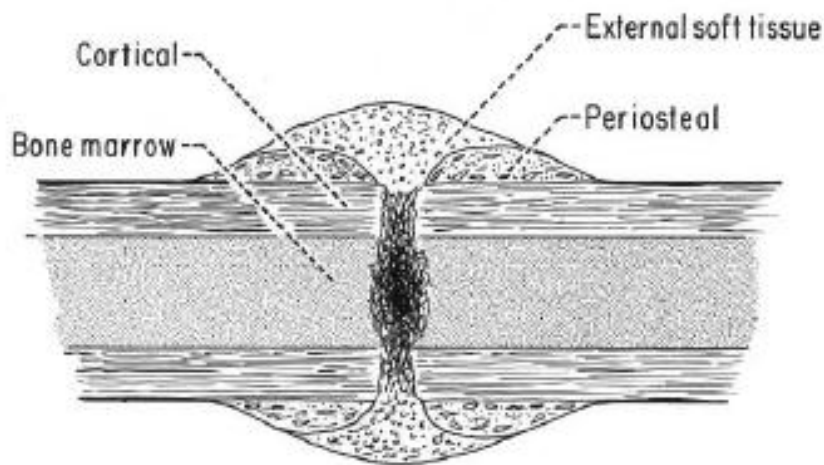
ข้อมูลที่ได้รับจากการศึกษาในครั้งนี้ จะเป็นความรู้เพื่อยืนยันว่าการใช้ยา nandrolone laurate สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการหายของกระดูกที่หักให้ดีขึ้นหรือเร็วขึ้น และคาดหวังว่าผลการวิจัยในครั้งนี้จะมีประโยชน์ต่อสัตวแพทย์ในการใช้ยาอย่างเหมาะสมมากขึ้น

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1. การเชื่อมของกระดูกหัก (fracture healing)

การเชื่อมของกระดูกหักเป็นการตอบสนองของร่างกาย เพื่อซ่อมแซมกระดูกส่วนที่หักให้กลับมามีลักษณะและการทำงานได้ตามปกติ โดยอาศัยการทำงานของระบบต่าง ๆ ในร่างกาย และปัจจัยเฉพาะที่ ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของเนื้อเยื่อหลัก 4 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กระดูกเนื้อแน่น (cortical bone) เยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) เนื้อเยื่ออ่อนบริเวณรอบ ๆ กระดูกหัก (external soft tissue) และไขกระดูก (bone marrow) ดังภาพที่ 2-1 (Einhorn, 2005)



ภาพที่ 2-1 เนื้อเยื่อ 4 กลุ่มใหญ่ คือ กระดูกเนื้อแน่น (cortical bone) เยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) เนื้อเยื่ออ่อนบริเวณรอบ ๆ กระดูกหัก (external soft tissue) และไขกระดูก (bone marrow) ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของร่างกายต่อการเชื่อมของกระดูกหัก (Einhorn, 2005)

การจำกัดการเคลื่อนของปลายกระดูกหักทั้งสองด้าน โดยการใช้เครื่องมือยึดตรึงกระดูกหักภายในอย่างแน่นหนา (rigid internal fixation) ทำให้เกิดการสร้างกระดูกเนื้อแน่นโดยตรง (primary cortical healing) เพื่อมาซ่อมแซมกระดูกที่หัก โดยเป็นการทำงานของกลุ่มเนื้อเยื่อกระดูกเนื้อแน่นเป็นหลัก ร่วมกับการทำงานของเยื่อหุ้มกระดูก เนื้อเยื่ออ่อนบริเวณรอบ ๆ กระดูกหัก และไขกระดูกเพียงบางส่วน จนกระทั่งเกิดการเชื่อมต่อของกระดูกที่หักทั้งสองด้าน การสร้างเนื้อกระดูกแน่นโดยตรงนี้เกิดจากการทำงานของเซลล์ 2 ชนิด คือ เซลล์ osteoclasts และ เซลล์ osteoblasts (Einhorn, 2005) โดยเซลล์ osteoclasts ทำหน้าที่เก็บกินเซลล์กระดูกเก่า จากนั้นจะเป็นการสร้างกระดูกใหม่โดยเซลล์ osteoblasts (Watts, 1999) อย่างไรก็ตามการแก้ไขภาวะกระดูกหักส่วนใหญ่ ไม่สามารถแก้ไขโดยวิธีการใช้เครื่องมือยึดตรึงกระดูกภายในอย่างแน่น

หนาได้ จึงมีความจำเป็นต้องแก้ไขด้วยวิธีการใช้เครื่องมือยึดตรึงกระดูกหักภายนอก (external fixation) หรือการใช้เครื่องมือยึดตรึงภายในโพรงกระดูก (intramedullary fixation) แทน ดังนั้น การตอบสนองของเนื้อเยื่อบริเวณกระดูกหักจึงมีความแตกต่างออกไป การเชื่อมกระดูกหักในกรณีดังกล่าวจะมีการสร้างกระดูกอ่อน (endochondral bone formation) และการสร้างเนื้อเยื่อภายใน (intramembranous) เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย ซึ่งเป็นการตอบสนองของเนื้อเยื่อหลักที่สำคัญ คือ เยื่อหุ้มกระดูก และเนื้อเยื่ออ่อนบริเวณรอบ ๆ กระดูกหัก และนอกจากนี้การบอบช้ำ (trauma) จากผ่าตัดแก้ไขภาวะกระดูกหักโดยศัลยสัตวแพทย์ก็ทำให้เกิดการเชื่อมของกระดูกหักโดยมีการสร้างกระดูกอ่อนด้วยเช่นกัน (Einhorn, 2005)

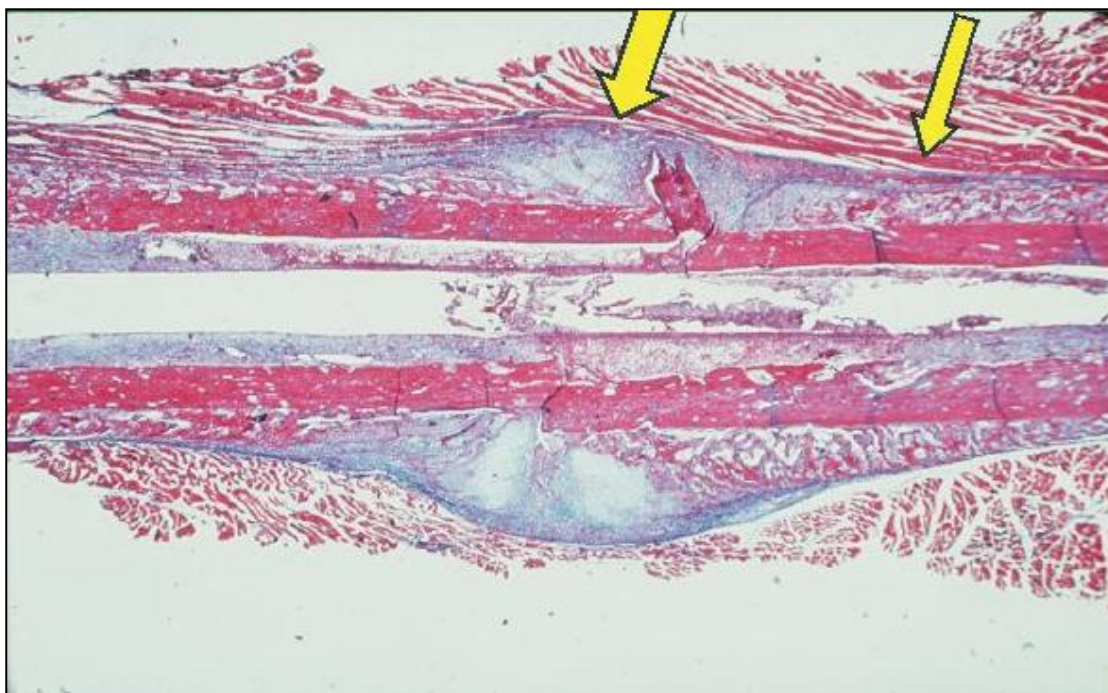
กระดูกมี 2 ชนิด คือ กระดูกเนื้อแน่น (cortical bone) เป็นกระดูกที่มีเนื้อกระดูกแน่น ทำหน้าที่รับน้ำหนัก หรือพยุงร่างกาย มีความเกี่ยวข้องกับเคลื่อนไหวของร่างกาย กระดูกเนื้อแน่นประกอบขึ้นเป็นกระดูกท่อนยาวในส่วนของกระดูกทรงยาค์ (appendicular skeleton) และเป็นส่วนของเปลือกหุ้มภายนอกของกระดูก ในร่างกายประกอบด้วยกระดูกชนิดนี้ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ กระดูกอีกชนิดหนึ่งคือ กระดูกเนื้อโปร่ง (cancellous หรือ trabecular bone) เป็นกระดูกที่มีลักษณะเนื้อฟ้ามคล้ายฟองน้ำ หรือรวงผึ้ง เป็นโครงสร้างกระดูกที่เหมาะสมสำหรับการสร้างเนื้อกระดูกใหม่ เพื่อให้มีพื้นที่ผิวมากสำหรับการสะสมแร่ธาตุ (mineralized) กระดูกชนิดนี้สร้างขึ้นเป็นส่วนเนื้อด้านในของกระดูกสันหลัง (vertebrae) และกระดูกสะโพก (pelvis) และเป็นส่วนประกอบส่วนท้ายของกระดูกท่อนยาวแกนกลางของลำตัว (axial หรือ central skeleton) (Watts, 1999)

กระบวนการสร้างกระดูกเพื่อเชื่อมกระดูกหักมี 3 ขั้นตอนหลัก โดยแต่ละขั้นตอนนั้นเกิดคาบเกี่ยวกัน (overlapping stages) ได้แก่ กระบวนการอักเสบ (inflammatory stage) กระบวนการซ่อมแซม (reparative stage) และกระบวนการปรับรูปกระดูก (remodeling stage)

กระบวนการอักเสบเริ่มขึ้นเมื่อเกิดการหักของกระดูก โดยมีเลือดมาคั่งบริเวณนั้น ภายใน 1 ชั่วโมงหรือ 1 วัน เพื่อนำเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory cells) เข้ามา เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหลายนิวเคลียส (polymorphonuclear leukocytes) โมโนไซต์ (monocytes) ลิมโฟไซต์ (lymphocytes) และมาโครฟาจ (macrophages) เป็นต้น จากนั้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) จะเข้ามายังบริเวณที่กระดูกเกิดความเสียหาย ภายใต้การทำงานของพรอสตาแกลนดิน  $E_2$  ( $PGE_2$ ) และเกิดการสร้างเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน (granulation tissue) กับเนื้อเยื่อหลอดเลือด (vascular tissue) ขึ้น รวมถึงมีการเข้ามาของเซลล์เนื้อเยื่อเมสเซนไคม์ (mesenchymal cells) ด้วย (Hulth, 1989, Kalfas, 2001)

ภายหลังการอักเสบ กระบวนการซ่อมแซมจะเริ่มเกิดขึ้น โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ จะเรียงตัวที่เนื้อเยื่อค้ำ (stroma) ของกระดูก เพื่อช่วยพยุงเนื้อเยื่อหลอดเลือดที่สร้างใหม่ และใน ขณะเดียวกันจะเกิดการเรียงตัวของคอลลาเจน (collagen matrix) ซึ่งเกิดพร้อมกับการสร้างสาร พื้น (osteoid) เกิดการสร้างกระดูกซ่อมชนิดอ่อน (soft callus) รอบ ๆ บริเวณนั้น โดยในระหว่าง 4 ถึง 6 สัปดาห์แรก กระดูกซ่อมบริเวณนี้จะมีความอ่อนแอมาก ต้องอาศัยการปกป้องด้วยเครื่องค้ำ จุน หรือเครื่องมือในการยึดตรึงกระดูก จนกระทั่งเกิดการสร้างเนื้อกระดูกขึ้นมาเพื่อเชื่อมกระดูกหัก และเกิดการสะสมแร่ธาตุต่อไป หากช่วงนี้ไม่มีการจำกัดการเคลื่อนไหวของปลายกระดูกหักทั้งสอง ด้าน จะทำให้เกิดการเชื่อมของกระดูกหักด้วยเนื้อเยื่อเส้นใย (fibrous) แทนกระดูกซ่อม ซึ่งมีความ แข็งแรงน้อยกว่า (Kalfas, 2001)

กระบวนการซ่อมแซมกระดูกหักในวันที่ 7 ถึง 10 จะมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างกระดูกอ่อน (chondrogenesis) (ภาพที่ 2-2) ทำให้เกิดการสร้างกระดูกอ่อนเชื่อมต่อกับส่วน กระดูกที่หัก และเกิดการสร้างกระดูกจากเซลล์ตั้งต้น (osteoprogenitor cells) ภายใต้อิทธิพลของ ฮอร์โมนกระดูก ซึ่งในช่วงนี้ยังมีการตอบสนองของเซลล์อักเสบต่าง ๆ อยู่ และเซลล์เหล่านี้ยังทำหน้าที่หลั่ง สารไซโตไคน์ (Einhorn, 2005) เช่น interleukin-1 และ interleukin-6 เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้าง โมเลกุล เช่น transforming growth factor beta และ platelet-derived growth factor โมเลกุล เหล่านี้มีความสำคัญในการควบคุมการแบ่งตัวและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (cell proliferation and differentiation) เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เกิด chemotaxis และการสร้างหลอดเลือด (angiogenesis) อีกด้วย (Kalfas, 2001)



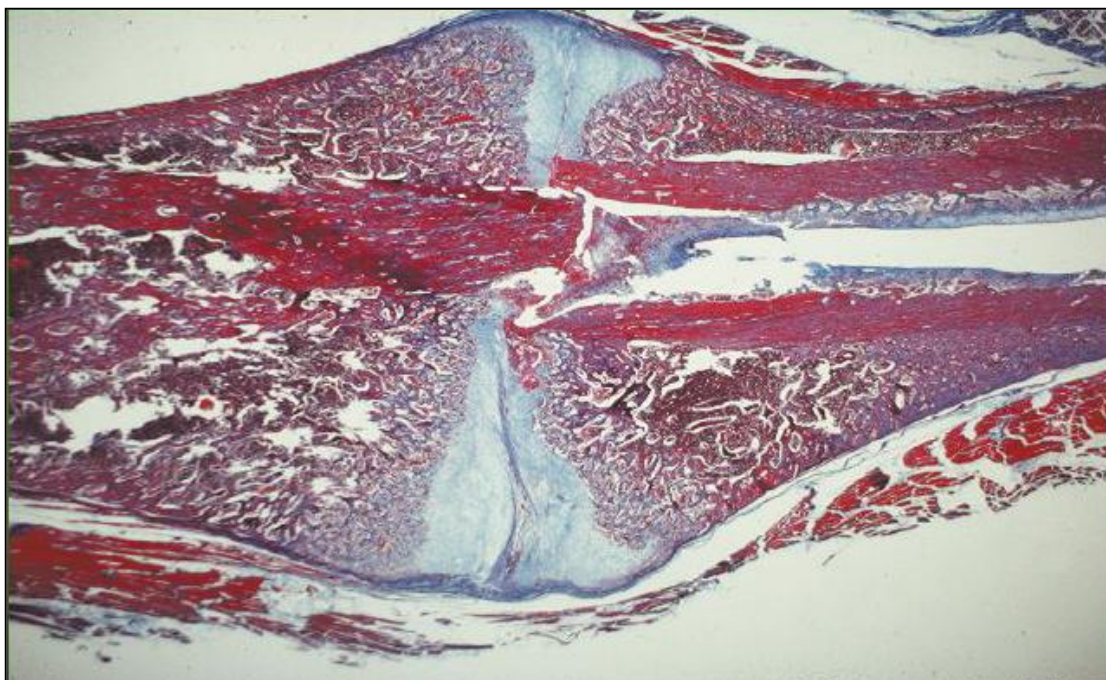
ภาพที่ 2-2 กระบวนการซ่อมแซมกระดูกหักในวันที่ 7 (ลูกศรหนา) มีการสร้างกระดูกอ่อนและการตอบสนองของเซลล์อักเสบต่าง ๆ บริเวณกระดูกหัก และ (ลูกศรบาง) การสร้างกระดูกจากเซลล์ตั้งต้นภายใต้เยื่อหุ้มกระดูก (Einhorn, 2005)

ในวันที่ 14 เกิดการสร้างกระดูกอ่อนภายใต้เยื่อหุ้มกระดูกมากขึ้น ในขณะที่การสร้างกระดูกอ่อนเพื่อเชื่อมกระดูกหักยังคงดำเนินไปเรื่อย ๆ นั้น กระดูกอ่อนบางส่วนเริ่มมีการสะสมแคลเซียม (calcification) ดังนั้น ในเบื้องต้นจึงพบว่ากระดูกซ่อมบริเวณกระดูกหักจะประกอบด้วยกระดูกอ่อนปริมาณมากที่พร้อมจะเกิดการสะสมแคลเซียม ในขั้นตอนของการสะสมแคลเซียมนั้น เซลล์กระดูกอ่อน (chondrocytes) จะหลั่งเอนไซม์ออกมา 2 ชนิด คือ เอนไซม์ phosphatases และเอนไซม์ proteases โดยเอนไซม์ phosphatases ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งให้เซลล์ไมโทคอนเดรียปล่อยแคลเซียมออกมา และไปสะสมอยู่ที่กระดูกอ่อน ส่วนเอนไซม์ proteases จะไปลดการทำงานของ proteoglycans ที่ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการเปลี่ยนและสะสมแร่ธาตุ (mineralization) ซึ่งจะทำให้เกิดการควบคุมการทำงานของเซลล์กระดูกอ่อนทั้งอัตราการทำงานและส่วนประกอบทางเคมี (physical chemistry) ของขั้นตอนการเปลี่ยนและการสะสมแร่ธาตุ (Einhorn, 2005)(ภาพที่ 2-3)



**ภาพที่ 2-3** กระบวนการซ่อมแซมกระดูกหักในวันที่ 14 (ลูกศร) เกิดกระบวนการสะสมแร่ธาตุในกระดูกอ่อน ที่บริเวณระหว่างกระดูกอ่อนชนิดกระดูกอ่อน (cartilaginous callus) และเนื้อเยื่อกระดูกที่สร้างจากเซลล์ตั้งต้นภายใต้เยื่อหุ้มกระดูก (Einhorn, 2005)

วันที่ 21 ของการเชื่อมกระดูกหัก กระดูกอ่อนชนิดกระดูกอ่อนส่วนใหญ่จะเกิดการสะสมแคลเซียมแล้ว และพร้อมจะถูกเปลี่ยนหรือแทนที่ด้วยกระดูก เนื้อเยื่อในช่วงนี้จะเป็นเป้าหมายของเซลล์ chondroclasts ซึ่งจะทำหน้าที่ในการสลาย (resorption) เนื้อเยื่อที่มีการสะสมแคลเซียม ในขณะที่เซลล์ chondroclasts กำลังสลายเนื้อเยื่อที่มีการสะสมแคลเซียมนั้น ยังมีการส่งสัญญาณให้หลอดเลือดแทรกเข้ามายังเนื้อเยื่อบริเวณนี้ เพื่อนำ perivascular mesenchymal stem cells เข้ามา ซึ่งจะพัฒนาไปเป็นเซลล์ตั้งต้นของเซลล์สร้างกระดูกหรือ osteoblast นั่นเอง นอกจากนี้มีการเปลี่ยนหรือแทนที่กระดูกอ่อนที่มีการสะสมแคลเซียมโดยการดูดกลับแร่ธาตุแล้ว ยังเป็นการกำจัดตัวเองของเซลล์ chondrocytes อีกด้วย โดยพบว่า ในขณะที่อยู่ระหว่างการสร้างกระดูกอ่อนเพื่อเชื่อมต่อกระดูกหัก เซลล์ chondrocytes เหล่านี้ จะอยู่ภายใต้การเกิดกระบวนการ programmed cell death (apoptosis) ด้วย ในการสลายกระดูกอ่อนที่มีการสะสมแคลเซียมนั้น เซลล์ chondrocytes จะจับอยู่เป็นส่วนหนึ่งใน extracellular matrix และนำเสนอ teopontin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่จับกับเซลล์ osteoclasts และทำให้เกิดการปรับเปลี่ยนรูปร่างกระดูกต่อไป (Einhorn, 2005) (ภาพที่ 2-4)

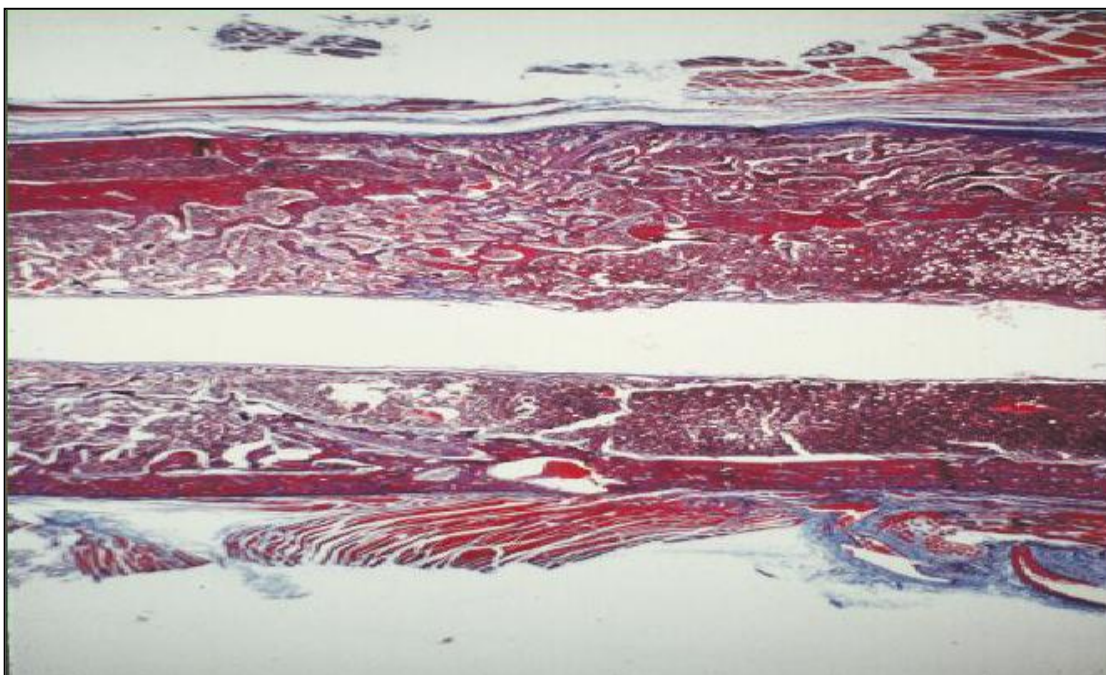


ภาพที่ 2-4 กระบวนการซ่อมแซมกระดูกหักในวันที่ 21 กระดูกซ่อมชนิดกระดูกอ่อนส่วนใหญ่เกิดการสะสมแร่ธาตุแล้ว (Einhorn, 2005)

ภายหลังการเชื่อมของกระดูกหัก เพื่อให้กระดูกกลับมามีรูปร่าง โครงสร้าง และการทำงานเหมือนเดิม ต้องอาศัยกระบวนการปรับรูปกระดูก ประมาณวันที่ 28 ถึง 35 การเกิดการสะสมแคลเซียมจะเกิดขึ้นร่วมกับการสร้างเนื้อกระดูกใหม่ลักษณะเป็นร่างแห (woven bone) ซึ่งในช่วงเวลานี้เซลล์ osteoclasts จะเข้ามาทำหน้าที่ในการปรับรูปกระดูกซ่อม และเปลี่ยนโครงสร้างของกระดูกเป็นลักษณะแผ่นกระดูก (lamellar bone) เรียงเป็นชั้น (Einhorn, 2005) (ภาพที่ 2-5) ซึ่งกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ต้องอาศัยระยะเวลาเป็นเดือนถึงปี (Kalfas, 2001)

เมื่อการเชื่อมของกระดูกหักปกติ (clinical union) เกิดขึ้นโดยสมบูรณ์ สามารถพิจารณาถอดเครื่องมือหรืออุปกรณ์สำหรับยึดตรึงกระดูกหักออกได้ สัตว์ที่มีกระดูกหักกลับมาใช้งานกระดูกส่วนนั้นได้ตามปกติ ซึ่งระยะเวลาในการเชื่อมของกระดูกหักนี้ใช้เวลาแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเครื่องมือที่ใช้ยึดตรึงกระดูกที่หัก รวมถึงช่วงอายุที่แตกต่างกันของสัตว์ด้วย ดังตารางที่ 2-1 (Thrall, 2002)





**ภาพที่ 2-5** กระบวนการซ่อมแซมกระดูกหักในวันที่ 28-35 เกิดการสะสมแร่ธาตุในกระดูกอ่อน และเกิดการสร้างกระดูกใหม่ลักษณะเป็นร่างแห (Einhorn, 2005)

**ตารางที่ 2-1** ระยะเวลาในการเชื่อมของกระดูกหักในการแก้ไขภาวะกระดูกหักด้วยเครื่องมือชนิดต่าง ๆ ของแต่ละช่วงอายุของสัตว์ (Thrall, 2002)

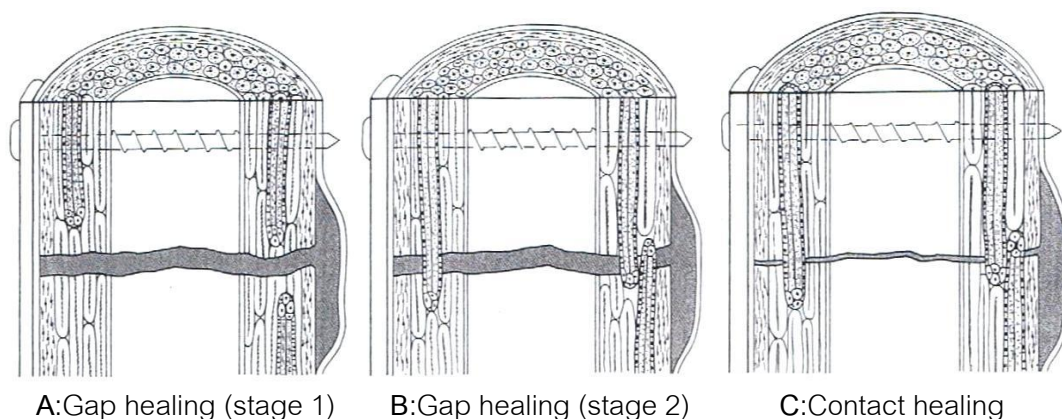
Age of Animal	External Skeletal and	
	Intramedullary Pin	Plates
	Fixation	
Under 3 mo	2-3 wk	4 wk
3-6 mo	4-6 wk	2-3 mo
6-12 mo	5-8 wk	3-4 mo
Over 1 yr	7-12 wk	5-8 mo

## 2. การสร้างกระดูก (bone formation) เพื่อเชื่อมกระดูกหัก

การสร้างกระดูก (bone formation) เพื่อเชื่อมกระดูกหัก ทั้งการสร้างกระดูกเนื้อแน่นโดยตรง [direct bone healing] การสร้างกระดูกจากกระดูกอ่อน (cartilaginous precursor หรือ endochondral bone) [indirect bone healing] และการสร้างกระดูกโดยไม่มีการสร้างกระดูกอ่อน [intramembranous bone healing] ซึ่งเกิดขึ้นได้โดยอาศัยกลไกของสิ่งแวดล้อมในบริเวณที่มีกระดูกหัก (Fossum, 2002) มีรายละเอียดและความแตกต่างของการสร้างกระดูกดังนี้

## 2.1 การสร้างกระดูกเนื้อแน่นโดยตรง (Direct bone healing หรือ primary bone healing)

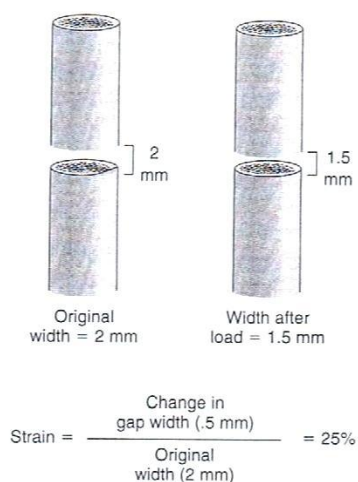
การสร้างกระดูกแบบนี้ เป็นการซ่อมแซมและสร้างกระดูกเนื้อแน่นโดยตรงเพื่อเชื่อมกระดูกหัก และไม่มีการสร้างกระดูกซ่อม การหายของกระดูกในลักษณะนี้จะเกิดขึ้นเมื่อมีการแตะกันของปลายกระดูกหักทั้งสองข้างอย่างสมบูรณ์และมีความคงที่ เช่น ในกรณีการแก้ไขภาวะกระดูกหักโดยการใช้เครื่องมือยึดตรึงกระดูกหักภายในอย่างแน่นหนา ทำให้มีช่องว่างระหว่างปลายกระดูกทั้งสองข้างน้อยมาก (150-300 ไมครอน) การสร้างกระดูกโดยตรงบริเวณรอยต่อกระดูกหักนี้ เรียกว่า “gap healing” เริ่มจากมีการสร้างใยกระดูก (fibrous bone) ขึ้นเป็นร่างแหมาเติมบริเวณรอยต่อของกระดูกหัก (ภาพที่ 2-6A) ขั้นตอนต่อมาของการเชื่อมกระดูกหักเรียกว่า “haversian remodeling” (ภาพที่ 2-6B) โดยเซลล์ osteoclast จะทำหน้าที่ในการสลายเนื้อกระดูกให้เกิดโพรงไปตามความยาวของเนื้อกระดูกจนสุดปลายกระดูกหัก และผ่านช่องว่างระหว่างกระดูกหักไปยังปลายกระดูกหักอีกข้างหนึ่ง จากนั้นเซลล์ osteoblast จะทำหน้าที่ที่หลังสารพื้น (osteoids) มาเติมในโพรงกระดูกที่เกิดขึ้น พร้อมกับเกิดการสะสมแร่ธาตุของกระดูกใหม่ด้วย โดยกระดูกที่สร้างขึ้นใหม่เพื่อเชื่อมรอยต่อของกระดูกหักจะมีลักษณะเป็นแผ่นกระดูกเรียงเป็นชั้นซึ่งจะมีความแข็งแรง และทำให้เกิดการเชื่อมของกระดูกหักได้อย่างสมบูรณ์ (ภาพที่ 2-6C) (McKibbin, 1978; Fossum, 2002) ภาพถ่ายทางรังสีวินิจฉัยของการเชื่อมกระดูกหักในลักษณะนี้ จะมีปริมาณของกระดูกซ่อมที่น้อยมาก รอยที่บริเวณปลายกระดูกหักจะค่อย ๆ หายไป และรอยหักของกระดูก (fracture line) จะหายไปอย่างรวดเร็ว (Thrall, 2002)



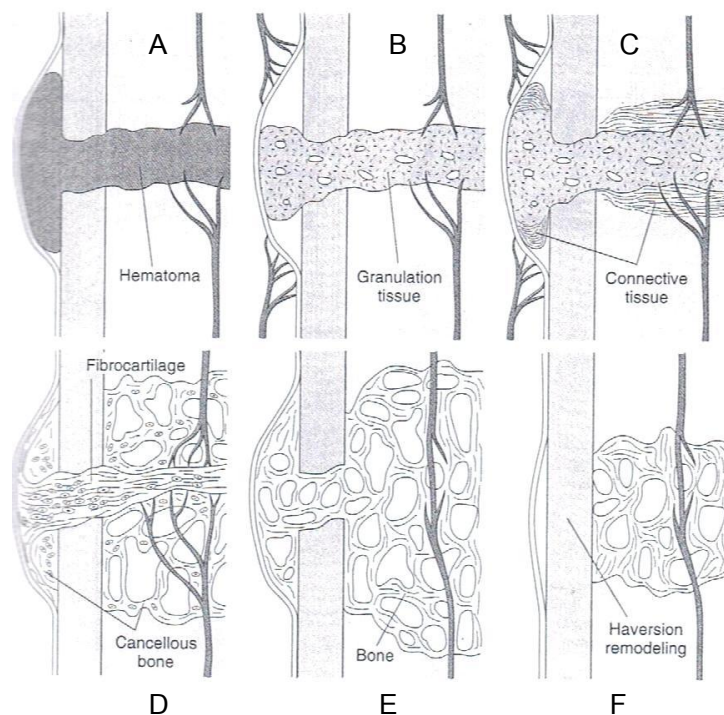
ภาพที่ 2-6 กระบวนการสร้างกระดูกเนื้อแน่นโดยตรง (direct bone healing) (A) บริเวณรอยต่อกระดูกหัก หรือ “gap healing” มีการสร้างใยกระดูกขึ้นมาเป็นร่างแห (B) ขั้นตอน “haversian remodeling” ในการเชื่อมกระดูกหักโดยเซลล์ osteoclast และเซลล์ osteoblast (C) การเชื่อมของกระดูกหักโดยสมบูรณ์ (Fossum, 2002)

## 2.2 การสร้างกระดูกจากกระดูกอ่อน (Indirect bone healing หรือ secondary bone healing)

การสร้างกระดูกในกรณีนี้ เกิดขึ้นเมื่อรอยต่อของปลายกระดูกหักทั้งสองข้างไม่คงที่ มีการเคลื่อนที่ของปลายกระดูกหักที่อยู่ติดกัน การเคลื่อนที่ของปลายกระดูกหักที่อยู่ติดกันเกิดขึ้นได้จากกระดูกหักที่ไม่ได้รับการรักษาแก้ไขที่ถูกต้องวิธี หรือข้อจำกัดของการลดการเคลื่อนที่ของปลายกระดูกหักทั้งสองข้างจากการแก้ไขภาวะกระดูกหักโดยการใส่เฝือก (casts) การใช้แท่งเหล็กยึดตรึงภายในโพรงกระดูก (intramedullary pins) การใช้อุปกรณ์ยึดตรึงกระดูกภายนอก (external fixators) หรือแผ่นเหล็กยึดกระดูก (bone plates) เป็นต้น ซึ่งการเคลื่อนที่ของปลายกระดูกหักทั้งสองข้างมีผลต่อขนาดช่องว่างระหว่างปลายกระดูกหักทั้งสองด้าน อัตราส่วนระหว่างความกว้างของขนาดช่องว่างที่เปลี่ยนไปต่อความกว้างเริ่มต้น เรียกว่า “strain” (ภาพที่ 2-7) strain ที่ลดลงขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย หนึ่งในปัจจัยนั้นคือ การลดการเคลื่อนที่ของปลายกระดูกหักโดยอาศัยการสร้างกระดูกซ่อมภายนอก (external หรือ periosteal callus) มาพอกบริเวณรอบ ๆ รอยต่อของกระดูกหัก เพราะการเพิ่มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณรอยต่อกระดูกหักจะช่วยต้านการงอของกระดูกได้ การสร้างเยื่อภายในกระดูก (intramembranous bone) เพื่อเชื่อมกระดูกหักเกิดขึ้นภายใต้เยื่อหุ้มกระดูกโดยเริ่มจากบริเวณปลายกระดูกหักทั้งสองข้างไปยังบริเวณช่องว่างระหว่างรอยต่อของปลายกระดูกหักทั้งสองข้าง ที่มีการสร้างกระดูกซ่อมมาเชื่อมเพื่อให้เกิดความคงที่ของปลายกระดูกหักแล้ว โดยในช่วงแรก ช่องว่างระหว่างรอยต่อของกระดูกหัก จะมีเลือดมาคั่ง (ภาพที่ 2-8A) และเกิดการสร้างเนื้อเยื่อแกรนูเลชันขึ้นที่บริเวณดังกล่าว (ภาพที่ 2-8B) จากนั้นจะมีเนื้อเยื่อกระดูกที่มีความแข็งแรงมากกว่าเข้ามาแทนที่ได้แก่ เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (fibrous connective tissue) กระดูกอ่อนแบบ fibrocartilage และเนื้อกระดูกลักษณะเป็นแผ่นกระดูกเรียงเป็นชั้น ตามลำดับขั้นตอนของการสร้างกระดูกแบบนี้ (ภาพที่ 2-8C) ในตอนท้ายของการเชื่อมกระดูกหัก จะเกิดการสะสมแร่ธาตุที่กระดูกอ่อนแบบ fibrocartilage โดยเริ่มจากปลายกระดูกหักทั้งสองด้านเข้ามาตรงกลางเป็นกระดูกเนื้อโปร่ง และเนื้อกระดูกลักษณะเป็นร่างแห (ภาพที่ 2-8D) จนกระดูกหักเชื่อมติดกัน (ภาพที่ 2-8E) จากนั้นจะเกิดกระบวนการปรับรูปร่างของกระดูก โดยการสร้างและการสลายของกระดูก จนกระทั่งเกิดการเปลี่ยนของกระดูกซ่อม (bony callus) ไปเป็นกระดูกเนื้อแน่น (ภาพที่ 2-8F) (Fossum, 2002, Thrall, 2002)

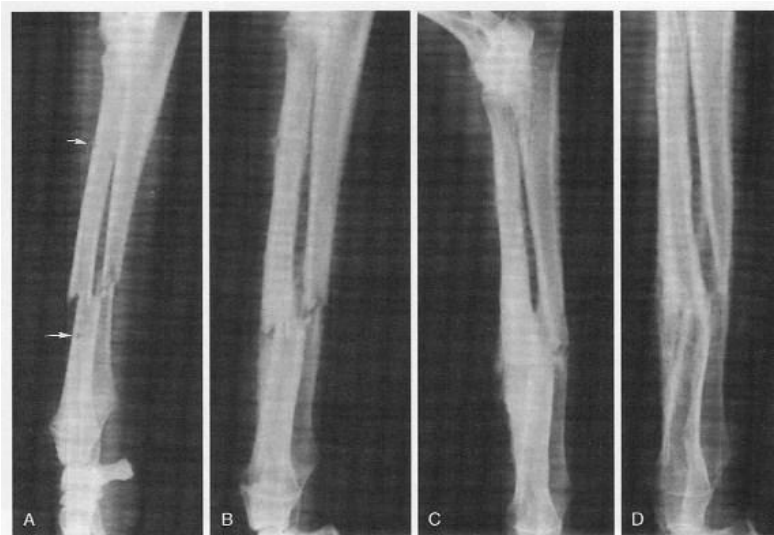


ภาพที่ 2-7 ขนาดของช่องว่างระหว่างปลายกระดูกหักทั้งสองด้าน อัตราส่วนระหว่างความกว้างของขนาดช่องว่างที่เปลี่ยนไปต่อความกว้างเริ่มต้น เรียกว่า “strain” (Fossum, 2002)



ภาพที่ 2-8 การสร้างกระดูกจากกระดูกอ่อน (indirect bone healing) และการลดลงของ “strain” เมื่อเกิดการยึดตรึงของปลายกระดูกหักทั้งสองด้านภายหลังการหักของกระดูก (A) จะมีเลือดมาคั่งบริเวณกระดูกหัก (B) ก่อนจะเกิดการสร้างเนื้อเยื่อแกรนูเลชันเข้ามาแทนที่ ได้แก่ (C) การสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน หรือกระดูกอ่อนแบบ fibrocartilage ต่อมา (D) เกิดการสะสมแร่ธาตุโดยเริ่มจากปลายกระดูกหักทั้งสองข้างเข้ามาตรงกลางเป็นกระดูกเนื้อโปร่ง และเนื้อกระดูกลักษณะเป็นร่างแห และ (E) เกิดการสร้างกระดูกเนื้อแน่นบริเวณโดยรอบของกระดูกจนกระดูกหักเชื่อมติดกัน (F) จากนั้นเกิดกระบวนการปรับรูปของกระดูก (Fossum, 2002)

ภาพถ่ายทางรังสีวินิจฉัยของการเชื่อมกระดูกหักในลักษณะนี้พบว่า ในสัปดาห์แรก ปลายของกระดูกหักทั้งสองด้านจะมีความมนมากขึ้น และช่องว่างระหว่างปลายกระดูกหักจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย อันเป็นผลมาจากการเคลื่อนไหวระหว่างปลายกระดูกหักทั้งสองด้าน การสลายของเซลล์กระดูกที่ตายแล้ว และการสร้างเนื้อเยื่อหลอดเลือดบริเวณกระดูกที่หัก (ภาพที่ 2-9A) ในสัปดาห์ที่ 2 เกิดการสร้างกระดูกซ่อมโดยรอบ (periosteal callus) การสร้างกระดูกซ่อมที่ส่วนปลายของกระดูกหัก (endosteal callus) และการสร้างกระดูกซ่อมระหว่างกระดูกที่หัก (intercortical callus) ปริมาณหนึ่ง เริ่มแรกกระดูกซ่อมโดยรอบบางส่วนเริ่มมีการสะสมแร่ธาตุ และขอบเขตโดยรอบเริ่มขรุขระ แสดงถึงการเริ่มมีการสร้างกระดูกเพื่อเชื่อมต่อกับกระดูกที่หัก (ภาพที่ 2-9B) ในสัปดาห์ที่ 4 กระดูกซ่อมเริ่มเรียบมากขึ้นและมีความทึบแสง มองเห็นการสร้างกระดูกมาเชื่อมต่อกับกระดูกหักชัดเจนยิ่งขึ้น และรอยหักของกระดูกมีขนาดเล็กลง (ภาพที่ 2-9C) หลังจากสัปดาห์ที่ 4 รอยหักจะค่อย ๆ หายไป พร้อมกับสังเกตเห็นการสร้างกระดูกซ่อมมาเชื่อมต่อกับกระดูกหัก ซึ่งในเวลานี้กระดูกซ่อมจะมีความทึบแสงใกล้เคียงกับกระดูกปกติข้างเคียง ต่อมาภายหลังสัปดาห์ที่ 12 กระดูกซ่อมภายนอกจะเริ่มเกิดกระบวนการปรับรูปกระดูก จนกระทั่งเกิดการเชื่อมต่อกับกระดูกอย่างสมบูรณ์ และมีการสร้างโพรงกระดูกขึ้นมาใหม่ (ภาพที่ 2-9D) กระบวนการนี้เสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์ต้องอาศัยระยะเวลาเป็นเดือนถึงเป็นปี (Thrall, 2002)



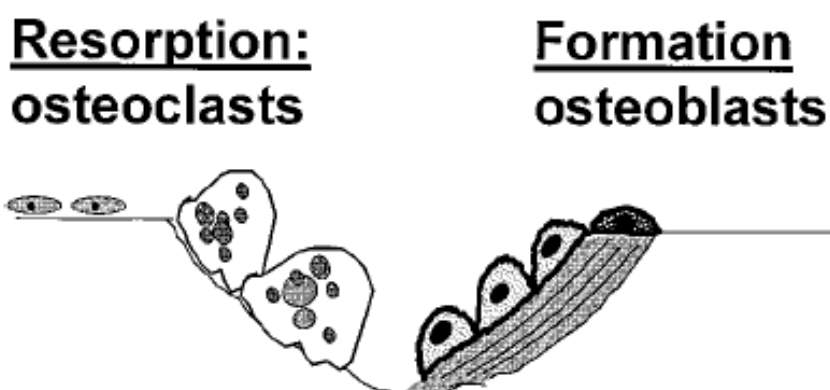
**ภาพที่ 2-9** ภาพถ่ายทางรังสีวินิจฉัยการเชื่อมของกระดูกหัก (ภาพ A) ปลายของกระดูกหักทั้งสองข้างเกยกันประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ หลังการจัดกระดูกหักให้เข้าที่ ก่อนยึดตรึงด้วยอุปกรณ์ยึดตรึงกระดูก (ภาพ B) 2 สัปดาห์ต่อมาเริ่มมีกระดูกซ่อมมาปกบริเวณกระดูกหักและเริ่มมีการสะสมแร่ธาตุ แต่ยังมีปริมาณไม่มาก (ภาพ C) 4 สัปดาห์ต่อมา กระดูกซ่อมเริ่มเชื่อมปลายกระดูกหักทั้งสองข้าง และมีการสะสมแร่ธาตุอย่างสมบูรณ์ และ (ภาพ D) 10 สัปดาห์ต่อมา การเชื่อมของกระดูกหักเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ (Thrall, 2002)

### 2.3 การสร้างกระดูกโดยไม่มีการสร้างกระดูกอ่อน (Intramembranous bone formation)

การสร้างกระดูกแบบนี้เป็นการสร้างกระดูกข้อมที่บริเวณกระดูกหักโดยตรง โดยไม่มีการสร้างกระดูกอ่อน เกิดขึ้นเมื่อบริเวณปลายของกระดูกหักมี strain น้อยมากหรือมีการแตกกันอย่างคงที่ของปลายกระดูกหักทั้งสองด้าน หลังการใช้เครื่องมือยึดตรึงกระดูกหักหรือการใช้เทคนิค biological fixation ในการแก้ไขกระดูกหัก โดยปริมาณกระดูกข้อมจะน้อยกว่าการสร้างกระดูกจากกระดูกอ่อน เนื้อกระดูกที่สร้างขึ้นมาเชื่อมกระดูกหักจะมีลักษณะเป็นแผ่นกระดูกเรียงเป็นชั้น จากนั้นจึงเกิดกระบวนการปรับรูปกระดูก โดยการสร้างและสลายของกระดูก และเกิดการเปลี่ยนของกระดูกข้อมให้กลายเป็นกระดูกเนื้อแน่นเช่นเดียวกัน (Fossum, 2002)

### 3. วงจรการสร้างกระดูก (bone remodeling) และสารชีวเคมีที่ออกมาจากกระดูก (biochemical bone marker)

ในภาวะปกติการเปลี่ยนแปลงของกระดูก (bone turnover) เกิดขึ้นเป็นวงจรการสร้างกระดูก (bone remodeling cycle) (ภาพที่ 2-10) ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นอย่างซ้ำ ๆ เริ่มจากการเข้ามาของเซลล์ osteoclasts จากไขสันหลังมายังบริเวณผิวของกระดูก เพื่อทำหน้าที่สลายกระดูก ทำให้ผิวกระดูกบริเวณนั้นมีลักษณะขรุขระ เซลล์ osteoclasts จะทำงานโดยปล่อยอนุภาคไฮโดรเจน (hydrogen ions) แลคเตต (lactate) และเอนไซม์ proteolytic ทำให้เกิดการสลายของโปรตีนในเนื้อกระดูก และมีการปล่อยแคลเซียม รวมถึงองค์ประกอบแร่ธาตุอื่น ๆ ออกมา หลังจากการทำงานของเซลล์ osteoclast ผิวของกระดูกบริเวณนั้นจะถูกขุดเป็นหลุมหรือเป็นโพรง จากนั้นเซลล์ osteoblasts ซึ่งเป็นเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงมาจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน จะเข้ามาฝังกระดูกบริเวณนั้น และทำหน้าที่ในการสร้างเนื้อเยื่อโปรตีนหรือเนื้อกระดูกใหม่ที่บริเวณดังกล่าว ก่อนจะเกิดการสะสมแร่ธาตุที่เนื้อกระดูกต่อไป การทำงานของเซลล์ osteoclast ในวงจรการสร้างกระดูกเรียกว่า การสลายกระดูก (bone resorption) ใช้เวลาประมาณ 7-10 วัน ในขณะที่การทำงานของเซลล์ osteoblast เรียกว่า การสร้างกระดูก (bone formation) ใช้เวลานานถึง 2-3 เดือน ในทุก ๆ ปีจะเกิดวงจรการสร้างกระดูกประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปกติการสลายและการสร้างกระดูกจะเกิดขึ้นคู่กัน โดยการสร้างกระดูกจะเกิดนำการสลายกระดูกเสมอ (Watts, 1999)



ภาพที่ 2-10 วงจรการสร้างกระดูก (bone remodeling cycle) จากการทำงานของเซลล์ 2 ชนิด คือ เซลล์ osteoclasts และเซลล์ osteoblasts (Watts, 1999)

การเปลี่ยนแปลงของกระดูก มีความสัมพันธ์กับการสร้างสารชีวเคมีที่ออกมาจากกระดูก (biochemical bone marker) 2 ชนิด ได้แก่ resorption marker และ formation marker ของกระดูก ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การเปลี่ยนแปลงของกระดูกที่แตกต่างกัน โดยสารชีวเคมีทั้งสองขึ้นอยู่กับการทำงานของเซลล์ osteoclast และ osteoblast ตามลำดับ (Allen, 2003)

3.1 Formation marker ของกระดูก มีหลายชนิด ได้แก่ bone alkaline phosphatase (BALP), osteocalcin (OC) และ collagen propeptide (amino-terminal และ carboxy-terminal procollagen I extension peptides; PINP และ PICP) เป็นต้น (ตารางที่ 2-2) (Watts, 1999) ถูกปล่อยออกมาโดยเซลล์ osteoblast ในขณะที่มีการสังเคราะห์เนื้อกระดูกใหม่ และสามารถตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของ formation marker ของกระดูกได้ในซีรัมเท่านั้น (Watts, 1999; Allen, 2003)

3.2 Resorption marker ของกระดูก มีหลายชนิด เช่น pyridinoline (PYD) และ deoxypyridinoline (DPD) เป็นต้น (ตารางที่ 2-2) (Watts, 1999) สร้างและปล่อยออกมาจากการทำงานของเซลล์ osteoclast และสามารถตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นได้ทั้งในซีรัมและปัสสาวะ

ตารางที่ 2-2 สารชีวเคมีที่ออกมาจากกระดูก (biochemical bone marker) 2 ชนิด ได้แก่ resorption marker และ formation marker ของกระดูก (Watts, 1999)

Bone formation markers	Bone resorption markers
Alkaline phosphatase	Serum
- Total alkaline phosphatase	- C-terminal pyridinoline cross-linked
- BALP	telopeptide of type I collagen (ICTP)
Osteocalcin (bone-GLA protein, BGP)	- Free $\gamma$ -carboxy glutamic acid
Procollagen extension peptides	- TRACP or TRAP
- PINP	Urine
- PICP	- Calcium
	- Hydroxyproline (total, free)
	- Pyr (free, total)
	- Dpd (free, total)
	- NTx
	- C-telopeptide (ICTP)
	- Hydroxylysine glycosides

#### 4. ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารชีวเคมีของกระดูก

ปัจจัยที่มีผลต่อความแปรปรวนทางชีววิทยาของการสร้างสารชีวเคมีของกระดูกมีหลายปัจจัย เช่น อายุ เพศ สารอาหาร การออกกำลังกายหรือกิจกรรม และโรคในระบบร่างกาย (systemic diseases) นอกจากนี้ช่วงเวลาที่ต่างกันในแต่ละวัน วันที่ต่างกัน และฤดูกาลยังมีผลทำให้สารชีวเคมีของกระดูกในคน เช่น osteocalcin, collagen peptides, BALP และ pyridinium cross-linked เกิดความผันแปรได้ (Allen, 2003) โดยสามารถแบ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีของกระดูกได้เป็น 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่มีผลต่อความผันแปรของการสร้างสารชีวเคมีของกระดูกที่ควบคุมไม่ได้ และควบคุมได้



#### 4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อความผันแปรของการสร้างสารชีวเคมีของกระดูกที่ควบคุมไม่ได้

- อายุ การสร้างสารชีวเคมีของกระดูกในคน หรือสัตว์อายุน้อยสูงกว่าคนที่อายุมากหรือสัตว์ที่โตเต็มวัยแล้ว นอกจากนี้ในคนสูงอายุอาจมีปัจจัยเกี่ยวกับการทำงานของไตที่เกิดการเสื่อมถอยตามอายุที่เพิ่มขึ้น โดยไปมีผลต่อ osteocalcin หรือสารชีวเคมีตัวอื่น (pyridinoline crosslinks และตัวที่มีความเกี่ยวข้องกับ peptides) ที่ถูกเมตาบอไลซ์ และ/หรือถูกขับทิ้งผ่านการทำงานของไตได้

- เพศ สารชีวเคมีของกระดูกในวัยรุ่นเพศชายมีแนวโน้มที่สูงกว่าวัยรุ่นเพศหญิง 3-4 เท่า ในขณะที่ในชายสูงอายุจะมีแนวโน้มที่ต่ำกว่าหญิงในวัยหมดประจำเดือน

- กระดูกหัก (fractures) ในช่วง 4 สัปดาห์แรกของการเชื่อมกระดูกหักภายหลังเกิดภาวะกระดูกหัก ทั้ง resorption marker และ formation marker ของกระดูกจะเพิ่มสูงขึ้น 20-50 เปอร์เซ็นต์ และมีระดับที่สูงต่อเนื่องไปอย่างน้อย 6 เดือนถึง 1 ปี

- ยา การต้านการสลายกระดูก (antiresorptive treatments) ในผู้ป่วยที่มีภาวะกระดูกบาง (osteoporosis) หรือโรค metabolic ของกระดูก เช่น การได้รับฮอร์โมนทดแทนจะมีระดับของสารชีวเคมีลดลงอย่างรวดเร็วได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ยาอีกหลายตัวที่ได้รับโดยไม่เกี่ยวกับภาวะของกระดูกบางชนิด มีผลต่อระดับของสารชีวเคมีของกระดูกได้เช่นกัน ได้แก่ ยากลุ่ม corticosteroids มีผลต่อการลดระดับของ osteocalcin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จะมีผลเพียงเล็กน้อยต่อสารชีวเคมีตัวอื่น ๆ และยังพบว่าระดับของ resorption marker ของกระดูกก็ยังมีระดับสูงอยู่ ยาต้านอาการชัก (anticonvulsant drugs) และ GnRH agonist จะมีผลในการเพิ่มการสร้างสารชีวเคมีของกระดูกอย่างมีนัยสำคัญ ตรงกันข้ามกับยา thiazide diurectics จะมีผลลดระดับสารชีวเคมีของกระดูก

#### 4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อความผันแปรของการสร้างสารชีวเคมีของกระดูกที่ควบคุมได้

- ช่วงเวลาของวัน สารชีวเคมีของกระดูกส่วนใหญ่จะเพิ่มสูงขึ้นในเวลากลางคืน โดยจะมีระดับสูงสุดในช่วง 02.00-08.00 น. จากนั้นจะลดลงอย่างรวดเร็ว และเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งในช่วงเวลาระหว่าง 13.00-23.00 น. โดยระดับการขึ้นและลงแบบนี้จะพบได้ในส่วนของ resorption markers ของกระดูก มากกว่า formation markers ของกระดูก ส่วนระดับของ BALP มีความแตกต่างออกไป โดยพบว่า มีระดับสูงสุดในช่วง 11.00-14.00 น. และเพิ่มขึ้นสูงอีกครั้งในเวลา 23.30 น. จากช่วงเวลาที่ต่างกันมีผลต่อความผันแปรของระดับสารชีวเคมีของกระดูก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ควรต้องกำหนดช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจวัดระดับสารชีวเคมีของกระดูกด้วย

- ฤดูกาล การเปลี่ยนแปลงของฤดูกาลมีผลต่อการสร้างสารชีวเคมีของกระดูกไม่มากนัก ประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ แต่ในบางการศึกษาพบว่าระหว่างฤดูร้อน (summer) และฤดูหนาว (winter) มีความแตกต่างในการสร้างสารชีวเคมีของกระดูกค่อนข้างมาก โดยพบว่า ระดับ OC จะเพิ่มขึ้นในฤดูหนาวและฤดูใบไม้ผลิ (spring) ในขณะที่ BALP จะลดลงในช่วงฤดูหนาวและฤดูใบไม้ผลิ ส่วน PICP ไม่พบความแตกต่างในแต่ละฤดูอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ resorption markers ของกระดูกส่วนใหญ่จะเพิ่มขึ้นในช่วงฤดูหนาว แต่มีบางการศึกษาที่พบว่าระดับ PYD ที่วัดได้ในปัสสาวะมีค่าเพิ่มสูงขึ้นในช่วงฤดูร้อน ดังนั้นการคำนึงถึงผลการเปลี่ยนแปลงของฤดูกาลต่อระดับการสร้างสารชีวเคมีของกระดูก จึงมีความสำคัญในการติดตามผลในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ

## 5. Formation marker ของกระดูก

ในการซ่อมแซมกระดูกเพื่อเชื่อมกระดูกหัก จะมีการสร้างเซลล์กระดูกขึ้นมาใหม่ปริมาณมาก หรือมีการสร้างกระดูกมากกว่าการสลายกระดูกอย่างชัดเจน ดังนั้นในภาวะนี้จึงมีการสร้าง formation marker ของกระดูกที่เด่นชัดกว่าการสร้าง resorption marker ของกระดูก ซึ่งสามารถแบ่ง formation marker ของกระดูก ได้เป็น

5.1 เอนไซม์ ได้แก่ bone alkaline phosphatase (BALP) (Watts, 1999)

5.2 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์กระดูก ได้แก่ osteocalcin (OC), amino-terminal และ carboxy-terminal procollagen I extension peptides (PINP และ PICP) (Watts, 1999) amino-terminal procollagen III extension peptide (PIIINP) (Joerring et al., 1992)

สามารถตรวจวัดระดับ formation marker ของกระดูกในกระแสเลือดได้ด้วยวิธีที่ไม่เจ็บปวด (non-invasive) (Polak-Jonkisz and Zwolinska, 1998) การตรวจด้วยวิธี enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) และ radioimmunoassay (RIA) ได้มีการยอมรับให้ใช้ทั้งในงานวิจัย และการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการทางคลินิก (Ladlow et al., 2002)

## 6. Bone alkaline phosphatase (BALP)

Total serum หรือ plasma alkaline phosphatase (ALP) เป็นเอนไซม์ที่ผลิตออกมาจากเซลล์ของอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกาย ได้แก่ กระดูก ตับ ไต ลำไส้เล็ก รก และเซลล์สืบพันธุ์ (germ cells) ซึ่ง ALP ที่สร้างจากอวัยวะต่าง ๆ จะมีรูปแบบ (isoenzyme) และคุณสมบัติบางอย่างแตกต่างกันไป ในสุนัขมีรูปแบบของ ALP อยู่ 4 ชนิด คือ bone ALP (BALP), intestinal ALP (IALP), liver ALP (LALP) และ corticosteroid-induced ALP (CALP) โดย BALP และ LALP ผลิตจากยีนตัวเดียวกัน แต่ต่างกันเพียงแค่จำนวนและตำแหน่งของ posttranslational glycosylation (Allen et al., 1998; Mohamadnia et al., 2007) ซึ่งระดับ ALP ที่พบในกระแสเลือดส่วนใหญ่ถูกสร้างมาจากกระดูกและตับ ส่วนจากอวัยวะอื่นจะตรวจพบได้น้อยมากในกระแสเลือด (Sanecki et al., 1993)

BALP เป็น membrane-bound protein สร้างจาก osteoblast และปล่อยออกมาสู่กระแสเลือด สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีที่ไม่เจ็บปวด (Allen et al., 2000) ดังนั้นจึงถือว่า BALP เป็น formation marker ของกระดูก และสามารถใช้เป็นตัววัดการทำงานของเซลล์ osteoblast ได้ (Mohamadnia et al., 2007) แต่เนื่องจาก total ALP ในซีรัมประกอบด้วย ALP ที่ผลิตจากเซลล์กระดูก ลำไส้และตับ ดังนั้นในการประเมินผลของวงจรการสร้างกระดูก (bone remodeling) จึงต้องอาศัยการวัดด้วยวิธี radioimmunoassay ที่จำเพาะหรือใช้เทคนิคการแยก BALP ออกจาก total ALP ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

- การวัดเชิงปริมาณแบบก้ำกึ่ง (semi-quantitative) เช่น วิธีแยกมวลสารทางไฟฟ้า (gel electrophoretic separation) (Allen et al., 1998, Allen, 2003) การแยกด้วยวิธี high-performance liquid chromatography (HPLC) (Allen et al., 2000)

- การวัดโดยทางอ้อม (indirect) เช่น การทำให้สูญเสียสภาพโดยใช้ความร้อน (heat denaturation) (Farley et al., 1993; Mohamadnia et al., 2007) การเลือกตกตะกอนด้วย wheat-germ lectin (Behr and Barnert, 1986; Farley et al., 1993; Leung et al., 1993; Sanecki et al., 1993; Allen et al., 2000; Mohamadnia et al., 2007)

การวัดระดับ BALP ด้วยวิธีการทำให้สูญเสียสภาพโดยใช้ความร้อน ทำได้โดยนำซีรัม 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดพลาสติก (200 ไมโครลิตร) นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยระดับความร้อนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส จะทำให้ ALP ในรูปแบบที่สร้างจากกระดูกสูญเสียสภาพ ทำให้เย็นโดยนำไปผ่าน

น้ำไหล จากนั้นนำซีรัมที่ไม่ผ่านการอุ่นไปวัดระดับ total ALP และนำซีรัมที่อุ่นแล้วไปวัดระดับ ALP ด้วยวิธีเดียวกัน นำค่า total ALP มาหักลบด้วยค่า ALP ของซีรัมที่ผ่านการทำให้สูญเสียสภาพโดยใช้ความร้อน ได้ค่าของระดับของ BALP (Mohamadnia et al., 2007) การวัดระดับ BALP ด้วยวิธีการทำให้สูญเสียสภาพโดยใช้ความร้อนเป็นวิธีที่ถือว่ามีคุณภาพ แต่ไม่นิยมใช้วิธีนี้เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่สะดวกหากมีปริมาณของตัวอย่างค่อนข้างมาก เช่นเดียวกับการแยกมวลสารทางไฟฟ้าที่สามารถวัดระดับของ ALP ในซีรัมได้ มีวิธีการตรวจคือ ภายหลังเจาะเก็บตัวอย่างเลือดแล้ว ต้องทำการตรวจวัดระดับ ALP ภายในเวลา 4-8 ชั่วโมง โดยตัวอย่างซีรัมที่ได้ต้องไม่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง หรือใช้สารกันเลือดแข็งตัวใด ๆ ในการเก็บตัวอย่างเลือด ซีรัมที่ใช้ตรวจต้องใส และทำให้ปราศจากเซลล์ภายในเวลา 2 ชั่วโมงหลังจากเจาะเก็บตัวอย่างเลือด เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดผลบลวงของระดับเอนไซม์ จากนั้นนำตัวอย่างซีรัมที่ได้ไปแยกมวลสารทางไฟฟ้าผ่าน agarose gel ซึ่งวิธีการแยกมวลสารทางไฟฟ้านี้ (Bassiouni et al., 1993) เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวัดปริมาณของ ALP เชิงคุณภาพ แต่จะมีปัญหาในการเกิดการเหลื่อมล้ำของ BALP และ LALP ทำให้วิธีนี้ไม่มีความเหมาะสมในการวัดเชิงปริมาณ แต่สามารถใช้วัดเชิงปริมาณในกรณีของการวัด IALP ได้ (Moss, 1982)

การตรวจวัดระดับของ BALP ที่มีประสิทธิภาพในเชิงปริมาณอีกวิธีหนึ่ง คือ การใช้เทคนิคการเลือกตกตะกอนด้วย wheat-germ lectin เป็นวิธีที่พัฒนามาจากการตรวจวัดระดับ BALP ในซีรัมของคน (Behr and Barnert, 1986) มาตรวจวัดระดับ BALP ในซีรัมสุนัขได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการเติมสารละลาย lectin ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงหลอดพลาสติกขนาด 200 ไมโครลิตรที่มีซีรัมสุนัขบรรจุอยู่ 50 ไมโครลิตรเช่นกัน นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำของเหลวส่วนใส (supernatant) ที่ได้ไปตรวจวัดระดับ ALP ที่เหลือ ด้วยวิธีเดียวกันกับที่ตรวจ total ALP ในซีรัมหาค่า BALP โดยนำค่า total ALP หักลบด้วยค่าของ ALP ที่วัดได้จากการใช้เทคนิคการเลือกตกตะกอนด้วย wheat-germ lectin (Sanecki et al., 1993) แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก และใช้เวลาในการตรวจค่อนข้างมาก จึงมีการใช้วิธี enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) และ radioimmunoassay (RIA) ที่พัฒนามาจากการตรวจ BALP ในซีรัมของคน (DeLaurier et al., 2002; Ladlow et al., 2002) มาใช้ตรวจวัดระดับ ALP ของสุนัขได้อย่างจำเพาะในแต่ละ isoform ในการตรวจวัดระดับของ BALP ในซีรัมสุนัขด้วยวิธี ELISA นั้น ทำการตรวจโดยใช้ immunoreactive BALP (iBALP) เริ่มจากผสมซีรัมสุนัขปริมาตร 20 ไมโครลิตรและ buffer (iBALP) ปริมาตร 125 ไมโครลิตร นำส่วนผสมของซีรัมที่ได้ไปหยอดลงถาดหลุมที่มี

murine monoclonal anti-BALP IgG antibody เคลือบอยู่ ล้างเอาผลึกออกเพื่อชะส่วนผสมของซีรัมที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออก จากนั้นหยอด *p*-nitrophenyl phosphate substrate เพื่อเป็นตัวจับกับ iBALP ทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร (Allen et al., 2000) และจากการศึกษาของ Allen และคณะ (2000) ในครั้งนี้ เมื่อทำการตรวจวัดระดับ BALP ในซีรัมของสุนัขพันธุ์บีเกิล ในช่วงอายุต่าง ๆ ตั้งแต่ช่วงอายุน้อยกว่า 1 ปี จนถึงช่วงอายุมากกว่า 7 ปี โดยเปรียบเทียบการตรวจวัดระดับ BALP ในซีรัมระหว่างการใช้อ้างอิง commercial human ELISA และเทคนิคการเลือกตกตะกอนด้วย wheat-germ lectin พบว่าการตรวจด้วย commercial human ELISA มี cross-reactivity ที่ดีกับซีรัมของสุนัข และให้ผลการตรวจระดับ BALP สัมพันธ์กันทั้งสองวิธี

ทั้งนี้ทั้งนั้น ยังมีปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อระดับของ BALP ในซีรัมของสุนัข ดังได้มีการกล่าวถึงความสัมพันธ์ของช่วงอายุสุนัขต่อระดับของ BALP ในการศึกษาการวัดระดับ bone marker ในซีรัมสุนัขในช่วงอายุน้อยกว่า 1 ปี อายุ 1-2 ปี อายุ 3-7 ปี และอายุ 8 ปีขึ้นไป โดยใช้วิธี specific (ELISA) พบว่าระดับของ BALP มีแนวโน้มลดลงตามช่วงอายุที่เพิ่มขึ้น และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.0001$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มอายุน้อยกว่า 1 ปี โดยสุนัขกลุ่มอายุ 3-7 ปี มีระดับของ BALP ต่ำที่สุด และต่ำกว่าสุนัขกลุ่มอายุ 1-2 ปีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0026$ ) นอกจากนี้ความสัมพันธ์ของอายุมีผลต่อระดับของ BALP แล้ว จากการศึกษาครั้งนี้ยังกล่าวถึงเรื่องความสัมพันธ์ของระดับ BALP ในสุนัขเพศผู้และเพศเมีย พบว่าระดับ BALP ในสุนัขเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Allen et al., 1998) การศึกษาต่อมาในการตรวจวัดระดับของ BALP ในซีรัมสุนัข โดยเปรียบเทียบการใช้อ้างอิงเทคนิคการเลือกตกตะกอนด้วย wheat-germ lectin และการใช้ specific ELISA จากการศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งสุนัขออกเป็นกลุ่มช่วงอายุน้อยกว่า 1 ปี จำนวน 3 ตัว กลุ่มอายุ 1-2 ปี อายุ 2-3 ปี อายุ 3-7 ปี และอายุ 7 ปีขึ้นไป อีกกลุ่มละ 8 ตัว จากการตรวจวัดระดับของ BALP ด้วยวิธีการตรวจทั้งสองแบบ พบว่าระดับของ BALP ลดลงโดยมีความสัมพันธ์กับอายุที่เพิ่มขึ้น และลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับระดับของ BALP ในสุนัขกลุ่มอายุน้อยกว่า 1 ปี แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) ในระหว่างสุนัขกลุ่มอื่น ๆ ที่มีอายุมากกว่า 1 ปี (Allen et al., 2000)

มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับ BALP ในช่วงเวลาต่าง ๆ ในระหว่างวัน แบ่งเป็น 2 การศึกษา คือ การศึกษาระยะสั้น (short-term study) ทำการเจาะเก็บเลือดทุก 4 ชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และการศึกษาระยะยาว (long-term study) ทำการเจาะเก็บเลือดทุกสัปดาห์เป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยศึกษาในสุนัขพันธุ์บีเกิล (beagle) จำนวน 8 ตัว (เพศผู้ 4 ตัวยังไม่ทำหมัน เพศเมีย 1 ตัวทำหมันแล้ว และเพศเมีย 3 ตัวยังไม่ทำหมัน) ตรวจวัดระดับ BALP ใน

ซีรัมด้วยเทคนิค human ELISA โดยใช้ purified murine monoclonal anti-BALP IgG antibody เป็นตัวจับกับ BALP พบว่าจากการศึกษาาระยะสั้น ระดับของ BALP ระหว่างวันใน 24 ชั่วโมง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และมีระดับ BALP สูงที่สุดในช่วงบ่าย (15.04 น.) ส่วนการศึกษาาระยะยาว ถึงแม้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่าการเปลี่ยนแปลงระดับ BALP ในซีรัมสุนัขในระหว่างสัปดาห์ (inter-subject variability) มีค่ามากกว่าการเปลี่ยนแปลงระดับ BALP ในซีรัมสุนัขภายในสัปดาห์เดียวกัน (intra-subject variability) เสมอ (Ladlow et al., 2002)

สายพันธุ์และขนาดของสุนัขเป็นอีกปัจจัยที่มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ต่อระดับของ BALP มีการศึกษาระดับ BALP ในสุนัขปกติ พันธุ์ขนาดเล็ก (toy breed; Pomeranians) และพันธุ์ขนาดใหญ่ (giant breed; Irish Wolfhounds) กลุ่มละ 12 ตัว อายุเฉลี่ย 4.7 ปี และ 3.9 ปี ตามลำดับ โดยไม่จำกัดเพศ พบว่าสุนัขทั้งสองสายพันธุ์มีค่าระดับ BALP เฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.71$ ) (Breur et al., 2004) และค่าเฉลี่ยของระดับ BALP ของสุนัขทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับ BALP อ้างอิงที่เคยมีรายงานในสุนัขพันธุ์ขนาดกลาง (Beagles) ช่วงอายุ 3-7 ปี (Allen et al., 1998) ดังนั้นจึงถือว่าสายพันธุ์และขนาดของสุนัขไม่มีผลต่อระดับของ BALP ในซีรัมในของสุนัขปกติ

ในภาวะที่มีการหักของกระดูกหรืออยู่ในช่วงการเชื่อมกระดูกหัก จะมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของระดับ BALP ในกระแสเลือด ดังการศึกษาของ Leung และคณะ ในปี 1993 ที่ทำการตรวจวัดระดับ BALP ในซีรัมคนที่มีการหักของกระดูกท่อนยาวหัก จำนวน 49 คน โดยใช้เทคนิคการเลือกตกตะกอนด้วย wheat-germ lectin พบว่า ค่า BALP ของผู้ป่วย 94 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มขึ้นภายหลังที่มีการหักเกิดขึ้น และเพิ่มขึ้นระหว่างช่วงการเชื่อมกระดูกหักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และเพิ่มสูงขึ้นที่สุดในช่วงสัปดาห์ที่ 8-12 โดยสามารถวัดระดับการเพิ่มสูงขึ้นนี้ได้ถึงสัปดาห์ที่ 15 จากนั้นจะลดลงจนอยู่ในระดับปกติในช่วงสัปดาห์ที่ 24-30 ทั้งนี้ทั้งนั้น ต้องมั่นใจว่าผู้ป่วยมีการทำงานและการสร้างเอ็นไซม์ของตับอยู่ในระดับปกติ

ในสุนัข มีการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับ total ALP กับการเชื่อมกระดูกหัก จากการศึกษาการเชื่อมของกระดูกท่อนยาวหักในสุนัข และได้รับการแก้ไขกระดูกหักด้วยการใส่เครื่องมือเพื่อยึดตรึงกระดูกภายใน (internal fixation) ในโรงพยาบาล โดยศึกษาในสุนัขพันธุ์ขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ อายุระหว่าง 2-8 ปี จำนวน 83 ตัว โดยใช้การวัดระดับ total ALP ร่วมกับการถ่ายภาพรังสีวินิจฉัย เพื่อประเมินการเชื่อมกระดูกหักปกติ (clinical union) การเชื่อมกระดูกหักซ้ำ

กว่าปกติ (delayed union) และการไม่เชื่อมของกระดูกหัก (nonunion) โดยทำการเจาะเก็บเลือด เพื่อตรวจระดับ total ALP ในวันแรก วันที่ 10, 20, 30 และอีกทุก ๆ 30 วัน จนกระทั่งพบว่ามีการเชื่อมกระดูกซ่อมมาพอกบริเวณที่กระดูกหัก จากการถ่ายภาพรังสีวินิจฉัย พบว่าสุนัขกลุ่มที่มีการเชื่อมกระดูกหักปกติ มีระดับของ total ALP สูงกว่าระดับอ้างอิง (24-129 U/L) และมีระดับสูงที่สุดในวันที่ 10 จนกระทั่งพบว่ามีการเชื่อมกระดูกซ่อมมาพอกบริเวณกระดูกหักจากการถ่ายภาพรังสีวินิจฉัยเมื่อครบ 30 วัน ส่วนกลุ่มที่มีการเชื่อมของกระดูกหักช้ากว่าปกติจะมีระดับของ total ALP สูงกว่าระดับอ้างอิงแต่น้อยกว่ากลุ่มที่มีการเชื่อมกระดูกหักปกติ และคงอยู่สูงกว่าระดับอ้างอิงจนกระทั่งพบว่ามีกระดูกซ่อมมาพอกบริเวณกระดูกหัก ซึ่งใช้เวลานานถึง 150 วัน และกลุ่มที่เกิดการไม่เชื่อมของกระดูกหัก จะมีระดับ total ALP ต่ำกว่าระดับอ้างอิงตลอดการศึกษา (Komnenou et al., 2005)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับ BALP ในซีรัมของสุนัขที่มีภาวะต่าง ๆ ของกระดูก โดยเปรียบเทียบระดับ BALP ในซีรัมของสุนัขปกติ ก่อนและหลังเหนี่ยวนำให้กระดูก ulna หักโดยการผ่าตัด และสุนัขที่มีกระดูกขาหักจากอุบัติเหตุไม่เกิน 1 สัปดาห์ พบว่าสุนัขปกติก่อนและหลังผ่าตัดเหนี่ยวนำให้กระดูกหักในสัปดาห์แรก และสุนัขที่มีกระดูกหักจากอุบัติเหตุไม่เกิน 1 สัปดาห์ มีระดับ BALP ในซีรัมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) จากนั้นระดับ BALP ในซีรัมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 จนถึงสัปดาห์ที่ 16 ภายหลังจากผ่าตัดเหนี่ยวนำให้กระดูกหัก โดยระดับ BALP ขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 และคงระดับอยู่จนกระทั่งถึงสัปดาห์ที่ 12 แล้วค่อย ๆ ลดลง แต่ยังคงสูงกว่าระดับก่อนเหนี่ยวนำให้กระดูก ulna หักโดยการผ่าตัด (วรพัฒน์ ประชาศิลป์ชัย และคณะ, 2546) ต่อมามีการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับ BALP ในซีรัมกับการสร้างกระดูกใหม่ ในสุนัขก่อน และหลังเหนี่ยวนำให้กระดูกหักบางส่วน (transaction) ร่วมกับการประเมินทางรังสีวินิจฉัย โดยทำการศึกษาในสุนัขพันธุ์ Iranian sheepdog เพศผู้ อายุ 1-2 ปี ที่ถูกเหนี่ยวนำให้กระดูก radius หักบางส่วน จำนวน 8 ตัว (กลุ่มศึกษา 5 ตัว และกลุ่มควบคุม 3 ตัว) วัดระดับ BALP ในซีรัมในวันแรกก่อนเหนี่ยวนำให้กระดูกหัก และทุกสัปดาห์จนครบ 4 สัปดาห์ พบว่าระดับของ BALP มีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ตั้งแต่สัปดาห์แรกของการเหนี่ยวนำให้กระดูก radius หักบางส่วน และจากภาพถ่ายรังสีวินิจฉัยพบมีการเชื่อมของกระดูกอย่างสมบูรณ์ในสัปดาห์ที่ 4 แต่ระดับของ BALP ก็ยังคงสูงอยู่ (Mohamadnia et al., 2007)

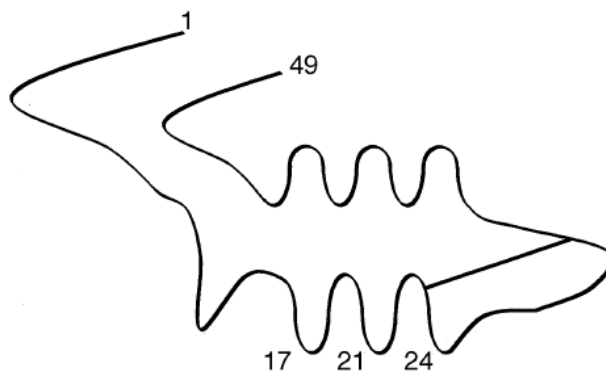
## 7. Osteocalcin (OC)

OC หรือ bone gamma-carboxyglutamic acid protein หรือ bone glutamic acid (Gla-) protein เป็น calcium-binding bone protein ที่มีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อของกระดูกและฟัน แต่ปัจจุบันยังไม่ทราบบทบาทของ OC ที่แน่ชัด ในภาวะปกติมี OC ที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ประมาณ 15-20 เปอร์เซ็นต์ ถูกปล่อยออกมาในกระแสเลือด และสามารถตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นได้ในซีรัม ด้วยเทคนิค radioimmunoassay (RIA) (Polak-Jonkisz and Zwolinska, 1998) ส่วนในขณะที่มีการสลายของกระดูก (bone resorption) OC จะไม่ถูกปล่อยออกมาในกระแสเลือด ดังนั้นปริมาณความเข้มข้นของ OC ที่วัดได้ในซีรัมจะเกิดการสังเคราะห์ขึ้นจากการทำงานของ osteoblast เท่านั้น (Allen, 2003) จึงถือว่า OC เป็นตัวบ่งชี้การทำงานของ osteoblast ได้ด้วย (Lee et al., 2000)

การสังเคราะห์ OC ต้องอาศัยวิตามินดีและวิตามินเค (vitamin D- and vitamin K-dependent) วิตามินดี หรือ 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) มีส่วนช่วยในการสังเคราะห์ OC โดยตรง โดยเป็นตัวกำหนดการเกิดกระบวนการ transcription ของ OC บนโครโมโซม (chromosome) และวิตามินเค หรือ phyloquinone จะเป็นตัวช่วยในการกระตุ้นการเกิดกระบวนการ  $\gamma$ -carboxylation ของ glutamic acid (Polak-Jonkisz and Zwolinska, 1998; Lee et al., 2000)

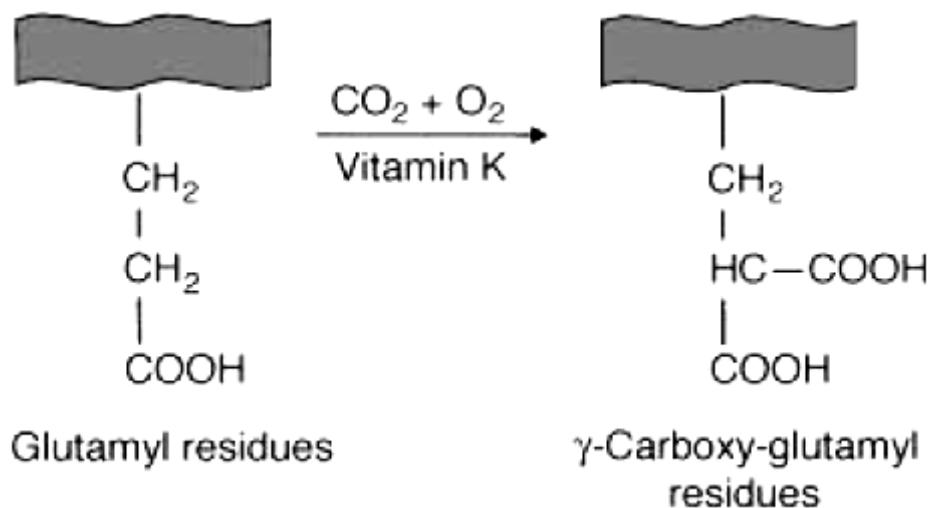
โครงสร้างของ OC เป็นโปรตีนสายยาว (polypeptide) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 49 ตัว อยู่อย่างจำเพาะบนโครโมโซม ของสัตว์แต่ละสปีชีส์ ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาเป็นโมเลกุลใหญ่ที่เรียกว่า prepro-osteocalcin ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 98 ตัว ซึ่งโมเลกุลของ OC นี้ประกอบด้วย 3 ส่วน ส่วนแรกคือ signal peptide ประกอบด้วย กรดอะมิโน 23 ตัว และจะถูกตัดออกในขณะที่เกิดกระบวนการ translation ส่วนต่อมาคือ propeptide ประกอบด้วย กรดอะมิโน 26 ตัว ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นโปรตีนเป้าหมายของกระบวนการ  $\gamma$ -carboxylation และส่วนสุดท้ายคือ mature protein หรือ intact OC ประกอบด้วย กรดอะมิโน 49 ตัว มีลักษณะเป็น two anti-parallel  $\alpha$ -helical domain และโครงสร้างนี้เสถียรโดยพันธะ disulphide (disulphide bond) เชื่อมที่ตำแหน่ง Cys<sub>23</sub>-Cys<sub>29</sub> (Lee et al., 2000) (ภาพที่ 2-11)





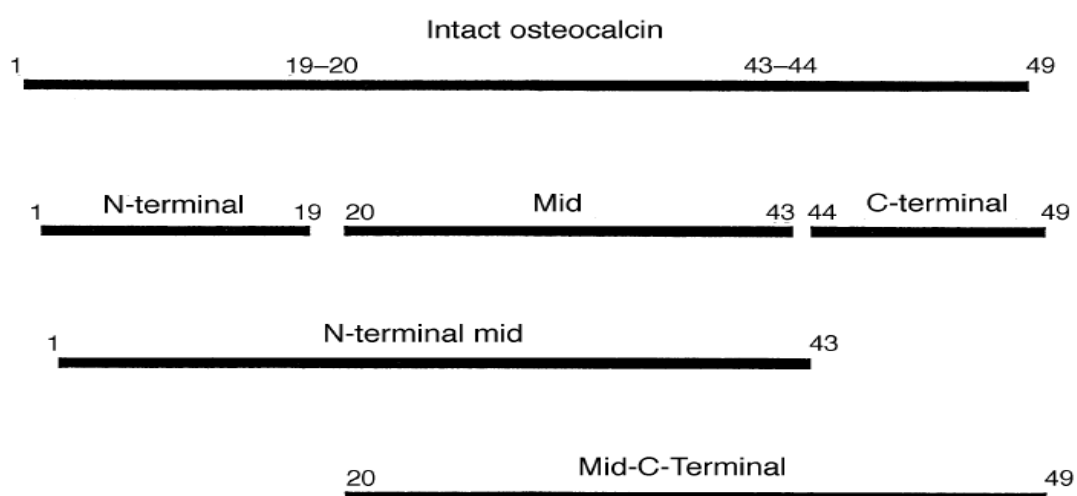
ภาพที่ 2-11 ไดอะแกรมของโครงสร้าง osteocalcin (OC) รวมถึงแสดง  $\gamma$ -carboxylglutamyl (Gla) residues ที่ตำแหน่งที่ 17 21 และ 24 และการเชื่อมกันของตำแหน่งที่ 23 และ 29 ด้วยพันธะ disulphide (Lee et al., 2000)

ในการเกิดกระบวนการ  $\gamma$ -carboxylation ของ OC จะมีวิตามินเค ทำหน้าที่เป็น co-factor สำหรับการเกิด post-translational  $\gamma$ -carboxylation ของ OC โดยในขณะที่เกิดกระบวนการ carboxylation จะเกิดการเติมหมู่ carboxyl ลำดับที่ 2 (second carboxyl group) ที่ตำแหน่ง 17 21 และ 24 ของ glutamic residues (Glu) ให้ได้เป็น  $\gamma$ -carboxylglutamyl residues (Gla) (Lee et al., 2000) (ภาพที่ 2-12)



ภาพที่ 2-12 การเกิดกระบวนการ  $\gamma$ -carboxylation ของ glutamyl (Glu) residues ให้ได้เป็น  $\gamma$ -carboxylglutamyl (Gla) residues โดยมีวิตามินเคเป็น co-factor (Lee et al., 2000)

Intact OC มีส่วนของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 19-20 และ 43-44 ซึ่งเป็นส่วนที่ง่ายต่อการเกิด tryptic hydrolysis ส่วน C-terminal fragment เป็นส่วนที่ถูกตัดออกไปได้ง่าย และ N-terminal mid-fragment เป็นส่วนที่มีเสถียรภาพมากที่สุด ดังนั้น intact OC และ N-terminal mid-fragment จึงเป็นรูปแบบ immunoreactive ที่สำคัญที่พบมากในภาวะปกติ และภาวะที่เกี่ยวข้องกับการลดลงของมวลกระดูก (osteoporotic subjects) (Lee et al., 2000) (ภาพที่ 2-13) ในภาวะที่มีการสลายของกระดูก intact OC จะไม่ถูกปล่อยออกมาในกระแสเลือด แต่ชิ้นส่วน (fragments) ของ OC จะถูกปล่อยออกมาใน in vitro และในระหว่างที่มีการสลายและการสร้างกระดูก (Watt, 1999)



ภาพที่ 2-13 Intact osteocalcin และชิ้นส่วนต่าง ๆ ของ OC (Lee et al., 2000)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของระดับ OC ที่วัดได้ในกระแสเลือด ได้แก่ อายุ เพศ อาหาร การออกกำลังกาย การทำงานของไต ระดับของฮอร์โมน การสังเคราะห์กระดูกใหม่ ยาบางชนิด โรคที่เกี่ยวข้องกับกระดูก (metabolic bone disease) ช่วงเวลาที่ต่างกันระหว่างวัน ฤดูกาล เวลาที่เจาะเก็บตัวอย่างเลือด และความจำเพาะของชุดตรวจ radioimmunoassay เป็นต้น (Polak-Jonkisz and Zwolinska, 1998; Allen, 2003)

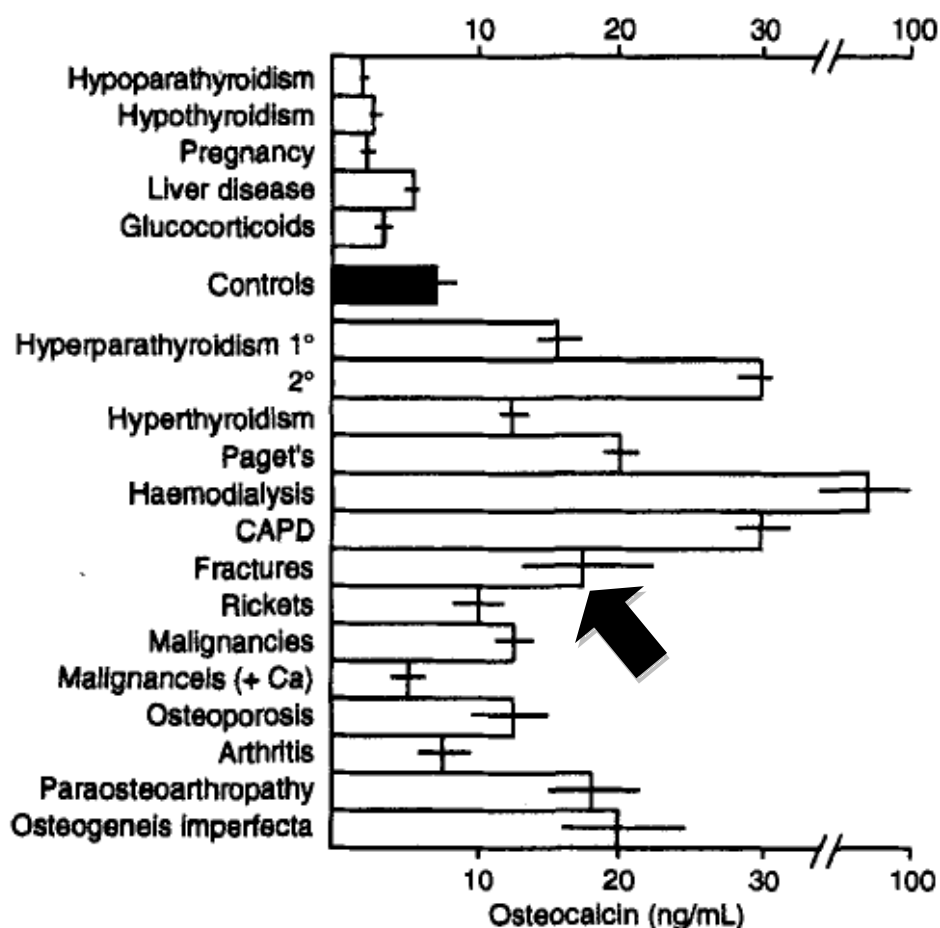
ความสัมพันธ์ระหว่างเพศและอายุต่อระดับของ OC ในซีรัม ในคนมีรายงานว่าผู้หญิงที่อยู่ในช่วงรอบเดือน (menstrual cycle) จะมีระดับ OC เพิ่มสูงที่สุดในระยะ luteal phase ความเข้มข้นของระดับ OC ในเด็กจะสูงกว่าในผู้ใหญ่ ในเพศชายสูงกว่าเพศหญิง และจะเริ่มลดลงในเพศหญิงที่อายุ 50 ปีขึ้นไป (Lee et al., 2000)

มีการกล่าวถึงความสัมพันธ์ของช่วงอายุของสุนัขต่อระดับ OC ในการศึกษา ระดับของ bone marker ในซีรัมสุนัข แบ่งเป็นกลุ่มช่วงอายุน้อยกว่า 1 ปี อายุ 1-2 ปี อายุ 3-7 ปี และอายุ 8 ปีขึ้นไป โดยใช้วิธี specific RIA ที่มีความจำเพาะต่อการตรวจ OC ในซีรัมสุนัข พบว่า สุนัขกลุ่มอายุน้อยกว่า 1 ปี มีระดับ OC สูงที่สุด และสูงกว่าสุนัขกลุ่มอายุ 1-2 ปี อายุ 3-7 ปี และ อายุ 8 ปีขึ้นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.0073$ ;  $p<0.0001$  และ  $p<0.0001$  ตามลำดับ) แต่ ระดับ OC ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสุนัขกลุ่มอายุมากกว่า 1 ปีขึ้นไปทั้งสามกลุ่ม จากการศึกษาครั้งนี้ยังกล่าวถึงความสัมพันธ์ของระดับ OC ในสุนัขเพศผู้และเพศเมีย โดยพบว่า ระดับ OC ในสุนัขเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Allen et al, 1998)

ในระหว่างวัน มีการเปลี่ยนแปลงของระดับ OC ในกระแสเลือดแตกต่างกันตาม แต่ละช่วงเวลา มีการศึกษาทั้งในคน และในสัตว์หลายสปีชีส์ พบว่า ในคนระดับของ OC ในกระแส เลือดจะมีปริมาณสูงในเวลาเช้ามืด (Lee et al., 2000) จากนั้นจึงค่อย ๆ ลดลง แล้วสูงขึ้นอีกครั้ง ในช่วงเวลาบ่ายและก่อนค่ำ และจะขึ้นสูงสุดในเวลากลางคืน (Lepage et al., 1990) นอกจากนี้ยัง มีความผันแปรไปตามฤดูกาล โดยจะมีปริมาณสูงสุดในฤดูหนาว (Lee et al., 2000) การศึกษา การเปลี่ยนแปลงของระดับ OC ในระหว่างวันของสุนัข โดยศึกษาในสุนัขพันธุ์บีเกิล (beagle) เพศ เมียที่ทำหมันแล้วโดยการตัดรังไข่ออก (ovariectomized) 10 ตัว อายุระหว่าง 3-4 ปี ใน 1 วัน (24 ชั่วโมง) ทำการวัดระดับ OC ทุก 2 ชั่วโมง เริ่มเจาะเก็บเลือดในช่วงเช้า (8.00 น.) ทำการศึกษาสอง ครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ พบว่าระดับค่าเฉลี่ยของ OC ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจนถึงช่วงบ่าย (14.00 น.) และเพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วงเช้ามืด (6.00 น.) (Liesegang et al, 1999) แต่มีความ แตกต่างกับในม้า ซึ่งพบว่าระดับ OC ค่อนข้างคงที่ในช่วงเวลากลางวัน (ช่วงที่มีแสงสว่าง) และมีความ แปรปรวนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในช่วงเวลากลางคืน (ช่วงที่ไม่มีแสงสว่าง) โดยพบว่ามี ระดับต่ำสุดอยู่ที่ 20.00 น. และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งเพิ่มสูงที่สุดที่ช่วงเช้ามืด (05.00 น.) (Lepage et al., 1991)

สำหรับในสุนัข มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับ OC ในช่วงเวลาต่าง ๆ ใน ระหว่างวัน โดยแบ่งเป็น 2 การศึกษาคือ การศึกษาระยะสั้น (short-term study) ทำการเจาะเก็บ เลือดทุก 4 ชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และการศึกษาระยะยาว (long-term study) ทำการเจาะเก็บ เลือดทุกสัปดาห์เป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยศึกษาในสุนัขพันธุ์บีเกิล (beagle) จำนวน 8 ตัว (เพศผู้ 4 ตัวยังไม่ทำหมัน เพศเมีย 1 ตัวทำหมันแล้ว และเพศเมีย 3 ตัวยังไม่ทำหมัน) ตรวจวัดระดับ OC ในซีรัมโดยใช้วิธี RIA จากการศึกษาในระยะสั้น พบว่าระดับ OC ระหว่างวันใน 24 ชั่วโมงแตกต่างกัน

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และมีระดับ OC ขึ้นสูงในเวลากลางคืน และสูงที่สุดช่วงเช้า มีด (04.13 น.) ก่อนจะค่อย ๆ ลดลงในช่วงกลางวัน และลดต่ำที่สุดในช่วงเย็น ส่วนการศึกษาในระยะยาว พบว่าระดับ OC ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ถึงแม้จะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่าการเปลี่ยนแปลงระดับ BALP ในซีรัมสุนัขในระหว่างสัปดาห์ (inter-subject variability) มีค่ามากกว่าการเปลี่ยนแปลงระดับ BALP ในซีรัมสุนัขภายในสัปดาห์เดียวกัน (intra-subject variability) เสมอ (Ladlow et al., 2002) ยาที่ใช้ระงับอาการชัก (anticonvulsant) มีผลทำให้ความเข้มข้นของ OC ในซีรัมเพิ่มสูงขึ้น ส่วนยาในกลุ่ม glucocorticoids และอนุพันธ์ของยาเบื้อหนุชนิด coumarins เช่น warfarin มีผลทำให้ระดับ OC ในกระแสเลือดลดลง (Lee et al., 2000) ภายหลังจากการเกิดกระดูกหัก OC จะมีความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 20-60 เปอร์เซ็นต์ และคงอยู่ในระดับสูงนานติดต่อกัน 6 เดือนหรือมากกว่านั้น (Watts, 1999) (ภาพที่ 2-14)



ภาพที่ 2-14 ระดับ OC ในซีรัมของคนในภาวะปกติ ภาวะที่เกี่ยวกับกระดูก และภาวะที่ไม่เกี่ยวกับกระดูก เปรียบเทียบระดับ OC ในภาวะปกติ (แถบทึบ) และระดับ OC ในภาวะกระดูกหัก (ลูกศร) (Polak-Jonkisz and Zwolinska, 1998)

ความเปลี่ยนแปลงของระดับ OC ในซีรัมของคน ภายหลังจากกระดูกหัก จากการศึกษาแบบไปข้างหน้า (prospectively) ในคน 14 คน (เพศชาย 13 คนและเพศหญิง 1 คน) อายุเฉลี่ย 38 ปี (20-56 ปี) ที่มีกระดูกหัก 1-2 แห่ง และได้รับการแก้ไขกระดูกหักด้วยการผ่าตัดใส่เครื่องมือยึดตรึงกระดูกภายใน (internal fixation) ภายใน 11 วันหลังจากกระดูกหัก ผู้ป่วย 7 คนได้รับการเจาะเก็บเลือดในวันแรกที่กระดูกหัก และเจาะติดตามผลมากกว่า 2 เดือน อีก 7 คนได้รับการเจาะเก็บเลือดภายใน 3-7 วันหลังจากกระดูกหัก และเจาะติดตามผล 3-4 สัปดาห์ในผู้ป่วย 4 คน และ 8 สัปดาห์ในผู้ป่วย 3 คน เปรียบเทียบระดับ OC ในซีรัมกับเพศชาย 2 คน อายุ 18-20 ปีที่ไม่มีการหักของกระดูก พบว่าระดับ OC ในซีรัมจากผู้ป่วยทั้ง 14 คนมีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) และมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น จากการศึกษาครั้งนี้ยังสรุปได้อีกว่าตำแหน่งที่หักของกระดูกและระยะเวลาในการยึดตรึงกระดูกไม่มีผลต่อระดับ OC ในซีรัมของคน (Obrant et al., 1990)

ความเปลี่ยนแปลงของระดับ OC ในซีรัมสุนัขภายหลังจากกระดูกหัก มีการศึกษาความเปลี่ยนแปลงของ OC ในซีรัม ภายหลังจากการเหนี่ยวนำให้เกิดกระดูกหัก และแก้ไขกระดูกหักด้วยการผ่าตัดใส่เครื่องมือยึดตรึงกระดูก ทำการศึกษาในสุนัขพันธุ์ผสม เพศผู้ อายุระหว่าง 1-3 ปี จำนวน 6 ตัว เหนี่ยวนำให้กระดูกขาหลังส่วน femur หักหนึ่งข้าง และแก้ไขกระดูกหักด้วยวิธี intramedullary osteosynthesis โดยใช้ Kuntcher nail ศึกษาโดยเจาะเลือด เพื่อเก็บตัวอย่างซีรัมก่อนการผ่าตัด และหลังผ่าตัดที่ 1, 2, 3, และ 4 สัปดาห์ตามลำดับ นำมาตรวจวัดระดับของ OC ในซีรัม ด้วยวิธี RIA พบว่าระดับ OC ในซีรัมเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนผ่าตัด แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) (Paskalev, 2005)

OC มีค่าครึ่งชีวิตในร่างกายค่อนข้างสั้น คือ ประมาณ 4 นาที โดยถูกไฮโดรไลซ์ที่ตับและไต สามารถเสื่อมสภาพได้ทั้งในซีรัม โดยเอนไซม์ protease จากเม็ดเลือดแดงในซีรัม (Polak-Jonkisz and Zwolinska, 1998; Watts, 1999) และในพลาสมาที่ได้จากการเติมสารกันเลือดแข็งตัวเช่น EDTA, heparin และ citrate (Polak-Jonkisz and Zwolinska, 1998) และควรหลีกเลี่ยง potassium oxalate กับ sodium fluoride ในสารกันเลือดแข็งตัวด้วยเช่นกัน (Lee et al., 2000) นอกจากนี้ OC ยังมีความไม่คงตัวในเลือด สามารถเสื่อมหรือสลายได้ง่ายใน whole blood และหากมีการแตกของเม็ดเลือดแดงเกิดขึ้น ฮีโมโกลบินจะถูกปล่อยออกมา มีผลทำให้ความเข้มข้นของ OC ในซีรัมและพลาสมาลดลงด้วยเช่นกัน (Polak-Jonkisz and Zwolinska, 1998) OC สามารถรวมตัวได้กับไขมันในซีรัมหรือพลาสมาที่มีไขมันสูงเกินไป มีผลทำให้ระดับของ OC ลดลง และอาจทำให้การวัดระดับ OC ได้ผลลบลง (false negative) ได้ (Watt, 1999)

ภายหลังการเจาะเลือดควรเก็บรักษาตัวอย่างเลือดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสทันที ทำการปั่นเก็บซีรัมหรือพลาสมาให้เร็วที่สุด (Lee et al., 2000) หรือให้เสร็จสิ้นกระบวนการปั่นเก็บตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมาภายในเวลา 2-3 ชั่วโมง ตั้งแต่เริ่มทำการเจาะเก็บตัวอย่างเลือด และปั่นเก็บตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมาด้วยเครื่องปั่นเย็น (cold-centrifuged) (Polak-Jonkisz and Zwolinska, 1998)

การแช่แข็ง (freezing) จะทำให้การเสื่อมของ OC ในซีรัม หรือพลาสมาเกิดได้ช้าลง (Polak-Jonkisz and Zwolinska, 1998) ดังนั้นหากยังไม่สามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ OC ได้ ควรนำซีรัมหรือพลาสมาแช่แข็งไว้จนกว่าจะนำมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ OC การแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า จะเก็บรักษาได้นานประมาณ 6 เดือน (Allen, 2003) แต่จะเก็บรักษาได้นานขึ้น หากแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส (Lee et al., 2000) แต่ทั้งนี้ทั้งนั้น การเสื่อมสลายของ OC จะเพิ่มขึ้นในทุก ๆ ครั้งที่มีการแช่แข็งและการละลาย ดังนั้นการแช่แข็งและการละลายในรอบที่สองหรือสาม หรือมากกว่า จะทำให้ความเข้มข้นของ OC ลดลงเรื่อย ๆ (Polak-Jonkisz and Zwolinska, 1998) จึงควรแบ่งเก็บรักษาซีรัมหรือพลาสมาที่ต้องการใช้ตรวจวัดระดับ OC ในหลอดเก็บตัวอย่างหลาย ๆ หลอด เพื่อหลีกเลี่ยงการแช่แข็งและการละลายของตัวอย่างหลาย ๆ ครั้ง (Allen, 2003)

การประเมิน OC มีวิธีที่สามารถวัดระดับ OC ในซีรัมและพลาสมาได้ เช่น radioimmunoassay (RIA) (Allen et al., 1998) immunoradiometric assay (IRMA) และ enzyme immunoassay (ELISA) ซึ่งแต่ละวิธีสามารถใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปที่มีจำหน่ายในปัจจุบันตรวจได้ (Master et al., 1994; Lee et al., 2000; Allen, 2003)

## 8. Amino- และ Carboxy-terminal procollagen I extension peptide

### (PINP และPICP) และ Amino-terminal extension peptide (PIINP)

บทบาทของ fibrillar collagen type I และ III ในการซ่อมแซมกระดูกหัก

- Collagen type I เป็น collagen ชนิดเดียวที่พบใน mature bone สังเคราะห์ขึ้นจากการทำงานของ osteoblast ในช่วงท้ายของการสร้างกระดูกใหม่ (Allen, 2003) ประกอบด้วยส่วนที่เป็น organic matrix มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาเป็น type I procollagen ขนาดใหญ่ ซึ่งประกอบด้วย extension peptide จำเพาะที่ปลายทั้งสองข้าง ในระหว่างที่มีการสังเคราะห์ collagen fibrils นั้น amino- และ carboxy-terminal extension peptide (PINP และ PICP) ที่สมบูรณ์จะถูกตัดออกโดย extracellular proteases และปล่อยสู่กระแสเลือด (Allen et

al., 1998; Allen, 2003) สามารถตรวจวัดระดับความเข้มข้นของ PICP และ PINP ในซีรัมด้วยวิธี radioimmunoassay และใช้เป็น marker ของการสังเคราะห์ type I collagen ในร่างกายได้ (Joerring et al., 1992)

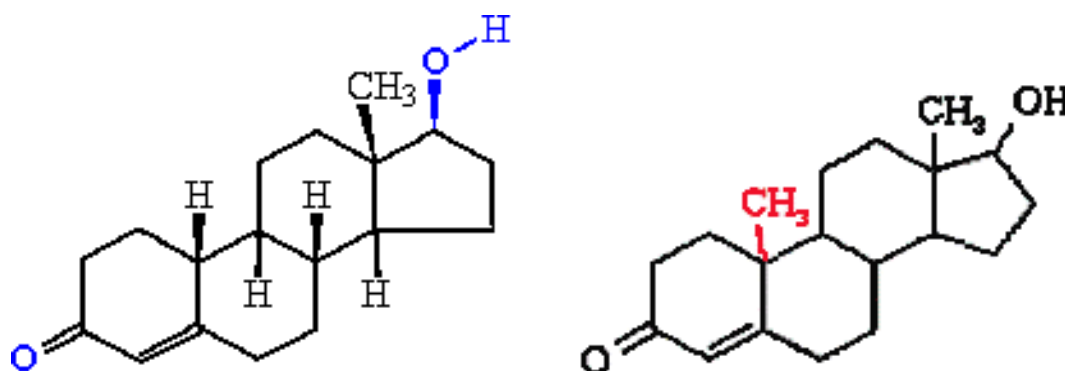
- Collagen type III พบว่าเป็นส่วนประกอบของกระดูกอ่อนในช่วงต้นของการซ่อมแซมกระดูกที่หัก และจะถูกแทนที่ในเวลาต่อมาด้วย collagen type I ในระหว่างที่มีการสังเคราะห์ type III fibrils นั้น amino-terminal procollagen III extension peptide (PIIINP) จะถูกตัดออกจาก type III procollagen ชิ้นส่วนของ PIIINP ที่ถูกตัดออกมาจะมีขนาดเล็กและจะไปต่อเข้ากับ type I collagen fibrils และเมื่อเกิดการสลาย (degradation) ของ fibrils เกิดขึ้น PIIINP จะถูกปล่อยออกมาอีกครั้ง ดังนั้นความเข้มข้นของ PIIINP ในซีรัมจะบ่งชี้ในกรณีของการสังเคราะห์ และการสลายของ type III collagen (Joerring et al., 1992)

มีการศึกษาระดับความเข้มข้นของ PICP และ PIIINP ในซีรัมของคน ในการสังเคราะห์ collagen ในระหว่างที่มีการซ่อมแซมกระดูกที่หัก โดยเปรียบเทียบความสัมพันธ์กับระดับของ OC ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การทำงานของ osteoblast ในขณะที่มีการซ่อมแซมกระดูกที่หัก ศึกษาในผู้ป่วยที่มีกระดูกหักและได้รับการแก้ไขโดยการใส่เฝือกจำนวน 16 คน (เพศชาย 2 คน และเพศหญิง 14 คน) เจาะเก็บตัวอย่างเลือดในวันที่ได้รับการแก้ไขภาวะกระดูกหัก สัปดาห์ที่ 1, 2 และ 5 จากนั้นเจาะเก็บเลือดในเดือนที่ 9 เพื่อตรวจวัดระดับ PICP PIIINP และ OC ด้วยวิธี radioimmunoassay พบว่าระดับ PICP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในสัปดาห์ที่ 2 ระดับ PIIINP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) ในสัปดาห์ที่ 1 และระดับ OC เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) ในสัปดาห์ที่ 1 ระดับของ PIIINP ที่สูงขึ้นในสัปดาห์แรกบ่งชี้ถึงการที่ collagen type III เป็นส่วนประกอบของกระดูกอ่อนในช่วงต้น ก่อนจะถูกแทนที่ด้วย collagen type I ทำให้ระดับของ PICP สูงขึ้นต่อมาในสัปดาห์ที่ 2 (Joerring et al., 1992)

การศึกษาระดับของ PICP และ PINP ในซีรัมสุนัขปกติด้วย human radioimmunoassay โดยใช้ rabbit-origin PICP antibody และ rabbit-origin PINP antibody ตามลำดับ พบว่า ระดับของ PICP และ PINP ไม่สอดคล้องกับระดับของ PICP และ PINP ของคนที่ใช้เป็นมาตรฐานเปรียบเทียบ (Allen et al., 1998)

## 9. Nandrolone laurate

Nandrolone เป็น anabolic steroids สังเคราะห์ที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน แต่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างอะตอมของคาร์บอนที่ตำแหน่งที่ 19 (ภาพที่ 2-15) ทำให้มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการสร้างพลังงานและเนื้อเยื่อ (anabolic effect) เพิ่มขึ้น และฤทธิ์ที่เกี่ยวกับลักษณะความเป็นชาย (androgenic effect) ลดลง ส่งผลให้ฤทธิ์ที่เกี่ยวกับลักษณะความเป็นชายต่ำกว่าฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (Plumb, 2005)



ภาพที่ 2-15 โครงสร้างทางเคมีที่คล้ายคลึงกันของ (A) anabolic steroids (nandrolone ester) และ (B) ฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (<http://www.chm.bris.ac.uk/motm/nandrolone/nandv.htm>)

Nandrolone ester มีชื่อทางการค้าหลายชื่อ เช่น Durabolin<sup>®</sup>, Deca-Durabolin<sup>®</sup> และ Laurabolin<sup>®</sup> เป็นต้น มีรูปแบบยาเตรียม และสารประกอบเอสเทอร์ (ester side chains) ที่แตกต่างกันและจากความแตกต่างนี้ทำให้ระยะเวลาในการออกฤทธิ์ของยาแต่ละตัวต่างกันด้วย

- Durabolin<sup>®</sup> ประกอบด้วย phenylpropionic ester ของ nandrolone จึงเรียกว่า nandrolone phenylpropionate มีระยะเวลาในการออกฤทธิ์ประมาณ 1 สัปดาห์

- Deca-Durabolin<sup>®</sup> ประกอบด้วย decanoic ester ของ nandrolone จึงเรียกว่า nandrolone decanoate มีระยะเวลาในการออกฤทธิ์ 2-3 สัปดาห์

- Laurabolin<sup>®</sup> มีองค์ประกอบเป็น dodecanoic ester (laurate) ของ nandrolone จึงเรียกว่า nandrolone laurate หรือ 19-nor-testosterone based steroid และมีระยะเวลาการออกฤทธิ์ 3-4 สัปดาห์



รูปแบบของยาเป็นยาฉีดเข้าน้ำมัน สีเหลืองอ่อนใส ใช้ฉีดเข้ากล้ามเนื้อหรือใต้ผิวหนัง ยาจะถูกดูดซึมจากบริเวณที่ฉีดเข้าสู่เส้นเลือดบริเวณส่วนปลาย (peripheral circulation) และถูกไฮโดรไลซ์ (hydrolyzed) อย่างรวดเร็วได้เป็น nandrolone ที่สามารถออกฤทธิ์ได้ ขนาดแนะนำที่ใช้ในสุนัขคือ 1-5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ขนาดใช้สูงสุดคือ 40-50 มิลลิกรัมต่อตัว โดยฉีดเข้าใต้ชั้นผิวหนังหรือกล้ามเนื้อทุก 2-4 สัปดาห์ (วรา พานิชเกรียงไกร และคณะ, 2551)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ nandrolone ester มีฤทธิ์เหมือน anabolic steroids ทั่วไป คือมีฤทธิ์ในการส่งเสริมกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อของร่างกาย และทำให้เกิดการย้อนกลับของปฏิกิริยาสลายไปเพื่อสลายให้ได้พลังงาน (reverse catabolism) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดง โดยกลไกการออกฤทธิ์ยังไม่มีรายงานที่แน่นอน แต่เชื่อว่าทำให้ปริมาณเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นโดยการไปกระตุ้นที่เซลล์ตั้งต้นของการสร้างเม็ดเลือดแดง (red cell precursors) ในไขกระดูกโดยตรง ทำให้ red cell 2,3-diphosphoglycerate เพิ่มขึ้น และทำให้การสร้าง erythropoietin จากไตเพิ่มขึ้นด้วย ข้อบ่งใช้ของ nandrolone ester ในทางสัตวแพทย์ ใช้ในการกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดงในสัตว์ป่วยที่มีภาวะโลหิตจางในกรณี เช่น secondary to renal failure และ aplastic anemias เป็นต้น และยังมีการแนะนำให้ใช้เพื่อกระตุ้นความอยากอาหาร (appetite stimulant) อีกด้วย ในทางสัตวแพทย์ยังไม่มีข้อบ่งใช้สำหรับ nandrolone ester ที่จำเพาะในสัตว์แต่ละสปีชีส์ แต่มีข้อควรระวังหรือผลข้างเคียง ซึ่งอ้างอิงมาจากข้อมูลของคน คือมีโอกาสทำให้สุนัขและแมวเกิดภาวะ sodium, calcium, potassium, water, chloride และ phosphate retention ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อตับ (hepatotoxicity) ดังนั้นหลังจากใช้ยาหรือมีการใช้เป็นระยะเวลานาน ควรมีการตรวจเลือดเพื่อประเมินการทำงานของตับร่วมด้วยเป็นระยะ ๆ เนื่องจาก nandrolone ester มีโครงสร้างและฤทธิ์คล้ายคลึงกับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน จึงอาจทำให้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมเกี่ยวกับลักษณะความเป็นชาย และมีความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ (reproductive abnormalities) ได้ เช่น เกิดภาวะ oligospermia และ estrus suppression เป็นต้น (Plumb, 2005)

ผลของ nandrolone ester ต่อกระดูก ได้มีการศึกษาผลของ nandrolone ester ต่อกระดูกในคน โดยทำการศึกษาประสิทธิภาพของ nandrolone decanoate ต่อมวลกระดูก (bone mineral content) ร่วมกับการได้รับแคลเซียมเสริมชนิดกินในผู้หญิงที่มีภาวะกระดูกบาง (osteoporosis) หลังวัยหมดประจำเดือน (post-menopausal) พบว่า nandrolone decanoate มีประสิทธิภาพในการเพิ่มมวลกระดูก โดยไปยับยั้งการสลายของมวลกระดูก ซึ่งสอดคล้องกับการลดลงของ bone resorption marker ที่วัดได้จากปัสสาวะ (Gennari et al., 1989) ต่อมาในปี

1993 Passeri และคณะ ได้ศึกษาเกี่ยวกับผลของ nandrolone decanoate ต่อมวลกระดูกในผู้หญิงที่มีภาวะกระดูกบางหลังวัยหมดประจำเดือนเช่นกัน พบว่า nandrolone decanoate ให้ผลไปในทางบวกต่อความหนาแน่นของมวลกระดูก (bone mineral density) ร่วมกับการลดลงของ bone resorption marker ที่วัดได้จากปัสสาวะ และยังพบว่า bone formation marker ชนิด osteocalcin มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นอีกด้วย นอกจากนี้มีการศึกษาผลของ nandrolone ester ในเพศชาย โดยทำการศึกษาผลของ nandrolone decanoate ต่อภาวะกระดูกบางในเพศชาย พบว่าผู้ชายที่ได้รับการฉีด nandrolone decanoate ร่วมกับการได้รับแคลเซียมชนิดกินมีมวลกระดูกเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ชายที่ได้รับแคลเซียมโดยการกินเพียงอย่างเดียว (Hamdy et al., 1998)

การศึกษาผลของ nandrolone ester ต่อกระดูกในสัตว์สปีชีส์อื่น ๆ พบว่า nandrolone phenylpropionate มีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของกระดูกศีรษะส่วน craniofacial ในหนูขาวเพศเมีย กระดูกศีรษะ ขากรรไกรบนและขากรรไกรล่างของหนูขาวมีความยาวเพิ่มขึ้น รวมถึงมีการทำงานของกล้ามเนื้อส่วน masticatory ดีขึ้นด้วย นอกจากนี้ยังทำให้น้ำหนักตัวของหนูขาวเพิ่มขึ้นประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ (Noda et al., 1994) การศึกษาผลของ nandrolone decanoate ต่อการเจริญเติบโตของกระดูกขากรรไกรล่างในหนูขาว พบว่า nandrolone decanoate มีผลต่อการเจริญเติบโตของกระดูกขากรรไกรล่างในหนูขาววัยเด็ก (juvenile) และหนูขาวที่โตเต็มวัย (adult) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบว่าในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ nandrolone decanoate ทั้งสองกลุ่มอายุ มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับยา (Gebhardt และ Pancherz, 2003)

การศึกษาผลของ nandrolone ester ในทางคลินิก มีการศึกษาประสิทธิภาพของ nandrolone laurate เพื่อฟื้นฟูสภาพภายหลังการใช้งานในม้า พบว่า nandrolone laurate ทำให้อัตราการฟื้นตัวของกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้นภายหลังการใช้งาน โดยไปทำให้การส่งออกของกลูโคสจากตับเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ความเข้มข้นของฮอร์โมนอินซูลินในพลาสมาสูงขึ้น และการขนส่งกลูโคสโดยอาศัยฮอร์โมนอินซูลินเพิ่มขึ้นด้วย (Hyppä, 2001)

## 10. การประเมินการเชื่อมของกระดูก

ในการประเมินการเชื่อมของกระดูกหักในทางคลินิก มีหลายวิธี เช่น การใช้การถ่ายภาพรังสีวินิจฉัย (radiography, X-rays), Computed tomography (CT), Magnetic resonance imaging (MRI) และ Tc-Methyl diphosphonate (Tc-MDP) เป็นต้น วิธีที่มีการใช้ในทางสัตวแพทย์โดยทั่วไปคือการถ่ายภาพรังสีวินิจฉัย เมื่อตรวจสอบและติดตามผลการเชื่อมของกระดูก ด้วยวิธีนี้ จะพบว่ามีการเชื่อมมาเกาะบริเวณที่มีกระดูกหัก ความขุ่นบริเวณปลายของกระดูกหักจะค่อย ๆ ลดลง และจะไม่ปรากฏรอยหักของกระดูก (fracture line) ต่อมาในตอนท้ายของการเชื่อมกระดูกหักจะมีการสร้างกระดูกส่วน cortex และเกิด medullary cavity ตามมา (Thrall, 2002)

การศึกษาความสัมพันธ์ของระดับ ALP ในซีรัมกับการเชื่อมของกระดูกหักในสุนัขของ Komnenou และคณะในปี 2005 ได้ใช้การถ่ายภาพรังสีวินิจฉัยเป็นตัวประเมินการเชื่อมของกระดูกหัก และจากภาพถ่ายทางรังสีวินิจฉัยของสุนัขจำนวน 83 ตัว สามารถแบ่งสุนัขออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

- กลุ่ม A (สุนัขจำนวน 35 ตัว) เป็นกลุ่มที่มีการเชื่อมของกระดูกหักเป็นปกติ มีกระดูกเชื่อมมาเชื่อมบริเวณกระดูกหักค่อนข้างมาก (medium-sized) ภายใน 2 เดือน
- กลุ่ม B (สุนัขจำนวน 36 ตัว) เป็นกลุ่มที่มีการเชื่อมของกระดูกค่อนข้างช้า จากภาพถ่ายรังสีวินิจฉัยเมื่อครบ 2 เดือนมีกระดูกเชื่อมมาพอกบริเวณกระดูกที่หัก แต่ยังไม่ปรากฏรอยหักของกระดูกอยู่ สุนัขในกลุ่มนี้ใช้เวลาในการเชื่อมของกระดูก 3 เดือนจำนวน 26 ตัว 4 เดือนจำนวน 9 ตัว และ 5 เดือนจำนวน 6 ตัว
- กลุ่ม C (จำนวนสุนัข 12 ตัว) เป็นกลุ่มที่มีการเชื่อมของกระดูกช้ามาก โดยภายใน 2 เดือนมีกระดูกเชื่อมค่อนข้างน้อย และไม่มีการเชื่อมของรอยต่อบริเวณกระดูกหัก

เมื่อวัดระดับความเข้มข้นของ ALP พบว่าระดับ ALP ของสุนัขในกลุ่ม A มีความสัมพันธ์สอดคล้องกับภาพถ่ายรังสีวินิจฉัย โดยพบว่าระดับของ ALP สูงที่สุดและค่อย ๆ ลดระดับลงจนถึงระดับอ้างอิง (24-129 U/L) พร้อมกับการเชื่อมของกระดูกเมื่อครบ 60 วัน เช่นเดียวกับกลุ่ม B ที่มีระดับของ ALP สอดคล้องกับภาพถ่ายรังสีวินิจฉัยเช่นกัน โดยพบว่ามีระดับของ ALP ขึ้นสูง แต่ต่ำกว่ากลุ่ม A และเมื่อครบ 60 วันยังคงมีระดับของ ALP สูงระดับอ้างอิงอยู่ และคงระดับจนครบ 150 วันที่พบการเชื่อมของกระดูกหัก ส่วนในกลุ่ม C ภายในระยะเวลา 2 เดือน พบว่าระดับของ ALP อยู่ที่ระดับอ้างอิง

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### วัสดุและอุปกรณ์

##### 1. สัตว์ทดลอง

สุนัข ไม่จำกัดเพศและสายพันธุ์ จำนวนทั้งสิ้น 16 ตัว อายุ 1-7 ปี ที่มีภาวะกระดูกอ่อนยาวขาหน้าหรือขาหลังหักไม่เกิน 1 สัปดาห์ และเข้ารับการรักษาแก้ไขภาวะกระดูกอ่อนยาวขาหน้าหรือขาหลังหักด้วยวิธีการผ่าตัดที่โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยทางผู้วิจัยได้ชี้แจงขั้นตอนการวิจัย และเจ้าของสุนัขที่ยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยได้ลงนามยินยอมในใบอนุญาตที่ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่อนงานทางวิทยาศาสตร์ ให้เป็นไปตามจรรยาบรรณสัตว์ทดลองของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

##### 2. ยา

Anabolic steroids ชนิด nandrolone laurate (Laurabolin<sup>®</sup>) ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รูปแบบยาฉีดเข้าน้ำมัน [บริษัทอินเตอร์เวท (ประเทศไทย) จำกัด, กรุงเทพฯ] บรรจุในขวดแก้วใส ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

##### 3. สารเคมี

- NaCl	(Merck, Germany)
- KCl	(Fluka, Switzerland)
- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	(Merck, Germany)
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(Merck, Germany)
- H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(Carlo Erba, Italy)
- NaOH	(Merck, Germany)

##### 4. ชุดตรวจสำเร็จรูป

- ชุดตรวจ Gla-type Osteocalcin EIA Kit Manual (Takara Bio Inc, Japan)
- ชุดตรวจ TRACP & ALP Assay Kit (Takara Bio Inc, Japan)

## 5. เครื่องมือ

- Biopette Multichannel (Labnet international, Inc, Poland)
- Refrigerated microcentrifuge (Hettich, Germany)
- Spectrophotometer (GDV, Italy)
- Microtube (Hycon, U.S.A.)
- Water bath (digital heat) (Scientific Promotion Co.,Ltd., Thailand)

### วิธีดำเนินการทดลอง

การศึกษาผลของ nandrolone laurate ต่อการเชื่อมของกระดูกในสุนัข แบ่งเป็นขั้นตอนการศึกษาดังนี้

#### ขั้นตอนที่ 1: การคัดเลือกและแบ่งกลุ่มสุนัข

สุนัขที่มีภาวะกระดูกอ่อนยาวขาหน้าหรือขาหลังหักไม่เกิน 1 สัปดาห์ ไม่มีแผลเปิดบริเวณผิวหนัง จากการตรวจทางกายภาพ (physical examination) ร่วมกับการประเมินทางรังสีวินิจฉัย (X-rays) และได้รับการพิจารณาให้แก้ไขภาวะกระดูกอ่อนยาวขาหน้าหรือขาหลังหักด้วยวิธีการผ่าตัด ณ โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 16 ตัว ไม่จำกัดเพศและสายพันธุ์ (ตารางที่ 3 – 1) มีอายุอยู่ระหว่าง 1-7 ปี โดยทางผู้วิจัยได้ชี้แจงขั้นตอนการวิจัย และเจ้าของสุนัขที่ยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยได้ลงนามยินยอมในใบอนุญาตที่ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ให้เป็นไปตามจรรยาบรรณของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ก่อนผ่าตัดสุนัขทุกตัวได้รับการเจาะเลือดเพื่อตรวจนับเม็ดโลหิต (complete blood count) และค่าทางเคมีโลหิต (blood chemistry profile) เพื่อประเมินความพร้อมก่อนการผ่าตัด และนัดวันผ่าตัดสุนัขที่มีความผิดปกติของค่าทางเคมีโลหิต หรือต้องได้รับการรักษาด้วยยากกลุ่ม glucocorticoids ถูกคัดออกจากการทดลอง แบ่งสุนัขเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม 8 ตัว และกลุ่มศึกษา 8 ตัว

#### ตารางที่ 3 -1 การแบ่งกลุ่มสุนัข สายพันธุ์ และเพศของสุนัขในแต่ละกลุ่ม

กลุ่มควบคุม (n=8)	กลุ่มศึกษา (n=8)
ปอมเมอเรเนียน (เพศผู้ 2 ตัว)	ปอมเมอเรเนียน (เพศเมีย 1 ตัว)
พูเดิ้ล (เพศผู้ 1 ตัว, เพศเมีย 2 ตัว)	พูเดิ้ล (เพศผู้ 2 ตัว, เพศเมีย 1 ตัว)
มินเจอร์ ฟินเชอร์ (เพศผู้ 1 ตัว)	ลาบราดอร์ (เพศผู้ 1 ตัว)
ชิลีห์ (เพศผู้ 1 ตัว)	ไทยผสม (เพศผู้ 1 ตัว, เพศเมีย 2 ตัว)
ไทยผสม (เพศผู้ 1 ตัว)	

## ขั้นตอนที่ 2 : การดำเนินการทดลอง

วันผ่าตัดแก้ไขภาวะกระดูกหัก (สัปดาห์ที่ 0) ก่อนเริ่มการผ่าตัด เจาะเลือดและแยกเก็บซีรัมเพื่อตรวจวัดระดับ OC, BALP, total calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) และ inorganic phosphorus (P) ในกระแสเลือด (Paskalev et al, 2005) สุนัขทุกตัวได้รับการรักษาและแก้ไขภาวะกระดูกขาพ่อนยาวหักด้วยวิธีการผ่าตัด

หลังผ่าตัดทำการฉีด nandrolone laurate ขนาด 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่ไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อตัวเข้าใต้ผิวหนังบริเวณกึ่งกลางหลังระหว่างกระดูกสะบักทั้งสองข้างในกลุ่มศึกษาทุกตัว ส่วนสุนัขในกลุ่มควบคุม ไม่ได้รับการฉีด nandrolone laurate เพื่อใช้เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ สุนัขทุกตัวในการศึกษารั้งนี้ ได้รับแคลเซียมเสริมชนิดกิน ในขนาด 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวสุนัข 10 กิโลกรัม วันละครั้งตลอดระยะเวลาการศึกษา

ติดตามผลในสัปดาห์ที่ 1, 2, 4, 8 และ 12 ภายหลังจากผ่าตัดแก้ไขภาวะกระดูกหัก เจาะเลือดและแยกเก็บซีรัมเพื่อตรวจวัดระดับ OC, BALP, total  $\text{Ca}^{2+}$ , inorganic P และปริมาณเม็ดโลหิตเปรียบเทียบระหว่างสุนัขกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับการฉีด nandrolone laurate สัปดาห์ที่ 2 และ 4 ภายหลังจากผ่าตัดแก้ไขภาวะกระดูกหัก ฉีด nandrolone laurate ในขนาดเดิม โดยทำการฉีดภายหลังจากการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดแล้ว สัปดาห์ที่ 8 ประเมินค่าทางเคมีโลหิตภายหลังจากได้รับ nandrolone laurate และประเมินผลการเชื่อมกระดูกหักด้วยการถ่ายภาพรังสีวินิจฉัยในสัปดาห์ที่ 4, 8 และ 12

การเก็บตัวอย่างเลือด เจาะเก็บเลือดจากหลอดเลือดดำบริเวณขาหน้าหรือขาหลัง (cephalic หรือ saphenous vein) ระหว่างเวลา 09.00 - 09.30 น. ตามวิธีของ Mohamadnia และคณะ (2007) โดยเจาะเลือดให้เสร็จภายในเวลา 30 นาที (Allen et al., 2000) เก็บรักษาตัวอย่างเลือดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสทันทีภายหลังจากเจาะเก็บตัวอย่างเลือด นำตัวอย่างเลือดปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บซีรัมด้วยเครื่อง refrigerated microcentrifuge ที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที โดยการปั่นเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แบ่งเก็บซีรัมไว้ในหลอดเก็บเลือด หลอดละประมาณ 100-150 ไมโครลิตร นำตัวอย่างซีรัมเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาทำการศึกษาต่อไป

### ขั้นตอนที่ 3: การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

1. การตรวจวัดระดับ osteocalcin (OC) ในซีรัม ด้วยวิธี enzyme immunoassay โดยใช้ mouse monoclonal anti-Gla-OC antibodies เป็นตัวจับกับ Gla-OC และวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป Gla-type osteocalcin EIA Kit manual (Takara Bio Inc, Japan)

1.1 เตรียม washing buffer (phosphate-buffered saline; PBS) โดยผสม NaCl 8.0 กรัม KCl 0.2 กรัม  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9 กรัม และ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 กรัม ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน (standard solution) (Takara Bio Inc, Japan) ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 และ 16 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำค่าที่วัดได้มาทำเป็นกราฟมาตรฐาน

1.3 หยอดซีรัมสุ่นซ์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หรือสารละลายมาตรฐานปริมาตรเท่ากันลงในถาดหลุม (microtiter plate) ที่เคลือบด้วย mouse monoclonal anti-Gla-OC ภายใน 5 นาที (1 หลุมต่อ 1 ตัวอย่างซีรัมหรือสารละลายมาตรฐาน) ปิดถาดหลุมด้วยกระดาษโลหะ (foil) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (20-25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

1.4 เทของเหลวในถาดหลุมทิ้ง ล้างด้วย washing buffer (PBS) จำนวน 3 รอบ

1.5 เติม Antibody-POD conjugate (Takara Bio Inc, Japan) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ปิดถาดหลุมด้วยกระดาษโลหะ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.6 เทของเหลวในถาดหลุมทิ้ง ล้างด้วย washing buffer (PBS) จำนวน 4 รอบ

1.7 เติม substrate solution (Takara Bio Inc, Japan) 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

1.8 เติม stop solution ( $1\text{N H}_2\text{SO}_4$ ) 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ ตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงโดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรทันที

**2 การตรวจวัดระดับ bone alkaline phosphatase (BALP) ในซีรัม** ด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป TRACP & ALP Assay Kit (Takara Bio Inc, Japan) โดยอาศัยการจับกันของ pNPP (*p*-nitro-phenyl phosphate) substrate และ BALP ในซีรัม ตรวจวัดการดูดกลืนแสงโดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานจาก alkaline phosphatase (*E.coli* C75) ความเข้มข้น 0.4 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปรับความเข้มข้นโดยทำให้เจือจาง 2 เท่า (2-fold dilution) 15 ครั้ง เพื่อนำค่าที่วัดได้มาทำเป็นกราฟมาตรฐาน

2.2 หยอดซีรัมสุนัข หรือสารละลายมาตรฐาน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในถาดหลุม (96-well plate) เติม substrate solution (*p*-nitro-phenyl phosphate substrate; pNPP substrate) (Takara Bio Inc, Japan) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที

2.3 เติม stop solution (0.9 N NaOH) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้สักครู่จนเกิดสารประกอบสี นำไปตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงโดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

### 3. การ ตรวจวัดระดับ total $\text{Ca}^{2+}$ และ inorganic P ในห้องปฏิบัติการ

3.1 ตรวจวัดระดับ total  $\text{Ca}^{2+}$  โดยเติม methylthymol blue (Biosystems S.A., Spain) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างซีรัม 10 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) methylthymol blue ทำปฏิกิริยากับ total  $\text{Ca}^{2+}$  ในซีรัม เกิดเป็นสารประกอบสี ตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงโดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร

3.2 ตรวจวัดระดับ inorganic P โดยเติม molybdate 1.0 มิลลิลิตร (Biosystems S.A., Spain) ลงในตัวอย่างซีรัม 10 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) molybdate ทำปฏิกิริยากับ inorganic P ในซีรัม เกิดเป็นสารประกอบ phosphomolybdate ตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงโดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร



## การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  standard error of means) จากนั้นนำผลการทดลองของสุนัขกลุ่มศึกษาที่ได้รับ nandrolone laurate และสุนัขกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ nandrolone laurate มาวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี Student's *t-test* เปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละสัปดาห์ภายในกลุ่มเดียวกัน และความแตกต่างระหว่างกลุ่ม พิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อยู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $p < 0.05$ )

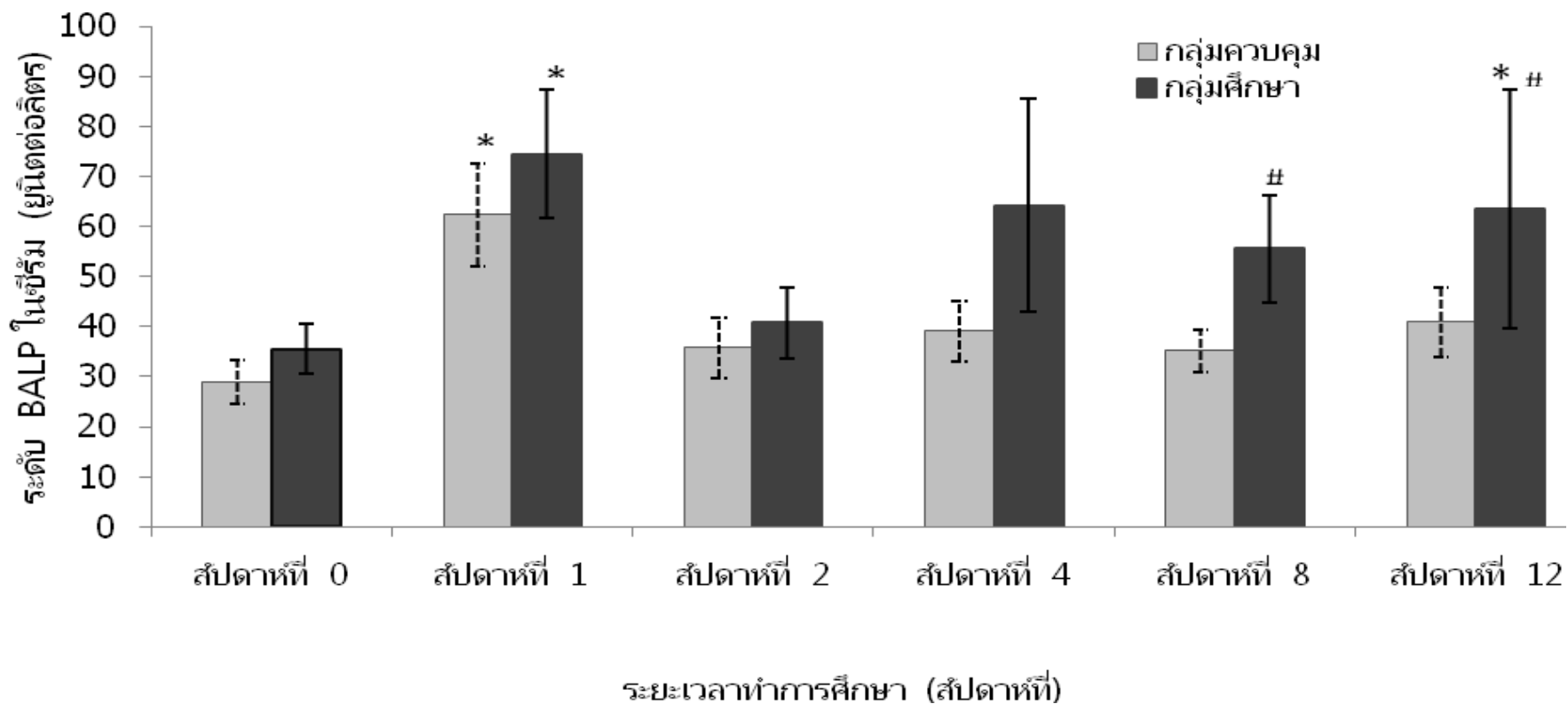
## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### การศึกษาผลของ nandrolone laurate ต่อการเชื่อมกระดูกของสุนัข

##### ผลของ nandrolone laurate ต่อระดับ BALP ในซีรัมของสุนัขกระดูกหัก

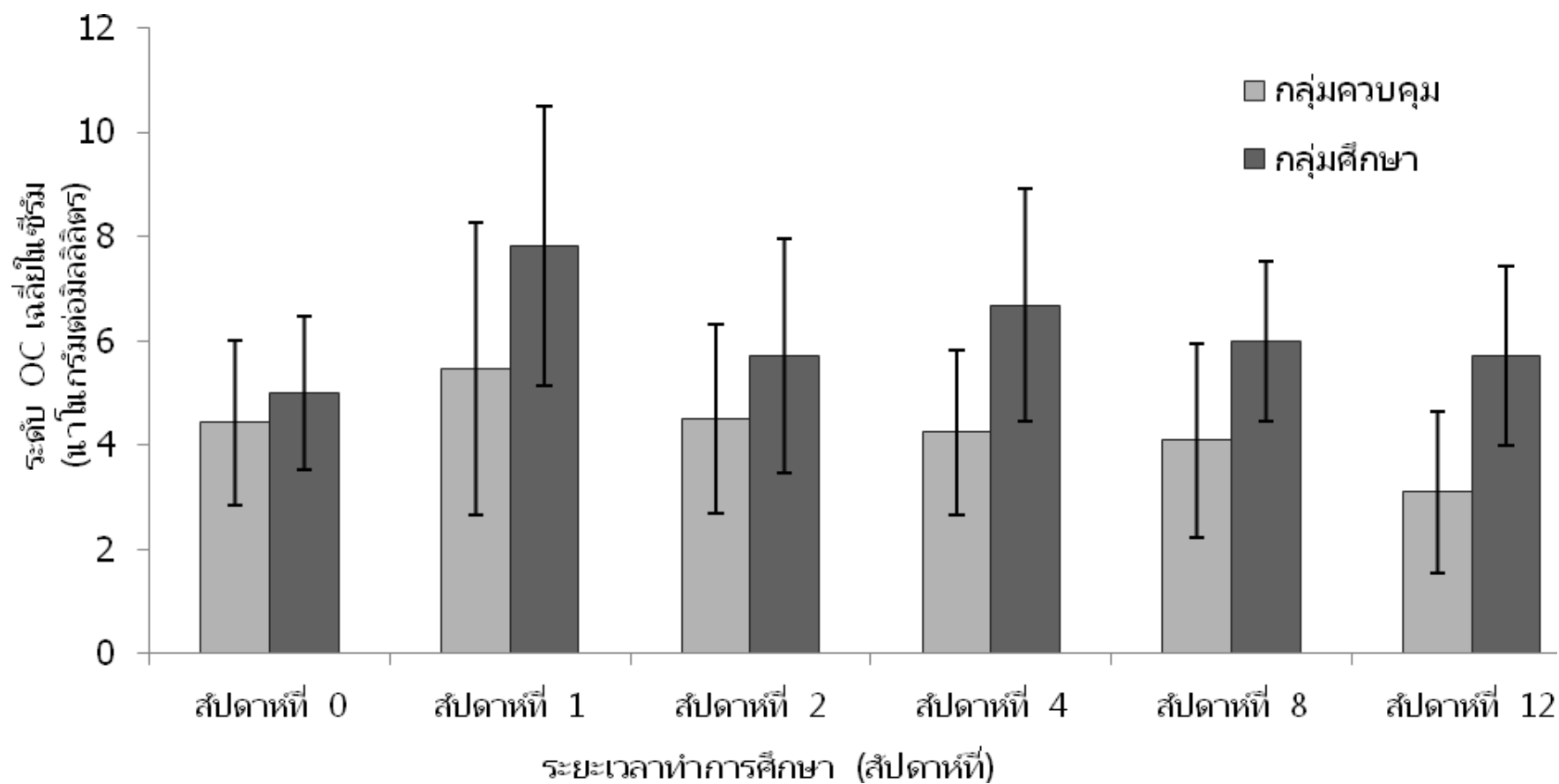
ภาพที่ 4-1 แสดงระดับ BALP ในซีรัมของสุนัขกระดูกหักกลุ่มศึกษา ก่อน และ ภายหลังจากได้รับ nandrolone laurate และสุนัขกลุ่มควบคุม ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0-12 พบว่าสุนัขในกลุ่มศึกษา และกลุ่มควบคุม มีระดับ BALP เฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 0 ก่อนการผ่าตัดแก้ไขภาวะกระดูกหัก เท่ากับ  $35.42 \pm 4.98$  และ  $28.89 \pm 4.25$  ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ของระดับ BALP ในซีรัมเฉลี่ยของสุนัขทั้งสองกลุ่มในสัปดาห์ที่ 0 นี้ ในกลุ่มควบคุมมีระดับ BALP ในซีรัมเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 (สัปดาห์ที่ 0 =  $28.89 \pm 4.25$  และสัปดาห์ที่ 1 =  $62.34 \pm 10.17$  ยูนิตต่อลิตร) จากนั้นระดับ BALP ในซีรัมมีแนวโน้มลดลงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2-12 โดยมีระดับ BALP สูงกว่าสัปดาห์ที่ 0 ตลอดระยะเวลาการศึกษา แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 (สัปดาห์ที่ 2 =  $35.73 \pm 5.99$  สัปดาห์ที่ 4 =  $39.05 \pm 6.09$  สัปดาห์ที่ 8 =  $35.24 \pm 4.20$  และสัปดาห์ที่ 12 =  $40.86 \pm 7.01$  ยูนิตต่อลิตร) ส่วนสุนัขกลุ่มศึกษาพบว่า ระดับ BALP ในซีรัมเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 เช่นกัน (สัปดาห์ที่ 0 =  $35.42 \pm 4.98$  สัปดาห์ที่ 1 =  $74.40 \pm 12.86$  ยูนิตต่อลิตร) จากนั้นลดลงในสัปดาห์ที่ 2 ก่อนเพิ่มขึ้นอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 4 และมีระดับลดลงอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 8 แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) (สัปดาห์ที่ 2 =  $40.73 \pm 7.01$  สัปดาห์ที่ 4 =  $64.19 \pm 21.21$  และสัปดาห์ที่ 8 =  $55.62 \pm 10.73$  ยูนิตต่อลิตร) สัปดาห์ที่ 12 ระดับ BALP ในซีรัมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 (สัปดาห์ที่ 12 =  $63.55 \pm 23.81$  ยูนิตต่อลิตร) และเมื่อเปรียบเทียบระดับ BALP ในซีรัมระหว่างสุนัขกลุ่มศึกษาที่ได้รับ nandrolone laurate และสุนัขกลุ่มควบคุม พบว่าสุนัขกลุ่มศึกษามีระดับ BALP ในซีรัมเพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมในทุกสัปดาห์ของการศึกษา และพบว่าในสัปดาห์ที่ 8 และ 12 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ณ เวลาเดียวกัน



ภาพที่ 4-1 ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ระดับ BALP ในซีรัมของสุนัขกระดูกหักกลุ่มควบคุม (n=8) และกลุ่มศึกษา (n=8) ก่อนและหลังได้รับ nandrolone laurate, \*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ  $P < 0.05$  เมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 0 ของกลุ่มเดียวกัน, #แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ  $P < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ณ เวลาเดียวกัน

### ผลของ nandrolone laurate ต่อระดับ OC ในซีรัมของสุนัขกระดูกหัก

ภาพที่ 4-2 แสดงระดับ OC ในซีรัมของสุนัขกระดูกหักกลุ่มศึกษาภายหลังได้รับ nandrolone laurate และสุนัขกลุ่มควบคุม ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0-12 พบว่าสุนัขในกลุ่มศึกษา และกลุ่มควบคุม มีระดับ OC เฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 0 ก่อนการผ่าตัดแก้ไขกระดูกหักเท่ากับ  $5.01 \pm 1.48$  และ  $4.43 \pm 1.57$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ของระดับ OC ในซีรัมเฉลี่ยของสุนัขทั้งสองกลุ่มในสัปดาห์ที่ 0 นี้ กลุ่มควบคุมมีระดับ OC ในซีรัมเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 1 เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) (สัปดาห์ที่ 0 =  $4.43 \pm 1.57$  และสัปดาห์ที่ 1 =  $5.46 \pm 2.81$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นมีแนวโน้มลดลงจนถึงสิ้นสุดการทดลอง โดยมีระดับต่ำกว่าสัปดาห์ที่ 0 ในช่วงสัปดาห์ที่ 4-12 อย่างไรก็ตามการเพิ่มและลดนี้ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 (สัปดาห์ที่ 2 =  $4.49 \pm 1.81$  สัปดาห์ที่ 4 =  $4.24 \pm 1.59$  สัปดาห์ที่ 8 =  $4.09 \pm 1.85$  และสัปดาห์ที่ 12 =  $3.10 \pm 1.55$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนสุนัขกลุ่มศึกษาพบว่า ระดับ OC ในซีรัมเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 1 จากนั้นมีแนวโน้มลดลงในสัปดาห์ที่ 2 และกลับเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 4 ก่อนจะลดลงอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 8 และ 12 ซึ่งแม้ว่าจะมีค่าสูงกว่าสัปดาห์ที่ 0 ตลอดการศึกษา แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 โดยในสัปดาห์ที่ 1 มีระดับ OC ในซีรัมสูงที่สุด (สัปดาห์ที่ 0 =  $5.01 \pm 1.48$  สัปดาห์ที่ 1 =  $7.82 \pm 2.68$  สัปดาห์ที่ 2 =  $4.49 \pm 1.81$  สัปดาห์ที่ 4 =  $4.24 \pm 1.59$  สัปดาห์ที่ 8 =  $4.09 \pm 1.85$  และสัปดาห์ที่ 12 =  $3.10 \pm 1.55$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อเปรียบเทียบระดับ OC ในซีรัมระหว่างสุนัขกลุ่มศึกษาที่ได้รับ nandrolone laurate และสุนัขกลุ่มควบคุม พบว่าสุนัขกลุ่มศึกษามีระดับ OC ในซีรัมเพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม ณ เวลาเดียวกันในทุกสัปดาห์ของการศึกษา แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )



ภาพที่ 4-2 ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ระดับ OC ในซีรัมของสุนัขกระดูกหักกลุ่มควบคุม (n=8) และกลุ่มศึกษา (n=8) ก่อนและหลังได้รับ nandrolone laurate

### ผลของ nandrolone laurate ต่อระดับ total calcium, inorganic phosphorous และ Ca/P ratio ในซีรัม

ตารางที่ 4 – 1 แสดงระดับ total  $\text{Ca}^{2+}$  และ inorganic P ในซีรัมของสุนัข กระตู่หัก กลุ่มศึกษา ก่อนและหลังได้รับ nandrolone laurate และกลุ่มควบคุม ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0-12 พบว่าค่าเฉลี่ยระดับ total  $\text{Ca}^{2+}$  ในซีรัมของสุนัขกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 (สัปดาห์ที่ 0 =  $13.34 \pm 0.71$  สัปดาห์ที่ 1 =  $12.04 \pm 1.42$  สัปดาห์ที่ 2 =  $12.75 \pm 0.56$  สัปดาห์ที่ 4 =  $13.31 \pm 0.52$  และสัปดาห์ที่ 8 =  $13.30 \pm 0.47$  และสัปดาห์ที่ 12 =  $12.97 \pm 0.26$  มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) และมีระดับสูงกว่าระดับปกติในสุนัข ( $9.3 - 11.9$  มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) (Komnenou., 2005) ตลอดระยะเวลาทำการศึกษ แต่ยังเป็นระดับที่ไม่ทำให้เกิดความผิดปกติของระบบการทำงานของร่างกายสุนัข (16 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) (Bistner et al., 2000) สุนัขกลุ่มศึกษามีค่าเฉลี่ยระดับ total  $\text{Ca}^{2+}$  ในซีรัมอยู่ในระดับปกติของสุนัขตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0 – 2 (สัปดาห์ที่ 0 =  $9.55 \pm 0.97$  สัปดาห์ที่ 1 =  $9.41 \pm 1.75$  สัปดาห์ที่ 2 =  $9.55 \pm 1.05$  มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) และมีค่าเฉลี่ยระดับ total  $\text{Ca}^{2+}$  ลดลงต่ำกว่าระดับปกติในสุนัข ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 – 12 (สัปดาห์ที่ 4 =  $8.17 \pm 0.97$  และสัปดาห์ที่ 8 =  $7.87 \pm 1.12$  และสัปดาห์ที่ 12 =  $5.73 \pm 0.64$  มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) โดยในสัปดาห์ที่ 12 ระดับ total  $\text{Ca}^{2+}$  ในซีรัมลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 และเมื่อเปรียบเทียบระดับ total  $\text{Ca}^{2+}$  ในซีรัมระหว่างสุนัขกลุ่มศึกษาที่ได้รับ nandrolone laurate และสุนัขกลุ่มควบคุม พบว่าสุนัขกลุ่มศึกษามีระดับ total  $\text{Ca}^{2+}$  ในซีรัมต่ำกว่ากลุ่มควบคุมในทุกสัปดาห์ของการศึกษา โดยในสัปดาห์ที่ 0, 2, 4, 8 และ 12 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ณ เวลาเดียวกัน

ค่าเฉลี่ยระดับ inorganic P ในซีรัมสุนัขกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 (สัปดาห์ที่ 0 =  $3.91 \pm 0.64$  สัปดาห์ที่ 1 =  $4.33 \pm 1.37$  สัปดาห์ที่ 2 =  $4.11 \pm 0.31$  สัปดาห์ที่ 4 =  $4.36 \pm 0.44$  สัปดาห์ที่ 8 =  $4.48 \pm 0.44$  และสัปดาห์ที่ 12 =  $3.35 \pm 0.13$  มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) และมีระดับอยู่ในช่วงปกติของสุนัข ( $2.0 - 5.5$  มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) (Komnenou., 2005) ตลอดระยะเวลาการศึกษา สุนัขในกลุ่มศึกษามีระดับ inorganic P ในซีรัมอยู่ในช่วงปกติของสุนัขตลอดระยะเวลาการศึกษาเช่นเดียวกัน (สัปดาห์ที่ 0 =  $3.98 \pm 0.15$  สัปดาห์ที่ 1 =  $5.07 \pm 1.26$  สัปดาห์ที่ 2 =  $4.23 \pm 0.28$  สัปดาห์ที่ 4 =  $5.40 \pm 0.81$  สัปดาห์ที่ 8 =  $5.62 \pm 0.61$  และสัปดาห์ที่ 12 =  $5.30 \pm 1.41$  มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) แต่ในสัปดาห์ที่ 8 และ 12 มีค่าเฉลี่ยระดับ inorganic P ในซีรัมเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อ

เทียบกับสัปดาห์ที่ 0 เปรียบเทียบระดับ inorganic P ในซีรัมระหว่างสุนัขกลุ่มศึกษาที่ได้รับ nandrolone laurate และสุนัขกลุ่มควบคุม พบว่าสุนัขกลุ่มศึกษามีระดับ inorganic P ในซีรัมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ณ เวลาเดียวกัน

Ca/P ratio ในกลุ่มควบคุมอยู่ในระดับปกติของสุนัขตลอดการศึกษา ส่วนกลุ่มศึกษา Ca/P ratio อยู่ในระดับปกติของสุนัขตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0 – 4 และมีระดับต่ำกว่าปกติในสัปดาห์ที่ 8 – 12 (Komnenou., 2005)

**ตารางที่ 4-1** ระดับ total calcium และ inorganic phosphorus ในซีรัมของสุนัขกระดูกหักกลุ่มควบคุม และกลุ่มศึกษาก่อนและหลังได้รับ nandrolone laurate

สัปดาห์ที่ ทำการศึกษา	ค่าเฉลี่ยระดับ total calcium และ inorganic phosphorous ในซีรัมสุนัข <sup>†</sup> (มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร)			
	กลุ่มควบคุม (n = 8)		กลุ่มศึกษา (n = 8)	
	Total Ca <sup>2+</sup>	Inorganic P	Total Ca <sup>2+</sup>	Inorganic P
สัปดาห์ที่ 0	13.34 ± 0.71	3.91 ± 0.64	9.55 ± 0.97 <sup>#</sup>	3.98 ± 0.15
สัปดาห์ที่ 1	12.04 ± 1.42	4.33 ± 1.37	9.41 ± 1.75	5.07 ± 1.26
สัปดาห์ที่ 2	12.75 ± 0.56	4.11 ± 0.31	9.55 ± 1.05 <sup>#</sup>	4.23 ± 0.28
สัปดาห์ที่ 4	13.31 ± 0.52	4.36 ± 0.44	8.17 ± 0.97 <sup>#</sup>	5.40 ± 0.81
สัปดาห์ที่ 8	13.30 ± 0.47	4.48 ± 0.44	7.87 ± 1.12 <sup>#</sup>	5.62 ± 0.61 <sup>*</sup>
สัปดาห์ที่ 12	12.97 ± 0.26	3.35 ± 0.13	5.73 ± 0.64 <sup>*,#</sup>	5.30 ± 1.41 <sup>*</sup>

<sup>†</sup> ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

<sup>\*</sup> แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ  $P < 0.05$  เมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 0 ของกลุ่มเดียวกัน

<sup>#</sup> แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ  $P < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ณ เวลาเดียวกัน

## การประเมินผลของ nandrolone laurate ต่อการเชื่อมกระดูกของสุนัข จาก ภาพถ่ายรังสีวินิจฉัย

การศึกษานี้เป็นการประเมินผลของ nandrolone laurate ต่อการเชื่อมกระดูกหักของสุนัขจากระดับ OC, BALP, total Ca<sup>2+</sup> และ inorganic P ในซีรัมแล้ว ยังใช้การประเมินจากภาพถ่ายทางรังสีวินิจฉัยและอาการทางคลินิกร่วมด้วย สุนัขที่เข้ารับการแก้ไขภาวะกระดูกหักด้วยการผ่าตัดและจัดแบ่งกลุ่มแล้วนั้น สามารถสรุปตำแหน่งกระดูกที่หัก และวิธีการแก้ไขได้ดังตารางที่ 4 - 2

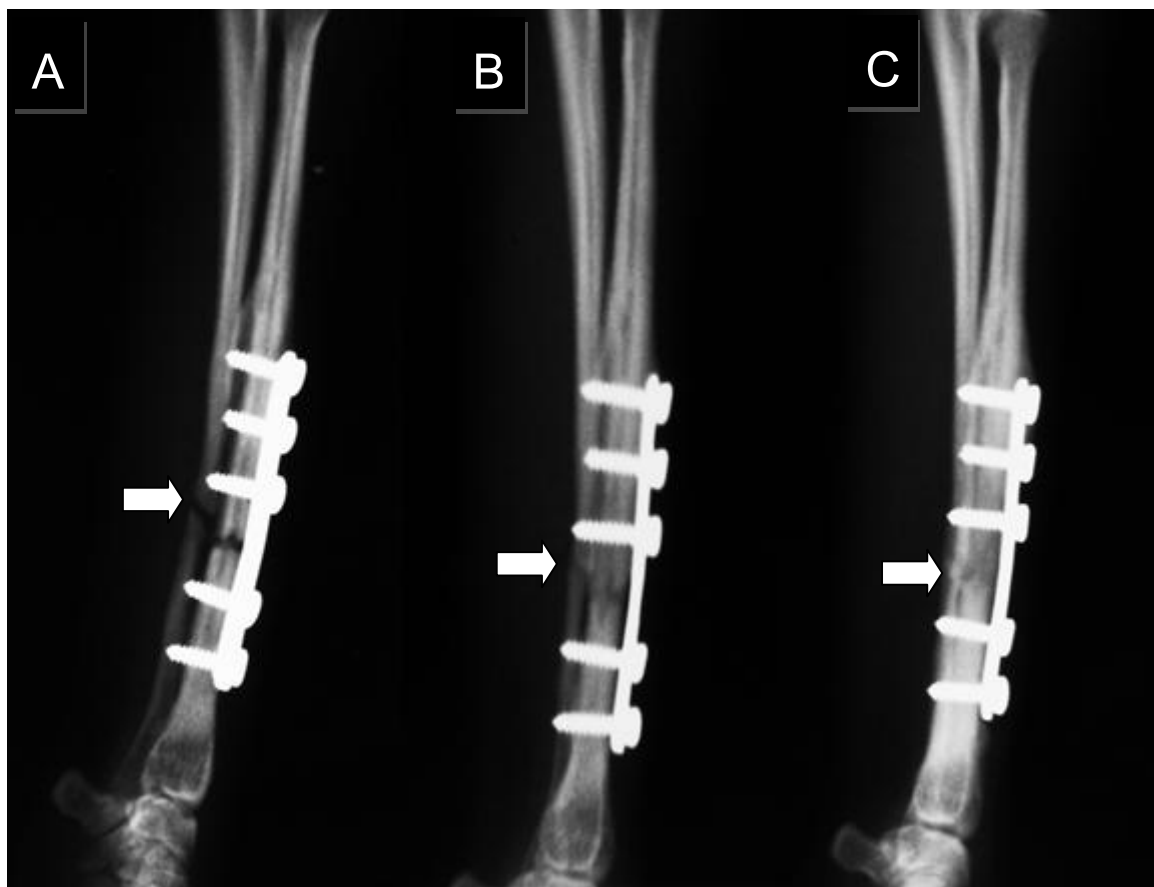
จากการประเมินการเชื่อมของกระดูกหักในสุนัขกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4 - 3 ถึงภาพที่ 4 - 7) และสุนัขกลุ่มศึกษาที่ได้รับ nandrolone laurate (ภาพที่ 4 - 8 ถึงภาพที่ 4 - 13) ด้วยภาพถ่ายรังสีวินิจฉัยในสัปดาห์ที่ 4, 8 และ 12 พบว่าในสัปดาห์ที่ 4 สุนัขในกลุ่มศึกษาและกลุ่มควบคุมเริ่มมีกระดูกเชื่อมภายนอกมาเชื่อมบริเวณรอยหักของกระดูก โดยพบว่าสุนัขในกลุ่มศึกษามีปริมาณของกระดูกเชื่อมค่อนข้างมากกว่ากลุ่มควบคุม ในสัปดาห์ที่ 8 สุนัขทั้งสองกลุ่มเริ่มมีการสร้างกระดูกเชื่อมภายในมาเชื่อมกระดูกหัก และในสัปดาห์ที่ 12 มีการสร้างกระดูกเชื่อมภายในมาเชื่อมกระดูกหักมากขึ้น และสุนัขบางตัวของทั้งสองกลุ่ม (สุนัขกลุ่มควบคุมจำนวน 5 ตัว และสุนัขกลุ่มศึกษาจำนวน 7 ตัว) มีการเชื่อมของกระดูกหักอย่างสมบูรณ์จนไม่พบรอยหักของกระดูก

ตารางที่ 4 - 2 ตำแหน่งของกระดูกหัก และวิธีการผ่าตัดแก้ไขกระดูกหักของสุนัขกลุ่มควบคุม และกลุ่มศึกษา

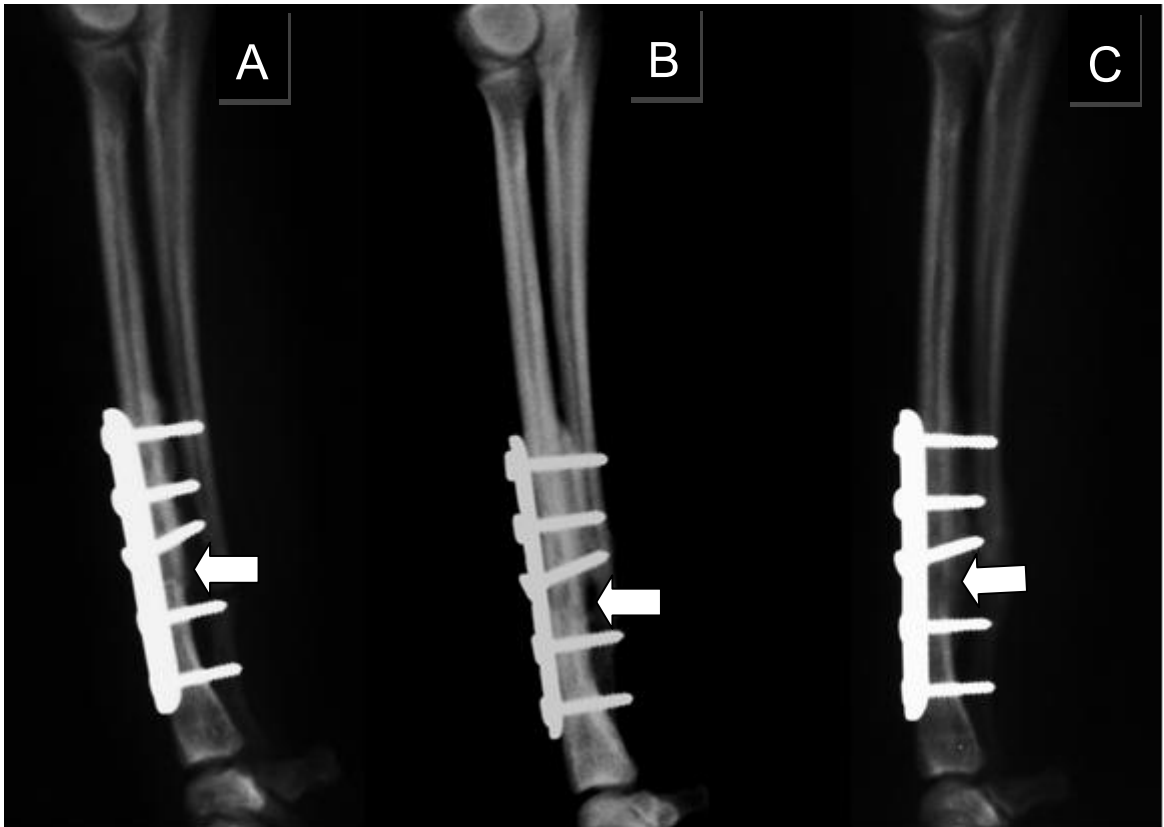
กลุ่ม	ตำแหน่งกระดูกหัก (จำนวนสุนัข, ตัว)	วิธีการผ่าตัด (จำนวนสุนัข, ตัว)
กลุ่มควบคุม (n = 8)	กระดูก Femur (3)	
	กระดูก Humerus (1)	Plate and screws (6)
	กระดูก Radius และ Ulna (3)	IM Pin/cross pin (2)
	กระดูก Tibia และ Fibular (1)	
กลุ่มศึกษา (n = 8)	กระดูก Femur (2)	Plate and screws (6)
	กระดูก Radius และ Ulna (4)	IM Pin (1)
	กระดูก Tibia และ Fibular (2)	External fixators (1)



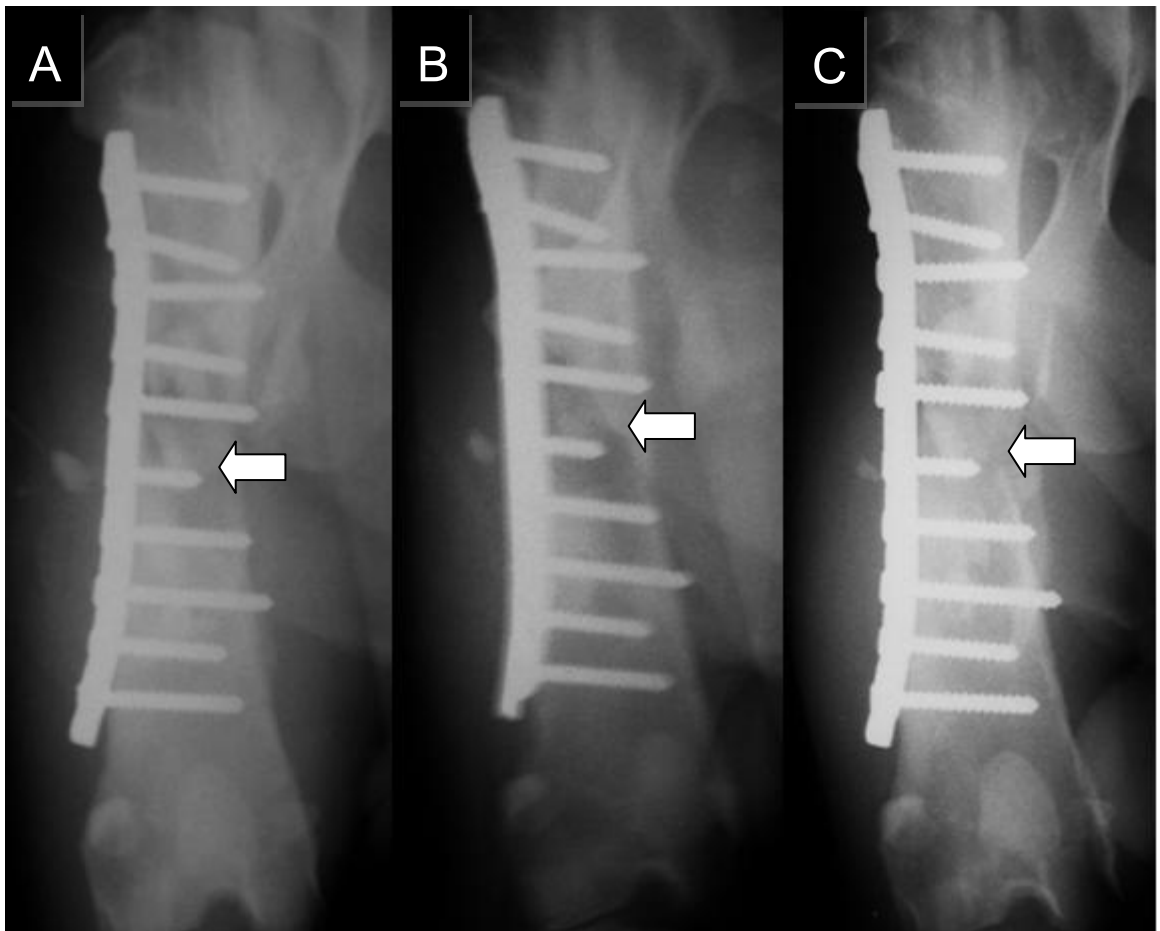
ภาพที่ 4 – 3 ถึงภาพที่ 4 – 7 เป็นตัวอย่างภาพรังสีวินิจฉัยของสุนัขกลุ่มควบคุมจำนวน 5 ตัว ภายหลังจากผ่าตัดแก้ไขกระดูกหักในสัปดาห์ที่ 4, 8 และ 12



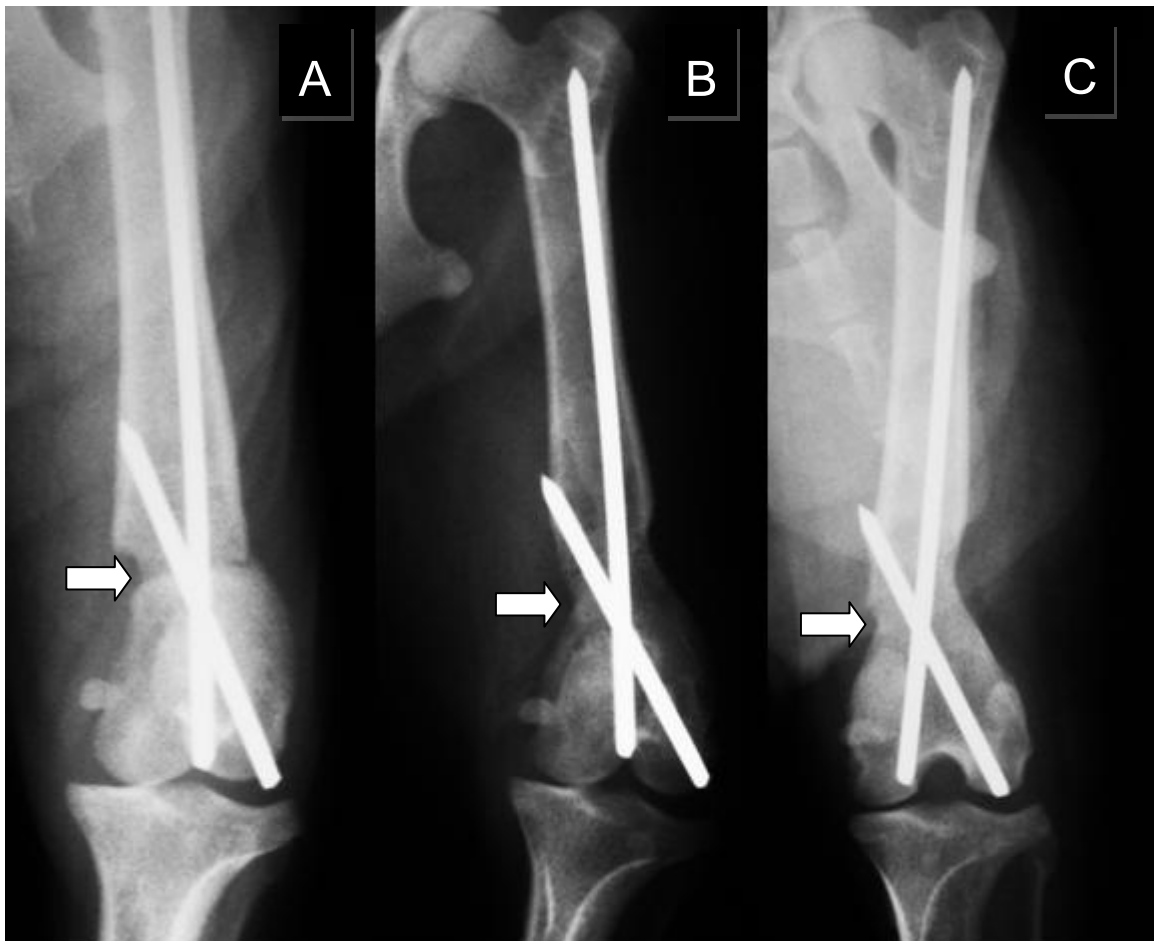
ภาพที่ 4 – 3 ภาพรังสีวินิจฉัยของกระดูก radius และ ulna ที่หักในสุนัขกลุ่มควบคุมตัวที่ 1 หลังการผ่าตัดแก้ไขโดยการใส่ plate และ screws (A) ในสัปดาห์ที่ 4 ลูกศรชี้ บริเวณรอยหักของกระดูก ยังพบช่องว่างระหว่างรอยหักของกระดูกอยู่ (B) ในสัปดาห์ที่ 8 ลูกศรชี้ เริ่มมีการสร้างกระดูกซ่อมภายนอก และกระดูกซ่อมภายในมาเชื่อมต่อกับปลายกระดูกหัก แต่ยังมีปริมาณกระดูกซ่อมค่อนข้างน้อย และยังพบช่องว่างระหว่างรอยหักของกระดูกอยู่ (C) ในสัปดาห์ที่ 12 ลูกศรชี้ กระดูกซ่อมภายในเชื่อมกระดูกหัก และไม่พบรอยหักของกระดูก



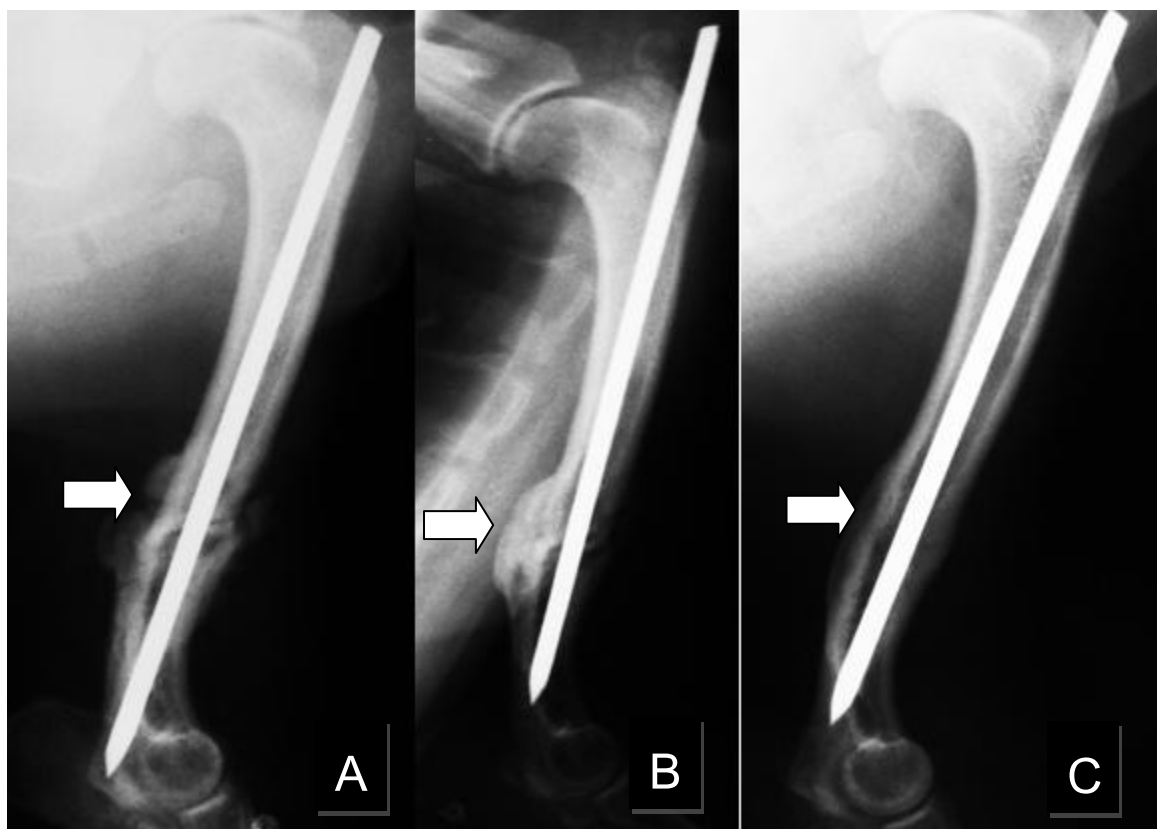
ภาพที่ 4 – 4 ภาพรังสีวินิจฉัยของกระดูก radius และ ulna ที่หักในสุนัขกลุ่มควบคุมตัวที่ 2 หลังการผ่าตัดแก้ไขโดยการใส่ plate และ screws (A) ในสัปดาห์ที่ 4 ลูกศรชี้ บริเวณรอยหักของกระดูกมีปริมาณกระดูกซ่อมเล็กน้อย และยังมีช่องว่างระหว่างรอยหักของกระดูกอยู่ (B) ในสัปดาห์ที่ 8 ลูกศรชี้ เริ่มมีกระดูกซ่อมภายนอกและกระดูกซ่อมภายในมาเชื่อมต่อของกระดูกหัก (C) ในสัปดาห์ที่ 12 ลูกศรชี้ มีกระดูกซ่อมภายนอกมากขึ้น และมีกระดูกซ่อมภายในเชื่อมกระดูกหัก และไม่พบรอยหักของกระดูก



ภาพที่ 4 – 5 ภาพรังสีวินิจฉัยของกระดูก femur ที่หักในสุนัขกลุ่มควบคุมตัวที่ 3 หลังการผ่าตัดแก้ไข โดยการใส่ plate และ screws (A) ในสัปดาห์ที่ 4 ลูกศรชี้ บริเวณรอยหักของกระดูกมีกระดูกซ่อม ภายนอกมาพอก แต่ยังมีปริมาณน้อย (B) ในสัปดาห์ที่ 8 ลูกศรชี้ เริ่มมีกระดูกซ่อมภายนอกมากขึ้น และเริ่มมีกระดูกซ่อมภายในมาเชื่อมต่อปลายกระดูกหัก แต่ยังพบรอยหักของกระดูกอยู่ (C) ในสัปดาห์ที่ 12 ลูกศรชี้ มีปริมาณกระดูกซ่อมภายนอกมากขึ้น กระดูกซ่อมภายในเชื่อมต่อปลายกระดูกหักยังไม่ สมบูรณ์ และยังพบรอยหักของกระดูกอยู่

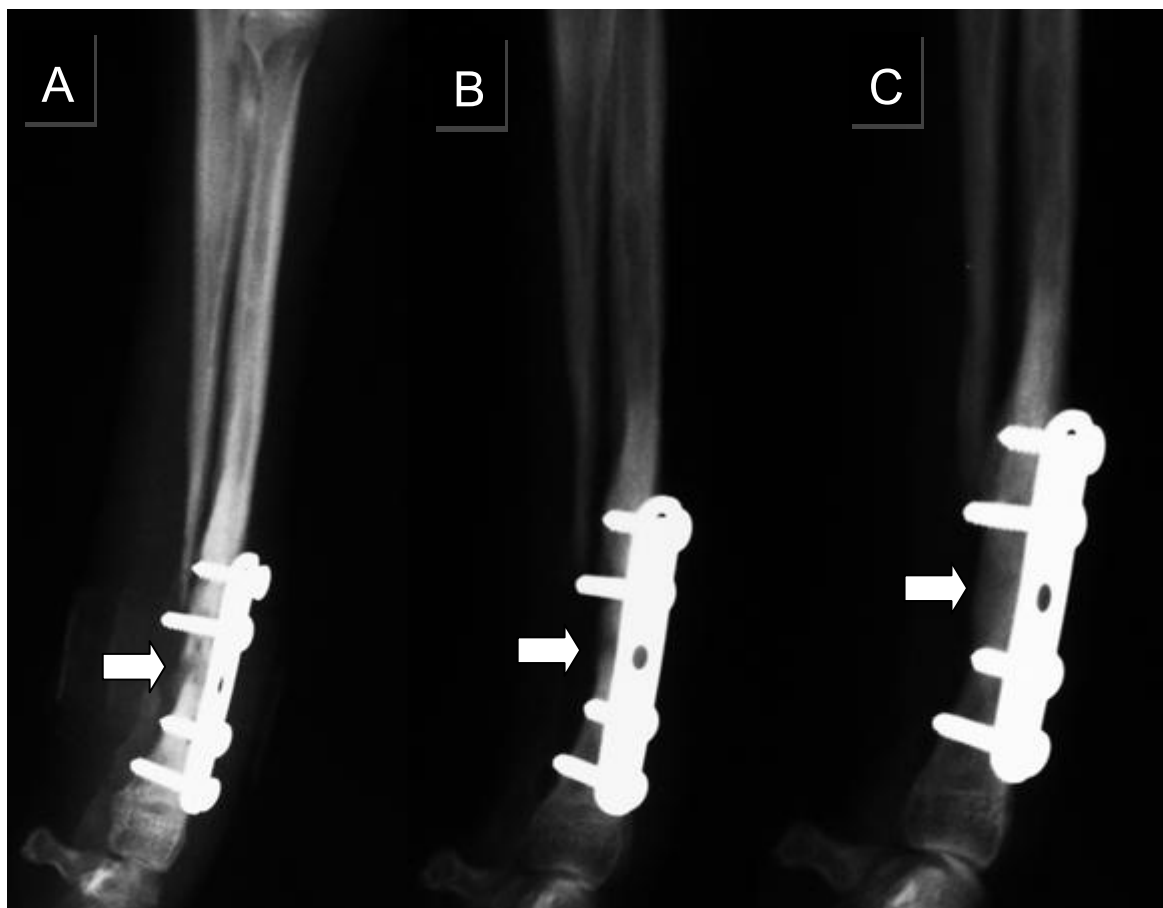


ภาพที่ 4 – 6 ภาพรังสีวินิจฉัยของกระดูก femur ที่หักในสุนัขกลุ่มควบคุมตัวที่ 4 หลังการผ่าตัดแก้ไข โดยการใส่ cross pins (A) ในสัปดาห์ที่ 4 ลูกศรชี้ บริเวณรอยหักของกระดูกมีกระดูกซ่อมภายนอกมาพอก แต่มีปริมาณไม่มาก (B) ในสัปดาห์ที่ 8 ลูกศรชี้ เริ่มมีกระดูกซ่อมภายนอกมากขึ้น และเริ่มมีกระดูกซ่อมภายในมาเชื่อมต่อปลายกระดูกหัก (C) ในสัปดาห์ที่ 12 ลูกศรชี้ มีกระดูกซ่อมภายในเชื่อมปลายกระดูกหักอย่างสมบูรณ์ และไม่พบรอยหักของกระดูก

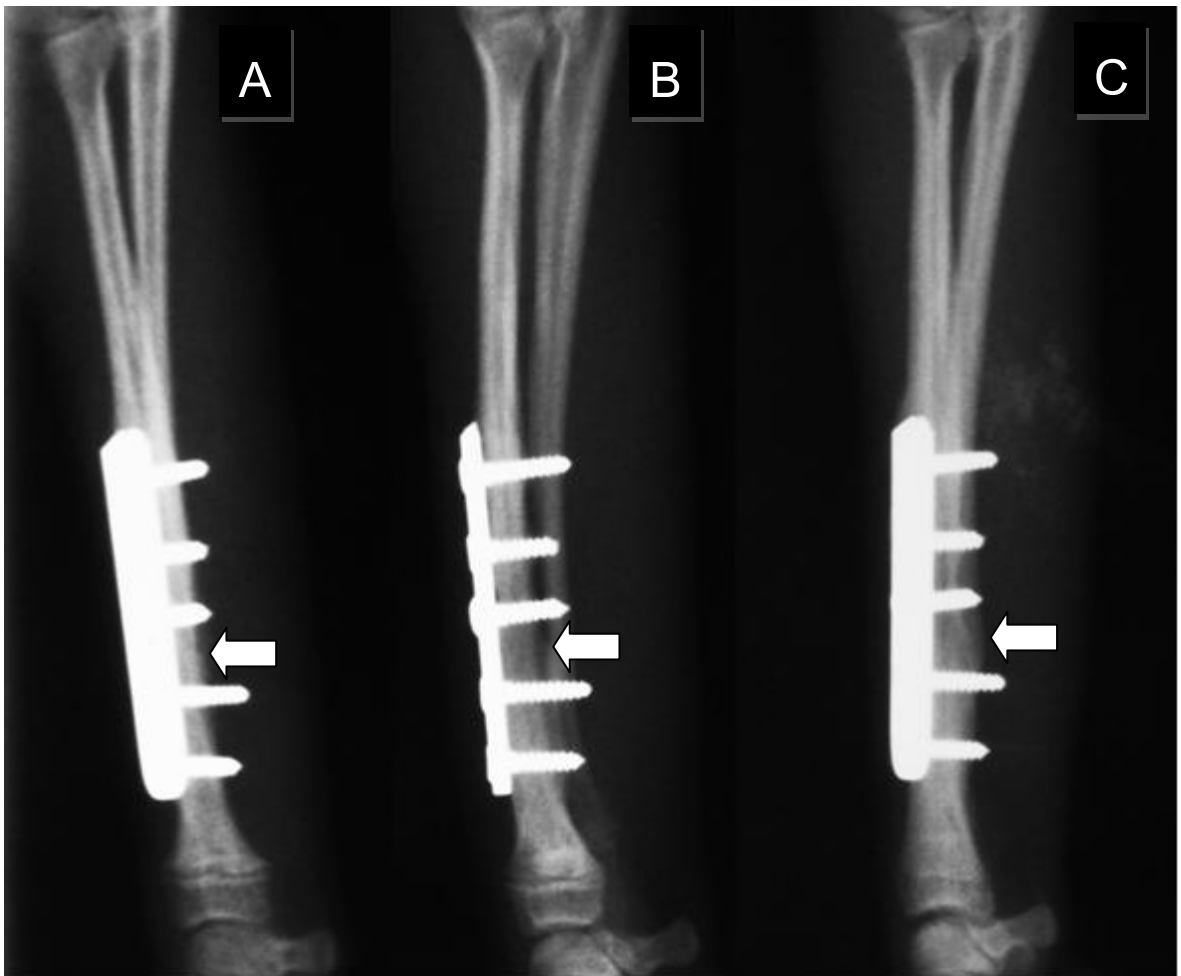


ภาพที่ 4 – 7 ภาพรังสีวินิจฉัยของกระดูก humerus ที่หักในสุนัขกลุ่มควบคุมตัวที่ 5 หลังการผ่าตัดแก้ไขโดยการใส่ IM pin (A) ในสัปดาห์ที่ 4 ลูกศรชี้ บริเวณรอยหักของกระดูกมีกระดูกซ่อมภายนอกมาพอก และมีปริมาณค่อนข้างมาก (B) ในสัปดาห์ที่ 8 ลูกศรชี้ เริ่มมีกระดูกซ่อมภายนอกมากขึ้น และเริ่มมีกระดูกซ่อมภายในมาเชื่อมต่อกับกระดูกหัก แต่ยังไม่พบรอยหักของกระดูกอยู่ (C) ในสัปดาห์ที่ 12 ลูกศรชี้ มีปริมาณของกระดูกซ่อมภายนอกมากขึ้น แต่การสร้างกระดูกซ่อมภายในเชื่อมกระดูกหักยังไม่สมบูรณ์ และยังไม่พบรอยหักของกระดูกอยู่

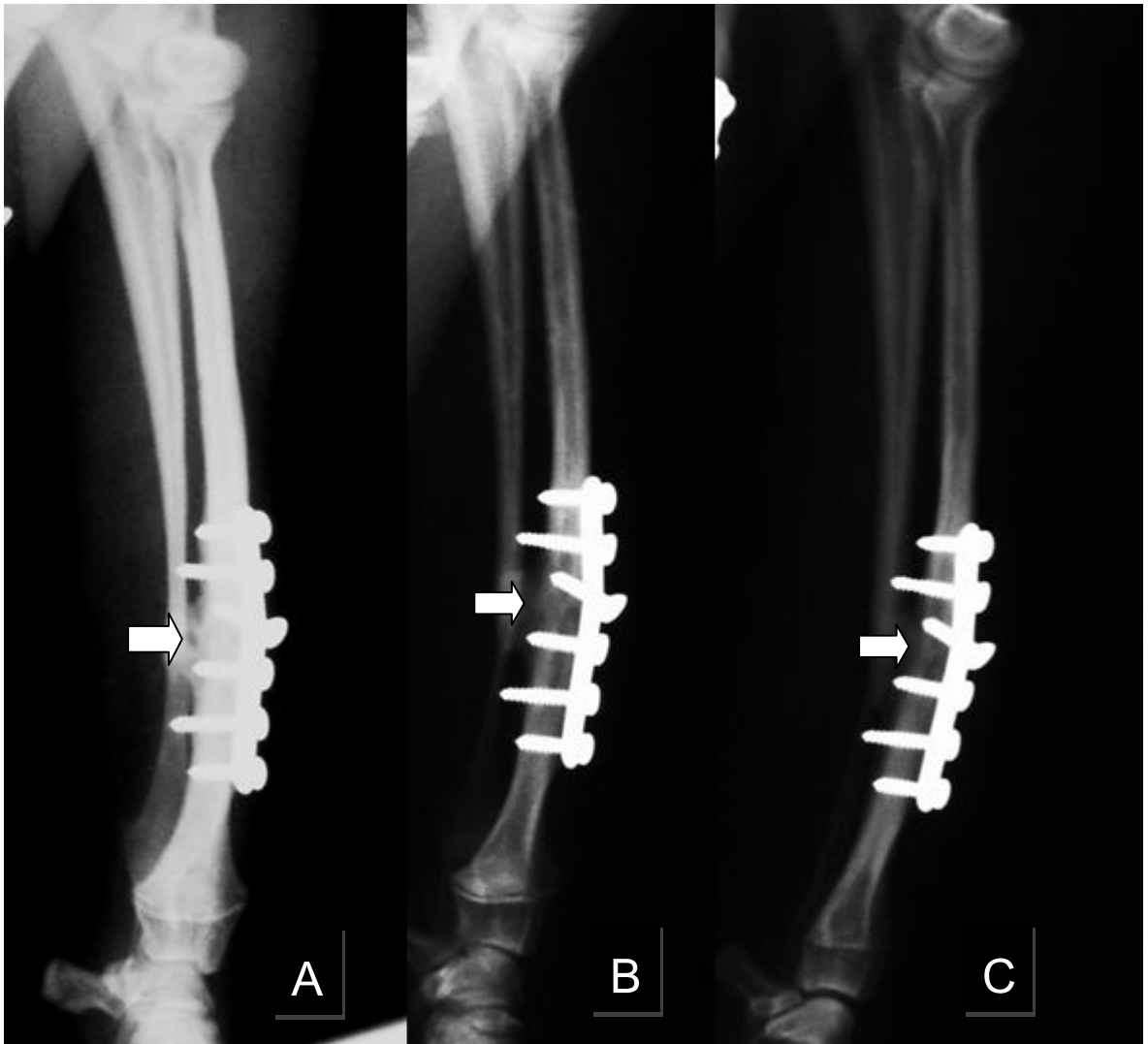
ภาพที่ 4 – 8 ถึงภาพที่ 4 – 12 เป็นตัวอย่างภาพรังสีวินิจฉัยของสุนัขกลุ่มศึกษาจำนวน 5 ตัว ที่ได้รับ nandrolone laurate หลังการผ่าตัดแก้ไขกระดูกหักในสัปดาห์ที่ 4, 8 และ 12



ภาพที่ 4 – 8 ภาพรังสีวินิจฉัยของกระดูก radius และ ulna ที่หักในสุนัขกลุ่มศึกษาตัวที่ 1 ที่ได้รับ nandrolone laurate หลังการผ่าตัดแก้ไขโดยการใส่ plate และ screws (A) ในสัปดาห์ที่ 4 ลูกศรชี้บริเวณรอยหักของกระดูกมีกระดูกซ่อมภายนอกมาพอก (B) ในสัปดาห์ที่ 8 ลูกศรชี้เริ่มมีกระดูกซ่อมภายในมาเชื่อมต่อปลายกระดูกหัก แต่ยังไม่พบรอยหักของกระดูกอยู่ (C) ในสัปดาห์ที่ 12 ลูกศรชี้เกิดการสร้างกระดูกซ่อมเชื่อมกระดูกหักอย่างสมบูรณ์ และไม่พบรอยหักของกระดูก

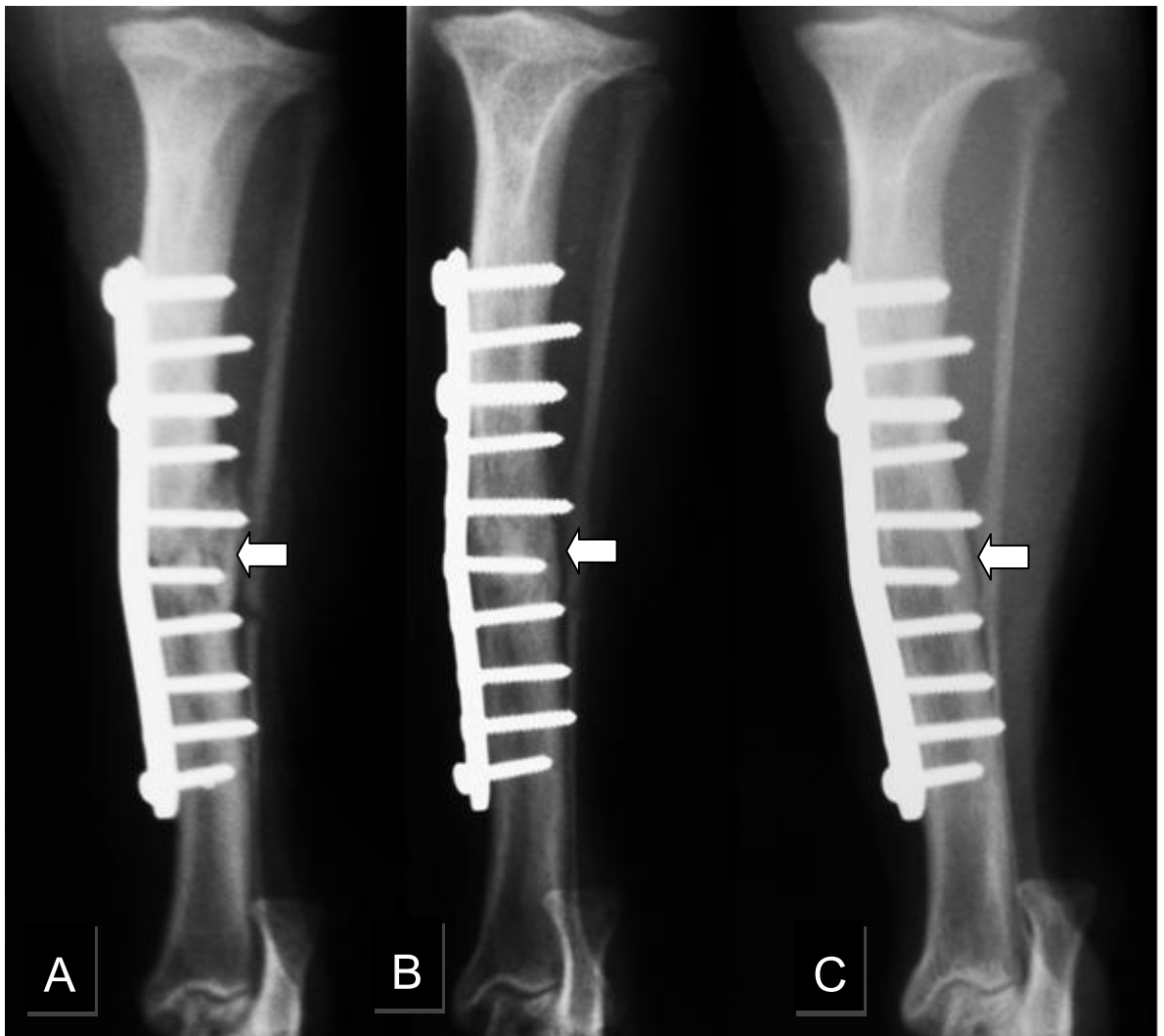


ภาพที่ 4 – 9 ภาพรังสีวินิจฉัยของกระดูก radius และ ulna ที่หักในสุนัขกลุ่มศึกษาตัวที่ 2 ที่ได้รับ nandrolone laurate หลังการผ่าตัดแก้ไขโดยการใส่ plate และ screws (A) ในสัปดาห์ที่ 4 ลูกศรชี้บริเวณรอยหักของกระดูกมีกระดูกเชื่อมภายนอกมาพอก และเริ่มมีการสร้างกระดูกเชื่อมภายในมาเชื่อมต่อปลายกระดูกหัก (B) ในสัปดาห์ที่ 8 ลูกศรชี้ เริ่มมีการสร้างกระดูกเชื่อมภายในมากขึ้นจนเริ่มไม่พบรอยหักของกระดูก (C) ในสัปดาห์ที่ 12 ลูกศรชี้ เกิดการสร้างกระดูกเชื่อมเชื่อมกระดูกหักอย่างสมบูรณ์ และไม่พบรอยหักของกระดูก

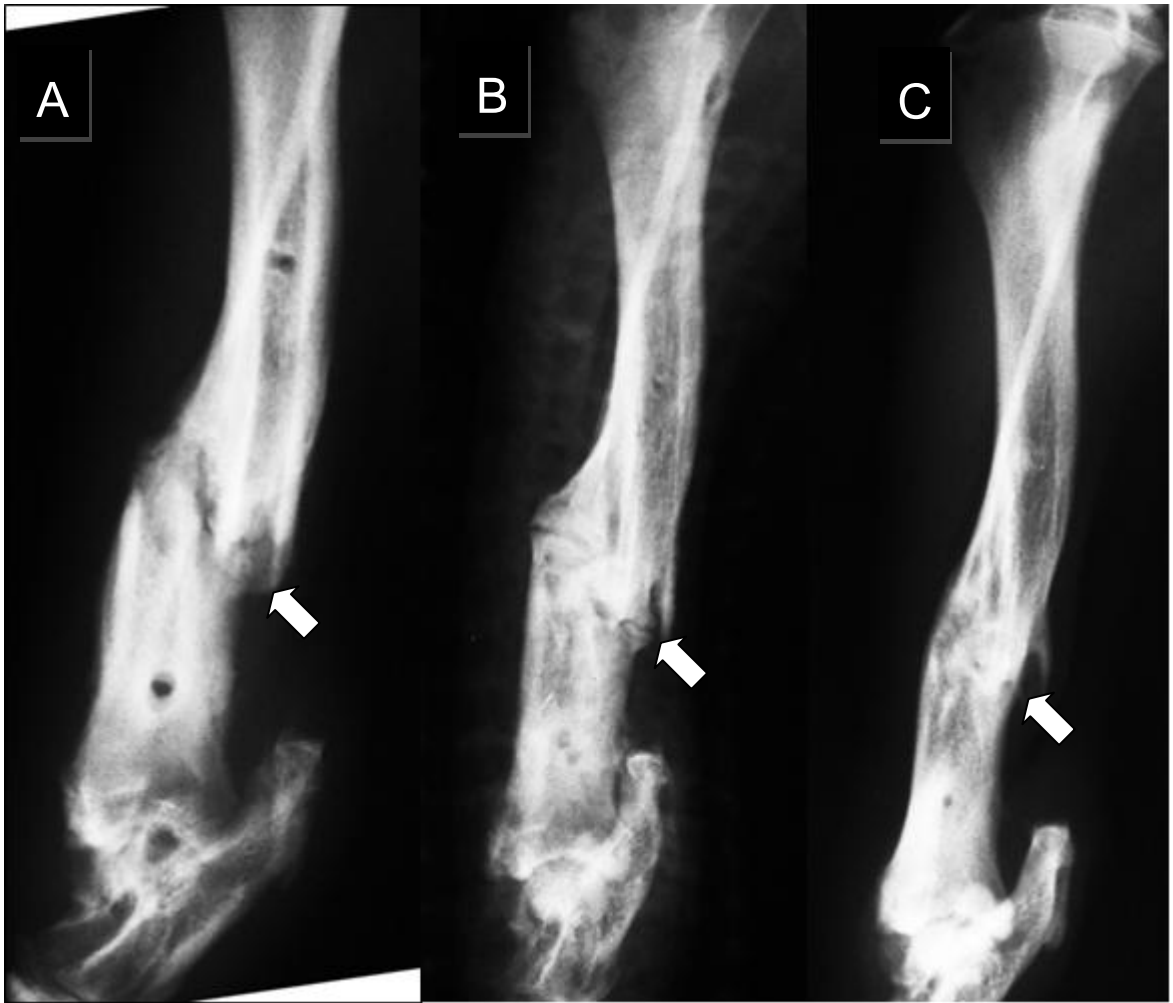


ภาพที่ 4 – 10 ภาพรังสีวินิจฉัยของกระดูก radius และ ulna ที่หักในสุนัขกลุ่มศึกษาตัวที่ 3 ที่ได้รับ nandrolone laurate หลังการผ่าตัดแก้ไขโดยการใส่ plate และ screws (A) ในสัปดาห์ที่ 4 ลูกศรชี้บริเวณรอยหักของกระดูกมีกระดูกซ่อมภายนอกมาพอก และมีปริมาณกระดูกซ่อมค่อนข้างมาก (B) ในสัปดาห์ที่ 8 ลูกศรชี้ เริ่มมีการสร้างกระดูกซ่อมภายในมาเชื่อมต่อปลายกระดูกหัก และเริ่มไม่พบรอยหักของกระดูก (C) ในสัปดาห์ที่ 12 ลูกศรชี้ เกิดการสร้างกระดูกซ่อมเชื่อมกระดูกหักอย่างสมบูรณ์ และไม่พบรอยหักของกระดูก





ภาพที่ 4 – 11 ภาพรังสีวินิจฉัยของกระดูก tibia ที่หักในสุนัขกลุ่มศึกษาตัวที่ 4 ที่ได้รับ nandrolone laurate หลังการผ่าตัดแก้ไขโดยการใส่ plate และ screws (A) ในสัปดาห์ที่ 4 ลูกศรชี้ บริเวณรอยหักของกระดูกมีกระดูกซ่อมภายนอกมาพอก และมีปริมาณกระดูกซ่อมค่อนข้างมาก (B) ในสัปดาห์ที่ 8 ลูกศรชี้ เริ่มมีการสร้างกระดูกซ่อมภายในมาเชื่อมต่อปลายกระดูกหัก และเริ่มไม่พบรอยหักของกระดูก (C) ในสัปดาห์ที่ 12 ลูกศรชี้ เกิดการสร้างกระดูกซ่อมเชื่อมกระดูกหักอย่างสมบูรณ์ และไม่พบรอยหักของกระดูก



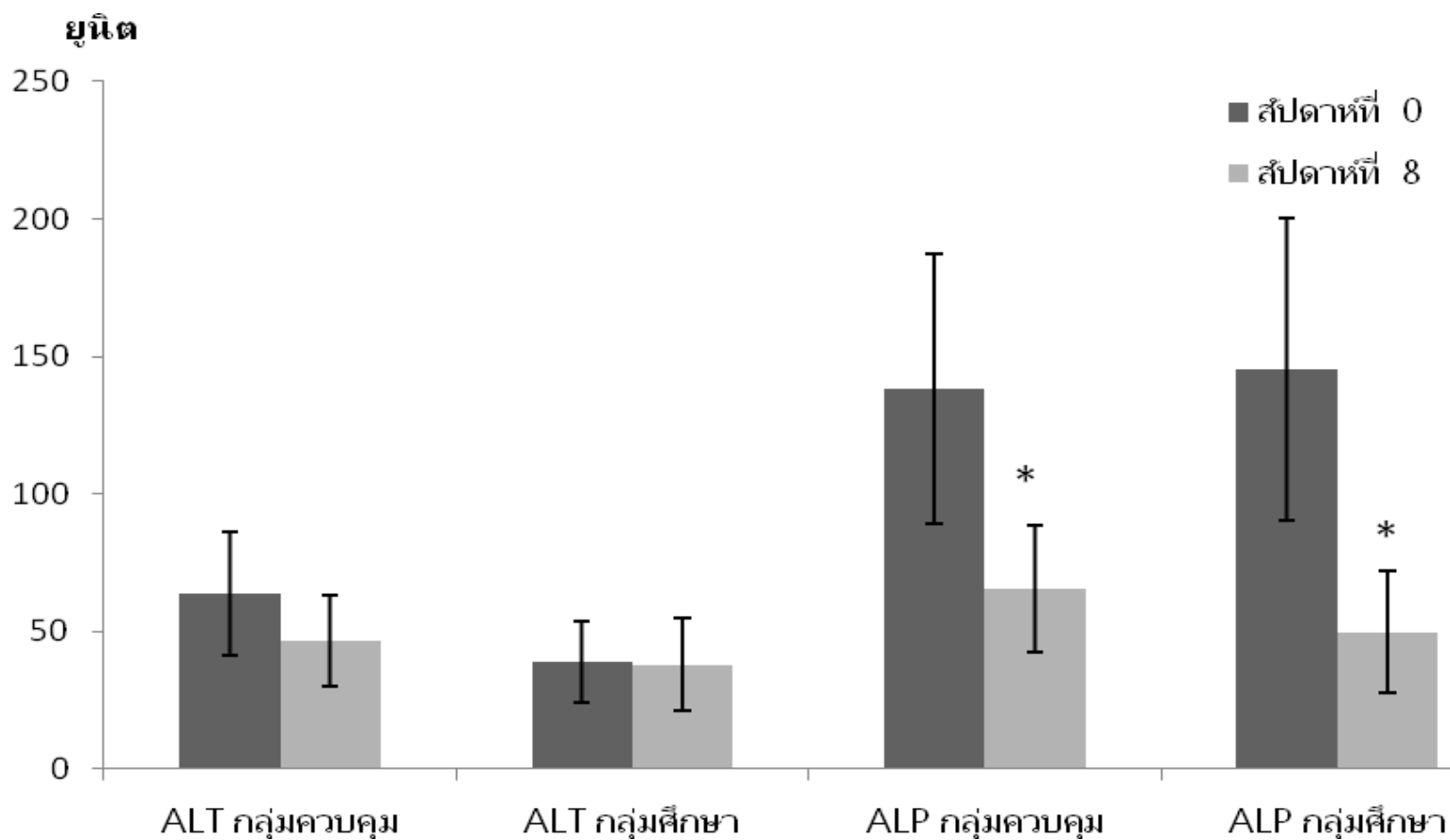
ภาพที่ 4 – 12 ภาพรังสีวินิจฉัยของกระดูก tibia และ fibular ที่หักในสุนัขกลุ่มศึกษาตัวที่ 5 ที่ได้รับ nandrolone laurate หลังการผ่าตัดแก้ไขโดยการใส่ external fixators (A) ในสัปดาห์ที่ 4 ลูกศรชี้บริเวณรอยหักของกระดูกมีกระดูกเชื่อมภายนอกมาพอก และมีปริมาณกระดูกเชื่อมค่อนข้างมาก (B) ในสัปดาห์ที่ 8 ลูกศรชี้ เริ่มมีการสร้างกระดูกเชื่อมภายนอกมากขึ้น และมีกระดูกเชื่อมภายในมาเชื่อมต่อปลายกระดูกหัก (C) ในสัปดาห์ที่ 12 ลูกศรชี้ เกิดการสร้างกระดูกเชื่อมภายในเชื่อมกระดูกหัก และไม่พบรอยหักของกระดูก

**ผลของ nandrolone laurate ต่อการเปลี่ยนแปลงค่าทางเคมีโลหิตของสุนัขกระดูกหัก**

ค่าทางเคมีโลหิตที่แสดงเอนไซม์การทำงานของตับ ได้แก่ ระดับ alanine transaminase (ALT) และ alkaline phosphatase (ALP)

ภาพที่ 4 – 13 แสดงค่า ALT และ ALP ของสุนัขกระดูกหักกลุ่มควบคุมและกลุ่มศึกษา ในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 8 ของการศึกษา พบว่าสุนัขกลุ่มควบคุมและกลุ่มศึกษา มีระดับ ALT เฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 0 เท่ากับ  $63.57 \pm 22.47$  และ  $39.14 \pm 14.79$  ยูนิต ตามลำดับ และในสัปดาห์ที่ 8 มีค่าเท่ากับ  $46.71 \pm 16.51$  และ  $37.80 \pm 16.90$  ยูนิต ตามลำดับ ซึ่งพบว่าระดับ ALT เฉลี่ยของสุนัขกลุ่มควบคุมมีระดับสูงกว่ากลุ่มศึกษาเล็กน้อยทั้งในสัปดาห์ที่ 0 และ 8 แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

ระดับ ALP เฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 0 ของสุนัขกลุ่มควบคุมและสุนัขกลุ่มศึกษา เท่ากับ  $138.28 \pm 48.89$  และ  $145.57 \pm 55.03$  ยูนิต ตามลำดับ และในสัปดาห์ที่ 8 มีค่าเท่ากับ  $65.57 \pm 23.18$  และ  $49.60 \pm 22.18$  ยูนิต ตามลำดับ ซึ่งพบว่าระดับ ALP เฉลี่ยของสุนัขทั้งสองกลุ่มในสัปดาห์ที่ 8 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ของระดับ ALP ในสุนัขกลุ่มศึกษาเมื่อเทียบกับสุนัขกลุ่มควบคุม ณ เวลาเดียวกัน



ภาพที่ 4-13 ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานระดับ ALT และ ALP ในซีรัมของสุนัขกระดูกหักกลุ่มควบคุม (n=8) และกลุ่มศึกษา (n=8) ในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 8 ของการศึกษา, \*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ  $P < 0.05$  เมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 0 ของกลุ่มเดียวกัน

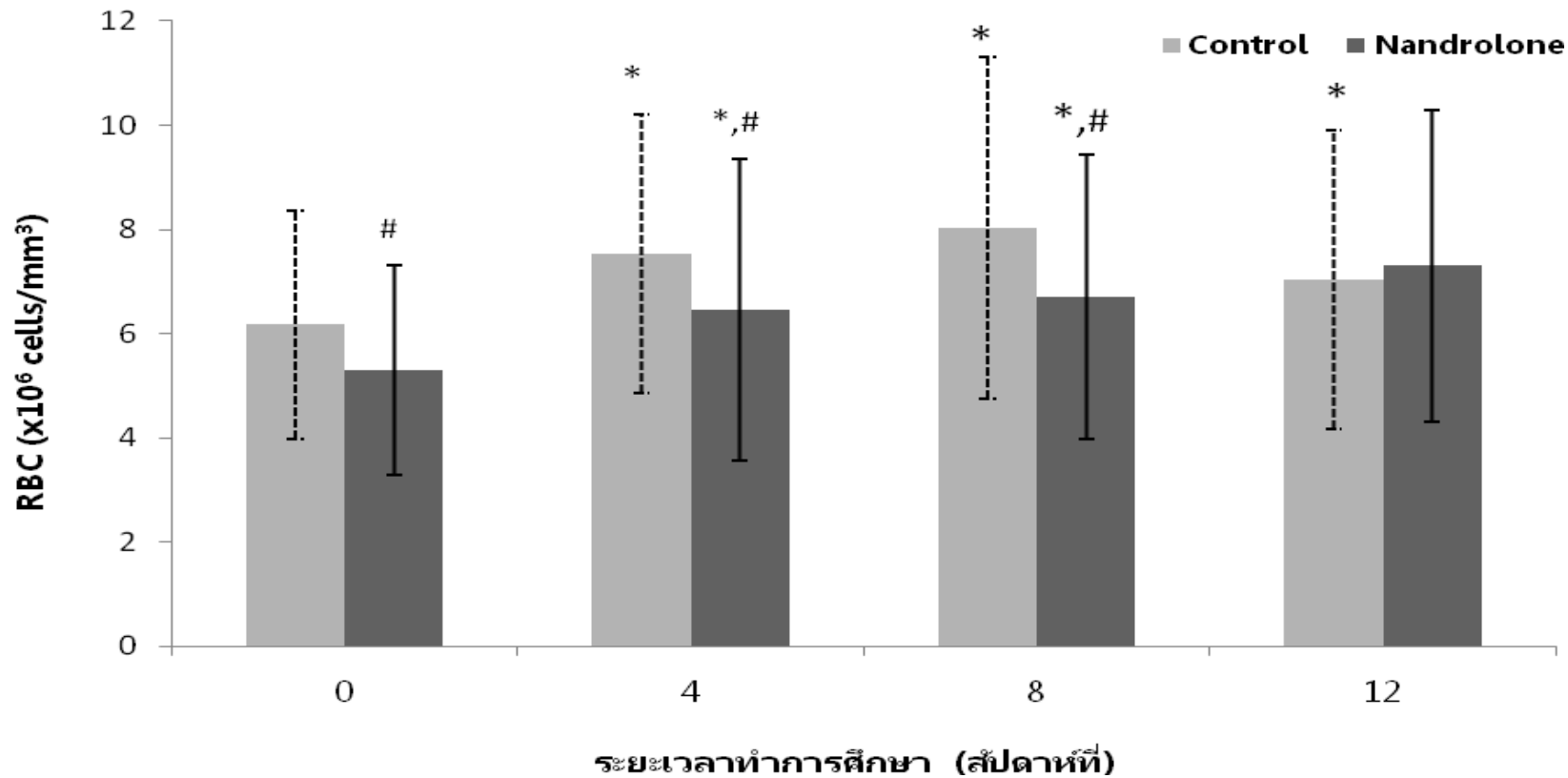
**ผลของ nandrolone laurate ต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเม็ดเลือดแดง ค่าฮีโมโกลบิน และ ค่าฮีมาโตคริตของสุนัขกระดูกหัก**

ภาพที่ 4 – 14 แสดงจำนวนเม็ดเลือดแดงของสุนัขกระดูกหักกลุ่มควบคุม และกลุ่มศึกษาในสัปดาห์ที่ 0 - 12 พบว่า สุนัขกลุ่มควบคุม และกลุ่มศึกษา มีจำนวนเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 0 ก่อนการผ่าตัดแก้ไขภาวะกระดูกหักเท่ากับ  $6.17 \pm 2.18 \times 10^6$  และ  $5.30 \pm 2.01 \times 10^6$  เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยสุนัขกลุ่มศึกษามีจำนวนเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 0 ต่ำกว่าค่าปกติของสุนัขเล็กน้อย ( $5.5 - 8.5 \times 10^6$  เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร) (Bistner et al., 2000) ในสุนัขกลุ่มควบคุมมีจำนวนเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 4, 8 และ 12 (สัปดาห์ที่ 4 =  $7.53 \pm 2.66 \times 10^6$  สัปดาห์ที่ 8 =  $8.03 \pm 3.28 \times 10^6$  และสัปดาห์ที่ 12 =  $6.86 \pm 2.80 \times 10^6$  เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร) และในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 มีจำนวนเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 ส่วนสุนัขกลุ่มศึกษาพบว่าจำนวนเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในสัปดาห์ที่ 4, 8 และ 12 เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 (สัปดาห์ที่ 4 =  $6.46 \pm 2.88 \times 10^6$  สัปดาห์ที่ 8 =  $6.70 \pm 2.73 \times 10^6$  และสัปดาห์ที่ 12 =  $7.30 \pm 2.98 \times 10^6$  เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร) และเมื่อเปรียบเทียบจำนวนเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยระหว่างสุนัขกลุ่มศึกษาที่ได้รับ nandrolone laurate และสุนัขกลุ่มควบคุม พบว่าสุนัขกลุ่มศึกษามีจำนวนเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยต่ำกว่ากลุ่มควบคุมในสัปดาห์ที่ 0, 4 และ 8 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ส่วนในสัปดาห์ที่ 12 สุนัขกลุ่มศึกษามีจำนวนเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุมแต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

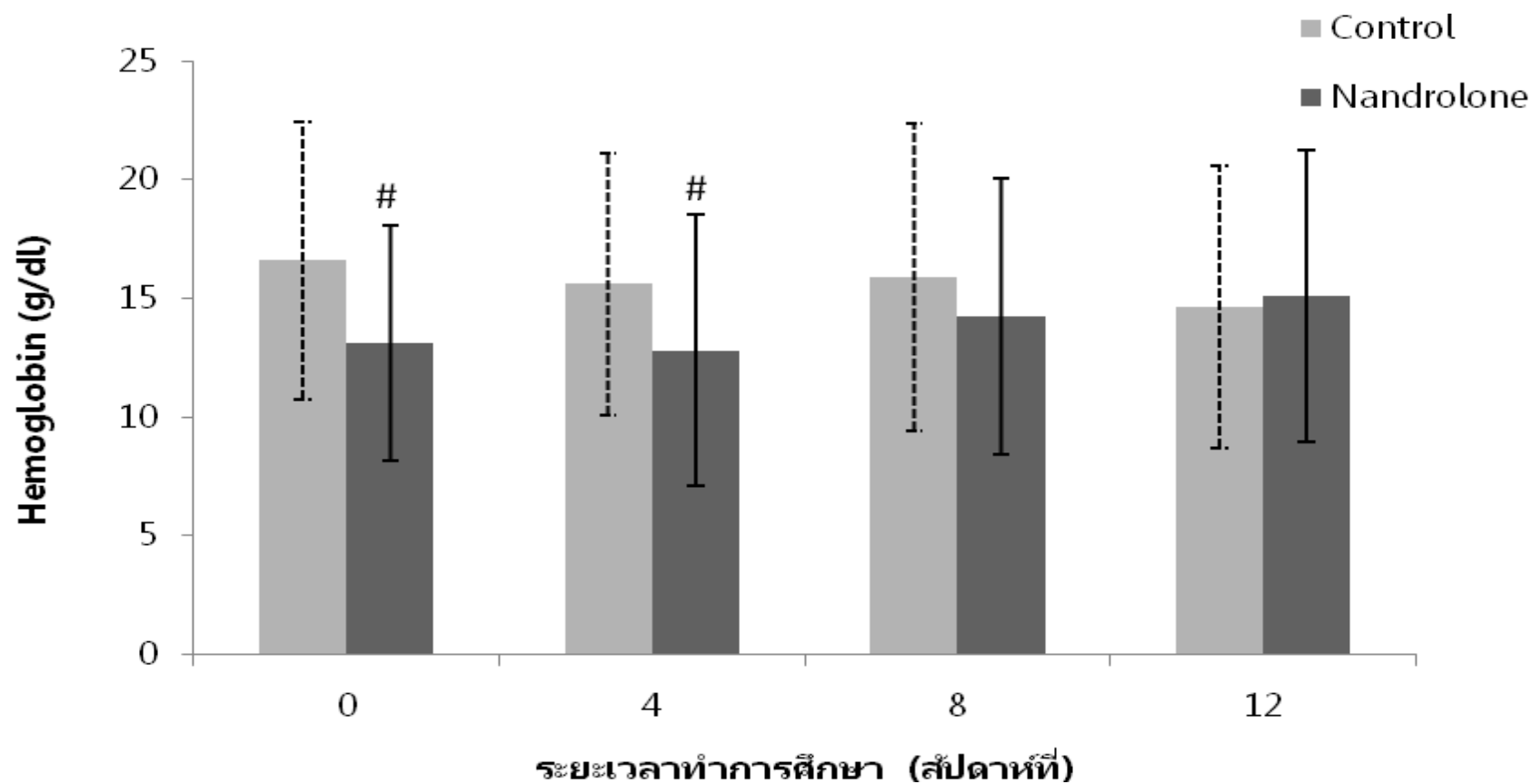
ภาพที่ 4 – 15 แสดงค่าฮีโมโกลบินของสุนัขกระดูกหักกลุ่มควบคุม และกลุ่มศึกษาในสัปดาห์ที่ 0 - 12 พบว่า กลุ่มควบคุม และสุนัขกลุ่มศึกษา มีค่าฮีโมโกลบินเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 0 ก่อนการผ่าตัดแก้ไขภาวะกระดูกหักเท่ากับ  $16.60 \pm 5.86$  และ  $13.14 \pm 4.96$  กรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ ในสุนัขกลุ่มควบคุมมีค่าฮีโมโกลบินเฉลี่ยลดลงในทุกสัปดาห์ที่ทำการศึกษา แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 (สัปดาห์ที่ 4 =  $15.61 \pm 5.52$  สัปดาห์ที่ 8 =  $15.90 \pm 6.49$  และสัปดาห์ที่ 12 =  $14.10 \pm 5.75$  กรัมต่อเดซิลิตร) ส่วนสุนัขกลุ่มศึกษามีค่าฮีโมโกลบินเฉลี่ยลดลงในสัปดาห์ที่ 4 จากนั้นเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 8 และ 12 แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 (สัปดาห์ที่ 4 =  $12.80 \pm 5.72$  สัปดาห์ที่ 8 =  $14.26 \pm 5.82$  และสัปดาห์ที่ 12 =  $15.08 \pm 6.15$  กรัมต่อเดซิลิตร) และเมื่อเปรียบเทียบค่าฮีโมโกลบินเฉลี่ยระหว่างสุนัขกลุ่มศึกษาที่ได้รับ nandrolone laurate และสุนัขกลุ่มควบคุม พบว่าสุนัขกลุ่มศึกษามีค่าฮีโมโกลบินเฉลี่ยต่ำกว่าสุนัขกลุ่มควบคุมในสัปดาห์ที่ 0, 4 และ 8 และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในสัปดาห์ที่ 0

และ 4 ส่วนในสัปดาห์ที่ 12 สุนัขกลุ่มศึกษามีค่าฮีโมโกลบินเฉลี่ยสูงกว่าสุนัขกลุ่มควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) สุนัขทุกตัวของทั้งสองกลุ่มในทุกสัปดาห์มีค่าฮีโมโกลบินอยู่ในระดับปกติของสุนัข (12 – 18 กรัมต่อเดซิลิตร) (Bistner et al., 2000)

ภาพที่ 4 – 16 แสดงค่าฮีมาโตคริตของสุนัขกระดูกหักกลุ่มควบคุม และกลุ่มศึกษาในสัปดาห์ที่ 0 – 12 พบว่า สุนัขกลุ่มควบคุม และกลุ่มศึกษา มีค่าฮีมาโตคริตเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 0 ก่อนการผ่าตัดแก้ไขภาวะกระดูกหักเท่ากับ  $51.06 \pm 18.05$  และ  $43.71 \pm 16.52$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในสุนัขกลุ่มควบคุมมีค่าฮีมาโตคริตเฉลี่ยลดลงในทุกสัปดาห์หลังการผ่าตัด (สัปดาห์ที่ 4 =  $46.75 \pm 16.53$  สัปดาห์ที่ 8 =  $49.16 \pm 20.07$  และสัปดาห์ที่ 12 =  $42.00 \pm 17.01$  เปอร์เซ็นต์) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) ในสัปดาห์ที่ 12 เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 ส่วนในสุนัขกลุ่มศึกษามีค่าฮีมาโตคริตเฉลี่ยลดลงในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 (สัปดาห์ที่ 4 =  $38.20 \pm 17.08$  และ สัปดาห์ที่ 8 =  $41.00 \pm 16.74$  เปอร์เซ็นต์) จากนั้นมีค่าฮีมาโตคริตเฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 12 (สัปดาห์ที่ 12 =  $45.66 \pm 18.64$  เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 และเมื่อเปรียบเทียบค่าฮีมาโตคริตเฉลี่ยระหว่างสุนัขกลุ่มศึกษาที่ได้รับ nandrolone laurate และสุนัขกลุ่มควบคุม พบว่าสุนัขกลุ่มศึกษามีค่าฮีมาโตคริตเฉลี่ยต่ำกว่าสุนัขกลุ่มควบคุมในสัปดาห์ที่ 0, 4 และ 8 และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) ในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 ส่วนในสัปดาห์ที่ 12 สุนัขกลุ่มศึกษา มีค่าฮีมาโตคริตเฉลี่ยสูงกว่าสุนัขกลุ่มควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) สุนัขทุกตัวของทั้งสองกลุ่มในทุกสัปดาห์มีค่าฮีมาโตคริตอยู่ในระดับปกติของสุนัข (37 – 55 เปอร์เซ็นต์) (Bistner et al., 2000)

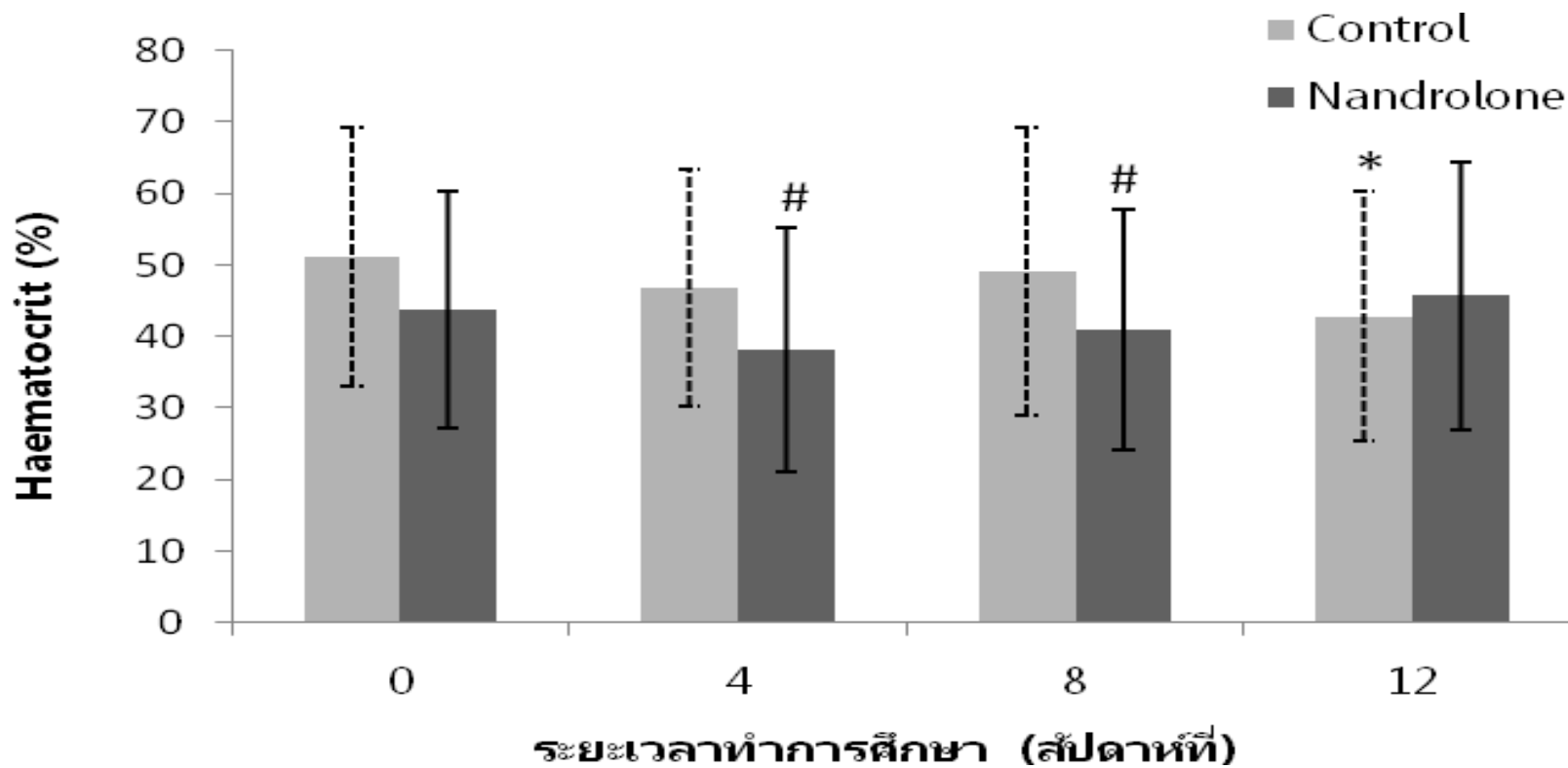


ภาพที่ 4-14 ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจำนวนเม็ดเลือดแดงของสุนัขกระดูกหักกลุ่มควบคุม (n=8) และกลุ่มศึกษา (n=8) ในสัปดาห์ที่ 0-12 ของการศึกษา, \*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ  $P < 0.05$  เมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 0 ของกลุ่มเดียวกัน, #แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ  $P < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ณ เวลาเดียวกัน



ภาพที่ 4-15 ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานค่าฮีโมโกลบิน ของสุนัขกระดูกหักกลุ่มควบคุม (n=8) และกลุ่มศึกษา (n=8) ในสัปดาห์ที่ 0 -12 ของการศึกษา. # แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ  $P < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ณ เวลาเดียวกัน





ภาพที่ 4-16 ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานค่าฮีมาโตคริตของสุนัขกระดูกหักกลุ่มควบคุม (n=8) และกลุ่มศึกษา (n=8) ในสัปดาห์ที่ 0-12 ของการศึกษา. \*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ  $P < 0.05$  เมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 0 ของกลุ่มเดียวกัน, # แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ  $P < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ณ เวลาเดียวกัน

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

#### อภิปรายผลการวิจัย

Nandrolone ester เป็น anabolic steroid ที่นิยมใช้ในทางการแพทย์และสัตวแพทย์ เพื่อรักษาภาวะกระดูกบาง (osteoporosis) หรือภาวะความหนาแน่นกระดูกลดลง (osteopenia) กระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีน กระตุ้นการสร้างเม็ดโลหิตแดง เช่น ในผู้ป่วยหรือสัตว์ป่วยที่มีอาการโลหิตจางจากภาวะโรคไต (Plumb, 2005) เป็นต้น มีการศึกษาและรายงานผลของ nandrolone ester ต่อการรักษาอย่างหลากหลาย เช่น nandrolone decanoate มีประสิทธิภาพในการเพิ่มมวลกระดูกในผู้หญิงที่มีภาวะกระดูกบางหลังวัยหมดประจำเดือน (Gennari et al., 1989) และผู้ชายที่มีภาวะกระดูกบาง (Hamdy et al., 1998) nandrolone phenylpropionate และ nandrolone decanoate ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตและความยาวของกระดูกซี่โครงและขากรรไกรในหนูขาว (Noda et al., 1994, Gebhardt และ Pancherz, 2003) และ nandrolone laurate มีผลทำให้อัตราการฟื้นตัวของกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้นในม้าภายหลังการใช้งาน (Hyypä, 2001) อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะมีการศึกษาและมีการรายงานผลของ nandrolone ester มากมาย แต่ยังไม่มีการอธิบายถึงกลไกการออกฤทธิ์ของ nandrolone ester ได้อย่างแน่ชัดนัก

จากการศึกษาในหลอดทดลอง หรือภายนอกตัวสัตว์ (*in vitro*) บ่งชี้ว่า anabolic steroids ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน อาจส่งผลโดยตรงต่อการสร้างกระดูกได้ โดยในการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า androgen receptors ซึ่งมีจำนวนไม่มากนักใน osteoblast-like cells เมื่อให้ฮอร์โมน androgen จะเกิดการกระตุ้น human และ murine osteoblastic cells ให้แบ่งตัวเพิ่มขึ้นในหลอดทดลอง และเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ osteoblastic-like cells กลายเป็น osteoblast และมีการนำเสนอสารชีวเคมีชนิด alkaline phosphatase (ALP) ออกมา แต่กลไกนี้ยังไม่สามารถอธิบายได้ในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) (Li et al., 2000)

### ผลของ nandrolone laurate ต่อระดับ BALP ในซีรัมของสุนัขกระดูกหัก

จากผลการศึกษาโดยการฉีด nandrolone laurate ร่วมกับการรักษาภาวะกระดูกหักโดยการผ่าตัดในสุนัข พบว่าสุนัขกลุ่มศึกษาที่ได้รับ nandrolone laurate มีระดับ BALP เพิ่มขึ้นในทุกสัปดาห์ตลอดการศึกษา และเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในสัปดาห์ที่ 1 และ 12 เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 และในสุนัขกลุ่มควบคุม มีระดับ BALP เพิ่มขึ้นในทุกสัปดาห์ตลอดการศึกษาเช่นเดียวกัน แต่พบว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เฉพาะในสัปดาห์ที่ 1 เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0

BALP เป็นสารชีวเคมีที่ปล่อยออกมาจากกระดูกจากการทำงานของเซลล์ osteoblast ซึ่งในภาวะปกติ การสร้างกระดูก (bone formation) และการสลายกระดูก (bone resorption) ของสุนัขจะเกิดขึ้นอย่างสมดุล โดยการสร้างกระดูก จะมีการปล่อย BALP ออกมาในกระแสเลือดจากการทำงานของเซลล์ osteoblast และในภาวะกระดูกหัก เซลล์ osteoblast จะทำหน้าที่เพิ่มขึ้นในการสร้างเซลล์กระดูกใหม่เพื่อเชื่อมกระดูกที่หัก ดังนั้นจึงสามารถใช้การวัดระดับ BALP ในซีรัม เพื่อประเมินการเชื่อมของกระดูกได้ (Kommenou et al., 2005) มีการรายงานการวัดระดับ BALP ในซีรัมของสุนัขปกติ โดยแบ่งเป็นช่วงอายุต่างๆ คือ สุนัขในช่วงอายุ 1 - 2 ปี ( $n=8$ ), 2 - 3 ปี ( $n=8$ ) และ 3 - 7 ปี ( $n=8$ ) มีระดับ BALP อยู่ที  $10.7 \pm 4.5$ ,  $7.0 \pm 2.5$  และ  $6.7 \pm 3.6$  ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ (Allen et al., 2000) และมีการรายงานระดับ BALP เฉลี่ยจากการศึกษาในระยะยาว (12 สัปดาห์) ในสุนัขพันธุ์ปีเกิลโตเต็มวัย ( $n=8$ ) เท่ากับ  $15.17 \pm 3.23$  ยูนิตต่อลิตร (Ladlow et al., 2002)

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ ทางคณะผู้วิจัยวัดระดับ BALP ในซีรัมสุนัขที่อยู่ในภาวะกระดูกหัก พบว่าระดับ BALP เฉลี่ยในซีรัมก่อนการผ่าตัดแก้ไขกระดูกหัก (สัปดาห์ที่ 0) ของสุนัขทั้งสองกลุ่มสูงกว่าระดับ BALP ในสุนัขปกติที่เคยมีรายงานมาแล้วข้างต้น (กลุ่มควบคุม =  $28.89 \pm 4.25$  และ กลุ่มศึกษา =  $35.42 \pm 4.98$  ยูนิตต่อลิตร) และในสัปดาห์ที่ 1 หลังการผ่าตัดแก้ไขกระดูกหัก ระดับ BALP ในซีรัมของสุนัขกลุ่มควบคุมเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 จากนั้นระดับ BALP ในซีรัมมีแนวโน้มลดลง แต่ยังมีระดับ BALP ในซีรัมสูงกว่าสัปดาห์ที่ 0 ตลอดการศึกษา ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับ BALP กับการสร้างกระดูกใหม่ ในสุนัข ( $n = 6$ ) ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้กระดูกหักบางส่วน (transection) เปรียบเทียบกับระดับ BALP ในซีรัมของสุนัขกลุ่มเดียวกันก่อนเหนี่ยวนำให้กระดูกหัก พบว่าระดับ BALP ในซีรัมเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับก่อนการเหนี่ยวนำให้กระดูกหักบางส่วนตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในทุกสัปดาห์จนครบระยะเวลาการศึกษาใน 4 สัปดาห์ (Mohamadnia et al., 2007) และถึงแม้ว่าระดับ BALP ในซีรัมจะมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นและลดลงในขณะที่เกิดการเชื่อมกระดูกหักแตกต่างกันในแต่ละ

ละการศึกษา แต่เมื่อใดก็ตามที่เกิดกระดูกหัก และมีการเชื่อมของปลายกระดูกหักเกิดขึ้น ระดับ BALP ในซีรัมมักจะมีระดับสูงกว่าระดับ BALP ในซีรัมของสุนัขปกติเสมอ

ในสุนัขกลุ่มศึกษาที่ได้รับการฉีด nandrolone laurate ขนาด 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เข้าใต้ผิวหนัง ในสัปดาห์ที่ 0, 2 และ 4 ของการศึกษา พบว่า ระดับ BALP ในซีรัมเพิ่มสูงขึ้นกว่า สัปดาห์ที่ 0 ตลอดระยะเวลาการศึกษาเช่นเดียวกัน โดยระดับ BALP สูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 1 ของการศึกษา และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในสัปดาห์ที่ 1 และ 12 เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่า ระดับ BALP ในซีรัมของสุนัขกลุ่มศึกษาสูงกว่ากลุ่มควบคุม ณ เวลาเดียวกันตลอดการศึกษา โดยพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 8 และ 12 แสดงว่า nandrolone laurate ส่งผลให้ osteoblast ทำงานเพิ่มขึ้น ในการสร้างกระดูก ซึ่งสามารถอธิบายได้จากการรายงานผลการศึกษาในห้องทดลอง (*in vitro*) ที่บ่งชี้ว่า anabolic steroids ส่งผลโดยตรงต่อกระดูก โดยออกฤทธิ์จับกับ androgen receptors ใน osteoblast-like cells จากนั้นเหนี่ยวนำให้กลายเป็นเซลล์ osteoblast และปลดปล่อยสารชีวเคมี ชนิด BALP ออกมา (Li et al., 2000) ดังนั้น nandrolone laurate ซึ่งเป็น anabolic steroids ชนิดหนึ่ง น่าจะออกฤทธิ์ได้โดยผ่านกลไกเดียวกัน คือ จับกับ androgen receptors และเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนเป็นเซลล์ osteoblast เพิ่มมากขึ้นในภาวะกระดูกหักเพื่อทำหน้าที่สร้างกระดูกซ่อม และกระดูกใหม่เพื่อเชื่อมกระดูกหักที่เสียหาย ทำให้มีการสร้าง BALP ออกมาในระดับที่มากกว่า สุนัขกลุ่มควบคุมได้ และเนื่องจาก nandrolone laurate ที่ใช้ในการศึกษานี้ มีองค์ประกอบของ dodecanoic ester หรือ laurate ในตำแหน่งอะตอมคาร์บอนที่ 19 ทำให้มีระยะเวลาออกฤทธิ์นาน 3-4 สัปดาห์ ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้ ได้ฉีด nandrolone laurate ให้สุนัขในกลุ่มศึกษาหลังการ ผ่าตัดทันที และฉีดซ้ำอีก 2 ครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ ดังนั้นจึงทำให้มีระดับของ nandrolone laurate สูงเพียงพอในการออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของ osteoblast ในการเชื่อมต่อของกระดูกได้ตลอด ระยะเวลาการศึกษา

สำหรับเทคนิคการตรวจวัดระดับ BALP ในซีรัมสุนัข สามารถวัดได้โดยตรง และทางอ้อม สำหรับการศึกษานี้ของ Mohamadnia และคณะในปี 2007 ใช้วิธีวัดระดับ BALP ในซีรัมด้วยวิธีการเลือกตกตะกอนด้วย wheat-germ lectin ซึ่งเป็นการวัดระดับของ BALP ทางอ้อม แต่ในการศึกษาผลของ nandrolone laurate ต่อการเชื่อมกระดูกของสุนัขครั้งนี้ ใช้การวัดด้วยวิธี enzyme immunoassay (EIA) ที่จำเพาะต่อการวัดระดับ BALP ในซีรัมสุนัข ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถ วัดระดับ BALP ในซีรัมสุนัขได้โดยตรง และจากการศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีการวัดระดับ BALP ใน สุนัขปกติช่วงอายุต่างๆ ของ Allen และคณะในปี 2000 พบว่าการวัดระดับ BALP ในซีรัมด้วย วิธีการเลือกตกตะกอนด้วย wheat-germ lectin มีความสัมพันธ์อย่างดีเยี่ยมกับการวัดด้วยวิธี EIA ที่จำเพาะ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.0001$ )

### ผลของ nandrolone laurate ต่อระดับ OC ในซีรัมของสุนัขกระดูกหัก

ในภาวะปกติของร่างกาย การสร้างกระดูก (bone formation) และการสลายกระดูก (bone resorption) ในสุนัขจะเกิดขึ้นพร้อมกันอย่างสมดุล การสร้างกระดูกเกิดจากการทำงานของเซลล์ osteoblast ซึ่งจากการทำงานของเซลล์ osteoblast นี้ ทำให้เกิดการหลั่ง OC ออกมาในกระแสเลือด (Lee et al., 2000, Allen et al., 2003) และเมื่อมีภาวะกระดูกหักระดับของ OC ในซีรัมจะเพิ่มสูงขึ้นกว่าปกติ (Polak-Jonkisz and Zwolinska, 1998, Watts, 1999) จากผลการทดลองของคณะผู้วิจัยครั้งนี้พบว่าสอดคล้องกับการรายงานข้างต้น คือ ระดับ OC ในซีรัมของสุนัขกระดูกหักช่วงอายุ 1 – 7 ปี ก่อน (สัปดาห์ที่ 0) และหลังการผ่าตัดแก้ไขในสัปดาห์ที่ 1 เท่ากับ  $4.43 \pm 1.57$  และ  $5.46 \pm 2.81$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นระดับ OC ในซีรัมจะลดต่ำลงในสัปดาห์ที่สองหลังการผ่าตัด ( $4.49 \pm 1.81$ ) และลดต่ำกว่าระดับก่อนการผ่าตัด ในสัปดาห์ที่ 4 ( $4.24 \pm 1.59$ ) สำหรับระดับ OC ในสัปดาห์ที่ 8 และ 12 ของการศึกษา เท่ากับ  $4.09 \pm 1.85$  และ  $3.10 \pm 1.55$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งหากพิจารณาจากอาการทางคลินิกและภาพถ่ายรังสีวินิจฉัยพบว่า การเชื่อมต่อของกระดูกหัก เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ในสัปดาห์ที่ 8 และ 12 ดังนั้นระดับ OC ในซีรัมที่วัดได้ในช่วงสัปดาห์นี้น่าจะเป็นระดับ OC ของสุนัขในภาวะปกติของร่างกาย และเมื่อกระดูกหัก ระดับ OC ในซีรัมจึงเพิ่มสูงขึ้นดังที่ตรวจพบในสัปดาห์ที่ 0 และ 1 ดังกล่าว ซึ่งผลการศึกษานี้ยังคงคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Paskalev และคณะ ในปี 2005 เกี่ยวกับระดับของ OC ในซีรัมก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดกระดูกหัก และแก้ไขกระดูกหักด้วยการผ่าตัดใส่แท่งเหล็กในโพรงกระดูกในสุนัขช่วงอายุ 1 – 3 ปี (n=6) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสุนัขปกติก่อนเหนี่ยวนำให้กระดูกหักมีระดับ OC ในซีรัมอยู่ที่  $3.90 \pm 0.38$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเหนี่ยวนำให้กระดูกหักและแก้ไขกระดูกหักด้วยการผ่าตัดแล้ว ระดับ OC ในซีรัมสัปดาห์ที่ 1 เท่ากับ  $4.50 \pm 0.54$  สัปดาห์ที่ 2 เท่ากับ  $4.42 \pm 0.51$  สัปดาห์ที่ 3 เท่ากับ  $3.95 \pm 0.24$  และสัปดาห์ที่ 4 เท่ากับ  $4.38 \pm 0.48$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งระดับ OC ของสุนัขกระดูกหักจากการศึกษาดังกล่าวเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเทียบกับก่อนการเหนี่ยวนำให้กระดูกหัก

อย่างไรก็ตามไม่สามารถเปรียบเทียบระดับ OC ในซีรัมของสุนัขจากผลการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 และ 12 ของคณะผู้วิจัย กับการรายงานระดับ OC ในซีรัมของสุนัขปกติของ Allen และคณะ (1998) ได้ เนื่องจากช่วงอายุของสุนัขที่ใช้ในการทดลองนี้อยู่ระหว่าง 1-7 ปี แต่จากการรายงานดังกล่าว พบว่าระดับ OC ในซีรัมแตกต่างกันตามช่วงอายุของสุนัข โดยพบว่าสุนัขในช่วงอายุ 1 – 2 ปี มีระดับ OC สูงที่สุด คือ  $13.62 \pm 1.96$  (10.49 – 16.76) นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร อายุ 3 – 7 ปี เท่ากับ  $4.9 \pm 1.63$  (1.70 – 8.10) นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และอายุมากกว่า 7 ปี มีระดับ OC ในซีรัม เท่ากับ  $3.71 \pm 1.21$  (1.34 – 6.08) นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

การวัดระดับ OC ในซีรัมทั้งในการสร้างกระดูกปกติ และการสร้างกระดูกเพื่อเชื่อมกระดูกหัก สามารถทำได้หลายวิธี เช่น enzyme immunoassay (EIA), radioimmunoassay (RIA) และ immunoradiometric assay (IRMA) (Polak-Jonkisz and Zwolinska, 1998) ซึ่งการวัดระดับ OC ในซีรัมด้วยวิธี RIA หรือ IRMA ต้องใช้ antibody ที่จำเพาะในการจับกับ OC ในซีรัมของสัตว์แต่ละ สปีชีส์ (homologous RIA/IRMA) (Bouillon et al., 1992) จากข้อจำกัดของการวัดระดับ OC ในซีรัมด้วยวิธี RIA นี้ จึงมีการศึกษาการใช้วิธี enzyme immunoassay (EIA) ในคน โดยใช้ bovine monoclonal anti-Gla-OC antibodies และทำการเปรียบเทียบกับการวัดระดับ OC ในซีรัม ด้วยวิธี RIA โดยใช้ชุดตรวจที่จำเพาะต่อการตรวจระดับ OC ในซีรัมของคน พบว่าการวัดระดับ OC ในซีรัมด้วยวิธี EIA ให้ผลการวัดระดับ OC ในซีรัมที่จำเพาะ (specificity) มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การวัดระดับ OC ในซีรัมด้วยวิธี RIA (Hosoda et al., 1992) และมีการศึกษาความไว (sensitivity) ของการตรวจวัดระดับ OC ในซีรัมของคนด้วยวิธี EIA เช่นเดียวกัน โดยทำการวัดระดับ OC ด้วยเทคนิค polyclonal antibody against human osteocalcin โดยใช้ swine anti-rabbit antibody ที่ติดฉลากด้วย horseradish peroxidase ร่วมกับการใช้ monoclonal antibody against bovine osteocalcin เปรียบเทียบกับการใช้ monoclonal antibody against bovine osteocalcin เพียงอย่างเดียว พบว่าการวัดระดับ OC ในซีรัมทั้งสองวิธีให้ผลที่สัมพันธ์กันเป็นอย่างดี (Monaghan et al., 1993) ดังนั้นการวัดระดับ OC ในซีรัมด้วยวิธี EIA จึงเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูงกว่าการวัดระดับ OC ในซีรัมด้วยวิธี RIA (Polak-Jonkisz and Zwolinska, 1998) และชุดตรวจ Gla-type osteocalcin EIA ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้ในการตรวจวัดระดับ bovine, canine, rabbit, goat, sheep และ monkey Gla-OC ในซีรัมทางห้องปฏิบัติการได้ (Takara Bio Inc, Japan)

การแปรผันของการสร้างสารชีวเคมีของกระดูกในภาวะกระดูกหัก ได้มีรายงานว่า ในช่วง 4 สัปดาห์แรกของการเชื่อมกระดูกหักภายหลังเกิดกระดูกหัก สารชีวเคมีของกระดูกชนิด formation marker จะเพิ่มสูงขึ้น 20-50 เปอร์เซ็นต์ และมีระดับที่สูงต่อเนื่องไปอย่างน้อย 6 เดือน ถึง 1 ปี (Delmas et al., 2000) ระดับ OC ที่สูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 1 ยังเกิดจากการเปลี่ยนแปลง อย่างฉับพลันบริเวณกระดูกที่หัก ทำให้ OC ถูกปล่อยออกมาจากบริเวณกระดูกที่เสียหาย ส่งผล ให้ระดับ OC ในซีรัมสูงขึ้นอย่างเด่นชัดได้ (Bowles et al., 1996) การศึกษาผลของ nandrolone laurate ต่อการเชื่อมกระดูกของสุนัขครั้งนี้พบว่า สุนัขกลุ่มศึกษาที่ได้รับการฉีด nandrolone laurate เสริมการรักษากระดูกหักด้วยการผ่าตัดมีระดับ OC ในซีรัมสูงสุดในสัปดาห์ที่ 1 สอดคล้องกับการรายงานนี้ และเมื่อเปรียบเทียบกับระดับ OC ในซีรัมในสัปดาห์ที่ 1 และสัปดาห์อื่น ๆ ของสุนัขกลุ่มศึกษากับกลุ่มควบคุม พบว่า สุนัขกลุ่มศึกษาที่ได้รับ nandrolone laurate มีระดับ OC ในซีรัมสูงกว่ากลุ่มควบคุมในทุก ๆ สัปดาห์ จากการศึกษาผลของ nandrolone decanoate ต่อมวลกระดูกในผู้หญิงที่มีภาวะกระดูกบางหลังวัยหมดประจำเดือน โดยประเมินผลการวัดความหนาแน่นของมวลกระดูก ร่วมกับการวัดระดับสารชีวเคมี ทั้ง bone formation marker ในซีรัมและ bone resorption marker ในปัสสาวะ พบว่า nandrolone decanoate มีผลทำให้ bone resorption marker ชนิด hydroxyproline ในปัสสาวะลดลง และ bone formation marker ชนิด OC ในซีรัมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่า ภาวะกระดูกบางหลังวัยหมดประจำเดือนในเพศหญิง มักมีการสร้างสารชีวเคมีของกระดูกสองชนิดไม่สมดุลกัน คือมีการสร้าง bone formation marker ที่ลดลง สามารถตรวจวัดระดับ OC ในซีรัมได้น้อยกว่าปกติ และมีการสร้าง bone resorption marker ที่เพิ่มขึ้น โดยตรวจวัดระดับ hydroxyproline ในปัสสาวะได้สูงกว่าปกติ ดังนั้นจากการศึกษาผลของ nandrolone decanoate ต่อมวลกระดูกในผู้หญิงที่มีภาวะกระดูกบางหลังวัยหมดประจำเดือนครั้งนี้ได้สรุปไว้ว่า nandrolone decanoate มีผลกระตุ้นการสร้างกระดูก และยับยั้งการสลายกระดูกได้ (Passeri et al., 1993) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวัดระดับ bone formation marker เพียงอย่างเดียว และพบว่าสุนัขที่ได้รับ nandrolone laurate เสริมการรักษาภาวะกระดูกหักมีระดับ OC ในซีรัมสูงกว่าสุนัขกลุ่มควบคุมตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 – 12 แม้จะไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม แนวโน้มของระดับ OC ในซีรัมเพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมตลอดระยะเวลาการศึกษาอย่างชัดเจน จึงเป็นไปได้ว่า ระดับ OC ในซีรัมของสุนัขกลุ่มศึกษาที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมเป็นผลของ nandrolone laurate ที่ทำให้เกิดการสร้างกระดูกเพิ่มขึ้นจากการทำงานของเซลล์ osteoblast มากกว่าการไม่ได้รับ nandrolone laurate ในสุนัขกลุ่มควบคุม

ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ OC ในซีรัมทั้งที่ควบคุมได้ และควบคุมไม่ได้ ได้แก่ อายุ เพศ อาหาร การออกกำลังกาย การทำงานของไต ระดับของฮอร์โมน การสังเคราะห์กระดูกใหม่ ยาบางชนิด โรคกระดูกที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึม (metabolic bone disease) ช่วงเวลาที่ต่างกันระหว่างวันและเวลาที่เจาะเก็บตัวอย่างเลือด ฤดูกาล และความจำเพาะของชุดตรวจ เป็นต้น (Polak-Jonkisz and Zwolinska, 1998; Allen, 2003) จากการศึกษาผลของ nandrolone laurate ต่อการเชื่อมกระดูกหักของสุนัขในครั้งนี้ เป็นการศึกษาในสุนัขกระดูกหักที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และไม่ได้พักฟื้นอยู่ที่โรงพยาบาล ทำให้ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ OC ในซีรัมบางอย่างอาจไม่สามารถควบคุมได้ทั้งหมด เช่น อาหาร และการออกกำลังกาย แต่เมื่อสุนัขอยู่ในภาวะกระดูกหัก จะมีการทำงานของเซลล์ osteoblast ในการซ่อมแซมกระดูกหักอย่างเด่นชัดกว่าสุนัขปกติอย่างมาก (Watts, 1999) ดังนั้นปัจจัยที่ไม่สามารถควบคุมได้เหล่านี้ จึงถือได้ว่ามีผลค่อนข้างน้อยต่อระดับ OC ในซีรัม

จากข้อมูลดังที่กล่าวมาสรุปได้ว่า nandrolone laurate มีผลในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเซลล์ osteoblast มากขึ้น และทำหน้าที่สร้างกระดูกใหม่เพื่อเชื่อมกระดูกหัก และมีการปล่อย OC ออกมาในกระแสเลือดมากกว่าการไม่ได้รับ nandrolone laurate ถึงแม้ว่า OC จะเป็น formation marker ของกระดูกที่ใช้บ่งชี้การทำงานของเซลล์ osteoblast ได้สมบูรณ์กว่า BALP (Bouillon et al., 1992) แต่จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ระดับ OC ในซีรัมอาจไม่ใช่ formation marker ของกระดูกที่ดีที่สุดเสมอไป และเมื่อพิจารณาจากการสืบค้นทางวรรณกรรม และผลการวัดระดับ BALP ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้แล้ว สรุปได้ว่า ในการประเมินผลของยาฮอร์โมน หรือภาวะใดๆ ที่อาจมีผลต่อการเชื่อมกระดูกหักในสุนัขนั้น ควรวัด bone formation marker ทั้ง OC และ BALP ร่วมกับ bone resorption markers ด้วย



**ผลของ nandrolone laurate ต่อระดับ total calcium, inorganic phosphorous ในซีรัม และ Ca/P ratio**

จากการศึกษาผลของ nandrolone laurate ต่อระดับ total  $\text{Ca}^{2+}$  ในซีรัม พบว่า ค่าเฉลี่ยระดับ total  $\text{Ca}^{2+}$  ในซีรัมของสุนัขกลุ่มควบคุมลดลง เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 แต่ยังคงอยู่ในระดับปกติของสุนัข (9.3 – 11.9 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) (Komnenou., 2005) ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา โดยมีระดับ total  $\text{Ca}^{2+}$  ต่ำที่สุดในสัปดาห์ที่ 1 สอดคล้องกับการศึกษาของ Paskalev และคณะ (2007) เกี่ยวกับระดับ total  $\text{Ca}^{2+}$  ในสุนัขก่อนและหลังเหนี่ยวนำให้กระดูกหัก และแก้ไขกระดูกหักด้วยการผ่าตัดใส่แท่งเหล็กในโพรงกระดูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ที่พบว่าระดับ total  $\text{Ca}^{2+}$  ในสัปดาห์ที่ 1 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) หลังเหนี่ยวนำให้กระดูกหักและแก้ไขกระดูกหักด้วยการผ่าตัดใส่แท่งเหล็กในโพรงกระดูกแล้ว เมื่อเทียบกับก่อนการเหนี่ยวนำให้เกิดกระดูกหัก ส่วนกลุ่มศึกษาที่ได้รับ nandrolone laurate พบว่าระดับ total  $\text{Ca}^{2+}$  มีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกัน โดยในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 มีระดับ total  $\text{Ca}^{2+}$  อยู่ในระดับปกติของสุนัข จากนั้นตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 – 12 ระดับ total  $\text{Ca}^{2+}$  ลดลงต่ำกว่าระดับปกติในสุนัข โดยในสัปดาห์ที่ 12 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 และเป็นระดับที่ทำให้เกิดภาวะแคลเซียมในกระแสเลือดต่ำของสุนัข (6.0 – 6.5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร; Bistner et al., 2000) เมื่อพิจารณา ระดับ total  $\text{Ca}^{2+}$  ในสุนัขกลุ่มศึกษา พบว่าสุนัขบางตัวในบางสัปดาห์ มีระดับ total  $\text{Ca}^{2+}$  ต่ำกว่าปกติ แต่สุนัขไม่แสดงอาการผิดปกติทางคลินิก สาเหตุของการเกิดภาวะแคลเซียมในเลือดต่ำของสุนัขมีหลายสาเหตุ (ตารางที่ 5 – 1) (Bistner et al., 2000) ถึงแม้ว่าสุนัขที่ใช้ในการศึกษาได้รับการตรวจประเมินสุขภาพก่อนการผ่าตัด ว่ามีภาวะความพร้อมของร่างกาย และในระหว่างการศึกษาสุนัขไม่แสดงอาการภาวะแคลเซียมในเลือดต่ำทางคลินิก จึงมีความเป็นไปได้ว่า อาจเกิดจากความผิดพลาดของผลตรวจระดับ total  $\text{Ca}^{2+}$  จากห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 5 - 1 สาเหตุของการเกิดภาวะแคลเซียมในเลือดต่ำของสุนัข (Bistner et al., 2000)

<b>สาเหตุการเกิดภาวะแคลเซียมในเลือดต่ำของสุนัข</b>	
Laboratory error	Hypomagnesemia
Primary hypoparathyroidism	Pseudohypoparathyroidism
Hypoalbuminemia	Vitamin D deficiency
Chronic renal failure	Intestinal malabsorption diseases
Acute renal failure (ethylene glycol poisoning)	Medication : EDTA, citrate
Puerperal tetany (eclampsia)	Phosphate-containing enemas

อย่างไรก็ตาม ข้อมูลจากตารางที่ 5-1 มีหลายสาเหตุที่ไม่สามารถตัดออกไปได้ เช่น ภาวะฮอร์โมนพาราไทรอยด์ต่ำ ภาวะแมกนีเซียมในเลือดต่ำ และ ภาวะโปรตีนอัลบูมินในเลือดต่ำ (hypoalbuminemia) ที่อาจมีผลทำให้การวัดระดับแคลเซียมในเลือดต่ำกว่าปกติได้ด้วย เนื่องจากสุนัขที่ใช้ในการศึกษาได้รับการตรวจประเมินผลเลือดโดยการแยกชนิดและนับจำนวนเม็ดเลือดรวมทั้งวัดระดับเอนไซม์การทำงานของตับ และไตเท่านั้น การเจาะเก็บเลือดเพื่อแยกเก็บซีรัมไม่มีการใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ดังนั้น จึงสามารถตัดสาเหตุที่อาจทำให้ระดับของ total  $Ca^{2+}$  ในเลือดต่ำ คือภาวะของโรคไต และผลของสารกั้นเลือดแข็งตัว (EDTA, citrate) ออกได้เท่านั้น ส่วนสาเหตุอื่น ๆ ดังที่กล่าวมาในตาราง 5 – 1 ต้องใช้การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพิ่มเติมเพื่อหาสาเหตุที่อาจมีผลต่อระดับของ total  $Ca^{2+}$  ในกระแสเลือดได้

ผลของ nandrolone laurate ต่อระดับ inorganic P ในซีรัม พบว่า ค่าเฉลี่ยระดับ inorganic P ในซีรัมของสุนัขกลุ่มควบคุม ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 และมีระดับอยู่ในช่วงปกติของสุนัข (2.0 – 5.5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) (Komnenou., 2005) ตลอดระยะเวลาการศึกษา ส่วนสุนัขในกลุ่มศึกษามีค่าเฉลี่ยระดับ inorganic P ในซีรัมอยู่ในช่วงปกติของสุนัขตลอดระยะเวลาการศึกษาเช่นเดียวกัน แต่ในสัปดาห์ที่ 8 และ 12 มีค่าเฉลี่ยระดับ inorganic P ในซีรัมเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 เนื่องจากการทำงานของเซลล์ osteoblast เพิ่มมากขึ้นเมื่อเกิดกระดูกหัก ทั้งการสร้างเนื้อกระดูกใหม่ (new bone matrix formation) และการสะสมแร่ธาตุ (mineralization) ของกระดูกเอง (Johnson และ Watson, 2005) และกระบวนการนี้ยังมีความเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) ที่ถูกปล่อยออกมาจำนวนมากด้วย (Leung et al., 1993) นอกจากระดับ inorganic P ในซีรัมที่เพิ่มสูงขึ้นยังเป็นผลมาจากสะสมแคลเซียมของเนื้อกระดูกที่สร้างขึ้นใหม่ ดังนั้นจะพบระดับ total  $Ca^{2+}$  ในซีรัมลดลงร่วมกับระดับ inorganic P ในซีรัมที่เพิ่มขึ้นด้วย (Komnenou., 2005) จากการศึกษาผลของ nandrolone laurate ต่อการเชื่อมกระดูกหักในครั้งนี้อยู่ เมื่อพิจารณาในระดับ BALP, total  $Ca^{2+}$  และ inorganic P ในซีรัมของสุนัขกลุ่มศึกษาร่วมกัน พบว่าระดับ BALP ในซีรัมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ณ ช่วงเวลาเดียวกัน ในสัปดาห์ที่ 8 และ 12 ร่วมกับระดับ inorganic P ในซีรัมที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในสัปดาห์ที่ 8 และ 12 และระดับ total  $Ca^{2+}$  ในซีรัมที่ลดลงต่ำกว่าระดับปกติของสุนัขในสัปดาห์ที่ 8 และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในสัปดาห์ที่ 12 จึงเป็นไปได้ว่าสุนัขในกลุ่มศึกษานี้มีการทำงานของเซลล์ osteoblast มากกว่าสุนัขกลุ่มควบคุมจากการศึกษาและรายงานผลของการใช้ nandrolone decanoate (ND) ต่อมวลความหนาแน่นของกระดูก (bone mass) และการสันดาปแคลเซียม (calcium metabolism) ในการรักษาภาวะกระดูกบางของผู้หญิงหลังวัยหมดประจำเดือน (n = 10) โดยการฉีด ND 50 มิลลิกรัมให้ผู้หญิงที่มี

ภาวะกระดูกบางหลังวัยหมดประจำเดือนแต่ละคน ทุก 3 สัปดาห์ เป็นเวลา 12 เดือน ร่วมกับการกินแคลเซียมเสริมขนาด 1 กรัมต่อวัน ใช้วิธีการประเมินการดูดซึมแคลเซียมของลำไส้ด้วยการวัดระดับ radiocalcium ( $^{47}\text{Ca}$ ) พบว่ามวลความหนาแน่นของกระดูก และระดับ  $^{47}\text{Ca}$  ในกระดูกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอกร่วมกับการกินแคลเซียมในปริมาณเท่ากัน (Gennari et al., 1989) ดังนั้น การได้รับ anabolic steroid หรือ nandrolone ester มีผลทำให้การสะสมแคลเซียมในเนื้อเยื่อกระดูกใหม่เพิ่มมากขึ้นได้ และจากการศึกษาดังกล่าว ได้ให้แคลเซียมร่วมกับการฉีด ND ในขนาดถึง 1 กรัมต่อวัน แต่การศึกษารวมของ nandrolone laurate ต่อการเชื่อมกระดูกหักของสุนัขในครั้งนี้ สุนัขได้รับแคลเซียมเพียง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 10 กิโลกรัม เมื่อพิจารณาร่วมกับระดับ total  $\text{Ca}^{2+}$  ในซีรัมที่ลดลงต่ำกว่าระดับปกติของสุนัขในสัปดาห์ที่ 8 และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในสัปดาห์ที่ 12 นั้น การให้แคลเซียมในขนาด 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 10 กิโลกรัมอาจไม่เพียงพอต่อการเสริมสร้างเนื้อกระดูกใหม่ได้ และจากระดับ total  $\text{Ca}^{2+}$  ในซีรัมที่ลดลง และ inorganic P ในซีรัมที่เพิ่มขึ้น ยังเป็นผลทำให้ระดับ Ca/P ratio ของสุนัขกลุ่มศึกษามีระดับต่ำกว่าปกติในสัปดาห์ที่ 8 และ 12 อีกด้วย

## การประเมินผลของ nandrolone laurate ต่อการเชื่อมกระดูกของสุนัข จากภาพถ่ายรังสีวินิจฉัย

จากการประเมินผลของ nandrolone laurate ต่อการเชื่อมกระดูกของสุนัขจากภาพถ่ายรังสีวินิจฉัย ในสัปดาห์ที่ 4 ซึ่งเป็นสัปดาห์แรกของการติดตามผลการรักษาหลังการผ่าตัด พบว่าสุนัขทั้งสองกลุ่มมีกระดูกซ่อมมาพอกบริเวณกระดูกหัก โดยสุนัขกลุ่มศึกษาพบปริมาณกระดูกซ่อมที่มากพอกบริเวณกระดูกหักมากกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งปริมาณกระดูกซ่อมที่มากหรือน้อยนั้น ส่วนหนึ่งขึ้นอยู่กับการทำงานของเซลล์ osteoblast ทั้งการสร้างเนื้อกระดูกใหม่ (new bone matrix formation) และการสะสมแร่ธาตุ (mineralization) ของกระดูกเอง (Johnson และ Watson, 2005) จากการศึกษาในหลอดทดลอง หรือภายนอกตัวสัตว์ (*in vitro*) ที่บ่งชี้ว่า anabolic steroids ส่งผลโดยตรงต่อกระดูก โดยออกฤทธิ์ที่ androgen receptors ใน osteoblast-like cells จากนั้นเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนเป็นเซลล์ osteoblast (Li et al., 2000) และเมื่อพิจารณา ร่วมกับปริมาณของกระดูกซ่อมที่มากขึ้น จึงเป็นการยืนยันว่า nandrolone laurate สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดเซลล์ osteoblast เพิ่มมากขึ้นในภาวะกระดูกหัก และทำหน้าที่สร้างกระดูกซ่อมเพื่อเชื่อมกระดูกที่หักเสียหายได้

เมื่อการสร้างกระดูกซ่อมสิ้นสุดลง ระดับของ BALP, total  $Ca^{2+}$  และ inorganic P ในซีรัมจะกลับเข้าสู่ระดับในภาวะปกติของสุนัข (Kommenou., 2005) จากการศึกษาผลของ nandrolone laurate ต่อการเชื่อมกระดูกหักของสุนัขในครั้งนี้ พบว่าเมื่อสิ้นสุดการศึกษา ระดับของ BALP, total  $Ca^{2+}$  และ inorganic P ในซีรัมยังไม่กลับเข้าสู่ภาวะปกติ ดังนั้นแสดงว่าการสร้างกระดูกซ่อมเพื่อเชื่อมกระดูกของสุนัขยังคงดำเนินไปอยู่ ถึงแม้ว่าจากภาพถ่ายรังสีวินิจฉัยจะไม่พบรอยหักของกระดูก สุนัขไม่แสดงอาการทางคลินิก และสามารถกลับมาใช้งานขาที่หักได้เหมือนเดิมแล้วก็ตาม

### ผลของ nandrolone laurate ต่อการเปลี่ยนแปลงค่าทางเคมีโลหิตของสุนัขกระดูกหัก

เอนไซม์ alanine transaminase (ALT) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ปริมาณมากในเซลล์ตับของสุนัข เมื่อเซลล์ตับถูกทำลายจะปล่อยเอนไซม์ ALT ออกมาและมีความเข้มข้นสูงขึ้นในซีรัม จึงถือได้ว่า ALT เป็นเอนไซม์ที่บ่งชี้ความเสียหายของเซลล์ตับได้อย่างจำเพาะ ระดับเอนไซม์ ALT อ้างอิงปกติในสุนัขเท่ากับ 10 – 94 ยูนิต (Bistner et al., 2000) นอกจากเอนไซม์ ALT แล้ว เอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) ยังเป็นเอนไซม์อีกหนึ่งตัวที่แสดงการทำงานของเซลล์ตับ โดยมีระดับอ้างอิงปกติในสุนัขเท่ากับ 0 – 90 ยูนิต (Bistner et al., 2000) เอนไซม์ ALP เป็นเอนไซม์ที่ผลิตออกมาจากเซลล์ของอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น กระดูก พื้นผิวของลำไส้ เนื้อเยื่อส่วนคอร์เทก (cortex) ในไต รก และเซลล์ตับ เป็นต้น (Bistner et al., 2000) แต่ระดับ ALP ที่พบในซีรัมส่วนใหญ่ถูกสร้างมาจากเซลล์กระดูกและตับ (Sanecki et al., 1993) ดังนั้นเมื่อตรวจพบระดับของ ALP ในซีรัมสูงทางคลินิก จะพบว่าเป็นความผิดปกติของตับและกระดูก (Bistner et al., 2000)

ระดับเอนไซม์ ALP ที่สูงขึ้นเกิดได้จากหลายสาเหตุได้แก่ 1) ท่อน้ำดีอุดตัน เกิดจากเซลล์ตับบวมและไปขัดขวางการไหลของน้ำดี ทำให้เกิดการสะสมของกรดน้ำดีภายในเซลล์ตับ และมีผลไปกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ ALP ไปสะสมที่ผนังเซลล์ของเซลล์ตับมากขึ้น 2) การทำงานของเซลล์ osteoblast มากกว่าปกติ เช่น ภาวะกระดูกหัก มะเร็งกระดูก (osteosarcoma) เป็นต้น 3) การได้รับยา หรือฮอร์โมน เช่น ยากลุ่ม phenobarbital หรือการเกิดภาวะตับอักเสบจากการได้รับยากลุ่มสเตียรอยด์ (steroid-induced hepatopathy) ในการรักษาภาวะของโรค Cushing's syndrome เป็นต้น (Bistner et al., 2000)

จากการศึกษาผลของ nandrolone laurate ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ ALT พบว่า สุนัขกลุ่มศึกษาที่ได้รับ nandrolone laurate เสริมการรักษากระดูกหักด้วยการผ่าตัด และสุนัขกลุ่มควบคุม ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ ALT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ของสุนัขกลุ่มศึกษาเมื่อเทียบกับสุนัขกลุ่มควบคุม ณ เวลาเดียวกัน และมีระดับอยู่ในช่วงปกติของสุนัข เนื่องจาก nandrolone laurate มีข้อควรระวังหรือผลข้างเคียง ซึ่งอ้างอิงมาจากข้อมูลของคนว่า อาจทำให้เกิดความเป็นพิษต่อตับได้ (hepatotoxicity) (Plumb, 2005) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ สุนัขกลุ่มศึกษาได้รับการฉีด nandrolone laurate 3 ครั้งห่างกันครั้งละ 2 สัปดาห์ และทำการตรวจวัดระดับเอนไซม์ ALT ในอีก 4 สัปดาห์ถัดมาหลังการได้รับ nandrolone laurate ครั้งสุดท้าย ไม่พบว่า nandrolone laurate มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ ALT ในสุนัขแต่อย่างใด และเมื่อพิจารณาระดับเอนไซม์ ALP ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า สุนัขทั้งสองกลุ่ม มีระดับเอนไซม์

ALP ที่สูงกว่าระดับปกติของสุนัขในสัปดาห์ที่ 0 แล้ว และระดับเอนไซม์ ALP ในซีรัมลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) จนกระทั่งอยู่ในช่วงปกติของสุนัขในสัปดาห์ที่ 8 เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ของสุนัขกลุ่มศึกษาเมื่อเทียบกับสุนัขกลุ่มควบคุม ณ เวลาเดียวกัน ซึ่งระดับ ALP ที่พบในซีรัมส่วนใหญ่ถูกสร้างมาจากสองแหล่งในร่างกาย คือ กระดูกและตับ (Sanecki et al., 1993) และเมื่อตรวจพบระดับของ ALP สูงทางคลินิก มักเป็นความผิดปกติของตับและกระดูก (Bistner et al., 2000) จากการศึกษาผลของ nandrolone laurate ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์การทำงานของตับครั้งนี้ พบว่าระดับเอนไซม์ ALT ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อการทำงานของตับมากกว่าเอนไซม์ ALP ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งก่อนและหลังการได้รับ nandrolone laurate และสุนัขที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ทั้งสองกลุ่ม ไม่ได้รับยาในกลุ่มสเตียรอยด์หรือฮอร์โมนที่มีผลต่อการเพิ่มระดับเอนไซม์ ALP ดังนั้นระดับเอนไซม์ ALP ที่สูงกว่าระดับปกติของสุนัขในสัปดาห์ที่ 0 น่าจะมีสาเหตุมาจากการทำงานของเซลล์ osteoblast ที่สูงขึ้นในภาวะกระดูกหัก บ่งชี้ได้ว่า nandrolone laurate ไม่มีผลให้เกิดความเป็นพิษ ต่อเซลล์ตับในสุนัข

**ผลของ nandrolone laurate ต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเม็ดเลือดแดง ค่าฮีโมโกลบิน และค่าฮีมาโตคริตของสุนัขกระดุกหัก**

Nandrolone ester มีฤทธิ์เพิ่มการสร้างเม็ดเลือดแดง (erythropoiesis) โดยกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดแดงตั้งต้นในไขกระดูกโดยตรง เพิ่มจำนวน red cell 2,3-diphosphoglycerate และเพิ่มการสร้างฮอร์โมน erythropoietin ในไต ในทางสัตวแพทย์ใช้ nandrolone ester ในการกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดงในสัตว์ป่วยที่มีภาวะโลหิตจางในหลายกรณี เช่น ภาวะโลหิตจางที่เกิดตามมาจากไตวาย และ aplastic anemias เป็นต้น (Plumb, 2005) จำนวนเม็ดเลือดแดงที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ฮีโมโกลบิน และฮีมาโตคริตเพิ่มสูงขึ้นด้วย (Bistner et al., 2000)

จากการศึกษาผลของ nandrolone laurate ต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเม็ดเลือดแดงในครั้งนี้ พบว่า สุนัขกลุ่มควบคุมมีจำนวนเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยอยู่ในช่วงปกติของสุนัขในสปีดาร์ที่ 0 สปีดาร์ ส่วนสุนัขกลุ่มศึกษามีจำนวนเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยต่ำกว่าระดับปกติของสุนัขในสปีดาร์ที่ 0 จากนั้นจำนวนเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยมีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในสปีดาร์ที่ 4, 8 และ 12 จนกระทั่งมีจำนวนเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยอยู่ในช่วงปกติของสุนัข ซึ่งรายงานความสำเร็จจากการใช้ nandrolone decanoate (ND) รักษาในคนที่เป็น aplastic anemia จำนวน 10 ราย แบ่งเป็นผู้ป่วย 3 ประเภท 5 ราย 1) ผู้ป่วยที่เป็น aplastic anemia โดยการเหนี่ยวนำด้วยยา 4 ราย (ยา benzol 2 ราย chloramphenicol 1 ราย และ phenylbutazone 1 ราย) 2) ผู้ป่วยที่เป็น aplastic anemia แบบไม่ทราบสาเหตุ (idiopathic) 3) ผู้ป่วยที่เป็น Fanconi-type anemia 1 ราย พบว่า 8 ใน 10 ให้ผลตอบสนองต่อการรักษาภาวะโลหิตจางหลังได้รับ ND ตั้งแต่ 2 เดือนขึ้นไป และมีจำนวนเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยกลับเข้าสู่ภาวะปกติหลังได้รับ ND อย่างน้อย 4 เดือนขึ้นไป (Daiber et al., 2009) การเกิดภาวะโลหิตจางจากการสูญเสียเลือด เกิดขึ้นได้เมื่อมีการสูญเสียเลือด 25 – 40 เปอร์เซ็นต์ ของระบบไหลเวียนในร่างกาย และเกิดขึ้นในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ เช่น การเสียเลือดจากบาดแผลหรือการกระทบกระทั่ง และการผ่าตัด เป็นต้น ซึ่งการเกิดภาวะโลหิตจางในลักษณะนี้ จำนวนเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยจะกลับเข้าสู่ภาวะปกติภายในเวลา 4 – 25 วัน (Bistner et al., 2000) อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถสรุปได้อย่างแน่ชัดว่า nandrolone laurate มีผลกระตุ้นให้เพิ่มการสร้างเม็ดเลือดแดงในสุนัขกลุ่มศึกษา หรือเป็นผลมาจากการปรับตัวของร่างกายสุนัขเอง ทำให้จำนวนเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยกลับเข้าสู่ภาวะปกติของสุนัขได้ จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในสุนัขที่มีภาวะโลหิตจางโดยตรง

จากการศึกษาผลของ nandrolone laurate ต่อการเปลี่ยนแปลงค่าฮีโมโกลบิน และค่าฮีมาโตคริตครั้งนี้ พบว่า ค่าฮีโมโกลบิน และค่าฮีมาโตคริตของสุนัขกลุ่มศึกษาที่ได้รับ

nandrolone laurate และกลุ่มควบคุม มีระดับอยู่ในช่วงปกติของสุนัข (ค่าฮีโมโกลบิน เท่ากับ 12 – 18 กรัมต่อเดซิลิตร และค่าฮีมาโตคริต เท่ากับ 37 – 55 เปอร์เซ็นต์) และระดับฮีโมโกลบินของสุนัขกลุ่มศึกษาที่ได้รับ nandrolone laurate เพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 8 และ 12 แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) มีการศึกษาและรายงานผลของ nandrolone decanoate (ND) ต่อความหนาแน่นของกระดูก (bone mineral density) และค่าฮีโมโกลบินในหญิงสูงอายุ (อายุมากกว่า 70 ปี) ที่มีภาวะกระดูกบาง โดยการฉีด ND ในขนาด 50 มิลลิกรัมต่อคน ทุก 3 สัปดาห์ จบครบ 2 ปี ร่วมกับการกินแคลเซียม 500 มิลลิกรัมต่อวัน พบว่าเมื่อครบ 2 ปี ค่าฮีโมโกลบินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับค่าปกติ (14.3 เปอร์เซ็นต์,  $p < 0.1$ ) (Frisoli Jr. et al., 2005) การศึกษาผลของ ND ต่อค่าฮีโมโกลบินของการศึกษาที่กล่าวมาอาศัยระยะเวลาการติดตามผลนานถึง 2 ปี แต่การศึกษาผลของ nandrolone laurate ต่อค่าฮีโมโกลบินในครั้งนี้นำเวลาติดตามผลเพียง 12 สัปดาห์ ดังนั้นควรเพิ่มระยะเวลาในการติดตามผลของ nandrolone laurate ต่อค่าฮีโมโกลบิน รวมถึงค่าฮีมาโตคริตให้นานขึ้น เพื่อยืนยันผลของ nandrolone laurate ต่อค่าฮีโมโกลบิน และค่าฮีมาโตคริตที่แน่นอนได้

เมื่อนำจำนวนเม็ดเลือดแดง ค่าฮีโมโกลบิน และค่าฮีมาโตคริตมาคำนวณหาค่า mean corpuscular volume (MCV) ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยของปริมาณเม็ดเลือดแดงโดยตรง ค่า mean corpuscular hemoglobin (MCH) ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในค่าเฉลี่ยของเซลล์ทั้งหมด และค่า mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) ซึ่งเป็นค่าของฮีโมโกลบินที่คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ในมวลของเม็ดเลือดแดง พบว่าค่า MCH และ MCHC (ไม่ได้แสดงผล) ในสุนัขกลุ่มศึกษา และสุนัขกลุ่มควบคุม มีค่าอยู่ในช่วงปกติของสุนัข (MCH = 19.5 – 24.5 พิโคกรัม และ MCHC = 30 – 36 กรัมต่อเดซิลิตร) ส่วนค่า MCV (ไม่ได้แสดงผล) มีระดับสูงกว่าปกติของสุนัขในสัปดาห์ที่ 0 ซึ่งสามารถพบได้เป็นปกติในการเกิดภาวะโลหิตจางจากการสูญเสียเลือด (Bistner et al., 2000) และค่า MCV กลับไปมีค่าอยู่ในช่วงปกติของสุนัข (MCV = 60 – 77 เฟมโตลิตร) ในสัปดาห์ที่ 4, 8 และ 12 ต่อมา ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสุนัขทุกตัวที่ใช้ในการศึกษาผลของ nandrolone laurate ต่อการเชื่อมของกระดูกครั้งนี้ ไม่ได้อยู่ในภาวะโลหิตจาง จึงไม่สามารถใช้สุนัขเป็นตัวประเมินผลของ nandrolone laurate ต่อการแก้ไขภาวะโลหิตจางในสุนัขที่ดีได้ จากผลของ nandrolone laurate ต่อจำนวนเม็ดเลือดแดง ค่าฮีโมโกลบิน และค่าฮีมาโตคริตในครั้งนี้ ตามที่รายงานมาข้างต้น ควรทำการศึกษาผลของ nandrolone laurate ต่อการแก้ไขภาวะโลหิตจางในสุนัขที่อยู่ในภาวะโลหิตจางต่อไป และควรมีการติดตามผลของ nandrolone laurate ต่อการแก้ไขภาวะโลหิตจางในสุนัขในระหว่าง 4 สัปดาห์แรก และหลังได้รับ nandrolone laurate ที่มากกว่า 4 เดือนขึ้นไป เพื่อให้ได้ผลที่แน่นอนมากยิ่งขึ้น



## สรุปผลการวิจัย

1. Nandrolone laurate ขนาด 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว แต่ไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อตัวสุนัข ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ทุก 2 สัปดาห์ติดต่อกัน 3 ครั้ง มีประสิทธิภาพในการเร่งการเชื่อมกระดูกหักในสุนัขที่อายุมากกว่า 1 ปีขึ้นไป โดยมีผลเพิ่มการทำงานของเซลล์ osteoblast
2. Nandrolone laurate มีผลเพิ่มการทำงานของเซลล์ osteoblast ในการสร้างเนื้อกระดูกใหม่เพื่อเชื่อมกระดูกหักในสุนัข และเมื่อวัดระดับ OC และ BALP ซึ่งเป็นสารชีวเคมีที่สร้างจากกระดูกจากการทำงานของเซลล์ osteoblast ในภาวะกระดูกหัก พบว่าระดับ OC ในซีรัมเพิ่มสูงขึ้น และระดับ BALP ในซีรัมเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) จึงสามารถใช้ OC และ BALP เป็นพารามิเตอร์ในการประเมินผลของ nandrolone laurate ต่อการเชื่อมกระดูกของสุนัขได้
3. การได้รับ nandrolone laurate เสริมการรักษาในสุนัขที่มีภาวะกระดูกหัก และได้รับการแก้ไขด้วยการผ่าตัด ในขนาดและความถี่ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ตับ

## ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาผลของ nandrolone laurate ต่อการเชื่อมกระดูกหักของสุนัขในจำนวนสุนัขที่มากกว่านี้
2. ควรเพิ่มขนาดของแคลเซียมเสริมชนิดกิน ร่วมกับการได้รับ nandrolone laurate ในสุนัขที่อยู่ในภาวะกระดูกหัก
3. ควรทำการศึกษาผลของ nandrolone laurate ต่อการแก้ไขภาวะโลหิตจางในสุนัขที่อยู่ในภาวะโลหิตจาง และใช้เวลาในการศึกษาและติดตามผลมากกว่า 4 เดือน

## รายการอ้างอิง

- วรพัฒน์ ประชาศิลป์ชัย, เทพมนัส นุปผาอินทร์, มาริษศักดิ์ กัลป์ประวิทย์, มีนา สาริกะภูติ และ สุमितร ดุรงค์พงษ์วร. 2003 (2546). ระดับของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เฉพาะจากกระดูกในซี่รุ่มของสุนัขที่มีภาวะต่างของกระดูก. Thai. J. Vet. Med. 33(3) : 82-90.
- วรา พานิชเกรียงไกร, ศิรินทร หยิบโชคอนันต์ และ ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย. 2008 (2551). Nandrolone : การैया A to Z สำหรับสัตวแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ทิวทัศน์การพิมพ์. 299-300.
- Allen, M.J., Hoffmann, W.E., Richardson, D.C. and Breur, G.J. 1998. Serum markers of bone metabolism in dogs. Am. J. Vet. Res. 59(3) : 250-254.
- Allen, L.C.V., Allen, M.J., Breur, G.J., Hoffmann, W.E. and Richardson, D.C. 2000. A comparison of two techniques for the determination of serum bone-specific alkaline phosphatase activity in dogs. Res. Vet. Sci. 68 : 231-235.
- Allen, M.J. 2003. Biochemical markers of bone metabolism in animals : Uses and limitations. An invited review. Vet. Clin. Patho. 32(3) : 101-113.
- Bassiouni, H.M., Zaki, K. and Kaiser, E. 1993. Electrophoretic separation of alkaline phosphatase isoenzymes in synovial fluid and serum from patients with rheumatoid arthritis. Clin. Rheumatol. 12(2) : 166-169.
- Behr, W. and Barnert, J. 1986. Quantification of bone alkaline phosphatase in serum by precipitation with Wheat-Germ lectin : A simplified method and its clinical plausibility. Clin. Chem. 32(10) : 1960-1966.
- Bistner, S.I, Ford, R.B. and Raffae, M.R. 2000. Interpretation of laboratory tests. In Kirk and Bistner' s handbook of veterinary procedures and emergency treatment. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia : Saunders. 627-786.
- Bouillon, R., Vanderschueren, D., Herck, E.V., Nielsen, H.K., Bex, M., Heyns, W. and Baelen, H.V. 1992. Homologous radioimmunoassay of human osteocalcin. Clin. Chem. 38(10) : 2055-2060.

- Bowles, S.A., Kurdy, N., Davis, A.M., France, M.W. and Marsh, D.R. 1996. Serum osteocalcin, total and bone-specific alkaline phosphatase following isolated tibial shaft fracture. *Ann. Clin. Biochem.* 33 : 196-200.
- Breur, G.J., Allen, M.J., Carlson, S.J. and Richardson, D.C. 2004. Markers of bone metabolism in dog breeds of different size. *Res. Vet. Sci.* 76 : 53-55.
- Daiber, A., Hervé, L., Con, I. and Donoso, A. 2009. "Treatment of aplastic anemia with nandrolone decanoate." *Blood.* 36(6) : 748-753. [online]. Available : <http://www.bloodjournal.org> Repeated by Chulalongkorn Univ. Lib. [2009, May 10]
- DeLaurier, A., Jackson, B., Ingham, K., Pfeiffer, D., Horton M.A. and Price, J.S. 2002. Biochemical markers of bone turnover in the domestic cat : Relationships with age and feline osteoclastic resorptive lesions. *American Society for Nutritional Sciences. J. Nutr.* 132 : 1742s-1744s.
- Delmas, P.D., Eastell, R., Garnero, P. Seibel, M.J. and Stepan, J. 2000. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Osteoporos. Int. Suppl.* 6 : S2 – 17.
- Einhorn, T.A. 2005. The science of fracture healing. *J. Orthop Trauma.* 19(10) supplement : S4-S6.
- Farley J.R., Hall, S.L., Herring, S. Libanati, C. and Wergedal, J.E. 1993. Reference standards for quantification of skeletal alkaline phosphatase activity in serum by heat inactivation and lectin precipitation. *Clin. Chem.* 39(9) : 1878-1884.
- Fossum, T.W., Hedlund, C.S., Hulse, D.A., Johnson, A.L., Seim III, H.B., Willard, M.D. and Carroll, G.L. 2002. Fundamentals of orthopedic surgery and fracture management. In *Small Animal Surgery.* 3<sup>rd</sup>ed. Missouri : Mosby. 831-839.

- Frisoli Jr., A., Chaves, P.H.M., Pinheiro, M.M. and Szejnfeld, V.L. 2005. The Effect of Nandrolone Decanoate on Bone Mineral Density, Muscle Mass, and Hemoglobin Levels in Elderly Women With Osteoporosis: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. (abstract). *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 60 (5) : 648-653.
- Gebhardt, A. and Pancherz. 2003. The effect of anabolic steroids on mandibular growth. *Am. J. Orthod. Dent. Orthop.* 123 : 435-40.
- Gennari, C., Agnusdei, D., Gonnelli, S. and Nardi, P. 1989. Effects of nandrolone decanoate therapy on bone mass and calcium metabolism in woman with established post-menopausal osteoporosis : a double-blind placebo-controlled study. (abstract). *Maturitas.* 11(3) : 187-97.
- Hamdy, R.C., Moore, S.W., Whalen, K.E. and Landy, C. 1998. Nandrolone decanoate for men with osteoporosis. *Am. J. Ther.* 5(2) : 89-95.
- Hosoda, K., Eguchi, H., Nakamoto, T., Kubota, T., Honda, H., Jindai, S., Hasegawa, R., Kiyoki, M., Yamaji, T. and Shiraki, M. 1992. Sandwich immunoassay for intact human osteocalcin. *Clin. Chem.* 38(11) : 2233-2238.
- Hulth, A. 1989. Current concepts of fracture healing : Section III Basic science and pathology. *Clin. Orthop. And related Res.* 249 : 265-284.
- Hyypä, S. 2000. Effects of nandrolone treatment on recovery in horses after strenuous physical exercise. *J. Vet. Med.* 48 : 343-352.
- Joerring, S., Jensen, L.T., Andersen, G.R. and Johansen, J.S. 1992. Type I and III procollagen extension peptide in serum respond to fracture in humans. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 111 : 265-267.
- Johnson, K.A. and Watson, A.D.J. 2005. Skeletal diseases. In *Textbook of veterinary internal medicine. Diseases of the dog and cat.* 6<sup>th</sup> ed. Ettinger, S.J. and Feldman, E.C. (eds). Missouri : Saunders. 1965-1991.
- Kalfas, I.H. 2001. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus.* 10(4) : 1-4.

- Komnenou, A., Karayannopoulou, M., Polizopoulou, Z.S., Constantinidis, T.C. and Dessiris, A. 2005. Correlation of serum alkaline phosphatase activity with the healing process of long bone fractures in dogs. *Vet. Clin. Pathol.* 34(1) : 35-8.
- Ladlow, J.F., Hoffmann, W.E., Breur, G.J., Richardson, D.C. and Allen, M.J. 2002. Biological variability in serum and urinary indices of bone formation and resorption in dogs. *Calcif. Tissue Int.* 70 : 186-193.
- Lee, A.J., Hodges, S. and Eastell, R. 2000. A review article : Measurement of osteocalcin. *Ann. Clin. Biochem.* 37 : 432-446.
- Lepage, O.M., Marcoux, M. and Tremblay, A. 1990. Serum osteocalcin or bone Gla-protein, a biochemical marker for bone metabolism in horses : Differences in serum levels with age. *Can. J. Vet. Res.* 54 : 223-226.
- Lepage, O.M., DesCôteaux, L., Marcoux, M. and Tremblay, A. 1991. Circadian rhythms of osteocalcin in Equine serum. Correlation with alkaline phosphatase, calcium, phosphate and total protein levels. *Can. J. Vet. Res.* 55 : 5-10.
- Leung, K.S., Fung, K.P., Sher, A.H.L., Li, C.K. and Lee, K.M. 1993. Plasma bone-specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. *J Bone Joint Surg [Br]*. 75 : 288-92.
- Li, X., Takahashi, M., Kushida, K., Shimizu, S., Hoshino, H., Suzuki, M. and Inoue, T. 2000. The effects of nandrolone decanoate on bone mass and metabolism in ovariectomized rats with osteopenia. *J. Bone Miner Metab.* 18 : 258-263.
- Liesegang, A., Reutter, R., Sassi, M.L., Risteli, J., Kraenzlin, M., Riond, J.L. and Wanner, M. 1999. Diurnal variation in concentrations of various markers of bone metabolism in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 60 : 949-953.
- Master, P.W., Jones, R.G., Purves, D.A., Cooper, E.H. and Cooney, J.M. 1994. Commercial assays for serum osteocalcin give clinically discordant results. *Clin. Chem.* 40(3) : 385-363.

- McKibbin, B. 1978. The biology of fracture healing in long bones. *The J of Bone and Joint Surg.* 60-B(2) : 150-162
- Mohamadnia, A. R., Shahbazkia, H. R., Sharifi, S. and Shafaei, I. 2007. Bone-specific alkaline phosphatase as a good indicator of bone formation in sheepdogs. *Comp. Clin. Pathol.* : DOI 10.1007/s00580-007-0692-0, Springer-Verlag London Limited. : 1-6.
- Monaghan, D.A., Power, M.J. and Fottrell, P.F. 1993. Sandwich enzyme immunoassay of osteocalcin in serum with use of an antibody against human osteocalcin. *Clin. Chem.* 39(6) : 942-947.
- Moss, D.W. 1982. Alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin. Chem.* 28(10) : 2007-2016.
- Nandrolone and testosterone hormone structure. [online]. Available : <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/nandrolone/nandv.htm>. Repeated [2010, Apr 7]
- Noda, K., Chang, H.P., Takahashi, I., Kinoshita, Z. and Kawamoto, T. 1994. Effects of the anabolic steroid nandrolone phenylpropionate on craniofacial growth in rats. *J. Morphol.* 220(1) : 25-33.
- Obrant, K.J., Merle, B., Bejui, J. and Delmas, P.D. 1990. Serum bone-Gla protein after fracture. *Clin. Orthop. and related Res.* 258 : 300-303
- Paskalev, M., Krastev, S. and Filipov, J. 2005. "Changes in some serum bone markers after experimental fracture and intramedullary osteosynthesis in dogs." *Trakia J. Sci.* 3(5) : 46-50. [online]. Available : <http://www.uni-sz.bg>. Repeated [2008, Jan 3]
- Passeri, M., Pedrazzoni, M., Pioli, G., Butturini, L., Ruys, A.H. and Cortenraad, M.G. 1993. Effects of nandrolone decanoate on bone mass in established osteoporosis. (abstract). *Maturitas.* 17(3) : 211-9.
- Plumb, D.C., 2005. Nandrolone decanoate. In *Plumb's Veterinary Drug Handbook*. 5<sup>th</sup> ed. Iowa : Blackwell publishing professional. 550-551.

- Polak-Jonkisz, D. and Zwolinska, D. 1998. A review article: Osteocalcin as a biochemical marker of bone turnover. *Nephrol.* 4 : 339-346.
- Sanecki, R.K., Hoffmann, W.E., Hansen, R. and Schaeffer, D.J. 1993. Quantification of bone alkaline phosphatase in canine serum. *Vet. Clin. Pathol.* 22(1) : 17-23.
- Thrall, D.E. 2002. Fracture healing and complications. *Text book of Veterinary Diagnostic Radiology.* 4<sup>th</sup> ed. Pennsylvania, The United State of America. 161-178.
- Wang, S.P., Demarest, K.T., Gunnet, J.W., Baylink, D.J. and William Lau, K.H. 1994. Development of a heterologous radioimmunoassay for canine osteocalcin. *Calcif. Tissue Int.* 55 : 134-140.
- Watts, N.B. 1999. Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. *Clin. Chem.* 45(8) : 1359-1368.

ภาคผนวก



## ภาคผนวก ก

ตารางที่ 1 ระดับ BALP ในซีรัมของสุนัขกระดูกหักกลุ่มควบคุม และกลุ่มศึกษาก่อนและหลังได้รับ nandrolone laurate

สัปดาห์ที่ทำการศึกษา	ค่าเฉลี่ยของระดับ BALP ในซีรัม (ยูนิตต่อลิตร) †	
	กลุ่มควบคุม (n=8)	กลุ่มศึกษา (n=8)
0	28.89 ± 4.25	35.42 ± 4.98
1	62.34 ± 10.17*	74.40 ± 12.86*
2	35.73 ± 5.99	40.73 ± 7.01
4	39.05 ± 6.09	64.19 ± 21.21
8	35.24 ± 4.20	55.62 ± 10.73 <sup>#</sup>
12	40.86 ± 7.01	63.55 ± 23.81 <sup>*,#</sup>

† ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

\*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ  $P < 0.05$  เมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 0 ของกลุ่มเดียวกัน

# แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ  $P < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ณ เวลาเดียวกัน

## ภาคผนวก ข

ตารางที่ 2 ระดับ OC ในซีรัมของสุนัขกระตูกหักกลุ่มควบคุม และกลุ่มศึกษาก่อนและหลังได้รับ nandrolone laurate

สัปดาห์ที่ทำการศึกษา	ค่าเฉลี่ยของระดับ OC ในซีรัม (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) <sup>†</sup>	
	กลุ่มควบคุม (n=8)	กลุ่มศึกษา (n=8)
0	4.43 ± 1.57	5.01 ± 1.48
1	5.46 ± 2.81	7.82 ± 2.68
2	4.49 ± 1.81	5.71 ± 2.26
4	4.24 ± 1.59	6.68 ± 2.22
8	4.09 ± 1.85	5.99 ± 1.53
12	3.10 ± 1.55	5.71 ± 1.71

<sup>†</sup> ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

## ภาคผนวก ค

ตารางที่ 3 ระดับ alanine transaminase (ALT) และ alkaline phosphatase (ALP) ของสุนัขกระดูกหักกลุ่มควบคุม และกลุ่มศึกษาในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 8 ของการศึกษา

สัปดาห์ที่ ทำการศึกษา	ค่าเฉลี่ยค่าเคมีโลหิตของสุนัขกระดูกหัก <sup>†</sup>			
	กลุ่มควบคุม (n = 8)		กลุ่มศึกษา (n = 8)	
	ALT (unit)	ALP (unit)	ALT (unit)	ALP (unit)
สัปดาห์ที่ 0	63.57 ± 22.47	138.28 ± 48.89	39.14 ± 14.79	145.57 ± 55.03
สัปดาห์ที่ 8	46.71 ± 16.51	65.57 ± 23.18*	37.80 ± 16.90	49.60 ± 22.18*

<sup>†</sup> ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

\*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ  $P < 0.05$  เมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ยเริ่มต้นในสัปดาห์ที่ 0 ของกลุ่มเดียวกัน

ภาคผนวก ง

ตารางที่ 4 จำนวนเม็ดเลือดแดง ค่าฮีโมโกลบิน และค่าฮีมาโตคริตของสุนัขกระดูกกลุ่มควบคุม และกลุ่มศึกษาในสัปดาห์ที่ 0-12 ของการศึกษา

สัปดาห์ที่	สุนัขกลุ่มควบคุม (n = 8)			สุนัขกลุ่มศึกษา (n = 8)		
	RBC <sup>†</sup> (x10 <sup>6</sup> cells/mm <sup>3</sup> )	Hemoglobin <sup>†</sup> (g/dl)	Haematocrit <sup>†</sup> (%)	RBC <sup>†</sup> (x10 <sup>6</sup> cells/mm <sup>3</sup> )	Hemoglobin <sup>†</sup> (g/dl)	Haematocrit <sup>†</sup> (%)
0	6.17±2.18	16.60±5.86	51.06±18.05	5.30±2.01 <sup>#</sup>	13.14±4.96 <sup>#</sup>	43.71±16.52
4	7.53±2.66 <sup>*</sup>	15.61±5.52	46.75±16.53	6.46±2.88 <sup>*#</sup>	12.80±5.72 <sup>#</sup>	38.20±17.08 <sup>#</sup>
8	8.03±3.28 <sup>*</sup>	15.90±6.49	49.16±20.07	6.70±2.73 <sup>*#</sup>	14.26±5.82	41.00±16.74 <sup>#</sup>
12	6.86±2.80	14.10±5.75	42.00±17.01 <sup>*</sup>	7.30±2.98 <sup>*</sup>	15.08±6.15	45.66±18.64

<sup>†</sup> ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

<sup>\*</sup> แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ P<0.05 เมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 0 ของกลุ่มเดียวกัน

<sup>#</sup> แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ P<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ณ เวลาเดียวกัน

## ภาคผนวก จ

### ดัชนีวัดเม็ดโลหิตแดง (red blood cell indices)

1. ค่าเฉลี่ยของปริมาณเม็ดเลือดแดงโดยตรง (mean corpuscular volume, MCV)
2. ค่าเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในค่าเฉลี่ยของเซลล์ทั้งหมด  
(mean corpuscular hemoglobin, MCH)
3. ค่าของฮีโมโกลบินที่คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ในมวลของเม็ดเลือดแดง  
(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)

### การคำนวณดัชนี MCV, MCH และ MCHC

$$\begin{aligned} \text{MCV (femtoliters, fL)} &= \frac{\text{PCV in mL/10 mL}}{\text{RBC count (10}^6\text{/}\mu\text{L)}} \\ \text{MCH (picograms, pg)} &= \frac{\text{Hb in g/dL} \times 10}{\text{RBC count (10}^6\text{/}\mu\text{L)}} \\ \text{MCHC (grams per deciliter, g/dL)} &= \frac{\text{Hb in g/dL} \times 100}{\text{PCV}} \end{aligned}$$

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายภาคภูมิ อาษา เกิดเมื่อวันที่ 26 สิงหาคม พ.ศ.2524 ที่จังหวัดเชียงราย

- สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาจากโรงเรียนมงฟอร์ตวิทยาลัย อ.เมือง จ.เชียงใหม่

ปีการศึกษา 2542

- สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2548

- ศึกษาต่อในระดับมหาบัณฑิตหลักสูตรเภสัชวิทยาทางสัตวแพทย์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 ถึง 2552