



การประเมินภาวะไตเสียหายในสุนัขด้วยตัวบ่งชี้ทางชีวภาพชนิด Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)

ธนากร วัฒนพรภิรมย์¹ เฉลิมพล เล็กเจริญสุข^{1,*} และชยกฤต สินธุสิงห์^{1,†}

¹ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ถนนงามวงศ์วาน

เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

บทคัดย่อ: ภาวะไตเสียหายเฉียบพลันทำให้มีความเสี่ยงในการตายที่เพิ่มขึ้นในสุนัข เนื่องจากการวินิจฉัยทางคลินิกด้วยค่ายูเรียในเลือดและซีรัมครีเอตินินไม่อาจบ่งชี้ถึงการสูญเสียหน้าที่ของไต และความเสียหายของโครงสร้างของไตในระยะแรกได้ ด้วยเหตุผลนี้การตรวจหาการบาดเจ็บที่ไตในระยะแรกด้วยตัวบ่งชี้ทางชีวภาพจึงมีความสำคัญต่อการวินิจฉัย เพื่อให้การรักษาโรคกระทำได้อย่างรวดเร็ว งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้ตัวบ่งชี้ Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่เกิดขึ้นเมื่อเซลล์ท่อไตเกิดการบาดเจ็บในการบ่งชี้ภาวะไตเสียหายเฉียบพลันและการประเมินโรคไตในสุนัข โดยการจัดกลุ่มศึกษาอ้างอิงตามเกณฑ์ของ IRIS AKI ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ สุนัขปกติอายุ 1-7 ปี จากการตรวจร่างกาย ค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมี และการตรวจปัสสาวะไม่พบความผิดปกติ กลุ่มที่ 2 คือสุนัขที่มีรอยโรคที่ไตแต่มีครีเอตินินปกติ (IRIS AKI ปี 2013 ระดับ I มีครีเอตินินในเลือด ≤ 1.6 มก./ดล.) และกลุ่มที่ 3 คือสุนัขที่มีภาวะไตวายและมีค่าครีเอตินินผิดปกติ (IRIS AKI ระดับ II-V โดยครีเอตินินในเลือด > 1.6 มก./ดล.) เก็บตัวอย่างซีรัมและปัสสาวะในแต่ละกลุ่มเพื่อตรวจระดับ NGAL (sNGAL และ uNGAL ตามลำดับ) ด้วยชุดทดสอบ Dog NGAL ELISA KIT (BIOPORTO®, Denmark) ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มสุนัขที่มีรอยโรคที่ไตแต่มีค่าครีเอตินินปกติมีค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL มากกว่าสุนัขปกติ อาจเป็นไปได้ว่าสุนัขที่มีรอยโรคที่ไตแต่มีค่าครีเอตินินปกติเกิดความเสียหายกับไตมากกว่าสุนัขปกติทำให้ค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL มีค่ามากกว่าสุนัขปกติ ดังนั้น sNGAL สามารถบ่งชี้ภาวะไตเสียหายได้ดีกว่าครีเอตินิน นอกจากนั้นค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL ในสุนัขที่มีรอยโรคที่ไตแต่มีครีเอตินินปกติมีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อไตเกิดความเสียหายมากขึ้นในสุนัขที่มีภาวะไตวายที่มี ครีเอตินินผิดปกติ จะพบการเปลี่ยนแปลงของค่าเฉลี่ย uNGAL มากกว่า sNGAL อย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่มสุนัขปกติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า uNGAL อาจสามารถใช้บ่งชี้ภาวะไตเสียหายเฉียบพลันได้ดีกว่า sNGAL ดังนั้นการตรวจระดับ NGAL จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการวินิจฉัยเพื่อบ่งชี้ภาวะไตเสียหายเฉียบพลันในสุนัข โดยทำให้ทราบระดับที่ไตเสียหาย การพยากรณ์โรคและติดตามผลการรักษาได้

คำสำคัญ: ภาวะไตเสียหาย ภาวะไตเสียหายเฉียบพลัน ตัวบ่งชี้ในสุนัข Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) สุนัข

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ; ^{*}ผู้รับผิดชอบบทความร่วม

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2560. 12(2): 79-89.

E-mail address: [#]chameow54@yahoo.com; ^{*}fvetcpl@ku.ac.th

The Detection of Kidney Injury in Dogs by Biomarker: Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)

Tanakorn Wattanapornpilom¹, Chalernpol Lekcharoensuk^{1,Ψ}, and Chayakirt Sinthusingha^{1,#}

¹Department of Companion Animal Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Ngam Wong Wan road, Chatuchak district, Bangkok 10900

Abstract: Acute kidney injury commonly causes the high risk of death in dogs because the clinical investigation by blood urea nitrogen and creatinine has failed to identify early stages of kidney dysfunction and structural injury. By this reason, there is important to use the biomarker for diagnosis of early kidney injury and immediate treatment. The objective of this research was to investigate the application of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) canine biomarker, a protein that is increasing when renal tubular cells damage resulted for the acute kidney injury and kidney diseases in dogs. The studied dogs were classified into three groups according to canine IRIS guidelines for grading AKI. Group 1 was defined as 1-7 years-old dogs without clinical or laboratory signs of AKI. Group 2 was defined as dogs with kidney injuries and normal creatinine values (IRIS AKI, 2013, grade I with serum creatinine ≤ 1.6 mg/dl). Group 3 was defined as renal failure dogs with elevated serum creatinine (IRIS AKI grade II-V with serum creatinine > 1.6 mg/dl). Serum and urine samples were taken for NGAL evaluation (sNGAL and uNGAL, respectively) with Dog NGAL ELISA kit (BIOPORTO[®], Denmark). The results found that the means of sNGAL and uNGAL in the dogs with kidney injuries and normal creatinine values were higher than normal dogs. It seems that the renal damages in the dogs with kidney injuries and normal creatinine values were severe than normal dogs. In this result, sNGAL could be effective to predict the acute renal injury better than creatinine level. Furthermore, the means of sNGAL and uNGAL were similar in the dogs with kidney injuries and normal creatinine values. Likewise, the level of uNGAL was increased more rapidly than the sNGAL level in dogs with renal failure and elevated serum creatinine compared to normal dogs. This indicated that uNGAL was better than sNGAL for evaluation of acute renal injury. This study showed that NGAL may serve as the marker for prediction of kidney injury, detection of different kidney diseases and evaluation of treatment outcome in dogs.

Keywords: Kidney injury, Acute kidney injury, Canine biomarker, Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL), Dogs

#Corresponding author; ΨCo-corresponding author *J. Mahanakorn Vet. Med.* 2017. 12(2): 79-89.

E-mail address: #chameow54@yahoo.com; Ψfvetcpl@ku.ac.th

บทนำ

Acute kidney injury (AKI) หมายถึง ภาวะที่ไตสูญเสียหน้าที่อย่างเฉียบพลันอันอาจเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงหน้าที่หรือโครงสร้างของไต ภาวะไตเสียหายเฉียบพลันในสุนัขนั้นจะเกิดความเสียหายที่ไตซึ่งไม่พบอาการที่เด่นชัด (Langston, 2010) การเกิดภาวะไตเสียหายเฉียบพลันเกิดขึ้นจากสาเหตุหลายประการ ได้แก่ การขาดเลือด โรคติดเชื้อ การได้รับยาหรือสารพิษ และดื่มน้ำจืดมากเกินไป (Linda, 2011) โดยจะพบอาการเมื่อไตเสียหายจนส่งผลต่อการขับของเสียออกจากร่างกาย เกิดปัญหาการดำรงดุลอิเล็กโทรไลต์ และฮอร์โมนในร่างกาย (Cowgill and Langston, 2010) การวินิจฉัยทางคลินิกและผลตรวจทางห้องปฏิบัติการไม่อาจบอกความเสียหายของไตในระยะเฉียบพลันได้ เนื่องจากข้อจำกัดบางประการ เช่น ค่ายูเรียและครีเอตินินจะสูงขึ้นเมื่อหน่วยไตทำงานลดลงมากกว่าร้อยละ 70 ขึ้นไป ดังนั้นค่าทั้งสองนี้จึงมีความไวไม่เพียงพอที่จะบ่งชี้ว่าไตทำงานผิดปกติระยะแรกได้ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆที่รบกวนการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของค่ายูเรียและครีเอตินิน เช่น สัตว์ที่ได้รับโปรตีนต่ำจะมีค่ายูเรียลดลง สัตว์ที่มีมวลกล้ามเนื้อมากและออกกำลังกายมากจะพบค่าครีเอตินินสูงขึ้น เป็นต้น (Mori *et al.*, 2007) ด้วยเหตุนี้ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพอาจใช้เป็นทางเลือกในการบ่งชี้ความเสียหายของไตในระยะแรกได้ จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาถึงตัวบ่งชี้ทางชีวภาพชนิด Neutrophil Gelatinase - Associated Lipocalin (NGAL) ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่สามารถพบได้ในเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล ไต ตับ และเนื้อเยื่อเพื่อตอบสนองต่อการเกิดพยาธิสภาพ เช่น การอักเสบ ติดเชื้อ การขาดเลือด เนื้องอก และได้รับสารพิษ เพื่อใช้ NGAL ในการ

วินิจฉัยโรคไต (Mori and Nakao, 2007) ในภาวะปกติ NGAL จะถูกพบในระดับต่ำ (Schmidt-Ott *et al.*, 2006; Devarajan, 2010) แต่หากเซลล์ท่อไตส่วนต้นเกิดการบาดเจ็บ จะพบ NGAL มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์ท่อไตส่วนต้นไม่อาจดูด NGAL กลับได้ (Mori and Nakao, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการศึกษาถึงการใช้น้ำ NGAL เป็นตัวบ่งชี้ในสุนัขที่ไตวายเรื้อรัง (Cobrin *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012; Nabity *et al.*, 2012; Kai *et al.*, 2013) และ NGAL ยังเป็นตัวบ่งชี้ที่มีความไวในการศึกษาสุนัขที่เกิดไตวายเฉียบพลันภายหลังได้รับการศัลยกรรมและหลังจากได้รับ gentamicin (Lee *et al.*, 2012; Kai *et al.*, 2013) การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการใช้น้ำ NGAL ในการวินิจฉัยภาวะไตเสียหายในสุนัขที่เข้ารับการรักษาในทางคลินิก และใช้น้ำ NGAL บ่งชี้ความเสียหายของไตก่อนที่จะเข้าสู่ภาวะไตวาย

อุปกรณ์และวิธีการ

สุนัขกลุ่มตัวอย่าง

สุนัข 30 ตัวที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ ถูกแบ่งเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ สุนัขปกติจำนวน 10 ตัว ประกอบด้วยเพศผู้จำนวน 7 ตัวและเพศเมียจำนวน 3 ตัว โดยมีค่าเฉลี่ยอายุเท่ากับ 5.3 ปี (2-6 ปี) สุนัขในกลุ่มนี้ทุกตัวจะไม่พบความผิดปกติจากการซักประวัติ การตรวจร่างกาย ผลการตรวจค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมีโลหิต และผลการตรวจปัสสาวะ กลุ่มที่ 2 คือ สุนัขที่มีรอยโรคที่โครงสร้างไต เช่น พบถุงน้ำหรือเนื้องอกที่ไต แต่มีค่าครีเอตินินในเลือดปกติ (ตามเกณฑ์ของ IRIS AKI ปี 2013 ระดับ I มีครีเอตินินในเลือด ≤ 1.6 มก./ดล.) จำนวน 10 ตัว ประกอบด้วยเพศผู้จำนวน

5 ตัว และเพศเมียจำนวน 5 ตัว มีอายุเฉลี่ย 10.6 ปี (5.4-15.5 ปี) และกลุ่มที่ 3 คือ สุนัขที่มีภาวะไตวาย และมีครีเอตินีนผิดปกติ (IRIS AKI ระดับ II-V โดยครีเอตินีนมีค่า >1.6 มก./ ดล.) จำนวน 10 ตัว ประกอบด้วยเพศผู้จำนวน 3 ตัว และเพศเมียจำนวน 7 ตัว มีอายุเฉลี่ย 10.75 ปี (4-15.7 ปี) พันธุ์สุนัขที่ศึกษาในการทดลองนี้คือ พันธุ์ผสม (13 ตัว) ตามมาด้วยพันธุ์ชิสุห์ และพูตเดิล (อย่างละ 4 ตัว) แลบริดอร์รีทรีฟเวอร์ (3 ตัว) โกลเดนรีทรีฟเวอร์ (2 ตัว) ร็อตไวเลอร์ (2 ตัว) และไซบีเรียนฮัสกี (2 ตัว) ซึ่งสุนัขทุกตัวจะถูกชักประวัติจากเจ้าของ และบันทึกข้อมูลพื้นฐาน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเลือด ปริมาณ 5 มิลลิลิตร โดยแบ่งใส่หลอดผสมสารป้องกัน การแข็งตัวของเลือด EDTA ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปตรวจค่าทางโลหิตวิทยาซึ่งรวมถึงค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit (%)) และเก็บในหลอดเก็บซีรัม ปริมาณ 4 มิลลิลิตร แยกซีรัมด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ยี่ห้อ Hettich รุ่น EBA-20 ด้วยความเร็ว 3,500 รอบ ต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 นาที เพื่อนำไปตรวจค่าเคมี โลหิต ได้แก่ ซีรัมยูเรีย (Blood Urea Nitrogen (BUN)) ซีรัมครีเอตินีน เอนไซม์ ALT (Alanine Aminotransferase) โพรตีนอัลบูมิน และฟอสฟอรัส การเก็บตัวอย่างปัสสาวะทำโดยการรองเก็บ สวน หรือเจาะเก็บผ่านทางหน้าท้อง ปริมาณ 3-5 มิลลิลิตร สำหรับตัวอย่างปัสสาวะทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัดกากเซลล์และวิเคราะห์ค่าความถ่วงจำเพาะ (Urine specific gravity; USG) จากนั้นทำการเก็บรักษา ตัวอย่างทั้งหมดที่จะวิเคราะห์ NGAL ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ภายใน 4 ชั่วโมงหลังจากที่ทำการเก็บ ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างเลือดและปัสสาวะทั้งหมดจะถูกนำไปตรวจระดับ NGAL ด้วยชุดทดสอบ Dog NGAL

ELISA KIT (BIOPORTO®, Denmark) ใน เวลาเดียวกันทั้งหมด

การตรวจด้วยชุดทดสอบ NGAL ELISA

ทำการตรวจค่า NGAL จากเลือด (sNGAL) และ NGAL จากปัสสาวะ (uNGAL) ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป NGAL ELISA ด้วยหลักการของ sandwich ELISA ตามคู่มือของชุดทดสอบ ซึ่งประกอบด้วย 5 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ 1. นำตัวอย่างและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ทดลองเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (20-25 องศาเซลเซียส) เจือจางตัวอย่างเลือดและปัสสาวะที่ 1 ต่อ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำตัวอย่างที่ทดสอบ ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมทดสอบที่เคลือบด้วย monoclonal antibody ซึ่งจะทำหน้าที่จับกับ NGAL 2. ใส่ biotinylated monoclonal detection antibody ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมทดสอบและตั้งไว้บนเครื่องเขย่าสารวอร์บ 200 ครั้ง ต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที สารนี้จะทำหน้าที่เกาะกับ NGAL 3. เติมน้ำ horseradish peroxidase-conjugated streptavidin ปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงในหลุมทดสอบ และตั้งไว้บนเครื่องเขย่าสารที่ตั้งค่าไว้ 200 ครั้ง ต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาทีเพื่อให้จับกับ biotinylated monoclonal detection antibody ที่เกาะกลุ่ม 4. ทำการล้างส่วนที่ไม่เกาะกลุ่มด้วย 0.01% (w/v) Bronidox (5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane) pH Neutral ซึ่งเป็นสารละลายล้างที่ถูกเจือจางแล้ว 5. เติมน้ำ tetramethylbenzidine (TMB) ปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงในหลุมทดสอบ จับเวลาเมื่อเติมน้ำ หลุมแรก ปิดปากหลุม และเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ในส่วนที่เกิดการเกาะกลุ่มจาก ขั้นตอนข้างต้นจะทำปฏิกิริยากับ TMB จนเกิดสีน้ำเงินขึ้น หลังจากนั้นเติมน้ำ sulfuric acid 0.5 mol/L

pH 0.6 ปริมาณ 100 ไมโครลิตรเพื่อหยุดปฏิกิริยา ซึ่งสารในหลุมทดสอบจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง หลังจากนั้นทำการอ่านค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA reader (TECAN sunrise) ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 450 นาโนเมตร ซึ่งเป็นการบอกความเข้มข้นของ NGAL ที่วัดได้ในแต่ละหลุมทดสอบโดยเทียบค่ากับกราฟมาตรฐาน

การวิเคราะห์ผล

อายุและเพศของสุนัขถูกเปรียบเทียบในแต่ละกลุ่มด้วย Chi-square test และทำการประมวลผลทางสถิติด้วย ANOVA โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ uNGAL และ sNGAL ของสุนัขทั้งสามกลุ่ม หากค่า *p-value* มีความ

แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ วิธี Tukey post-hoc comparison จะถูกใช้ในการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม ความสัมพันธ์ระหว่าง uNGAL และ sNGAL จะวิเคราะห์ด้วยวิธี Pearson correlation โดยที่ *p-value* < 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ผลศึกษาสุนัขทั้ง 3 กลุ่มพบว่าไม่มีความแตกต่างของพันธุ์และเพศของสุนัขในแต่ละกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ (*p-value*=0.11 และ 0.20 ตามลำดับ) ดังที่แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยพื้นฐานทางคลินิกของ 3 กลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษาในสุนัขที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน จำนวน 30 ตัว ได้แก่ สุนัขปกติ สุนัขที่มีรอยโรคที่ไตแต่มีค่าครีเอตินินอยู่ในระดับปกติ และสุนัขที่มีภาวะไตวายและมีค่าครีเอตินินอยู่ในระดับผิดปกติ

ตัวแปร	สุนัขปกติ	สุนัขที่มีรอยโรคที่ไตที่พบค่าครีเอตินินอยู่ในระดับปกติ	สุนัขที่มีภาวะไตวายที่พบค่าครีเอตินินผิดปกติ	<i>p-value</i>
จำนวน (ตัว)	10	10	10	
อายุ (ปี)	5.28 ^a ±3.491	10.63 ^b ±3.518	10.75 ^b ±3.439	0.0018
(min-max)	(2-6)	(5.4-15.5)	(4-15.67)	
เพศ				
ผู้	7	5	3	0.2019
เมีย	3	5	7	
พันธุ์				
โกลเดนรีทรีฟเวอร์	2	0	0	0.1111
ชิสุห์	0	3	1	
พันธุ์ผสม	5	4	4	
แลบราดอร์รีทรีฟเวอร์	2	0	1	
พุดเดิล	0	3	1	
ร็อตไวเลอร์	0	0	2	
ไซบีเรียนฮัสกี	1	0	1	

จากตารางที่ 2 พบว่าค่ายูเรียในเลือดของสุนัขที่มีภาวะไตวายที่มีค่าครีเอตินินผิดปกติมีค่าแตกต่างจากกลุ่มสุนัขปกติ และกลุ่มสุนัขที่มีรอยโรคที่ไต แต่พบค่าครีเอตินินปกติอย่างมีนัยสำคัญ (p -value <0.001) เช่นเดียวกับค่าครีเอตินินที่พบในสุนัขที่มีภาวะไตวายและมีค่าครีเอตินินผิดปกติมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p -value <0.001) จากทั้งสองกลุ่ม ส่วนผลการวิเคราะห์ค่าโปรตีนอัลบูมินที่ตรวจได้จากสุนัขปกติแตกต่างจากสุนัขที่มีภาวะไตวายและมีค่าครีเอตินินผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value =0.0018) นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ ALT (Alanine transferase) โปรตีนรวม (total protein) ฟอสฟอรัส (phosphorus) เม็ดเลือดขาว (WBC) เกล็ดเลือด (platelets) โปรตีนในพลาสมา (plasma protein) และค่ากรดต่างของปัสสาวะ (urine pH) จากทั้งสามกลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนค่าความถ่วงจำเพาะของปัสสาวะ (USG) ของสุนัขในกลุ่มที่มีภาวะไตวายและมีค่า

ครีเอตินินผิดปกติมีค่าแตกต่างจากทั้งสองกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ (p -value =0.005) ส่วนค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของกลุ่มสุนัขปกติมีค่าแตกต่างจากทั้งสองกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ (p -value <0.001)

ตารางที่ 3 แสดงค่าการวิเคราะห์ทางสถิติของค่า sNGAL และ uNGAL ของสุนัขทั้งสามกลุ่มด้วยโปรแกรม NCSS 2007 [Hintza, J (2007). NCSS, LLC. Kaysville, Utah, www.NCSS.com] เมื่อทำการทดสอบด้วย Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test พบว่าทั้ง sNGAL และ uNGAL ที่ตรวจได้จากสุนัขปกติและจากสุนัขที่มีภาวะไตวายโดยมีค่าครีเอตินินผิดปกติมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ค่าเฉลี่ยของทั้ง sNGAL และ uNGAL จากสุนัขที่มีรอยโรคที่ไตแต่มีครีเอตินินปกติไม่พบว่าแตกต่างจากสุนัขปกติและสุนัขไตวายที่มีค่าครีเอตินินผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = 0.015 และ 0.010 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด) ของค่าโลหิตวิทยา ค่าชีวเคมีโลหิต และผลวิเคราะห์ปัสสาวะในสุนัข 3 กลุ่ม

ค่าพารามิเตอร์	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	p -value
Creatinine (mg %)	1.06±0.11 ^a (0.94-1.29)	1.08±0.29 ^a (0.68-1.6)	5.55±3.77 ^b (1.71-14.5)	0.000066
BUN (mg %)	12.4±3.92 ^a (6-21)	23.3±19.40 ^a (9-66)	92.9±52.01 ^b (14-207)	0.000009
Albumin (gm %)	3.23±0.43 ^a (2.4-4.1)	2.8875±0.36 ^{ab} (2.2-3.3)	2.45±0.427 ^b (1.9-3.1)	0.001777
Hematocrit (%)	45.33±8.23 ^a (31.2-58)	35.11±6.55 ^b (22-41.8)	29±8.83 ^b (16.1-41.1)	0.000355
Urine specific gravity	1.028±0.013 ^a (1.01-1.05)	1.024±0.011 ^a (1.01-1.05)	1.011±0.003 ^b (1.008-1.020)	0.005224

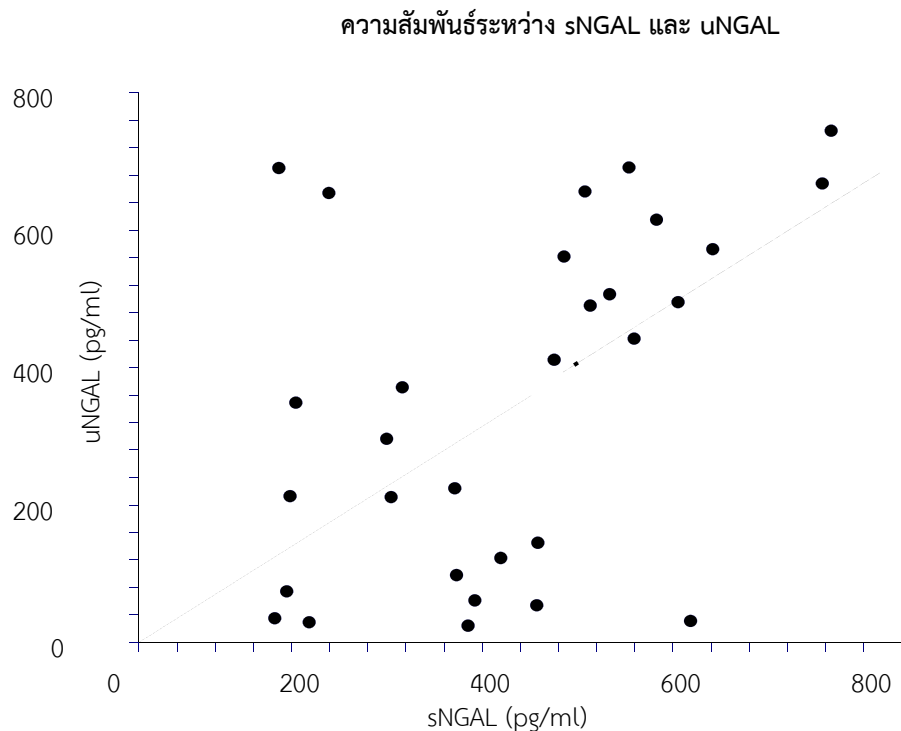
^{a,b} ตัวอักษรต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value <0.05)

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด) ของค่า sNGAL และ uNGAL ที่ได้จากการศึกษาในสุนัขทั้ง 3 กลุ่ม

NGAL (pg/ml)	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	p-value
sNGAL	290.31±133.63 ^a (123.73-485.02)	373.34±186.55 ^{ab} (128.49-607.81)	521.10±176.27 ^b (254.06-771.42)	0.015
uNGAL	170.04±216.27 ^a (0-693.777)	372.03±302.34 ^{ab} (0-731.80)	524.23±190.73 ^b (200.19-792.02)	0.010
sNGAL/uNGAL	3.36±2.56 (0.47-7.74)	4.19±6.58 (0.21-18.63)	1.01±0.14 (0.74-1.25)	0.214

^{a b} ตัวอักษรต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$)

เมื่อเทียบความสัมพันธ์ระหว่าง sNGAL และ uNGAL ของสุนัขทุกกลุ่มด้วย Pearson correlations section พบว่า uNGAL มีความสัมพันธ์กับ sNGAL ที่ค่า $r = 0.86$ ($p\text{-value} = 0.01$) ดังภาพที่ 1 จากสมการพบว่าค่า R^2 เท่ากับ 0.74 เมื่อตัวแปรต้นคือ sNGAL และตัวแปรตามคือ uNGAL



ภาพที่ 1 กราฟสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่า sNGAL และ uNGAL โดยวิเคราะห์ด้วย Linear Regression Plot Section โดยที่แกน Y = uNGAL และแกน X = sNGAL

เมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงความเป็นไปได้อื่นๆ โดยหาอัตราส่วนระหว่าง sNGAL ต่อ uNGAL (sNGAL/uNGAL ratio) พบว่าค่า sNGAL/uNGAL ratio จากทั้งสามกลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} = 0.214$)

วิจารณ์

จากการศึกษาพบว่า sNGAL และ uNGAL ในกลุ่มสุนัขปกติมีค่าแตกต่างจากสุนัขที่พบภาวะไตวายและมีค่าครีเอตินินผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Steinbach *et al.* (2014) ซึ่งพบว่าสุนัขที่มีภาวะอะโซธีเมียจะมีค่า sNGAL และ uNGAL สูงกว่าสุนัขปกติ นอกจากนี้ Hsu *et al.* (2014) ได้ทำการตรวจระดับ sNGAL และ uNGAL ในสุนัขที่มีภาวะอะโซธีเมียพบว่าสุนัขที่มีภาวะไตวายเฉียบพลันมีค่า NGAL สูงกว่าสุนัขปกติอย่างมีนัยสำคัญ

จากผลการทดลองนี้พบว่าค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL ของสุนัขที่มีรอยโรคไตแต่มีค่าครีเอตินินปกติ มีค่าอยู่ระหว่างค่าที่ได้จากสุนัขปกติและสุนัขที่พบไตวายที่มีค่าครีเอตินินผิดปกติโดยมีค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL ในกลุ่มสุนัขที่มีรอยโรคไตแต่มีค่าครีเอตินินปกติมีค่ามากกว่าค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL ของสุนัขปกติ และน้อยกว่าค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL ของสุนัขที่พบภาวะไตวายและมีค่าครีเอตินินผิดปกติตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า sNGAL และ uNGAL ไม่สัมพันธ์กับภาวะอะโซธีเมียแต่มีบทบาทในการพยากรณ์โรคในภาวะไตวายเรื้อรังและยังแสดงให้เห็นว่า sNGAL เป็นตัวบ่งชี้ที่ดีถึงความรุนแรงของไตวายในสุนัข สอดคล้องกับการศึกษาของ Hsu *et al.* (2014)

นอกจากนี้การแบ่งกลุ่มร่วมกับผลการทดลองที่พบว่าค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL ในสุนัขที่มีรอยโรคไตและมีค่าครีเอตินินปกติ มากกว่าค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL ของสุนัขปกติและน้อยกว่า sNGAL และ uNGAL ของสุนัขที่พบภาวะไตวายและมีค่าครีเอตินินผิดปกติตามลำดับนั้นมีความสำคัญในการวินิจฉัยภาวะไตเสียหายเฉียบพลันได้รวดเร็ว อันเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มโอกาสรอดชีวิตของสัตว์ป่วย ซึ่งสอดคล้องกับแนวความคิดหลักของงานวิจัยนี้ว่าภาวะไตเสียหายเฉียบพลันจะพัฒนาการเป็นระดับขึ้น สอดคล้องกับการแบ่งกลุ่มผู้ป่วยในคนตามที่ McCullough *et al.* (2013) ที่ได้ประเมินความเสียหายต่อไตและสามารถแบ่งผู้ป่วยได้เป็น 4 กลุ่ม ซึ่งเป็นลักษณะเดียวกับการแบ่งกลุ่มสุนัขที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 จัดเป็นกลุ่มที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของหน้าที่หรือเกิดความเสียหายต่อไต (เปรียบเทียบได้กับกลุ่มสุนัขปกติของการศึกษานี้) กลุ่มที่ 2 พบว่าการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของไตแต่ไม่พบภาวะเสียหายของไต กลุ่มที่ 3 พบว่าเกิดภาวะไตเสียหายที่ไม่แสดงอาการทางคลินิก (กลุ่มที่ 2 และ 3 นี้ เปรียบเทียบได้กับกลุ่มสุนัขที่มีรอยโรคไตแต่มีค่าครีเอตินินในระดับปกติ) และกลุ่มที่ 4 พบความเสียหายของไตและหน้าที่ของไต (เปรียบเทียบได้กับสุนัขกลุ่มที่ 3 ของการทดลองนี้)

จากการทดลองนี้พบว่ากลุ่มสุนัขที่มีรอยโรคไตแต่มีค่าครีเอตินินปกติมีค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL มากกว่าสุนัขปกติ อาจเป็นไปได้ว่าสุนัขที่มีรอยโรคไตแต่มีค่าครีเอตินินปกติเกิดความเสียหายกับไตมากกว่าสุนัขปกติ ทำให้ค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL มีค่ามากกว่าสุนัขปกติ แสดงให้เห็นว่า sNGAL สามารถบ่งชี้ภาวะไตเสียหายได้ดีกว่าค่าครีเอตินิน เนื่องจากค่าครีเอตินินในซีรัมไม่ได้

ตอบสนองต่อการเสียหายที่ไตโดยทันทีแต่จะพบว่ามีค่าครีเอตินินสูงขึ้นต่อเมื่อมีอัตราการกรองที่ลดลงมากกว่า 40-50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจสามารถบอกได้ว่า sNGAL บ่งชี้ภาวะไตเสียหายได้ดีกว่าค่าครีเอตินินในซีรัม สอดคล้องกับการศึกษาของ Singer *et al.* (2011)

โดยปกติ NGAL ถูกสร้างจากเซลล์หลายชนิดและไหลเวียนไปทั่วร่างกายในระดับต่ำจนถูกกรองผ่านไต จากนั้น NGAL จะถูกดูดกลับผ่าน Megalin pathway ใน proximal tubule (Hvidberg *et al.*, 2005) จึงพบ NGAL ระดับต่ำในปัสสาวะ แต่หากไตเสียหายเฉียบพลัน NGAL จะถูกดูดกลับในส่วนปลายของท่อไตเฮนเล่สรูปแบบหน่วยไตส่วนท้าย และท่อรวมทำให้ NGAL เพิ่มขึ้นในเลือดและปัสสาวะ สอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่าค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL ในสุนัขที่มีรอยโรคที่ไตแต่มีค่าครีเอตินินปกติและในสุนัขที่พบภาวะไตวายมีค่าสูงกว่าสุนัขปกติ หากท่อไตส่วนต้นเสียหายอาจมีผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ NGAL ในปัสสาวะต่อไป (Schmidt-Ott, 2011) จากการที่พบว่าค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL ในสุนัขที่มีรอยโรคที่ไตแต่มีค่าครีเอตินินปกติมีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเกิดความเสียหายจึงพบว่า uNGAL มากกว่า sNGAL ในสุนัขที่พบภาวะไตวายและมีค่าครีเอตินินผิดปกติจึงเป็นไปได้ว่า uNGAL บ่งชี้ภาวะไตเสียหายเฉียบพลันได้ดีกว่า sNGAL

ทั้งนี้นอกจากตัวบ่งชี้ทางชีวภาพชนิด NGAL ในทางสัตวแพทย์ยังมีตัวบ่งชี้เฉพาะชนิดต่างๆที่ใช้ในการตรวจโรคไต เช่น α 1-microglobulin ที่ใช้บ่งชี้ภาวะท่อไตส่วนต้นเสียหาย จึงมีผลต่อการลดการดูดกลับ โดยสามารถตรวจด้วยวิธี western blot จากตัวอย่างปัสสาวะ มีข้อดีคือสามารถตรวจในตัวอย่างที่เป็นกรด แต่มีข้อเสียคืออาจจะพบว่ามีค่าลดลงใน

รายที่ป่วยเป็นโรคตับ นอกจากนี้ NAG (N-acetyl- β -D-glucosaminidase) ใช้บ่งชี้ภาวะท่อไตส่วนต้นเสียหาย ซึ่งมีข้อดีที่สามารถตรวจได้จากตัวอย่างปัสสาวะชั่วคราวหนึ่ง แต่มีข้อเสียคือภาวะ proteinuria pyuria เ พ ศ hyperthyroidism เบาหวาน ปัสสาวะเป็นด่าง และตัวอย่างที่เก็บไว้นานอาจมีผลต่อค่าที่วัดได้ (Frangogiannis, 2012)

อย่างไรก็ตามการใช้ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ NGAL ในซีรัมและปัสสาวะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ทางคลินิกเพื่อเป็นทางเลือกในการวินิจฉัยอย่างหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ร่วมกับการตรวจในปัจจุบันเพื่อคัดกรองและพยากรณ์การเกิดไตเสียหายเฉียบพลันได้ แต่ควรตระหนักถึงข้อจำกัดบางประการ เนื่องด้วย sNGAL และ uNGAL อาจเพิ่มสูงขึ้นจากปัจจัยบางอย่าง เช่น ไตวายเรื้อรัง ภาวะติดเชื้อ และมะเร็ง เป็นต้น

สรุป

จากผลการศึกษาพบว่า การตรวจ NGAL ในซีรัมและปัสสาวะเป็นทางเลือกหนึ่งในการวินิจฉัยภาวะไตเสียหายเฉียบพลัน ทำให้ทราบระดับความเสียหายของไตและการพยากรณ์โรค ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัย การรักษา และการติดตามผลการรักษา เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของสัตว์ป่วยมากขึ้น ยิ่งไปกว่านั้นการใช้ NGAL สามารถแก้ปัญหาเรื่องข้อจำกัดในการวินิจฉัยด้วยค่าครีเอตินิน อย่างไรก็ตามการใช้ NGAL ในทางคลินิกควรคำนึงถึงข้อจำกัดบางประการ เนื่องด้วย sNGAL และ uNGAL อาจเพิ่มสูงขึ้นจากปัจจัยบางอย่าง เช่น ไตวายเรื้อรัง ภาวะติดเชื้อ และมะเร็ง เป็นต้น จึงต้องระมัดระวังในการแปลผล อย่างไรก็ตามชุดทดสอบของ NGAL ยังมี

ราคาสูง จึงจำเป็นต้องพัฒนาชุดตรวจที่ใช้สะดวก
ให้ผลรวดเร็ว และราคาถูกลงต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนวิจัยที่ได้รับ
จากการสนับสนุนโดยทุนคณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

Cobrin, A., Blois, S., Abrams-Ogg, A.C.G., Kruth, S. and Dewey, C. 2012. Serum and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) concentration in healthy dogs and dogs with chronic kidney disease. *Advanced Renal Therapies Symposium*, New York.

Cowgill, L.D. and Langston, C.E. 2010. Acute kidney insufficiency. In: Bartges J, and Polzi, D. eds. *Nephrology and Urology of Small Animals*. Ames, IA: Blackwell Publishing Ltd: 472–523.

Devarajan, P. 2010. Review: neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a troponin like biomarker for human acute kidney injury. *Nephrology (Carlton)* 15: 419– 428.

Frangogiannis, N.G. 2012. Biomarkers: hopes and challenges in the path from discovery to clinical practice. *Transl. Res.* 159: 197-204.

Hsu, W.L., Lin, Y.S., Hu, Y.Y., Wong, M.L., Lin, F.Y. and Lee, Y.J. 2014. Neutrophil

Gelatinase–Associated Lipocalin in Dogs with Naturally Occurring Renal Diseases. *J. Vet. Intern Med.* 1-6.

Hvidberg, V, Jacobsen, C., Strong, R.K., Cowland, J.B., Moestrup, S.K. and Borregaard, N. 2005. The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Lett.* Jan 31. 579 (3): 773-7.

Kai, K., Yamaguchi, T., Yoshimatsu, Y., Kinoshita, J., Teranishi, M., and Takasaki, W. 2013. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, a sensitive urinary biomarker of acute kidney injury in dogs receiving gentamicin. *J. Toxicol. Sci.* 38: 269–277.

Langston, C.E. 2010. Acute uremia. In: Ettinger, S.J. and Feldman, E.C. eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Philadelphia, PA: WB Saunders: 1955–2115.

Lee, Y.J., Hu, Y.Y. and Lin., Y.S. 2012. Urine neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute canine kidney injury. *BMC Vet Rec.* 8: 248.

Linda, R. 2011. Acute Kidney Injury in Dogs and Cats. *Vet. Clin. Small Anim.* 41: 1–14.

McCullough, P.A., Shaw, A.D., Haase, M., Bouchard, J., Waikar, S.S., Siew, E.D.,

- Murray, P.T., Mehta, R.L. and Ronco, C. 2013. Diagnosis of acute kidney injury using functional and injury biomarkers: workgroup statements from the tenth Acute Dialysis Quality Initiative Consensus Conference. *Contrib Nephrol.* 182: 13-29
- Mori, K. and Nakao, K. 2007. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney Int.* 71: 967-970.
- Nabity, M.B., G.E. Lees, R. Cianciolo, M.M. Boggess, J.M. Steiner and J.S. Suchodolski. 2012. Urinary biomarkers of renal disease in dogs with X-linked hereditary nephropathy. *J. Vet. Intern Med.* 26: 282-293.
- Schmidt-Ott, K.M., Mori, K., Kalandadze, A., Li, J.Y., Paragas, N., Nicholas, T., Devarajan P. and Barasch, J. 2006. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin mediated iron traffic in kidney epithelia. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension.* 15: 442-449.
- Schmidt-Ott, K.M. 2011. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of acute kidney injury-where do we stand today? *Nephrol. Dial. Transplant.* 26: 762-764.
- Singer, E., Elger, A., Elitok, S., Kettritz, R., Nickolas, T.L., Barasch, J., Luft F.C. and Schmidt-Ott, K.M. 2011. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin distinguishes pre-renal from intrinsic renal failure and predicts outcomes. *Kidney Int.* 80: 405-414.
- Steinbach, S., Weis, J., Schweighauser, A., Francey, T. and Neiger, R. 2014. Plasma and Urine Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in dogs with acute kidney injury or chronic kidney disease. *J. Vet. Intern Med.* 1-6.

