นิพนธ์ต้นฉบับ

การตรวจวัดปริมาณ N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase ในปัสสาวะ*

ดารี่ พลนามอินทร์**
รุ่งสิริ เมืองมูลชัย**
นันทยา ชนะรัตน์**

บทคัดย่อ

ได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณ N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) ในปัสสาวะ เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้พยาธิสภาพของไตระยะเริ่มแรกในผู้ป่วยเบาหวาน โดยใช้น้ำยาเดี่ยวที่มี 2-chloro-4-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide เป็นสับสเตรท วิเคราะห์โดยเครื่อง Abbott Spectrum CCx วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ มีความถูกต้องโดยการวิเคราะห์กลับคืนเฉลี่ยเท่ากับ 93.7% ค่าความเที่ยงเมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างค่าสูงในเวลาเดียวกันเท่ากับ 8.65% และเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกันเท่ากับ 10.10% ผลการวิเคราะห์ในคนสุขภาพดีจำนวน 82 ราย ได้ค่าเฉลี่ย ± ความเบี่ยงเบนมาตรฐานของ NAG/ครีอะตินีน 1 กรัม เท่ากับ 13.47± 4.45 หน่วย ในผู้ป่วยเบาหวานจำนวน 204 ราย มีระดับสูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่เป็นโรคไม่เกิน 5 ปี (37.62± 24.48 หน่วย/ครีอะตินีน 1 กรัม, $p < 0.005$) และมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเป็นโรค และตามระดับโปรตีนที่ตรวจวัดโดยใช้ Albustix วิธีที่นำเสนอสามารถทำได้ทั้งวิธีธรรมดา และกับเครื่องอัตโนมัติ สำหรับงานประจำวันได้

คำหัส : Urinary NAG, proteinuria, diabetes mellitus

* ส่วนหนึ่งของภาคนิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) ปีการศึกษา 2538

** ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract : The Determination of Urinary N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase*

Pholnamin D, Muangmoonchai R**, Chanarat N****

The kinetic assay for urinary N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) was developed for using as an early marker of diabetic nephropathy. The single reagent with 2-chloro-4-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide as substrate was prepared and applied to be used with Abbott Spectrum CCx autoanalyzer. The average percent recovery of standard added was 93.7%, coefficient of variation of within run and between day assay of high level urine sample were 8.65% and 10.10% respectively. Urinary NAG in 82 healthy persons (mean ± standard deviation) was 13.47 ± 4.45 U/gm creatinine. Urine from 204 diabetic patients showed significantly higher NAG activity within the first 5 years of disease (37.62 ± 24.48 U/gm creatinine, $p < 0.005$) and directly correlated with duration of disease and to the intensity of proteinuria detected by Albustix. The present method can be applied for manual assay or with automated analyzer for routine laboratory work.

Key words : Urinary NAG, proteinuria, diabetes mellitus

* Part of Term Paper for B.S. (Medical Technology), 1995

** Department of Clinical Chemistry, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University

บทนำ

N-acetyl-β-D-glucosaminidase (2-acetamido-2-deoxy-D-glucoside-acetamino-deoxy glycohydrase, E.C. 3.2.1.30 : NAG)[1] เป็น lysosomal enzyme ชนิดหนึ่ง ส่วนใหญ่พบในเซลล์ของท่อไต[2,3] เนื้อเยื่อและของเหลวในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทุกชนิด[3] คนทั่วไป พบ NAG ในปัสสาวะได้ในระดับต่ำ เนื่องจากมีการทำลายหรือการเปลี่ยนโครงสร้างของเซลล์เยื่อบุผิวของท่อไต และพบระดับสูงขึ้นมากหลังจากไตถูกทำลายจากสาเหตุต่างๆ เช่น ไตวาย (renal failure) การไม่ยอมรับไตที่ปลูกถ่าย การได้รับสารเป็นพิษต่อไต ความดันเลือดสูง ภายหลังการผ่าตัดไต[4] หรือเบาหวาน เป็นต้น ระดับของ NAG ในปัสสาวะจะเพิ่มสูงขึ้นก่อนผลการตรวจสมรรถภาพไตตัวอื่นๆ[2-4] นอกจากนั้น ยังมีความคงตัวในปัสสาวะสูง และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเพศและช่วงเวลาการเก็บปัสสาวะระหว่างวัน

อาการแสดงเริ่มแรก ที่สามารถบ่งชี้ว่าผู้ป่วยเบาหวานเริ่มมีโรคแทรกซ้อนทางไต คือการตรวจพบว่ามี microalbuminuria (มีการขับอัลบูมิน 30-300 มก. ต่อวัน) เรียกว่า incipient diabetic nephropathy การพบภาวะ microalbuminuria เป็นข้อที่ทำนายว่าผู้ป่วยจะเกิดโรคไต (overt diabetic nephropathy) โดยเฉพาะเมื่อผู้ป่วยมีความดันเลือดสูงและการทำงานของไตเสื่อมลง จนถึงระยะที่ตรวจพบโปรตีนในปัสสาวะด้วยแถบน้ำยาจุ่ม (Albustix) เรียกภาวะนี้ว่า clinical proteinuria

การวินิจฉัยผู้ป่วยระยะที่มีความผิดปกติของการทำงานของไตเริ่มแรกนี้มีความสำคัญต่อการพยากรณ์โรคมาก ทั้งนี้หากทำการรักษาได้เหมาะสมก็จะสามารถป้องกันการกำเริบของโรคไตหรือทำให้ไตกลับทำงานได้อย่างปกติได้[5]

การศึกษาครั้งนี้ เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวัดการทำงานของ NAG ในปัสสาวะโดยเลือกใช้ 2-chloro-4-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide (CNP-NAG) เป็นสับสเตรทวิเคราะห์โดยเครื่อง Abbott Spectrum CCx และศึกษาระดับการทำงานของ NAG ในปัสสาวะผู้ป่วยเบาหวานระยะต่างๆ

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง ปัสสาวะที่เก็บตอนเช้าจากผู้ที่มีสุขภาพดี 82 คน เป็นชาย 41 คนและหญิง 41 คน และจากผู้ป่วยเบาหวาน 204 ราย มาทำการตรวจน้ำตาล โปรตีน และความเป็นกรด-ด่างโดยใช้แถบน้ำยาจุ่ม ตรวจวัดปริมาณครีอะตินีนและ NAG ภายใน 24 ชั่วโมง ถ้าไม่สามารถทำได้ให้เก็บปัสสาวะไว้ที่ -20 °ซ

การตรวจวัดการทำงานของ NAG มีหลักการคือ เมื่ออุ่นปัสสาวะซึ่งมี NAG กับสับสเตรท (CNP-NAG) ที่ 37 °ซ pH 4.8 NAG จะย่อยสับสเตรทออกเป็น N-acetyl-D-glucose และ CNP (2-chloro-4-nitrophenol) วัดการดูดกลืนแสงของ CNP ที่ 404 นาโนเมตร

การตรวจวัดปริมาณครีอะตินีน โดยเครื่อง Abbott Spectrum CCx มีหลักการคือ ให้ครีอะตินีนทำปฏิกิริยากับ alkaline picrate จะได้สารสีแดง ของ alkaline creatinine picrate วัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นที่ 516 นาโนเมตร

การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน (Microalbumin, MA) ในปัสสาวะ ใช้ปฏิกิริยาของอัลบูมินกับสี bromphenol blue ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3.10 วัดสีเปลี่ยนแปลงไปที่ 610 นาโนเมตร[6]

ผลการศึกษา

การศึกษาความเที่ยงของวิธีการตรวจวัด NAG โดยการตรวจปัสสาวะ 2 ระดับ เมื่อทำไปพร้อมๆ กัน (Optimum condition variance, OCV) และตรวจคนละวัน (Routine condition variance, RCV) ได้ค่า mean ± SD, %CV ของตัวอย่างปกติเท่ากับ 14.62 ± 0.10, 0.66% และ 14.64 ± 0.18, 1.23% และตัวอย่างค่าสูงเท่ากับ 31.32 ± 2.71, 8.65% และ 30.29 ± 3.06, 10.10% ตามลำดับ

ค่าความถูกต้องของวิธี โดยการทำการวิเคราะห์ค่ากลับคืนของสารมาตรฐาน NAG ที่เติมลงไป มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 93.77% (พิสัย 90.77 - 96.62%) และวิธีนี้มีค่าความเป็นเส้นตรงได้อย่างน้อยถึงระดับ 64 U/gm creatinine

ค่าเฉลี่ย ± ความเบี่ยงเบนมาตรฐานของ NAG ในปัสสาวะคนปกติ 82 คน เท่ากับ 13.47 ± 4.45 U/gm creatinine แบ่งเป็นเพศชาย 41 คน มีค่า 11.06 ± 4.14 U/gm creatinine และเพศหญิง 41 คน มีค่า 15.83 ± 5.64 U/gm creatinine ค่าเฉลี่ย ± ความเบี่ยงเบนมาตรฐานของ MA เท่ากับ 0.20 ± 0.09 mg/mg creatinine ในเพศชายมีค่า 0.18 ± 0.08 mg/mg creatinine และในเพศหญิงมีค่า 0.23 ± 0.09 mg/mg creatinine

ระดับการทำงานของ NAG ในปัสสาวะผู้ป่วยเบาหวานแบ่งตามความแรงของผลการตรวจโปรตีนด้วย Albustix พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นไปตามกัน ดังตารางที่ 1 และเมื่อแบ่งตามระยะเวลาที่ผู้ป่วยเป็นเบาหวาน ตั้งแต่เริ่มเป็นถึง 5, 5-10, 10-15 และมากกว่า 15 ปี พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะ 0-5 ปี แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนเมื่อระยะเวลาการเป็นโรคนานขึ้น ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ระดับการทำงานของ NAG ในปัสสาวะ (ค่าเฉลี่ย ± ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน) แบ่งตามความแรงของผลการตรวจโปรตีนด้วย Albustix

Protein	N	NAG (U/gm creatinine)
Negative	100	39.33 ± 26.79*
Trace	12	27.61 ± 14.48*
1+	44	42.12 ± 28.26*
2+	18	43.36 ± 24.96*
3+	15	50.56 ± 21.71*
4+	16	61.09 ± 27.96*

* $p < 0.005$ by t-test เมื่อเทียบกับกลุ่มคนปกติ

ตารางที่ 2 ระดับการทำงานของ NAG ในปัสสาวะผู้ป่วยเบาหวาน (ค่าเฉลี่ย ± ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน) แบ่งตามระยะเวลาที่เป็นเบาหวาน

ระยะเวลา(ปี)	N	NAG (U/gm creatinine)
0-5	22	38.47 ± 30.52*
5-10	27	46.40 ± 27.71*
10-15	6	50.84 ± 24.32*
> 15	9	42.65 ± 14.10*

* $p < 0.005$ by t-test เมื่อเทียบกับกลุ่มคนปกติ

วิจารณ์

วิธีการตรวจวัดระดับการทำงานของ NAG ในปัสสาวะที่นำเสนอโดยใช้ CNP-NAG เป็นสับสเตรท เตรียมเป็นน้ำยาเดี่ยวใช้กับเครื่องอัตโนมัติ Abbott Spectrum CCx จัดว่าเป็นวิธีที่มีความถูกต้องแม่นยำ และมีความเที่ยงสูงเป็นที่น่าพอใจ เนื่องจากการใช้ CNP-NAG เป็นสับสเตรทจะไม่มีสารที่รบกวนปฏิกิริยา[7] และการวัดแบบ kinetic จะตัดปัญหาการรบกวนจากสารต่างๆ ที่อยู่ในปฏิกิริยา วิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว สามารถทำได้ถึง 48 รายภายใน 1 ชั่วโมง

ผลการวิเคราะห์ในปัสสาวะ พบว่าผู้ป่วยเบาหวานมีแนวโน้มที่จะเกิดความบกพร่องของไตได้ตั้งแต่ระยะเริ่มเป็น ทั้งในส่วนของท่อไต และส่วนของโกลเมอรูลัส เนื่องจาก MA ก็มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นไปตามกัน การที่พบเอนไซม์ของเซลล์ท่อไตในปัสสาวะ แสดงถึงการมี tubular damage และการพบโปรตีนในปัสสาวะ ก็แสดงถึงโกลเมอรูลัสมีการเสียหาย Yaqoob และคณะ[8] ได้รายงานการพบทำนองเดียวกันในผู้ป่วยเบาหวานที่มีอาการของโรคไตแบบชั่วคราวและแบบชัดเจน แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับเอนไซม์กับอัลบูมินในปัสสาวะ

ต่างจากผู้ที่เป็นโรคไตเนื่องจาก primary glomerulonephritis ที่มีความสัมพันธ์ระหว่างระดับสารทั้งสอง Jones และคณะ[9] ได้รายงานระดับ NAG/creatinine ในผู้ป่วยเบาหวานชนิด IDDM พบว่ามีความสัมพันธ์กับ albumin excretion ratio (AER) แต่ไม่สัมพันธ์กับสารบ่งชี้ถึงการควบคุมระดับน้ำตาลอื่น เช่น fructosamine อย่างไรก็ดี เขาได้สรุปว่า การตรวจวัดปริมาณ NAG ในผู้ป่วยเบาหวานสามารถใช้บอกความผิดปกติของท่อไตได้ก่อนที่จะพบความผิดปกติของ AER

Lorini และคณะ[10] ได้เปรียบเทียบการเก็บตัวอย่างปัสสาวะแบบตลอดคืน (overnight urine) และปัสสาวะที่เก็บตอนเช้า (second morning urine) ในผู้ป่วย IDDM อายุ 7.4-25 ปี และเป็นเบาหวานมานาน 2-19.6 ปี พบว่าผู้ป่วยทุกรายมีระดับ NAG/creatinine สูงกว่าคนปกติที่มีอายุและเพศใกล้เคียงกัน ระดับ NAG/creatinine ในปัสสาวะที่เก็บตอนเช้ามีระดับสูงกว่าปัสสาวะที่เก็บตลอดคืนชัดเจนแต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง NAG/creatinine กับอายุ ระยะเวลาการเป็นโรค การเข้าสู่วัยหนุ่มสาว body mass index ระดับน้ำตาลในเลือดหรือปัสสาวะ ระดับอินซุลินที่ใช้ และความดันเลือดในผู้ป่วยกลุ่มนี้ นอกจากนี้ ผู้ที่มีภาวะแทรกซ้อนตั้งแต่ 1 อย่างขึ้นไป จะมี NAG/creatinine สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะแทรกซ้อนเลย โดยจะพบในปัสสาวะที่เก็บตอนเช้าเท่านั้น ซึ่งจะเห็นว่า เวลาการเก็บปัสสาวะน่าจะมีผลต่อค่า NAG/creatinine ด้วย จึงควรเก็บปัสสาวะให้เป็นช่วงเวลาใกล้เคียงกัน

การตรวจการทำงานของ NAG ในปัสสาวะโดยวิธีที่นำเสนอนี้ น่าจะนำมาใช้เป็นแนวทางในการเป็นตัวบ่งชี้ระยะเริ่มแรกของความบกพร่องของท่อไต และการตรวจวัดปริมาณ MA จะเป็นตัวบ่งชี้เริ่มแรกของความบกพร่องของโกลเมอรูลัส วิธีการตรวจวัด NAG สามารถทำได้ทั้งแบบธรรมดาหรือประยุกต์เข้ากับเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติชนิดต่างๆ ได้สำหรับการวิเคราะห์ในงานประจำวัน

เอกสารอ้างอิง

1. Ong-ajyooth S, Ong-ajyooth L, Nilwarangur S, Sinsakulsuk B. Urinary N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) isozyme in normal and patient with glomerulonephritis. Intern Med 1989; 5: 120-3.
2. Noto A, Okawa Y, Mori S, Yoshioka M, *et al.* Simple, rapid spectrophotometry of urinary N-acetyl-β-D-glucosaminidase with use of new chromogenic substrate. Clin Chem 1983; 29: 1713-6.
3. Jacobson HR, Striker GE. The Principle and Practice of Nephrology. 2nd ed, 1995, Walsworth Publishing Co, 330-51.
4. Wellwood JM, Ellis BG, Prince RG, *et al.* Urinary N-acetyl-β-D-glucosaminidase activities in patients with renal disease. Br Med J 1975; 3: 408-11.
5. สมาคมต่อมไร้ท่อแห่งประเทศไทย. ความสำคัญของการควบคุมระดับน้ำตาลใน NIDDM. การอบรมวิชาการต่อมไร้ท่อสำหรับเวชปฏิบัติทั่วไป ครั้งที่ 11; 19-21 กรกฎาคม 2538. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2538.
6. Chanarat N, Suksriwong S. Microalbuminuria in diabetes mellitus patients. J Med Lab Sc 1995; 9: 27-30.
7. Itoh Y, Numata Y, Morita A, Asano Y, Kawai Y. Varies value of urinary N-acetyl-β-D-glucosaminidase isozyme B in male of reproductive age. Kidney International 1994; 46: 38-42.
8. Yaqoob M, McClelland P, Patrick AW, Stevenson A, Mason H, Bell GM. Tubular

damage in microalbuminuric patients with primary glomerulonephritis and diabetic nephropathy. Ren Fail 1995; 17: 43-9.

9. Jones AP, Lock S, Griffiths KD. Urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase activity in type I diabetes mellitus. Ann Clin Biochem 1995; 35: 58-62.

10. Lorini R, Scaramuzza A, Cortona L, Valenti G, Annunzio G, Melzi EGV. Increased urinary N-acetyl-β-glucosaminidase (NAG) excretion in young insulin-dependent diabetic patients. Diabetes Res Clin Pract 1995; 29: 99-105.