

ระดับของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเฉพาะจากกระดูกในซี่ร่่มของสุนัข ที่มีภาวะต่างๆ ของกระดูก

วรพัฒน์ ประชาธิลปชัย^{1*} เทพมนัส บุปผาอินทร์² มาริษศักดิ์ กัลล์ประวิทย์³
มีนา สาริกะภูติ⁴ สุมิตร ดุรงค์พงษ์ธร³

Abstract

Warapat Prachasilpchai^{1*} Tapmanus Bupha-intr² Marissak Kalpravidh³
Meena Sarikaputi⁴ Sumit Durongphongtorn³

SERUM BONE-SPECIFIC ALKALINE PHOSPHATASE OF DOGS WITH VARIOUS BONE CONDITION

Serum total and bone alkaline phosphatase (TAP and BAP) including Ca and P were measured in 6 dogs with osteoporotic bone and 10 dogs with less than a week fracture presented to the Small Animal Hospital, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University. The serum chemistry and ulnar radiographs were evaluated in plaster casting 9 normal experimental dogs before and after ulnar osteotomy on weeks 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 and 16, postoperation. The 9 normal experiment dogs had the average ($\pm$ SE) of 97.7($\pm$ 19.1) U/L TAP, 23.3($\pm$ 21.4) U/L BAP, 9.6($\pm$ 0.4) U/L Ca and 5.4($\pm$ 0.3) U/L P. Serum TAP, BAP, Ca, and P of the osteoporotic dogs were significantly ($p<0.05$) higher while Ca to P ratio was lower, than those of the normal dogs. During bone healing, serum TAP and BAP had increased since the first postoperative week. Increased TAP reached the highest level at the 6th postoperative week and decreased to the normal preoperative level during the 16th week. TAP at the 2nd, 4th, 6th weeks were significantly ($p<0.05$) higher than those measured before osteotomy. BAP at every interval after osteotomy were significantly ($p<0.05$) higher than the preoperative levels. BAP reached the highest level at the 4th week and remained the high level until the 12th week before decreasing to the level close to the preoperative level. Ca, P and Ca:P ratio were normal throughout 16 weeks, except at the 6th week when the Ca level was significantly decreased ($p<0.05$). From the finding that BAP increase when there is bone abnormality. BAP might be used as an indicator for the diagnosis, treatment follow up and research of bone diseases.

Keywords : Dogs, Alkaline Phosphatase, Bone

¹Small Animal Clinic, Department of Companion Animal, Faculty of Veterinary Medicine, Chiangmai University

²Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University

³Department of Veterinary Surgery, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University

⁴Biochemistry unit, Department of Veterinary Physiology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok 10330

*Corresponding author

¹สาขาวิชาคลินิกสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

²ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

³ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

⁴หน่วยชีวเคมี ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

*ผู้รับผิดชอบบทความ

บทคัดย่อ

วรพัฒน์ ประชาศิลป์ชัย^{1*} เทพนันต์ บุปผาอินทร์² มาริษักร์ กัลป์ประวิทย์³ มีนา สาริกะภูติ⁴ สุมิตร ดุรงค์พงษ์ธร³

ระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเฉพาะจากกระดูกในซีรัมของสุนัขที่มีภาวะต่างๆ ของกระดูก

การวัดระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสรวม หรือ TAP (Total Alkaline Phosphatase) และเฉพาะที่มาจากกระดูก หรือ BAP (Bone-specific Alkaline Phosphatase) รวมทั้ง แคลเซียม (Ca) และฟอสฟอรัส (P) ในซีรัมของสุนัขป่วยที่มารักษาที่ โรงพยาบาลสัตว์คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เป็นโรคกระดูกอ่อน 6 ตัว และกระดูกหักจากอุบัติเหตุไม่เกิน 1 สัปดาห์ 10 ตัว และวัดระดับของค่าดังกล่าวในซีรัมของสุนัขปกติ 9 ตัว ซึ่งใช้ศึกษาการเชื่อมต่อของกระดูก ulna ที่ถูกตัดแล้ว ใส่ฝือกโดยเจาะเลือดและถ่ายภาพเอ็กซเรย์ก่อนตัดและภายหลังตัดและเข้าฝือกกระดูก ulna แล้ว 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 และ 16 สัปดาห์ จากการศึกษาพบว่าสุนัขปกติที่ใช้ทดลองจำนวน 9 ตัว มีค่าเฉลี่ย ($\pm$ ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย) ของ TAP 97.7($\pm$ 19.1) U/L, BAP 23.3($\pm$ 21.4) U/L, Ca 9.6($\pm$ 0.4) mEq/L และ P 5.4($\pm$ 0.3) mEq/L สุนัขป่วยโรคกระดูกอ่อนมี TAP, BAP, Ca และ P สูงกว่าค่าดังกล่าวของสุนัขปกติแต่มี Ca:P ต่ำกว่าสุนัขปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สุนัขทดลองที่ตัดและเข้าฝือกกระดูก ulna เพื่อศึกษาระดับของค่าต่างๆ ในซีรัมขณะที่มีการเชื่อมต่อของกระดูก มี TAP และ BAP สูงขึ้นตั้งแต่สัปดาห์แรก TAP ขึ้นสูงสุดที่สัปดาห์ที่ 6 ภายหลังตัดกระดูก และลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงระดับใกล้เคียงปกติในสัปดาห์ที่ 16 และพบว่าระดับ TAP ที่ 2, 4 และ 6 สัปดาห์สูงกว่าค่าปกติก่อนการตัดกระดูกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วน BAP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตลอด 16 สัปดาห์ โดยขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 แล้วคงระดับอยู่จนถึง 12 สัปดาห์จึงค่อยๆ ลดลง ระดับ Ca, P และ Ca:P อยู่ในเกณฑ์ปกติตลอด 16 สัปดาห์ ยกเว้น Ca ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่สัปดาห์ที่ 6 จากการศึกษาพบว่า BAP ในซีรัมสูงขึ้น เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของกระดูก จึงน่าจะสามารถใช้ BAP เป็นตัวบ่งชี้ภาวะของกระดูกเพื่อช่วยในการวินิจฉัย ติดตามผลการรักษา และการวิจัยเกี่ยวกับกระดูก

คำสำคัญ: สุนัข อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส กระดูก

บทนำ

สารชีวเคมีที่ออกมาจากกระดูกแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ชนิดแรกเกิดขึ้นเมื่อมีการสร้างกระดูกที่สำคัญ ได้แก่ เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส หรือ AP (alkaline phosphatase) และออสติโอแคลซิน (osteocalcin) ชนิดที่สองเกิดขึ้นเมื่อมีการสลายของกระดูก ได้แก่ ไฮดรอกซีโปรลีน (hydroxyproline) ซึ่งพบมากในสัตว์และคนที่มีอายุมาก (Calvo et al., 1996; Gundberg et al., 2002) สารดังกล่าวเป็นสารประกอบโปรตีน สารที่สามารถตรวจได้โดยวิธีทางเคมีขั้นพื้นฐานคือเอนไซม์ AP ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การทำงานของกระดูก AP สร้างมาจากเซลล์ออสติโอเบลาสต์ (osteoblast) (Woitge et al., 1996) ที่มีหน้าที่สร้างสารพื้นของกระดูกและช่วยในการสะสมแร่ธาตุใน osteoid (Delmas, 1988; Hulth, 1989) เมื่อออสติโอเบลาสต์ทำงาน BAP (bone-specific alkaline phosphatase) ก็จะถูกหลั่งออกมาจาก

เซลล์มากขึ้น กระดูกที่มีพยาธิสภาพจะมีการทำงานของออสติโอเบลาสต์เพิ่มขึ้น ทำให้มีระดับ BAP ถูกปล่อยออกมาในกระแสเลือดสูงขึ้นตามไปด้วย

การวัดระดับ BAP สามารถใช้บอกได้ว่าร่างกายของสัตว์มีการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกมากขึ้นหรือน้อยลงในสัตว์ที่มีโรคของกระดูก และมีการทำงานของเนื้อเยื่อกระดูกผิดปกติ เช่น มีการซ่อมแซมกระดูกหัก (Taniguchi et al., 2003) โรคกระดูกอ่อน และโรคมะเร็งของกระดูก

เอนไซม์ AP เป็นโปรตีนที่ผลิตออกมาจากเซลล์เยื่อของอวัยวะต่างๆ ได้แก่ กระดูก ตับ ไต ลำไส้เล็ก และรก เอนไซม์ AP ที่สร้างจากแต่ละอวัยวะมีไอโซเอนไซม์และคุณสมบัติบางอย่างต่างกันไป (Hoffmann and Dörner, 1975; Moss, 1982; Kutzler et al., 2003) ในสภาพร่างกายปกติจะตรวจพบเอนไซม์ AP ที่ผลิตจากไต ลำไส้เล็ก และรก ใน

กระแสนี้ได้น้อยมาก ดังนั้นระดับ AP ในซีรัมส่วนใหญ่จะมาจากกระดูกและตับ (Moss, 1982)

การแยกเพื่อวัดเอ็นไซม์ AP ที่มาจากกระดูก หรือ BAP (Kleerekoper et al., 1995) และที่มาจากตับ หรือ LAP ในซีรัมอาจใช้วิธีแยกมวลสารทางไฟฟ้า (electrophoretic separation) (Hoffmann and Dorner, 1975) วิธีตกตะกอน BAP ด้วยวิธีเจิร์มเล็กติน (wheat germ lectin) (Behr and Barnert, 1986) และวิธีใช้ความร้อนเร่งปฏิกิริยา (heat activation analysis) (Sanecki et al., 1993; Burtis and Ashwood, 1994) การตรวจด้วยวิธีแยกมวลสารทางไฟฟ้าเป็นวิธีแยกไอโซเอ็นไซม์ของเอ็นไซม์ AP ที่ดีที่สุด แต่การวัดออกมาเป็นปริมาณยุ่งยากและต้องใช้เครื่องมือราคาแพง ดังนั้นจึงนำใช้ วิธีตกตะกอน BAP ด้วยวิธีเจิร์มเล็กติน (Sanecki et al., 1993)

การศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อหาระดับของ BAP ในซีรัม สุนัขปกติ สุนัขป่วยกระดูกอ่อน กระดูกหัก และสุนัขที่มีการเชื่อมต่อของกระดูก เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการตรวจวินิจฉัย รักษาและงานวิจัยด้านออร์โธปิดิกส์ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

สุนัขที่ทำการศึกษแบ่งเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 สุนัขที่มีสุขภาพปกติ จำนวน 9 ตัว

กลุ่มที่ 2 สุนัขป่วยที่มารักษาที่โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีผลการตรวจด้วยรังสีวินิจฉัยเป็นโรคกระดูกอ่อน (nutritional secondary hyperparathyroidism) จำนวน 6 ตัว เป็นเพศผู้ 4 ตัว และเพศเมีย 2 ตัว ทุกตัวมีอายุน้อยกว่า 1 ปี

กลุ่มที่ 3 สุนัขป่วยที่มีกระดูกขาหักแบบ transverse ไม่เกิน 1 สัปดาห์จำนวน 10 ตัว เป็นเพศผู้ 7 ตัว และเพศเมีย 3 ตัว มีอายุอยู่ระหว่าง 2-8 ปี

กลุ่มที่ 4 สุนัขทดลองที่ได้รับการผ่าตัดกระดูก ulna ข้างขวา ให้มีกระดูกหักแบบ transverse แล้วใส่เฝือกไว้ 5 สัปดาห์จนกระดูกเชื่อมต่อ จำนวน 9 ตัว เป็นเพศเมีย 4 ตัว และเพศผู้ 5 ตัว มีอายุเกิน 1 ปี 8 ตัว และน้อยกว่า 1 ปี 1 ตัว

1. การศึกษาระดับเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส แคลเซียม และฟอสฟอรัส ในสุนัขที่มีกระดูกปกติและผิดปกติ

ตรวจสอบสุขภาพ และเจาะเลือดของสุนัขปกติและสุนัขป่วยก่อนทำการรักษา เพื่อตรวจนับเม็ดเลือด วัดระดับเอ็นไซม์ TAP, BAP, Ca และ P โดยนำเลือดที่ได้จากสุนัขมาแยกซีรัมให้ได้อย่างน้อย 200 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง นำซีรัม 100

ไมโครลิตรไปตรวจระดับ Ca, P และ TAP ด้วยเครื่องวิเคราะห์หัตถ์โนมิตี (Kodak Ektachem DT slides biochemical analyzer, USA) ใช้ซีรัมที่เหลืออีก 50 ไมโครลิตรผสมกับวิธีเจิร์มเล็กติน (Sigma, USA) ที่มีความเข้มข้น 5 มก./ล. นำซีรัมอีก 50 ไมโครลิตรไปอุ่นที่ 37°C นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ความเร็ว 16,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แยกส่วนใสนำไปตรวจระดับเอ็นไซม์ AP ด้วยเครื่องวิเคราะห์หัตถ์โนมิตี นำค่าระดับ TAP ในซีรัม ลบด้วยสองเท่าของระดับเอ็นไซม์ AP ใน supernatant หลังตกตะกอน ด้วยวิธีเจิร์มเล็กตินจะได้ปริมาณ BAP

2. การศึกษาระดับเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส แคลเซียม และฟอสฟอรัส ในสุนัขที่มีการเชื่อมต่อของกระดูก ulna ทดลองภายหลังตัดและเข้าเฝือกกระดูก

ตรวจสอบสุขภาพและเจาะเลือดก่อนผ่าตัดกระดูก ulna 1 วัน เพื่อวัดระดับปกติของ TAP, BAP, Ca และ P โดยใช้วิธีเช่นเดียวกับการศึกษาข้างต้น หลังจากนั้นทำการผ่าตัดกระดูก ulna ข้างขวาให้กระดูกหักแบบ transverse แล้วใส่เฝือก ถ่ายภาพรังสีและเจาะเลือดเพื่อวัดค่าต่างๆโดยวิธีเดียวกันกับการก่อนการผ่าตัดในสัปดาห์ที่ 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 และ 16 ภายหลังการผ่าตัด

แบ่งลักษณะการเชื่อมต่อกระดูกที่พบในภาพถ่ายรังสี ออกเป็น 5 ระดับตั้งแต่ 0 ถึง +4

0 - ไม่มี callus, +1 - เริ่มมี callus เกิดขึ้น, +2 - callus เริ่มเชื่อมต่อระหว่างปลายหักทั้งสอง, +3 - มี callus เป็นสะพานเชื่อมปลายหักทั้งสองแต่ยังมองเห็นรอยกระดูกหัก (fracture line) และ +4 - มี clinical union จนไม่เห็นรอยกระดูกหัก

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

คำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ยของระดับ TAP, BAP, Ca และ P ของสุนัขทดลองก่อนและภายหลังตัดและเข้าเฝือกกระดูก ulna สุนัขป่วยที่มีกระดูกหักไม่เกิน 1 สัปดาห์และสุนัขที่เป็นโรคกระดูกอ่อน แล้วใช้ ANOVA เปรียบเทียบระดับ TAP, BAP, Ca และ P ระหว่างกลุ่มสุนัข และใช้ student's pair t test เปรียบเทียบค่าต่างๆของสุนัขทดลองระหว่างก่อนและภายหลังตัดและเข้าเฝือกกระดูก ulna

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย ของ TAP, BAP, Ca และ P ในซี่ร่่มของสุนัขที่มีภาวะต่างๆ ของกระดูก

	TAP(U/L)	BAP(U/L)	Ca(mEq/L)	P(mEq/L)
สุนัขปกติ (9 ตัว)	97.8 $\pm$ 19.1	23.3 $\pm$ 21.4	9.6 $\pm$ 0.2	4.5 $\pm$ 0.3
สุนัขกระดูกหักไม่เกิน 1 สัปดาห์ (10 ตัว)	133.0 $\pm$ 2.0	33.0 $\pm$ 9.5	8.5 $\pm$ 0.08	3.9 $\pm$ 0.6
สุนัขทดลองหลังตัดและเข้าเฝือกกระดูก ulna 1 สัปดาห์ (9 ตัว)	130.8 $\pm$ 20.3	32.1 $\pm$ 8.4	9.4 $\pm$ 0.2	4.6 $\pm$ 0.2
สุนัขกระดูกอ่อน (6 ตัว)	305.7 $\pm$ 80.5 ^a	234 $\pm$ 66.2 ^a	11.3 $\pm$ 0.4 ^a	7.4 $\pm$ 0.5 ^a

^aมีความแตกต่างจากสุนัขปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผล

สุนัขที่มีกระดูกปกติมีค่าเฉลี่ยของระดับ TAP เท่ากับ 97.8 $\pm$ 19.1 U/L, BAP เท่ากับ 23.3 $\pm$ 21.4 U/L, Ca เท่ากับ 9.6 $\pm$ 0.2 mEq /L และ P เท่ากับ 4.5 $\pm$ 0.3 mEq /L สุนัขป่วยกระดูกหักจำนวน 10 ตัว และสุนัขที่มีกระดูกหักจากการทดลองตัดและเข้าเฝือกกระดูก ulna จำนวน 9 ตัว มีค่าเฉลี่ยของ TAP และ BAP ไม่แตกต่างจากค่าเฉลี่ยดังกล่าวของสุนัขปกติ ($p > 0.05$) สุนัขป่วยโรคกระดูกอ่อน 6 ตัว มีค่าเฉลี่ยของ TAP และ BAP สูงกว่าค่าเฉลี่ยดังกล่าวของสุนัขปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 1 นอกจากนี้ยังพบว่าสุนัขป่วยโรคกระดูกอ่อนมีระดับ Ca และ P สูงกว่าของสุนัขปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ระดับ TAP สูงกว่าก่อนการผ่าตัดตั้งแต่สัปดาห์แรกภายหลังตัดและเข้าเฝือกกระดูก ulna (ตารางที่ 2) เพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนมีระดับสูงสุดในสัปดาห์ที่ 6 และมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในสัปดาห์ที่ 2 4 และ 6 ก่อนลดลงจนถึงระดับใกล้เคียงระดับปกติในสัปดาห์ที่ 16 (รูปที่ 1) ส่วนระดับ BAP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 จนถึงสัปดาห์ที่ 16 ภายหลังผ่าตัด ซึ่งเป็นช่วงที่เริ่มพบ callus ในภาพรังสีจนกระทั่งถึง 16 สัปดาห์ (ตารางที่ 2) ระดับ BAP ขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 และคงระดับอยู่จนกระทั่งถึงสัปดาห์ที่ 12 แล้วค่อยๆ ลดลง แต่ยังสูงกว่าระดับก่อนตัดกระดูก ระดับ Ca และ P ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ยกเว้นในสัปดาห์ที่ 6 ที่มีระดับ Ca ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 2, รูปที่ 2)

จากภาพถ่ายรังสีพบว่าสุนัขทุกตัวเริ่มมี callus ในสัปดาห์ที่ 4 และมากขึ้นตลอดการตรวจ 16 สัปดาห์ และเริ่ม

มี clinical union จนไม่เห็นรอยหักในสุนัข 2 ตัวในสัปดาห์ที่ 14 และ 4 ตัวในสัปดาห์ที่ 16

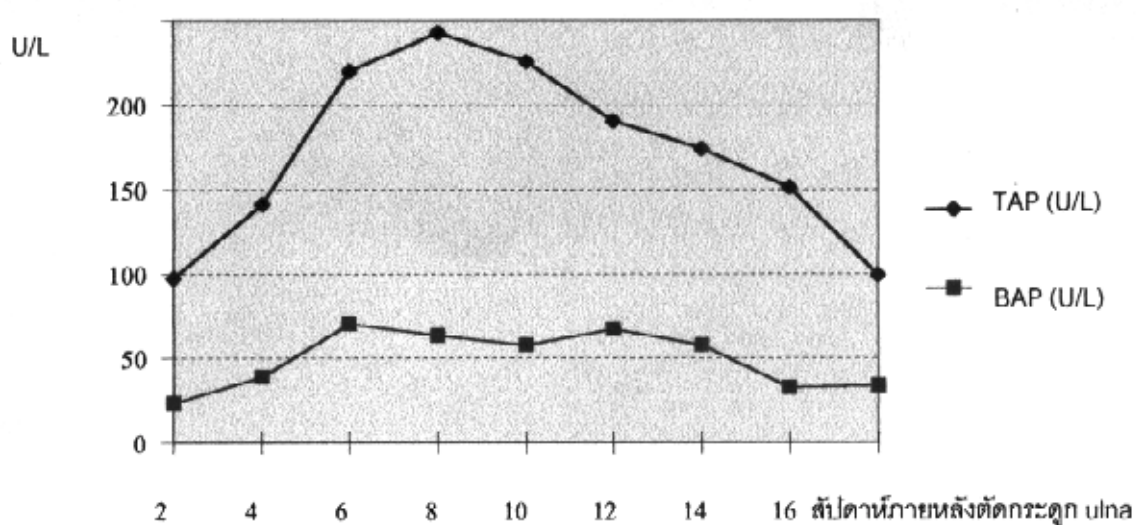
รูปที่ 3 แสดงให้เห็นว่าในสัปดาห์แรกๆ ภายหลังกระดูกหัก ระดับ BAP ในซี่ร่่มค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้น พร้อมกับการสร้าง callus มาเชื่อมต่อกกระดูกเพิ่มขึ้น เมื่อ callus เชื่อมต่อรอยหักแล้ว ประมาณสัปดาห์ที่ 12 ระดับ BAP จะค่อยๆ ลดลงสู่ค่าใกล้เคียงกับค่าที่วัดได้ก่อนตัดกระดูก

จากการวิเคราะห์ระดับ TAP ระดับและร้อยละของ BAP ในซี่ร่่มของสุนัขปกติ สุนัขป่วยกระดูกหักไม่เกิน 1 สัปดาห์ สุนัขทดลองภายหลังตัดและเข้าเฝือกกระดูก ulna แล้ว 1 และ 12 สัปดาห์ และสุนัขป่วยกระดูกอ่อน (รูปที่ 4) พบว่าสุนัขป่วยที่มีกระดูกหักไม่เกิน 1 สัปดาห์ และสุนัขทดลองภายหลังตัดและเข้าเฝือกกระดูก 1 สัปดาห์มีระดับ TAP และ BAP สูงขึ้นแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) จากค่าที่วัดได้ในสุนัขปกติ และระดับทั้งสองในซี่ร่่มของสุนัขป่วยกระดูกหักไม่เกิน 1 สัปดาห์ก็ไม่แตกต่างจากค่าที่วัดได้ในสุนัขทดลองหลังตัดและเข้าเฝือกกระดูกแล้ว 1 สัปดาห์ แต่ต่ำกว่าค่าที่วัดได้ในสุนัขทดลองภายหลังตัดและเข้าเฝือกกระดูกแล้ว 12 สัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สุนัขป่วยโรคกระดูกอ่อนมีระดับ TAP และ BAP สูงกว่าระดับดังกล่าวของสุนัขปกติอย่างมีนัยสำคัญและมีร้อยละของ BAP เท่ากับ 76 ซึ่งสูงมากเมื่อเทียบกับร้อยละ 24 ในสุนัขปกติ ร้อยละ 24.5-25 ในสุนัขป่วยและสุนัขทดลองที่มีกระดูกหัก 1 สัปดาห์ และร้อยละ 33 ในสุนัขทดลองที่ตัดและเข้าเฝือกกระดูก 12 สัปดาห์

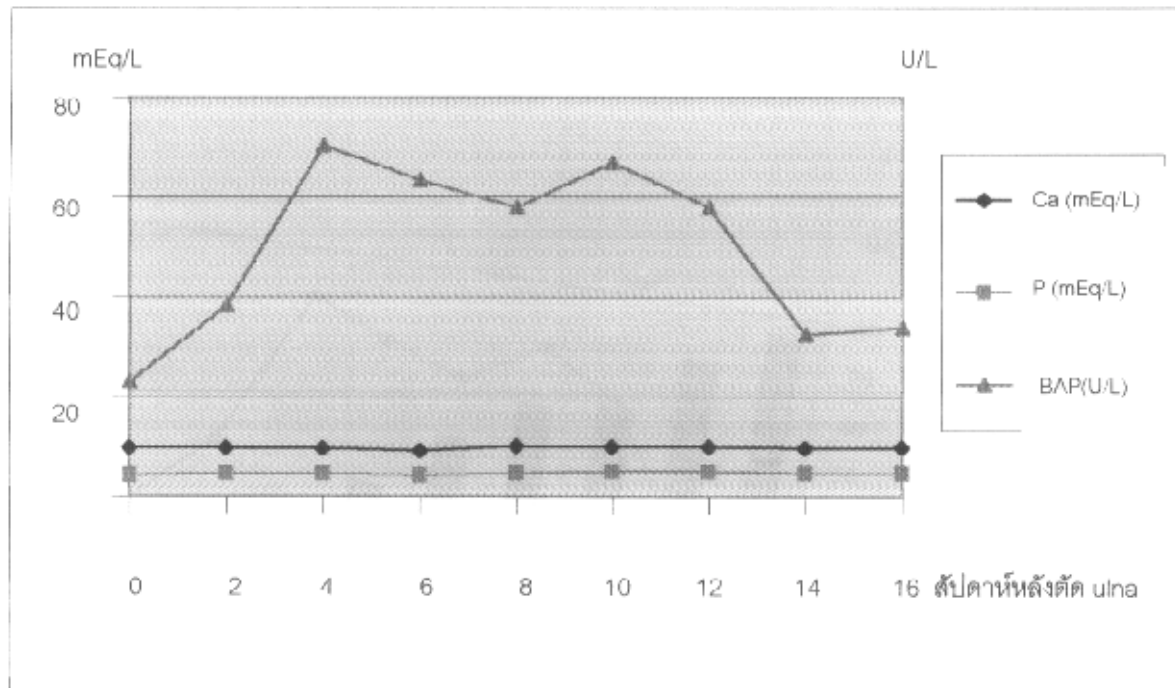
ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย ของระดับ TAP, BAP, Ca และ P ในซีรัม และปริมาณ callus ที่ประเมินจากภาพถ่ายรังสีของสุนัขทดลองก่อนและทุกๆ 2 สัปดาห์ภายหลังตัดและเข้าเฝือกกระดูก ulna

	ก่อนตัด	สัปดาห์ภายหลังตัดและเข้าเฝือกกระดูก ulna							
		2	4	6	8	10	12	14	16
TAP (U/L)	97.8 ± 19.1	141.4 ^a ± 23.5	220.4 ^a ± 62.9	242.9 ^a ± 68.8	225.9 ± 74.4	190.6 ± 62.0	174.0 ± 69.8	151.2 ± 53.0	99.3 ± 22.0
BAP (U/L)	23.3 ± 21.4	38.3 ± 11.6	70.3 ^a ± 23.3	63.4 ^a ± 21.5	57.9 ^a ± 21.6	66.8 ^a ± 22.5	57.8 ^a ± 22.3	32.4 ^a ± 7.7	33.8 ^a ± 8.5
Ca (mEq/L)	9.6 ± 0.2	9.9 ± 0.3	9.7 ± 0.2	9.1 ^a ± 0.3	9.9 ± 0.2	9.7 ± 0.3	10.0 ± 0.2	9.7 ± 0.3	9.9 ± 0.1
P (mEq/L)	4.5 ± 0.3	4.6 ± 0.2	4.8 ± 0.2	4.4 ± 0.1	4.0 ± 0.2	5.1 ± 0.2	5.1 ± 0.3	4.7 ± 0.4	4.8 ± 0.4
X-rays	0 ± 0	0.5 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.5 ± 0.2	2.0 ± 0.3	2.4 ± 0.3	2.5 ± 0.3	3.0 ± 0.5	3.3 ± 0.5

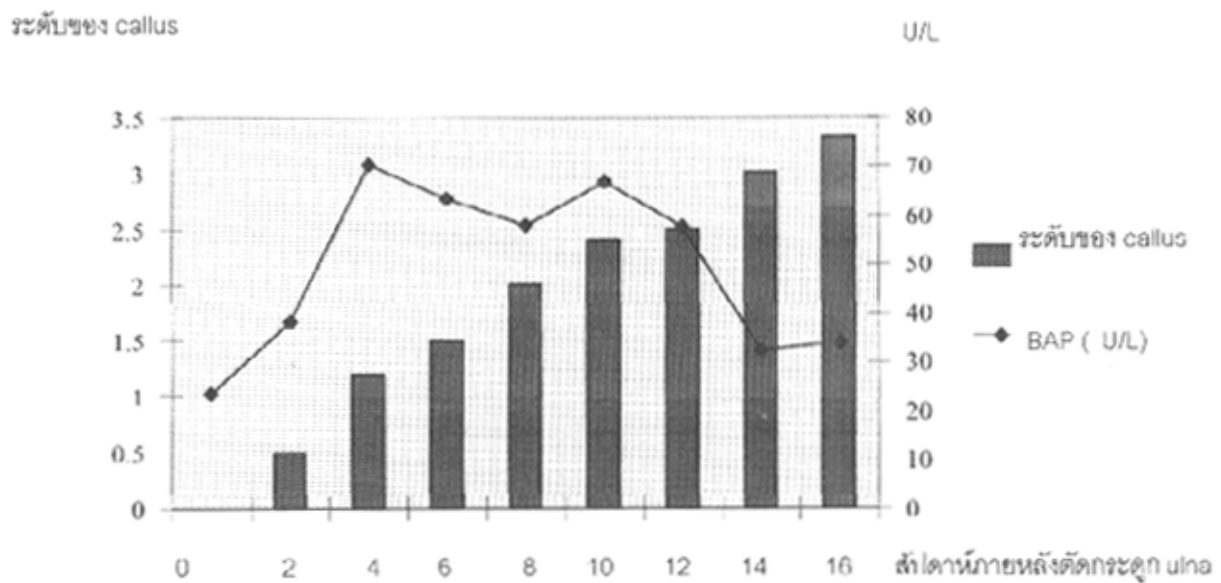
*มีความแตกต่างจากค่าที่วัดก่อนผ่าตัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



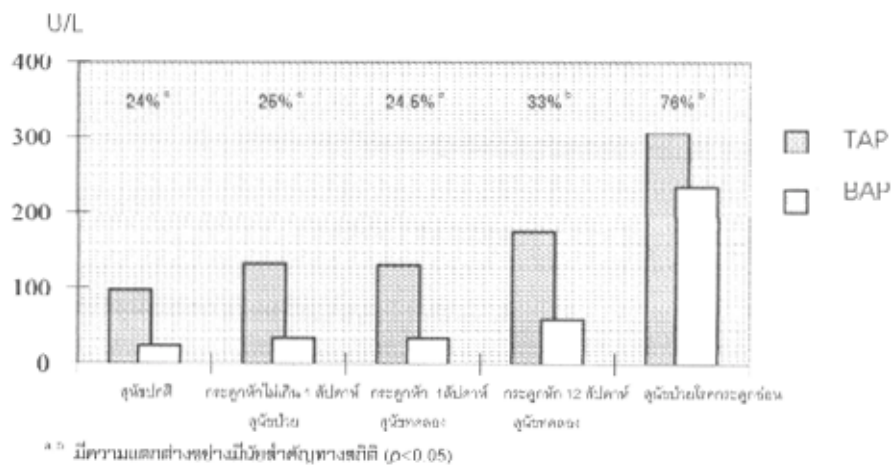
รูปที่ 1 ระดับ TAP และ BAP ในซีรัมสุนัขระหว่างที่มีการเชื่อมต่อของกระดูก ulna ที่ถูกตัดและเข้าเฝือก



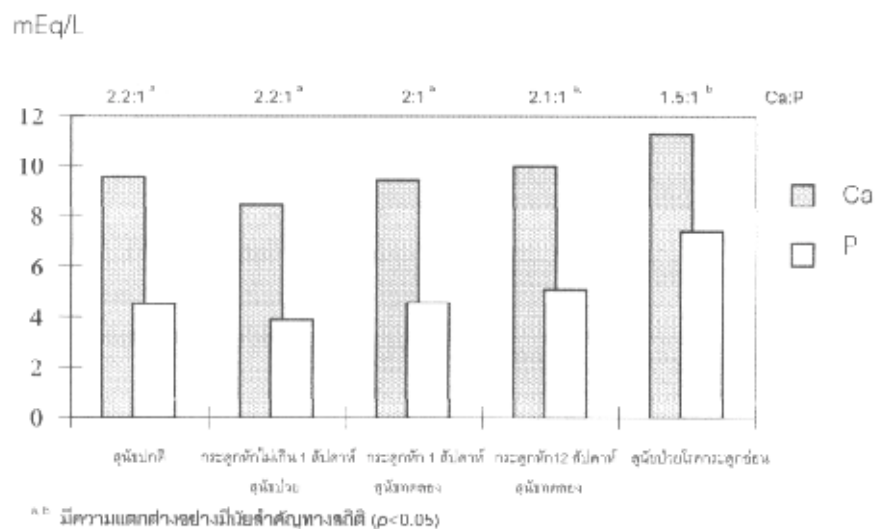
รูปที่ 2 ระดับ BAP, Ca และ P ในซีรัมของสุนัขระหว่างที่มีการเชื่อมต่อของกระดูก ulna ที่ถูกตัดและเข้าฝือก



รูปที่ 3 ระดับ BAP และปริมาณ callus ในระหว่างที่มีการเชื่อมต่อของกระดูกที่ประเมินจากภาพถ่ายรังสีของสุนัขที่ตัดและเข้าฝือกกระดูก ulna



รูปที่ 4 ระดับ TAP, BAP และ % ของ BAP ในซีรัมของสุนัขปกติ สุนัขป่วยกระดูกหักไม่เกิน 1 สัปดาห์ สุนัขทดลองภายหลังตัดและเข้าฝือกกระดูก ulna แล้ว 1 และ 12 สัปดาห์ และสุนัขป่วยโรคกระดูกอ่อน



รูปที่ 5 ระดับ Ca, P และสัดส่วน Ca ต่อ P ในซีรัมของสุนัขปกติ สุนัขป่วยกระดูกหักไม่เกิน 1 สัปดาห์ สุนัขทดลองภายหลังตัดและเข้าฝือกกระดูก ulna แล้ว 1 และ 12 สัปดาห์ และสุนัขป่วยโรคกระดูกอ่อน

จากการวิเคราะห์ระดับ Ca, P และสัดส่วน Ca ต่อ P ในซีรัมสุนัขปกติ สุนัขป่วยกระดูกหัก สุนัขทดลองภายหลังตัดและเข้าฝือกกระดูก ulna แล้ว 1 และ 12 สัปดาห์ และสุนัขป่วยโรคกระดูกอ่อน (รูปที่ 5) พบว่า Ca และ P ในซีรัมของสุนัขป่วยโรคกระดูกอ่อนมีระดับสูงที่สุดและแตกต่างจากสุนัขกลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) Ca และ P ที่ 12 สัปดาห์ของสุนัขทดลองที่ตัดและเข้าฝือกกระดูกมีค่าสูงกว่าสุนัขปกติและสุนัขที่มีกระดูกหัก 1 สัปดาห์ ทั้งจากการทดลองและจากอุบัติเหตุ ระดับ Ca และ P ของสุนัขป่วย

กระดูกหักมีค่าน้อยที่สุด และน้อยกว่าสุนัขปกติ อัตราส่วน Ca ต่อ P ของสุนัขทุกกลุ่มอยู่ในเกณฑ์ปกติ ยกเว้นกลุ่มสุนัขป่วยโรคกระดูกอ่อนมีอัตราส่วน Ca ต่อ P เท่ากับ 1.5 ต่อ 1 ซึ่งต่ำกว่าสุนัขปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

วิจารณ์

สุนัขทดลองก่อนตัดกระดูกมีระดับ BAP เหลือใกล้เคียงกับสุนัขที่โตเต็มวัยในรายงานของ Sanecki และคณะ (1993) การพบระดับ BAP สูงขึ้น ในสุนัขที่กระดูกหัก

แสดงให้เห็นว่า BAP นั้นมีความจำเพาะกับการทำงานของเนื้อเยื่อกระดูกมากกว่า TAP ซึ่งระดับ TAP จะเพิ่มขึ้นได้อีกจากปัจจัยอื่น เช่น มีการทำงานของตับผิดปกติ ดังนั้น BAP จึงเหมาะที่จะใช้เป็น ตัวบ่งชี้สภาพของกระดูก (Parviainen, 1998; Jenkins, 2001; Magnusson et al., 2002; Akbari et al., 2003; Komoda, 2003; Scariano et al., 2003; Taniguchi et al., 2003) ร่วมกับอาการที่สัตว์แสดงและปริมาณ callus ที่พบในภาพถ่ายรังสีในการติดตามผลการเชื่อมต่อของกระดูก สุนัขที่มีกระดูกหักจะมีระดับ BAP เพิ่มขึ้น (Bowles et al., 1996) ซึ่งในการศึกษานี้พบในช่วง 2 สัปดาห์แรก และสูงสุดในช่วงที่มี callus และจะคงระดับตลอดช่วงซ่อมแซม จากนั้นระดับ BAP จะลดลงในระหว่างการปรับรูปกระดูกที่ประมาณสัปดาห์ที่ 12 แต่ยังสูงกว่าระดับปกติ ระยะที่ BAP เริ่มลดลงนี้เราจะใช้เป็นเกณฑ์พิจารณา ร่วมกับอาการและปริมาณ callus ที่พบในภาพถ่ายรังสีในการวิจัยเกี่ยวกับการหาวิธีการหรือสารสำหรับใช้ในการรักษากระดูกหัก วิธีการหรือสารใดสามารถทำให้กระดูกเชื่อมติดกันและมีระดับ BAP ลดลงสู่เกณฑ์ปกติได้เร็วย่อมเป็นวิธีการ หรือเป็นสารที่เหมาะสมสำหรับรักษาการหักของกระดูก สุนัขป่วยโรคกระดูกอ่อนมีระดับ BAP ตั้งแต่ 89 ถึง 462 U/L (เฉลี่ย 234 U/L) การที่มีเนื้อกระดูกน้อยกว่ากระดูกปกติในสุนัขป่วยโรคกระดูกอ่อน เกิดจากการขาดความสมดุลของการสร้างกระดูกกับการสลายกระดูก ซึ่งอาจจะเกิดจากการสร้างเนื้อกระดูกน้อยลง หรือมีการสลายเนื้อกระดูกมากกว่าปกติหรือเกิดจากทั้งสองอย่างร่วมกัน สุนัขป่วยโรคกระดูกอ่อนในการศึกษารั้งนี้ เป็นสุนัขที่ยังโตไม่เต็มวัยคือมีอายุน้อยกว่า 10 เดือน ซึ่ง Sanecki et al. (1993) ได้รายงานว่าระดับ BAP ของสุนัขปกติที่มีอายุน้อยกว่า 10 เดือนจะมีค่าระหว่าง 50-500 U/L จากการมี BAP ที่สูงระดับเดียวกันนี้แสดงให้เห็นว่าสุนัขปกติและสุนัขกระดูกอ่อนในช่วงอายุต่ำกว่า 10 เดือนมีการทำงานของออสติโอเบลาสมากพอๆกัน ดังนั้นภาวะกระดูกอ่อน จึงน่าจะเกิดจากการสลายกระดูกมากกว่าปกติ ซึ่งมีสาเหตุมาจากการมีระดับ P ในซีรัมที่สูงกว่าปกติแล้วทำให้มีสัดส่วนของ Ca ต่อ P ในเลือดต่ำ ร่างกายจะหลั่งฮอร์โมนพาราไธรอยด์กระตุ้นให้มีการสลายกระดูกมากขึ้น เพื่อเพิ่ม Ca ในกระแสเลือดสำหรับปรับอัตราส่วน Ca ต่อ P ในเลือดให้เป็นปกติ ดังนั้นในสุนัขอายุน้อยการพิจารณากระดับของ absolute BAP เพียงอย่างเดียวอาจยังไม่เพียงพอสำหรับการที่จะสรุปว่าสุนัขเป็นโรคกระดูกอ่อนได้ จากการเปรียบเทียบร้อยละของ BAP ต่อ TAP ของสุนัขทดลองที่มีอายุอยู่ในช่วงเดียวกัน สุนัขทดลองอายุน้อยจะมี

BAP ใน TAP ประมาณไม่เกินร้อยละ 50 ต่ำกว่าของสุนัขที่เป็นโรคกระดูกอ่อนมากซึ่งมี BAP ประมาณร้อยละ 76 ดังนั้นการคิดร้อยละของ BAP ใน TAP เป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่าจะนำมาใช้ในการวินิจฉัยภาวะของกระดูกโดยเฉพาะอย่างยิ่งในสุนัขอายุน้อยซึ่งปกติมีระดับ BAP สูง โดยทั่วไปการเชื่อมต่อของกระดูกหักแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะการอักเสบ ระยะการซ่อมแซม และระยะการปรับแต่งรูป ในช่วง 4-5 วันภายหลังกกระดูกหัก จะมีเซลล์อักเสบต่างๆเข้ามาสะสม และจะพบมีเซลล์ออสติโอเบลาสแทรกเข้ามาในบริเวณรอยหักภายใน 1 สัปดาห์ (Govan et al., 1994) ทำให้ระดับ BAP สูงขึ้นตั้งแต่ 1 สัปดาห์ แต่จะสูงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 จนถึง 16 สัปดาห์ สัปดาห์ที่ 4 เป็นช่วงที่มีเร้าตุมาสะสมบริเวณที่หักมาก ซึ่งต้องอาศัยการทำงานของออสติโอเบลาส ในช่วงนี้เอง Ca ในเลือดจะถูกนำมาสร้าง callus มาก ทำให้ระดับ Ca ที่วัดได้ในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในสัปดาห์ที่ 6 แสดงว่าในช่วงที่ระดับ BAP สูงขึ้น Ca ในเลือดจะถูกนำไปสร้างเนื้อกระดูกมากทำให้มีระดับ Ca ในเลือดต่ำ หลังจากนั้นร่างกายจะปรับสมดุล Ca และ P ในเลือด ระดับของทั้งสองจึงเข้าสู่ภาวะปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับระดับ TAP และ BAP กับระดับของ callus ที่พบในภาพถ่ายรังสีจะเห็นว่าช่วงที่ callus เชื่อมต่อระหว่างปลายหักของกระดูก ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 ถึงสัปดาห์ที่ 10 ระดับของเอ็นไซม์ทั้งสองจะเพิ่มขึ้นสูงสุด โดยเฉพาะ BAP จะสูงเป็นสามเท่าของค่าปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการทำงานของกระดูกมากในช่วง 4 ถึง 10 สัปดาห์ภายหลังกกระดูกหัก ระดับ BAP จะเพิ่มสูงและมีค่ากว่า 3 เท่าของระดับปกติ เซลล์ออสติโอเบลาสทำงานมากเพื่อสร้าง callus มาเชื่อมต่อกระดูกทำให้ BAP ในซีรัมสูงขึ้น (Pedrazzoni et al., 1996) จึงสามารถนำหลักการนี้ไปวินิจฉัยการทำงานของกระดูกร่วมกับภาพถ่ายรังสี ในภาวะที่มีการเชื่อมต่อกระดูกไม่ปกติ เมื่อระยะการซ่อมแซมกระดูกใกล้ถึงระยะสุดท้ายภายหลังเกิด clinical union เซลล์ออสติโอเบลาสทำงานลดลง ทำให้มีระดับ AP ลดลง โดยพบ TAP จะมีอัตราการลดลงอย่างรวดเร็วจนมีระดับใกล้เคียงกับระดับปกติก่อนตัดกระดูกต่างกับระดับ BAP ยังคงระดับสูงถึงสัปดาห์ที่ 12 แล้วค่อยๆลดลงมาถึงระดับหนึ่ง แต่ยังสูงกว่าระดับปกติก่อนตัดกระดูกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งน่าจะมาจากการที่เซลล์ออสติโอเบลาสยังทำงานต่อไปในระยะปรับแต่งรูป ซึ่งเป็นช่วงที่ใช้เวลานานที่สุด การทำงานของออสติโอเบลาสมีความสัมพันธ์โดยตรงกับระดับ

BAP (Scariano et al., 2003) ในทางกลับกันหากพบว่าภายหลังกระดูกหักแล้วไม่มีการเชื่อมต่อ (nonunion) ซึ่งแสดงว่าออสติโอ بلاสไม่ได้ทำงาน ระดับ BAP ก็จะไม่สูงขึ้น ซึ่งจากการทดลองมีสุนัขหนึ่งตัวที่เกิดสภาวะนี้ ขึ้นก็จากภาพถ่ายรังสีพบว่า มี callus เกิดขึ้นในสัปดาห์ที่ 4 แต่กลับลดลงไปในสัปดาห์ที่ 6 จนไม่พบ callus แต่พบ fracture line ชัดเจนในสัปดาห์ที่ 8 เมื่อวัดระดับเอ็นไซม์ AP พบว่าระดับ TAP สูงขึ้นและลดลงอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 12 เช่นเดียวกับสุนัขกลุ่มที่มีการเชื่อมของกระดูกอย่างปกติ แต่ระดับ BAP จะสูงอยู่แค่ช่วง 2-4 สัปดาห์แรกที่มี callus แล้วลดลงจนต่ำกว่าระดับก่อนตัดกระดูกในสัปดาห์ที่ 6 และไม่สูงขึ้นอีกเลย ซึ่งระดับ BAP มีความสัมพันธ์กับสิ่งที่ปรากฏบนภาพถ่ายรังสี นอกจากนี้ระดับ BAP สามารถใช้เป็นสารบ่งชี้การทำงานของกระดูก สำหรับเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาหรือวิธีการที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเนื้อเยื่อกระดูกได้

สรุป

สุนัขปกติที่โตเต็มวัยมีระดับ BAP ในซีรัมเฉลี่ยประมาณ 23.3 ± 21.4 ขณะมีการสร้างกระดูกจะมีระดับ BAP เพิ่มขึ้น สุนัขป่วยโรคกระดูกอ่อนมีระดับ TAP, BAP และร้อยละของ BAP สูงกว่าของสุนัขปกติและสุนัขกระดูกหักแต่มีอัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสต่ำกว่าปกติ สุนัขที่มีกระดูกหัก 1 สัปดาห์มีระดับ TAP, BAP ร้อยละของ BAP ไม่ต่างจากของสุนัขปกติ ในระหว่างที่มีการสร้างกระดูกใหม่ระดับ TAP จะเพิ่มขึ้นและลดลงอย่างรวดเร็ว ขณะที่ BAP คงระดับสูงจนกระทั่ง 12 สัปดาห์ภายหลังผ่าตัด จึงค่อยๆ ลดลงในระยะที่มีการปรับรูปกระดูก

เอกสารอ้างอิง

- Akbari, M., Nikbakht, M., Sobhani, A., 2003. "Expression of Alkaline Phosphatase during Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Stromal Cells." [Online]. Available: <http://www.royaninstitute.org/yakhteh/Yakh-Eng/Yakh-Eng-Full-01-3.htm>
- 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. 1960-1966.
- Bowles, S.A., Kurd, N. and Davis, A.M., 1996. Serum osteocalcin, total and bone-specific alkaline phosphatase following isolated tibial shaft fracture. *Ann. Clin. Biochem.* 33. 196-200.
- Burtis, A.C. and Ashwood, R.E., 1994. Alkaline phosphatase, Enzymes. In: Tietz Text book of Clinical Chemistry, 2nd ed., A.C. Burtis and R.E. Ashwood (eds.) Philadelphia: W.B Saunders. 830-843.
- Calvo, M.S., Eyre, D.R. and Gundberg, C.M., 1996. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocrine Rev.* 17. 333-368.
- Delmas, P.D. 1988. Biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. In: Osteoporosis: Etiology, Diagnosis and Management. B.L. Riggs and L.J. Melton (eds.). New York: Raven Press. 297-316.
- Dorner, J.L., Hoffmann, W.E. and Long, B.G., 1974. Corticosteroid induction of isoenzyme of alkaline phosphatase in the dog. *Am. J. Vet. Res.* 35: 1457-1458.
- Govan, T.D.A., Macfarlane, S.P. and Callender, R. 1994. Special situation healing. In: Pathology Illustrated. 4thed. T.D.A. Govan, S.P. Macfarlane and R. Callender (eds.). London: 58-66.
- Gundberg, C. M., Looker, A. C., Nieman, S. D. and Calvo, M. S., 2002. Patterns of osteocalcin and bone specific alkaline phosphatase by age, gender, and race or ethnicity. *Bone.* 31 (6): 703-708.
- Hoffmann, W.E. and Dorner, J.L. 1975. Separation of isoenzymes of canine alkaline phosphatase by cellulose acetate electrophoresis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 11: 283-285.
- Hulth, A. 1989. Current concepts of fracture healing. *Clin. Ortho.* 249: 265-270.
- Jenkins, D.K., 2001. "Bone alkaline phosphatase, a serum bone turnover assay: usefulness in managing postmenopausal women receiving therapy to prevent or treat osteoporosis." [Online]. Available: http://www.quidel.com/Products/BoneHealth/Usefulness_BAP_In_Managing_Postmenopausal_Women.pdf

- Kleerekoper, M., Parikh, N. and Parfitt, A.M., 1995. Comparison of 3 methods for bone specific alkaline-phosphatase. *J. Bone Miner. Res.* 10: 371.
- Komoda, T., 2003. "Protein electrophoresis in pathological biochemistry." [Online]. Available: <http://proteome.tmig.or.jp/JES/JJE/v43n4summary/komoda.html>
- Kutzler, M.A., Solter, P.F., Hoffman, W.E. and Volkmann, D.H., 2003. Characterization and localization of alkaline phosphatase in canine seminal plasma and gonadal tissues, *Theriogenology*. 60(2): 299-306.
- Magnusson, P., Sharp, C.A. and Farley, J.R., 2002. Different distributions of human bone alkaline phosphatase isoforms in serum and bone tissue extracts. *Clinica Chimica Acta*. 325(1-2): 59-70.
- Moss, W.D. 1982. Alkaline phosphatase isoenzymes. *Clinical Chem.* 28: 2007-2016.
- Parviainen, M.T., 1998. "Human bone alkaline phosphatase isoforms." [Online]. Available: <http://www.bibl.liu.se/liu.se/liupubl/disp/disp98/med574s.htm>
- Pedrazzoni, M., Alfano, F.S., Girasole, G., 1996. Clinical observations with a new specific assay for bone alkaline phosphatase: a cross-sectional study in osteoporotic and pagetic subjects and longitudinal evaluation of the response to ovariectomy, estrogens, and bisphosphonates. *Calcif. Tissue Int.* 59: 334-338.
- Sanecki, R.K., Hoffmann, W.E., Hansen, R., and Schaeffer, D. 1993. Quantification of bone alkaline phosphatase in canine serum. *Vet. Clin. Path.* 22(1): 17-23.
- Scariano, J.K., Garry, P.J., Montoya, G.D., Chandani, A.K. Wilson, J.M. and Baumgartner, R.N., 2003. Serum leptin levels, bone mineral density and osteoblast alkaline phosphatase activity in elderly men and women. *Mechanisms of Ageing and Development*. 124 (3): 281-286.
- Taniguchi, T., Matsumoto, T. and Shindo, H., 2003. Changes of serum levels of osteocalcin, alkaline phosphatase, IGF-I and IGF-binding protein-3 during fracture healing. *Injury*. 34(7): 477-479.
- Woitge, H.W., Seibel, M.J. and Ziegler, R., 1996. Comparison of total and bone-specific alkaline phosphatase in patients with nonskeletal disorders or metabolic bone diseases. *Clin. Chem.* 42: 1796-1804.