


ความผิดปกติของวิลลินในผู้ป่วยเด็กทารกที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันและ  
โรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ



นางสาวอิงคนิจ ชลไกรสุวัฒน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขากุมารเวชศาสตร์ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1759-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABNORMALITIES OF VILLIN IN INFANTS WITH BILIARY ATRESIA  
AND OTHER CHOLESTATIC LIVER DISEASES



Miss Engcanit Cholkraisuwat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Pediatrics

Department of Pediatrics

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-53-1759-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์                      ความผิดปกติของวิลลิสในผู้ป่วยเด็กทารกที่เป็นโรคท่อน้ำดี  
ตีบตันและโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ

โดย    นางสาวอิงคนิจ ชลไกรสุขวัฒน์

สาขาวิชา                                      กุมารเวชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษา                              รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงวรนุช จงศรีสวัสดิ์

---

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์นายแพทย์ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา  
(รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงวรนุช จงศรีสวัสดิ์)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ไพศาล เวชชพิพัฒน์)

สภามหาวิทยาลัย  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อิงคินิจ ชลไกรสุวัฒน์ : ความผิดปกติของวิลลินในผู้ป่วยเด็กทารกที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันและโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ (ABNORMALITIES OF VILLIN IN INFANTS WITH BILIARY ATRESIA AND OTHER CHOLESTATIC LIVER DISEASES).อ.ที่ปรึกษา : รศ.พญ.วรรณุช จงศรีสวัสดิ์, 34 หน้า.ISBN 974-53-1759-4.

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความผิดปกติของ villin ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ และเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของ villin ในผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

วิธีการศึกษา ขึ้นเนื้อตับจากผู้ป่วยเด็กที่มีภาวะตัวเหลืองชนิดที่มีน้ำดีคั่งทำการตรวจจ้อมด้วย monoclonal antibody ของ villin ซึ่งแบ่งเป็น โรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 21 คน, โรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ จำนวน 4 คน และกลุ่มควบคุมที่ได้จากผู้บริจาคตับ จำนวน 6 คน โดยผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ favorable outcome (ค่า total bilirubin < 2 mg/dl หลังจากผ่าตัดโดยวิธี Kasai's operation เป็นระยะเวลา 1 ปี) และ unfavorable outcome (ค่า total bilirubin  $\geq$  2 mg/dl หลังจากผ่าตัดโดยวิธี Kasai's operation เป็นระยะเวลา 1 ปี หรือ เสียชีวิต) ส่วนผลการจ้อม villin จะแบ่งเป็น ผลบวก และผลลบ โดยผลบวก คือ การจ้อม villin ติดทั้งที่ apical cell และ รอบ cell membrane ของ bile ductular cell ส่วนผลลบ คือ การจ้อม villin ติดเฉพาะบริเวณ apical cell ของ bile ductular cell เท่านั้น

ผลการศึกษา ผลการจ้อม villin จากชิ้นเนื้อตับพบว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน 18 คน จาก 21 คน และกลุ่มควบคุม 2 คน จาก 6 คน มีผลการจ้อม villin เป็นผลบวก ส่วนผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ ทุกคนมีผลการจ้อม villin เป็นผลลบ ซึ่งผลการจ้อม villin ของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ และกลุ่มควบคุม ส่วนผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด favorable และ unfavorable outcome ผลการจ้อม villin ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สรุป ผลการจ้อม villin อาจจะช่วยในการวินิจฉัยแยกโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งในผู้ป่วยเด็กได้นอกจากนี้ผลการจ้อม villin ไม่มีความสัมพันธ์กับ prognostic outcome ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

ภาควิชา.....ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2547

4774799830 : MAJOR PEDIATRICS

KEY WORDS: cholestasis, biliary atresia, other cholestatic liver diseases, villin

ENGCANIT CHOLKRAISUWAT : ABNORMALITIES OF VILLIN IN INFANTS  
WITH BILIARY ATRESIA AND OTHER CHOLESTATIC LIVER DISEASES. THESIS  
ADVISOR : ASSOC.PROF.VORANUSH CHONGSRISAWAT M.D.34pp.ISBN974-  
53-1759-4

Objectives: To compare the abnormalities of villin in patients with cholestatic liver diseases and to correlate the difference of villin with prognostic outcome of biliary atresia.

Methods: Stored liver specimens of 21 children with biliary atresia, 4 children with other cholestatic liver diseases, and 6 donors of liver transplantation as the control group were stained with monoclonal antibody of villin. Biliary atresia patients were classified into favorable outcome (total bilirubin  $< 2$  mg/dl at 1 year post Kasai's operation) and unfavorable outcome (total bilirubin  $\geq 2$  mg/dl at 1 year post Kasai's operation or death at enrollment). Villin positive was defined by staining on apical cell and pericellular membrane of the bile ductular cell, whereas villin negative was staining only on apical cell of the bile ductular cell.

Results: Villin staining of 18/21 biliary atresia patients and 2/6 normal controls were positive. In contrast, all patients with other cholestatic liver diseases had negative villin staining. This difference was statistical significant when compared biliary atresia, other cholestatic liver diseases, and normal controls. There was no statistical difference of villin staining between biliary atresia patients with favorable and unfavorable outcome.

Conclusions: The pattern of villin staining may be useful in the differential diagnosis of cholestatic jaundice in children. There was no correlation between villin staining and prognostic outcome of biliary atresia.

Department of Pediatrics

Student's signature.....

Field of study of Pediatrics

Advisor's signature.....

Academic year 2004

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของบุคคลต่างๆที่  
เกี่ยวข้องมากมาย ขอขอบพระคุณทุกท่านดังกล่าวนี้

รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงวรรณุช จงศรีสวัสดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้  
ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆในการวิจัยด้วยดีมาตลอด

ศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณและผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ไพศาล เวชช  
พัฒน์ที่ช่วยตรวจและแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิงนฤมล วิเศษโอบาสอาจารย์ประจำภาคพยาบาลวิทยาและ  
คุณปรีชา เรืองเวชวรชัยนักเทคนิคการแพทย์ (ชันนาญการ) 8 ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์  
มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสละเวลาเพื่อการตัด ย้อมชิ้นเนื้อตับและแปลผล วิเคราะห์

แพทย์ประจำบ้านและเจ้าหน้าที่พยาบาลตึกสิริกิติ์ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเก็บข้อมูล  
และเก็บตัวอย่างส่งตรวจ

ทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์และกลุ่มวิทยานิพนธ์เพื่อการตีพิมพ์เผยแพร่ จึงขอขอบพระคุณ  
มา ณ ที่นี้ด้วย

ผลความดีและประโยชน์ที่ได้รับจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ขอมอบให้แก่ผู้ป่วยเด็กที่  
โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ทุกคน

ทำยนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และบูรพาจารย์ทุกท่าน ที่เป็นหลัก เป็น  
กำลัง และเป็นพลังใจ ให้กับผู้นิพนธ์เสมอมา

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตารางและแผนภูมิ.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1. บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
บทที่ 3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	8
ประชากรและตัวอย่าง.....	8
วัตถุประสงค์และวิธีการ.....	8
การรวบรวมข้อมูล.....	11
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	11
ปัญหาทางจริยธรรม.....	11
บทที่ 4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูลศึกษา.....	12
บทที่ 5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	23
สรุปผลการวิจัย.....	23
อภิปรายผลการวิจัย.....	23
ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการทำการวิจัยครั้งต่อไป.....	25
รายการอ้างอิง.....	26
ภาคผนวก.....	28
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	34

## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงจำนวนผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน, โรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ และผู้บริจาคตับ (กลุ่มควบคุม).....	12
ตารางที่ 2 แสดงจำนวนผู้ป่วยทั้งโรคท่อน้ำดีตีบตัน, โรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆและผู้บริจาคตับ (กลุ่มควบคุม) โดยแยกตามเพศ.....	13
ตารางที่ 3 แสดงค่าการทำงานของตับโดยแสดง ค่าต่ำสุด (min), ค่าสูงสุด (max), ค่าเฉลี่ย (mean), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดยเปรียบเทียบระหว่างโรคท่อน้ำดีตีบตันและโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ.....	15
ตารางที่ 4 แสดงจำนวนผู้ป่วยที่ได้ผลการย้อม villin positive และ negative โดยแยกเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน,โรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆและผู้บริจาคตับ (กลุ่มควบคุม).....	16
ตารางที่ 5 แสดงจำนวนผู้ป่วยโดยเปรียบเทียบโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด favorable และ unfavorable outcome และผลการย้อม villin.....	17
ตารางที่ 6 แสดงจำนวนผู้ป่วยในแต่ละ grading ของการย้อม villin โดยเปรียบเทียบระหว่างโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด favorable และ unfavorable outcome.....	18
ตารางที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ย percent ของการย้อม villin โดยเปรียบเทียบระหว่างโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด favorable และ unfavorable outcome.....	19
แผนภูมิ	
แผนภูมิที่ 1 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนผู้ป่วยในแต่ละอายุที่มาพบแพทย์โดยแบ่งเป็นผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ.....	14



## สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
ภาพที่ 1 หน้าที่ของ villin.....	7
ภาพที่ 2 ภาพ liver tissue ของกลุ่ม control (ผู้บริจาคตับ).....	20
ภาพที่ 3 ภาพ liver tissue ของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน (biliary atresia).....	21
ภาพที่ 4 ภาพ liver tissue ของโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ (choledochal cyst)....	22



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ภาวะน้ำดีคั่ง (cholestasis) คือ ภาวะที่มีความผิดปกติในการสร้างหรือการขับถ่ายน้ำดีทำให้ น้ำดีและส่วนประกอบต่างๆของน้ำดีคั่งในตับและในกระแสเลือด มีผลทำลายเซลล์ตับ ผู้ป่วยที่มี cholestasis จะมีอาการตัวเหลือง ตาเหลือง ปัสสาวะสีเหลืองเข้ม อุจจาระสีเหลืองซีดหรือสีครีม และค่า direct bilirubin สูงเกินร้อยละ 20 ของ total bilirubin

โรคตับชนิด cholestasis (cholestatic liver disease) อาจมีสาเหตุจากความผิดปกติของการสร้างน้ำดี (bile formation) โดยเซลล์ตับหรือความผิดปกติของ bile flow ผ่านท่อน้ำดีทั้งที่อยู่ภายในและภายนอกตับ ความผิดปกติเหล่านี้ อาจเกิดในทารกก่อนหรือหลังคลอดก็ได้ ภาวะ cholestatic jaundice ที่พบในวัยทารกยังมีการศึกษาไม่มากนักในประเทศไทย ข้อมูลส่วนใหญ่ต้องอาศัยการอ้างอิงจากต่างประเทศซึ่งมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากคนไทย กุมารแพทย์ในประเทศไทยมีประสบการณ์การดูแลรักษาผู้ป่วย neonatal cholestasis ที่ไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัดเป็นจำนวนมาก ซึ่งผู้ป่วยในกลุ่มนี้บางรายมีการดำเนินโรคกลายเป็นตับแข็งและโรคตับระยะสุดท้าย โรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นสาเหตุของ neonatal cholestasis ที่พบบ่อยที่สุด ในปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันที่แน่ชัด สันนิษฐานว่าอาจเกิดจากการติดเชื้อ ความผิดปกติแต่กำเนิด สารพิษหรือความผิดปกติทาง immune มีการศึกษาพบว่ามี ความผิดปกติของยีนที่ควบคุม cell signaling, transcription regulation, hepatic development, morphogenesis และ fibrogenesis ในโรคท่อน้ำดีตีบตัน ยังเป็นที่ถกเถียงกันถึง onset ของโรคท่อน้ำดีตีบตันว่าเกิดขึ้นตั้งแต่เมื่อใด ผู้ป่วยบางคนซึ่งเป็นส่วนน้อยมีอาการตัวเหลืองตั้งแต่แรกเกิด ทำให้เชื่อว่า onset เกิดระหว่าง embryogenesis แต่ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันส่วนใหญ่มีอาการตัวเหลืองหลังอายุ 2 สัปดาห์ ซึ่งเชื่อว่า onset เกิดภายหลังคลอด การวินิจฉัยที่แน่นอนของโรคท่อน้ำดีตีบตันคือการผ่าตัดฉีดสารทึบแสงหรือ methylene blue เข้าไปในท่อน้ำดี cystic duct หรือท่อน้ำดีเพื่อดูความผิดปกติ (operative cholangiography) (กรณีที่ผู้ป่วยไม่มี cystic duct หรือท่อน้ำดีแพทย์ศัลยกรรมจะไม่สามารถทำ cholangiography ได้) ซึ่งเป็นวิธีการที่ invasive ส่วนการรักษาโรคนี้คือการผ่าตัดทำ hepatopertoenterostomy (Kasai's operation) เพื่อระบายน้ำดีลงสู่ลำไส้เล็ก แต่ถึงแม้ผู้ป่วยจะได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัดแล้ว ประมาณร้อยละ 80 ยังมีการดำเนินโรคไปสู่ end-stage liver failure ซึ่งต้องรักษาด้วยการผ่าตัดปลูกถ่ายตับ

เนื่องจากโรคท่อน้ำดีตีบตันมี onset ของโรคและผลการรักษาด้วยการผ่าตัด Kasai's operation ที่แตกต่างกัน ทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจว่าปัจจัยอะไรบ้างที่ทำให้การดำเนินโรคมีความแตกต่างกันในผู้ป่วยแต่ละคน มีความเป็นไปได้ที่ยีนที่มีผลต่อ bile secretion เช่นยีน villin ผิดปกติทำให้เกิดตัวเหลืองตั้งแต่แรกเกิด ทำให้มี prolonged cholestasis และนำไปสู่ biliary cirrhosis ในที่สุด villin เป็นส่วนประกอบของ microvilli ที่ canalicular membrane ของเซลล์ตับ villin ช่วยในการ maintain structural integrity ของ canalicular microvilli ในตับ มีการศึกษาพบว่า villin เป็นส่วนประกอบของ hepatic-growth-factor-dependent cytoskeleton-remodelling pathway ซึ่งเป็นขบวนการที่มีบทบาทสำคัญในขั้น morphogenesis ของอวัยวะต่างๆรวมทั้งตับและท่อน้ำดี ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานไว้ว่า ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจะมี villin แตกต่างกับผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆและกลุ่มควบคุมนอกจากนี้ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด favorable และ unfavorable outcome น่าจะมีผลการย้อม villin แตกต่างกัน

การศึกษานี้จะสามารถบอกความแตกต่าง ความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของการย้อม villin เปรียบเทียบระหว่างโรคท่อน้ำดีตีบตันและโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆและเป็นการคาดคะเนผลการรักษาในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันได้ เพื่อใช้เป็นประโยชน์ในทางคลินิกต่อไป

### คำถามการวิจัย

- 1) ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีผลการย้อม villin แตกต่างจากผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆหรือไม่
- 2) ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด favorable และ unfavorable outcome มีผลการย้อม villin แตกต่างกันหรือไม่

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) เพื่อเปรียบเทียบผลการย้อม villin ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ
- 2) เพื่อเปรียบเทียบผลการย้อม villin ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด favorable และ unfavorable outcome

## คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

ภาวะคั่งของน้ำดี (cholestasis)

คือ ภาวะที่มีความผิดปกติในการสร้างหรือการขับถ่ายน้ำดีทำให้น้ำดีและส่วนประกอบต่างๆของน้ำดีคั่งในตับและในกระแสเลือด มีผลทำลายเซลล์ตับ ผู้ป่วยที่มี cholestasis จะมีอาการตัวเหลือง ตาเหลือง ปัสสาวะสีเหลืองเข้ม อุจจาระสีเหลืองซีดหรือสีครีมและค่า direct bilirubin สูงเกินร้อยละ 20 ของ total bilirubin

โรคท่อน้ำดีตีบตัน (biliary atresia)

คือ เป็น severe cholestatic liver disease โดยมีการตีบตันในส่วน extrahepatic biliary tree ซึ่งมีผลทำให้เกิด biliary cirrhosis ถ้าไม่ได้รับการรักษา ยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด

โรคตับชนิดที่มีท่อน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ (other cholestatic liver diseases)

คือ โรคตับที่มีการคั่งของน้ำดีจากสาเหตุอื่นๆ ที่ไม่ใช่ biliary atresia โดยผู้ป่วยจะมีอาการตัวเหลือง ปัสสาวะเข้ม อุจจาระสีซีดหรือสีครีม ได้ในการวิจัยครั้งนี้จะใช้แทนด้วยคำว่า non biliary atresia (non BA)

วิลลิน (villin)

คือ actin binding protein ที่มีส่วนในการ maintain structural integrity ของ canalicular microvilli ในตับและเป็นส่วนประกอบของ hepatic-growth-factor-dependent cytoskeleton-remodeling pathway ซึ่งเป็นขบวนการที่มีบทบาทสำคัญในขั้น morphogenesis ของอวัยวะต่างๆรวมทั้งตับและท่อน้ำดี

โรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด favorable outcome

คือ ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่หลังจากการทำ Kasai's operation เป็นระยะเวลา 1 ปี แล้วไม่มีภาวะตัวเหลืองหรือ total bilirubin  $< 2$  mg/dl

โรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด unfavorable outcome

คือ ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่หลังจากการทำ Kasai's operation เป็นระยะเวลา 1 ปีแล้วยังมีภาวะตัวเหลืองหรือ total bilirubin  $\geq 2$  mg/dl หรือเสียชีวิต

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) เพื่อให้ทราบว่าผลการยับยั้ง villin ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆมีความแตกต่างกัน โดยสามารถใช้การยับยั้ง villin จากชั้นเนื้อตับเป็นการตรวจคัดกรองก่อนการทำ operative cholangiography ได้ในอนาคต
- 2) เพื่อให้ทราบว่าผลการยับยั้ง villin สามารถใช้คาดคะเนผลการรักษาในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันได้

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคตับชนิด cholestasis (cholestatic liver disease) มีสาเหตุจากความผิดปกติของการสร้างน้ำดี (bile formation) โดยเซลล์ตับหรือความผิดปกติของ bile flow ผ่านท่อน้ำดีทั้งที่อยู่ภายในและภายนอกตับ ความผิดปกติเหล่านี้อาจเกิดในทารกก่อนหรือหลังคลอดก็ได้ ภาวะ cholestatic jaundice ที่พบในวัยทารกยังมีการศึกษาไม่มากนักในประเทศไทย ข้อมูลส่วนใหญ่ต้องอาศัยการอ้างอิงจากต่างประเทศซึ่งมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากคนไทย

Ubol B. และคณะ ได้ทำการศึกษาผู้ป่วยเด็กที่มีภาวะ cholestatic jaundice ที่อายุแรกคลอด - 1 ปี ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่ 1 มกราคม 2530 ถึง 31 ธันวาคม 2534 จำนวน 123 ราย พบว่าสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากโรคตับอักเสบในทารกคิดเป็นร้อยละ 43 และโรคท่อน้ำดีตีบตันคิดเป็นร้อยละ 22 โดยอายุที่ผู้ป่วยมาพบแพทย์ส่วนใหญ่ คือ 2-4 เดือน (1)

ภาวะ cholestatic jaundice ที่พบในวัยทารกอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุเช่น

- การติดเชื้อของเซลล์ตับจากแบคทีเรีย ไวรัสหรือโปรโตซัว
- โรคทางเมตาบอลิก เช่น galactosemia, tyrosinemia,  $\alpha$ -1 antitrypsin deficiency
- ความผิดปกติของท่อน้ำดีเช่น ท่อน้ำดีตีบตัน (extrahepatic biliary atresia), ท่อน้ำดีโป่งพอง (choledochal cyst), ท่อน้ำดีในตับลดจำนวนลง (paucity of interlobular bile duct)
- Parenteral nutrition หรือยาบางชนิด
- Idiopathic neonatal hepatitis

กุมารแพทย์ในประเทศไทยมีประสบการณ์การดูแลรักษาผู้ป่วย neonatal cholestasis ที่ไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัดเป็นจำนวนมาก ซึ่งผู้ป่วยในกลุ่มนี้บางรายมีการดำเนินโรคกลายเป็นตับแข็งและโรคตับระยะสุดท้าย เมื่อเกิดภาวะ cholestasis การ excrete สารต่างๆจากตับจะเสียไป ผู้ป่วยจะมีอาการตัวเหลือง, คัน, xanthoma, ระดับ cholesterol, alkaline phosphatase, total bilirubin และ bile acids ในเลือดสูงขึ้น

โรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นสาเหตุของ neonatal cholestasis ที่พบบ่อยที่สุดและยังเป็นข้อบ่งชี้ในการทำผ่าตัดปลูกถ่ายตับในเด็กที่พบบ่อยที่สุด (2) อุบัติการณ์ของโรคประมาณ 1:10,000 ของเด็กเกิดมีชีวิต ไม่ทราบอุบัติการณ์ของโรคในประเทศไทย ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์มีผู้ป่วยโรคนี้ประมาณปีละ 10-15 ราย (3) โรคนี้ทำให้มีการตีบตันของท่อน้ำดีภายนอกตับและทำให้เกิด

biliary cirrhosis และเสียชีวิตภายในอายุ 2 ปีเป็นส่วนใหญ่นักถ้าไม่ได้รับการรักษาอย่างเหมาะสม การรักษาใช้การผ่าตัด hepatoportoenterostomy (Kasai's operation) เพื่อระบายน้ำดีลงสู่ลำไส้เล็ก แต่ถึงแม้ผู้ป่วยจะได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัดแล้ว ประมาณร้อยละ 80 ยังมีการดำเนินโรคไปสู่ end-stage liver failure ซึ่งต้องรักษาด้วยการผ่าตัดปลูกถ่ายตับ (4)

ในปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันที่แน่ชัด สันนิษฐานว่าอาจเกิดจากการติดเชื้อ ความผิดปกติแต่กำเนิด สารพิษหรือความผิดปกติทาง immune (5) มีการศึกษาพบว่ามีความผิดปกติของยีนที่ควบคุม cell signaling, transcription regulation, hepatic development, morphogenesis และ fibrogenesis ในโรคท่อน้ำดีตีบตัน (6,7) cytokines และ growth factors ที่หลั่งในภาวะที่มี inflammation สามารถ induce ให้เกิด remodeling ของ bile duct epithelium มีการศึกษาสนับสนุนว่าภาวะ bile duct obliteration และ subsequent loss of bile ducts ที่พบในโรคท่อน้ำดีตีบตันอาจเกิดจาก biliary epithelium remodeling ผิดปกติ (8)

ยังเป็นที่ถกเถียงกันถึง onset ของโรคท่อน้ำดีตีบตันว่าเกิดขึ้นตั้งแต่เมื่อใด ผู้ป่วยบางคนซึ่งเป็นส่วนน้อยมีอาการตัวเหลืองตั้งแต่แรกเกิด (ชนิด embryogenic หรือ fetal) และอาจพบร่วมกับ congenital anomalies อื่นๆ เช่น โรคหัวใจ, situs inversus, intestinal malrotation, asplenia หรือ polysplenia ทำให้เชื่อว่า onset เกิดระหว่าง embryogenesis โดยมีความผิดปกติของ epithelial deletion และ mesenchymal proliferation ที่จำเป็นสำหรับการ form ท่อน้ำดีปกติ (9,10) แต่ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันส่วนใหญ่ (65-90%) (11) มีอาการตัวเหลืองหลังอายุ 2 สัปดาห์ (ชนิด classic) ซึ่งเชื่อว่า onset เกิดภายหลังคลอด ยง ภูววรรณและคณะทำการศึกษาในเด็กที่เป็น dizygotic twins 1 คู่และ monozygotic twins 7 คู่พบว่าโรคท่อน้ำดีตีบตันเพียงคนเดียวทุกคู่ (3) ซึ่งช่วยสนับสนุนทฤษฎีของ onset ที่เกิดภายหลังคลอด

เนื่องจากโรคท่อน้ำดีตีบตันมี onset ของโรคและผลการรักษาด้วยการผ่าตัด Kasai's operation ที่แตกต่างกัน ทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจว่าปัจจัยอะไรบ้างที่ทำให้โรคมีความแตกต่างกันในผู้ป่วยแต่ละคน มีความเป็นไปได้ที่ยีนที่มีผลต่อ bile secretion ผิดปกติทำให้เกิดตัวเหลืองตั้งแต่แรกเกิด ทำให้มี prolonged cholestasis และนำไปสู่ biliary cirrhosis ในที่สุด ความหลากหลายของการดำเนินโรคในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันทำให้สันนิษฐานว่าโรคนี้น่าจะเป็น heterogeneous disorder และ common phenotype ของความผิดปกติของ inflammatory, fibrogenic และ morphogenetic factors ประกอบกัน (12)

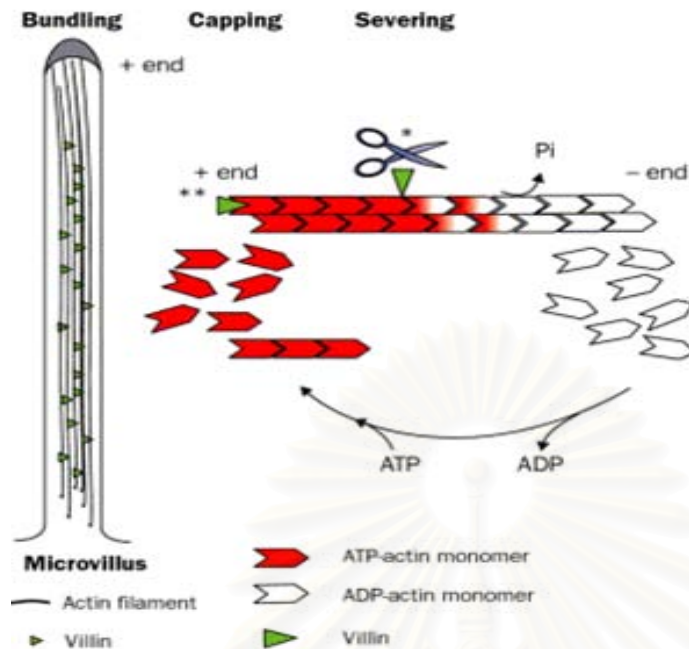
เซลล์ตับ (hepatocyte) มีลักษณะเป็น polarized epithelial cells ซึ่งล้อมรอบโดย membrane 3 ชนิดคือ (13-15)

- 1) Sinusoidal หรือ basolateral membrane เป็นผนังของ sinusoidal space



- 2) Apical หรือ canalicular membrane อยู่รอบๆ bile canaliculi ซึ่งมี microvilli เป็นแหล่งของโปรตีนที่มีความสำคัญต่อ bile secretion (membrane transporters) ได้แก่ bile-salt export-pump BSEP, phospholipid translocator MDR3 และ organic-anion-transporting protein MRP2 ดังนั้นถ้ามี disruption ของ microvilli จะทำให้เกิดภาวะ cholestasis
- 3) Lateral hepatic membrane อยู่ระหว่างเซลล์ตับ โดยมี tight junction complexes แบ่งแยก sinusoidal space ออกจาก bile canaliculi นอกจากนี้ยังมี nonparenchymal cells ในตับทำหน้าที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับ hepatic response ต่อ injury และ inflammation เช่น
- Macrophage-derived Kupffer cells อยู่ใน sinusoidal space ทำหน้าที่เป็น phagocytic cells และหลั่ง mediators ตอบสนองต่อภาวะ inflammation ของตับ
  - Stellate cell (lipocyte, fat storage cell, Ito cell) เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ผลิต extracellular collagen และ fibrogenic response ต่อ liver injury การ activate stellate cells โดย cytokines ให้กลายเป็น myofibroblast-like state มีความสัมพันธ์กับ collagen gene expression, การลดลงของ intracellular vitamin A content, และ profound morphologic changes ในตับ การควบคุมการ activate stellate cell เป็นปัจจัยเริ่มแรกในการเกิด hepatic fibrosis และตับแข็ง (cirrhosis)

Villin, fimbrin และ actin เป็นส่วนประกอบของ microvilli ที่ canalicular membrane ของเซลล์ตับ, brush border ของ enterocytes, renal proximal tubule และตับอ่อน (16,17) villin เป็น calcium-dependent actin-binding protein ขนาด 95 kDa ในภาวะที่มีแคลเซียมต่ำ villin ทำหน้าที่ในการ bundling ของ actin filament ส่วนในภาวะที่มีแคลเซียมสูง villin จะทำหน้าที่กระตุ้นการ severing ของ actin filament หน้าที่ของ villin ดังแสดงในรูปที่ 1. โปรตีน villin ช่วยในการ maintain structural integrity ของ canalicular microvilli ในตับ การศึกษาของ Athman และคณะพบว่า villin เป็นส่วนประกอบของ hepatocyte-growth-factor-dependent, cytoskeleton-remodeling pathway ซึ่งเป็นขบวนการที่มีบทบาทสำคัญในขั้น morphogenesis ของอวัยวะต่างๆรวมทั้งตับและท่อน้ำดี (18) villin gene ของมนุษย์อยู่บนโครโมโซม 2q35-36 (19) ประกอบด้วย DNA ขนาด 25 kb และมี 19 exons



ภาพที่ 1. หน้าที่ของ villin

M.J. Phillips และคณะได้รายงานผู้ป่วยที่เป็น neonatal cholestatic disease และมีท่อน้ำดีนอกตับตีบตันในภายหลังจำนวน 3 คนพบว่าผู้ป่วยไม่มี villin protein และ mRNA(20) ผู้ป่วยกลุ่มนี้ไม่ได้เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด classic เนื่องจากผล liver biopsy พบลักษณะ giant-cell transformation, mild cholestasis, portal inflammation, mild fibrosis และท่อน้ำดีลดจำนวนลง ส่วนในโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด classic ผล liver biopsy จะพบเป็น portal fibrosis, bile duct proliferation, cholangitis และ cholestasis จากการศึกษาที่สรุปว่าความผิดปกติของ villin gene expression ทำให้เกิด severe malformation ของ canalicular microvillus structure, รบกวนการทำงานของ transport proteins ที่จำเป็นสำหรับ bile formation ที่ canalicular membranes เป็นกลไกสำคัญทำให้เกิด cholestasis สิ่งที่น่าสนใจคือยังไม่ทราบว่า villin gene defect ที่พบในผู้ป่วยกลุ่มนี้เป็นโรคทางพันธุกรรมหรือเกิดจากการติดเชื้ระหว่าง embryogenesis เนื่องจากมีรายงานพบว่าการติดเชื้ออาจทำให้มี disruption ของ villin expression (21)

จากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นช่วยสนับสนุนว่า structure และ function ของ microvilli น่าจะมีความสำคัญต่อ bile canalicular biology จุดประสงค์ของการศึกษาคือเพื่อดูบทบาทของ canalicular-associated cytoskeletal proteins เช่น villin ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและโรคตีบตันที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### รูปแบบการวิจัย

การวิจัยเชิงพรรณนา ณ จุดใดจุดหนึ่ง (Cross Sectional Descriptive Design)

#### ระเบียบวิธีการวิจัย

##### 1) ประชากรที่ศึกษา

Inclusion criteria ผู้ป่วยเด็กที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันและโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆที่มารักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

Exclusion criteria ผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการทำ liver biopsy

##### 2) การคำนวณขนาดตัวอย่าง

เป็นการสุ่มตัวอย่างโดยไม่อาศัยทฤษฎีความน่าจะเป็น (non-probability sampling) โดยการเลือกตัวอย่างจากจุดมุ่งหมาย (purposive sampling)

โดยในแต่ละปีจะมีผู้ป่วยที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันมารักษาประมาณ 10-15 รายต่อปีจึงได้กำหนดกลุ่มประชากรเป้าหมาย ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน (biliary atresia) โดยวิธี operative cholangiography จำนวน 20 ราย และแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

- favorable outcome คือ ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่หลังจากการทำ Kasai's operation เป็นระยะเวลา 1 ปีแล้วไม่มีภาวะตัวเหลืองหรือ total bilirubin < 2 mg/dl
- unfavorable outcome คือ ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่หลังจากการทำ Kasai's operation เป็นระยะเวลา 1 ปีแล้วยังมีภาวะตัวเหลืองหรือ total bilirubin  $\geq$  2 mg/dl หรือเสียชีวิต

กลุ่มที่ 2 กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ (non biliary atresia) จำนวน 10 ราย

กลุ่มที่ 3 กลุ่มควบคุมที่มีชิ้นเนื้อตับ (liver tissue) ปกติซึ่งได้จากผู้บริจาคตับ จำนวน 10 ราย

### 3) วัตถุประสงค์และวิธีการ

#### 3.1) การเก็บชิ้นเนื้อตับ

ชิ้นเนื้อตับจะเก็บจากผู้ป่วยที่มีภาวะตัวเหลือง จากการที่มีน้ำดีคั่งทั้งจาก โรคท่อน้ำดีตีบตันและโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ โดยวิธีการได้ชิ้นเนื้อตับคือ ศัลยแพทย์จะเก็บชิ้นเนื้อตับในขณะที่ทำ operative cholangiography ซึ่งเป็นขั้นตอนที่จะต้องทำก่อนการทำ Kasai 's operation และชิ้นเนื้อตับบางส่วนได้จากการทำ percutaneous liver biopsy

#### 3.2) การตรวจชิ้นเนื้อตับ

การตรวจ immunohistochemistry เพื่อศึกษา villin

#### 3.3) วิธีการทาง Immunohistochemistry

##### 3.3.1 Slide preparation

- ชิ้นเนื้อตับซึ่งถูกเก็บไว้ใน paraffin block
- เตรียม formalin-fixed, paraffin-embedded section บน slide ที่เคลือบด้วย 3-aminopropyltriethoxysilane
- อบที่ 60 °c เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- deparaffinize slides ใน xylene 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที
- rehydrate slides ด้วย absolute ethyl alcohol, 95% ethyl alcohol, น้ำกลั่น ตามลำดับ

##### 3.3.2 Epitope retrieval

- แช่ slides ที่มี specimen ลงใน citrate buffer pH6 (citric acid 2.1 g+น้ำ 1 L+2M NaOH 13 cc) ใน pressure cooker
- ตั้งไฟรอจนเดือดจนได้ pressure ที่ต้องการทิ้งไว้ 1 นาที
- ทำให้อุณหภูมิลดลงอย่างรวดเร็ว

##### 3.3.3 Block endogenous peroxidase activity

- วรอบ section ด้วย DAKO PEN
- หยด 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in distilled water 200 µL
- incubate 5 นาที
- ล้างด้วย PBS (phosphate-buffered saline), pH7.4 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

##### 3.3.4 Block nonspecific background

- หยด 3% Normal horse serum 200 µL

- incubate 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

### 3.3.5 Antibody application

- drain excess 3% Normal horse serum
- หยด villin (Biosciences, BD Pharmingen lot No.0000082566, cat No.610358, USA) dilution (1:100)
- incubate 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- ล้างด้วย PBS, pH7.4 2 ครั้งๆละ 5 นาที
- หยด detection kit DAKO (Envision system), HRP (DAB) code No.K1392 200  $\mu$ L
- incubate 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- ล้างด้วย PBS, pH7.4 2 ครั้งๆละ 5 นาที

### 3.3.6 Colour development

- หยด DAB (3,3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride) 200  $\mu$ L
- incubate 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง, monitor under microscope
- ล้างด้วยน้ำกลั่น
- counterstain ด้วย Hematoxylin
- mount slide

### 3.4) ขั้นตอนการอ่านผล

การอ่านผลย้อม monoclonal antibody ของ villin ทำโดยผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิงนฤมล วิเศษโสภาส อาจารย์ประจำภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพียง 1 ท่านโดยการอ่านสไลด์ผู้อ่านสไลด์จะไม่ทราบการวินิจฉัยโรคทางคลินิก ซึ่งการอ่านผลจะแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ

#### 1) positive และ negative

- positive คือ การย้อมติด villin ที่บริเวณ apical cell และรอบ cell membrane ของ bile ductular cell
- negative คือ การย้อมติด villin ที่บริเวณ apical cell ของ bile ductular cell เท่านั้น

#### 2) intensity of villin staining แสดงเป็น grading 1+ to 4+

#### 3) percent การย้อมติด villin เทียบกับ area of liver tissue บนสไลด์ทั้งหมด

## การรวบรวมข้อมูล

### 1) ข้อมูลผู้ป่วย

1.1) ข้อมูลทั่วไป เพศ, อายุที่มาพบแพทย์, ลักษณะอุจจาระ, ลักษณะปัสสาวะ, ประวัติมารดา, ประวัติการคลอด, ประวัติเรื่องหายเหลืองหลังผ่าตัดในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน ตรวจร่างกายโดยละเอียด และบันทึกลงไปในรูปแบบบันทึกโดยผู้ทำการวิจัย

1.2) ข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ ข้อมูลการทำงานของตับ SGOT, SGPT, alkaline phosphatase, albumin, globulin, total bilirubin, direct bilirubin

### 2) ข้อมูลผลการย้อม monoclonal antibody ของ villin

## การวิเคราะห์ข้อมูล

1) การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ค่าเฉลี่ย (mean) เปอร์เซ็นต์ (percentage) สัดส่วน (ratio)

2) การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงวิเคราะห์ (analytic statistics) ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบระหว่างโรคท่อน้ำดีตีบตันและโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ โดยใช้ Mann-Whitney test สำหรับ continuous data และใช้ Chi-square test หรือ Fisher 's Exact test สำหรับ discontinuous data ขึ้นกับจำนวนตัวอย่าง การวิเคราะห์ใช้โปรแกรม SPSS 11.5 โดยค่า  $p < 0.05$  มีนัยสำคัญทางสถิติ

## ปัญหาทางจริยธรรม

โครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเป็นที่เรียบร้อยแล้วทั้งระเบียบการศึกษาวิจัยและเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในงานวิจัย การวิจัยนี้เป็นการศึกษาขั้นเนื้อต่อกับการย้อมติด monoclonal antibody ของ villin ซึ่งขั้นเนื้อต่อบนี้ได้ในขณะที่ศัลยแพทย์ทำ operative cholangiography ซึ่งเป็นขั้นตอนในการวินิจฉัยที่แน่นอนในผู้ป่วยที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันซึ่งต้องทำทุกราย จึงไม่ได้เพิ่มความเสี่ยงกับผู้ป่วยมากขึ้น รวมทั้งได้รับความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากผู้ปกครองของผู้ป่วยที่นำมาศึกษา โดยผู้วิจัยได้ให้ข้อมูลอย่างละเอียดและชัดเจนเพียงพอก่อนการเซ็นใบยินยอม

## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลแสดงจำนวนผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ

	จำนวนผู้ป่วย(คน)	จำนวนผู้ป่วย(ร้อยละ)
โรคท่อน้ำดีตีบตัน	21	67.7
โรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ	4	12.9
ผู้บริจาคตับ (กลุ่มควบคุม)	6	19.4
จำนวนรวม	31	100

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆและผู้บริจาคตับ (กลุ่มควบคุม)

จากการเก็บข้อมูลพบว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน 21 คน คิดเป็นร้อยละ 67.7, โรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ 4 คน คิดเป็นร้อยละ 12.9 และผู้บริจาคตับ (กลุ่มควบคุม) 6 คน คิดเป็นร้อยละ 19.4

โดยผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆแบ่งเป็น

รายที่1 วินิจฉัยว่าเป็น neonatal hepatitis ซึ่งหลังจากติดตามอาการพบว่าผู้ป่วยหายเหลือง

รายที่2 วินิจฉัยว่าเป็น neonatal hepatitis เมื่อทำ operative cholangiography พบว่าสารทึบแสงสามารถผ่านไปที่ลำไส้และ intrahepatic duct ได้ แต่ผ่านเพียงเล็กน้อยร่วมกับผลการทำ liver biopsy พบว่าเข้าได้กับ neonatal hepatitis ซึ่งหลังจากการผ่าตัดผู้ป่วยก็ไม่ได้มาติดตามอาการอีก

รายที่3 วินิจฉัยว่าเป็น neonatal hepatitis และผล DISIDA scan พบว่ามีการขับ isotope ลงมาในลำไส้ได้ ซึ่งหลังจากติดตามอาการพบว่าผู้ป่วยหายเหลือง

รายที่4 วินิจฉัยว่าเป็น choledochal cyst จากผลอัลตราซาวน์และการผ่าตัด ซึ่งหลังจากติดตามอาการหลังการผ่าตัดพบว่าผู้ป่วยหายเหลือง

ข้อมูลแสดงจำนวนผู้ป่วยทั้งโรคท่อน้ำดีตีบตันและโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ โดยแยกตามเพศ

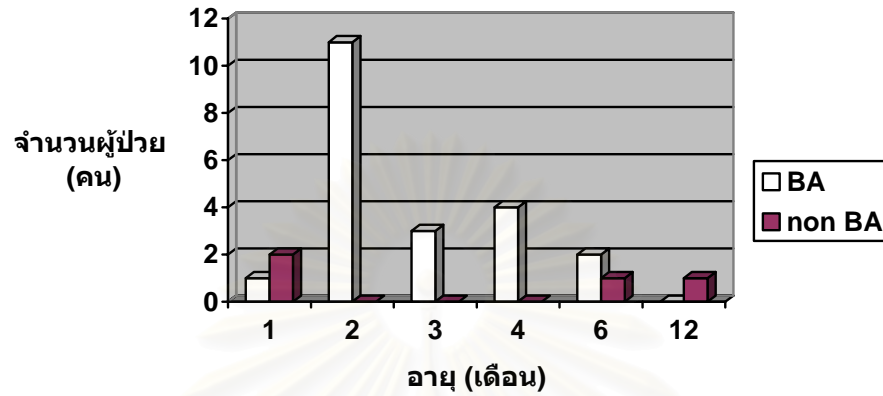
	จำนวนผู้ป่วย(คน)		จำนวนรวม(คน)
	ชาย	หญิง	
โรคท่อน้ำดีตีบตัน	7	14	21
โรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ	2	2	4
ผู้บริจาคตับ (กลุ่มควบคุม)	2	4	6
จำนวนรวม	11	20	31

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลจำนวนผู้ป่วยทั้งโรคท่อน้ำดีตีบตันและโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆและผู้บริจาคตับ (กลุ่มควบคุม) โดยแยกตามเพศ

จากการเก็บข้อมูลพบว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นเพศชาย 7 คน เป็นเพศหญิง 14 คน, โรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆเป็นเพศชาย 2 คน เป็นเพศหญิง 2 คน และผู้บริจาคตับ (กลุ่มควบคุม) เป็นเพศชาย 2 คน เป็นเพศหญิง 4 คน

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อมูลแสดงจำนวนผู้ป่วยในแต่ละอายุโดยแบ่งเป็นผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ



แผนภูมิที่ 1 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนผู้ป่วยในแต่ละอายุที่มาพบแพทย์โดยแบ่งเป็นผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ

จากกราฟแสดงจำนวนผู้ป่วยในแต่ละอายุซึ่งส่วนใหญ่ผู้ป่วยมาพบแพทย์ด้วยภาวะตัวเหลืองที่อายุ 2-6 เดือน

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ข้อมูลแสดงค่าการทำงานของตับ SGOT, SGPT, alkaline phosphatase, albumin, globulin, total bilirubin, direct bilirubin โดยแยกเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน และโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ

	MIN		MAX		MEAN+/- SD		P value
	BA	Non BA	BA	Non BA	BA	Non BA	
SGOT (U/L)	141	44	777	430	321.3 (+/-174.06)	240.67 (+/-193.11)	0.191
SGPT (U/L)	91	53	489	366	212.20 (+/-118.11)	175.33 (+/-167.32)	0.279
albumin (g/dl)	1.9	3.3	5.7	4.9	3.69 (+/-0.827)	3.83 (+/-0.924)	0.834
globulin (g/dl)	1.9	2.3	5.4	3.4	3.03 (+/-0.951)	2.73 (+/-0.586)	0.696
alkaline phosphatase (U/L)	310	196	1079	1079	559.80 (+/-178.65)	761.33(+/-490.84)	0.811
total bilirubin (mg/dl)	6.58	7.06	23.33	10.37	11.56 (+/-4.58)	9.24 (+/-1.89)	0.090
direct bilirubin (mg/dl)	5.5	5.5	16.69	8.54	9.10 (+/-3.49)	6.69 (+/-1.62)	0.048*

ตารางที่ 3 แสดงค่าการทำงานของตับโดยแสดง ค่าต่ำสุด (min), ค่าสูงสุด (max), ค่าเฉลี่ย (mean), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดยเปรียบเทียบระหว่างโรคท่อน้ำดีตีบตันและโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆจากการรวบรวมข้อมูลการทำงานของตับในกลุ่มโรคท่อน้ำดีตีบตันและโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆเปรียบเทียบกันพบว่าค่า direct bilirubin ของผู้ป่วย 2 กลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



ข้อมูลแสดงผลการย้อมติด monoclonal antibody ของ villin ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน, โรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆและผู้บริจาคตับ (กลุ่มควบคุม)

villin	จำนวนผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน (คน)	จำนวนผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ (คน)	ผู้บริจาคตับ (กลุ่มควบคุม) (คน)
positive	18	0	2
negative	3	4	4
จำนวนรวม	21	4	6

ตารางที่ 4 ตารางแสดงจำนวนผู้ป่วยที่ได้ผลการย้อม villin positive และ negative โดยแยกเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน, โรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆและผู้บริจาคตับ (กลุ่มควบคุม)

จากการรวบรวมข้อมูลพบว่าผลการย้อม villin มีความสัมพันธ์กับผู้ป่วยที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันและผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p$  value = 0.003 และจากการรวบรวมข้อมูลพบว่าการย้อม villin มีค่าความไว (sensitivity) ได้ 85.7%, ค่าความจำเพาะ (specificity) 100%, ค่าความแม่นยำ (accuracy) โดยแสดงเป็นค่า positive predictive value ได้ 100%, negative predictive value ได้ 57.14%

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อมูลแสดงความสัมพันธ์ระหว่างผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด favorable outcome และ unfavorable outcome และผลการย้อม villin

	villin	
ชนิดผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน	positive	negative
	จำนวนผู้ป่วย (คน)	
favorable outcome	10	1
unfavorable outcome	6	2
จำนวนผู้ป่วยรวม (คน)	16	3

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนผู้ป่วยโดยเปรียบเทียบโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด favorable และ unfavorable outcome และผลการย้อม villin

จากการรวบรวมข้อมูลพบว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีจำนวน 21 คน ย้อม villin ได้ผล positive จำนวน 18 คน ย้อม villin ได้ผล negative จำนวน 3 คน ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันทั้งหมด 21 คน มีผู้ป่วยจำนวน 2 คน ที่ไม่สามารถจัดชนิดของผู้ป่วยว่าเป็น favorable หรือ unfavorable outcome เนื่องจากไม่ได้ทำ Kasai's operation แต่ได้รับการยืนยันว่าเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันด้วย operative cholangiography ทุกราย โดยรายแรกเนื่องจากแพทย์เตรียมทำ liver transplantation และรายที่สองเนื่องจากผู้ป่วยมี numerous varices at porta hepatis ดังนั้นจึงมีผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่สามารถจัดชนิด favorable และ unfavorable outcome ได้จำนวน 16 คน

และจากการรวบรวมข้อมูล พบว่า ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด favorable outcome ผลการย้อม villin positive จำนวน 10 คน, ผล villin negative จำนวน 1 คน และผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด unfavorable outcome ผลการย้อม villin positive จำนวน 6 คน, ผล villin negative จำนวน 2 คน เมื่อเปรียบเทียบโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด favorable และ unfavorable outcome และผลการย้อม villin พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ทางสถิติ  $p \text{ value} = 0.546$  ( $p \text{ value} > 0.05$ )

ข้อมูลแสดงความสัมพันธ์ระหว่างผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด favorable outcome และ unfavorable outcome และ intensity ของการย้อม villin

	Intensity of villin staining	
ชนิดผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน	1+ or 2+	3+ or 4+
	จำนวนผู้ป่วย (คน)	
favorable outcome	4	6
unfavorable outcome	4	2
จำนวนผู้ป่วยรวม (คน)	8	8

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนผู้ป่วยในแต่ละ grading ของการย้อม villin โดยเปรียบเทียบระหว่างโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด favorable และ unfavorable outcome

จากการรวบรวมข้อมูลจำนวนผู้ป่วยในแต่ละ grading ของการย้อม villin โดยเปรียบเทียบระหว่างโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด favorable และ unfavorable outcome พบว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด unfavorable outcome มีจำนวน 6 คน และผู้ป่วยชนิด favorable outcome มีจำนวน 10 คน โดยผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด unfavorable outcome ที่มี grading 3+ or 4+ จากการย้อม villin มีจำนวน 2 คน และผู้ป่วยชนิด favorable outcome ที่มี grading 3+ or 4+ มีจำนวน 6 คน เมื่อเปรียบเทียบชนิดของโรคท่อน้ำดีตีบตันทั้ง favorable และ unfavorable outcome และ grading พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ทางสถิติ  $p \text{ value}=0.637$  ( $p \text{ value}>0.05$ )

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

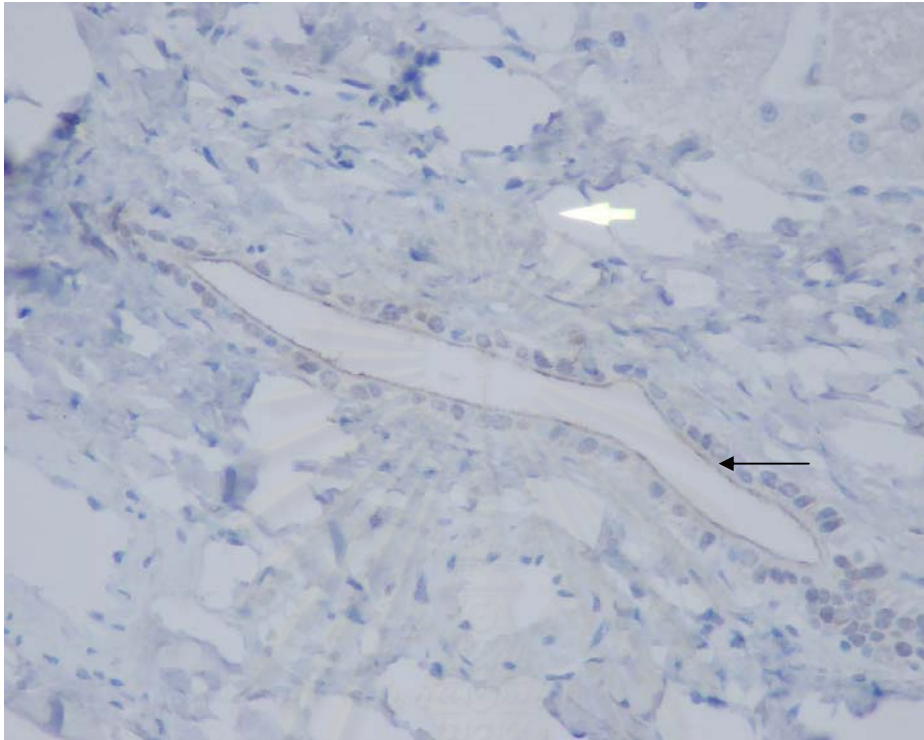
ข้อมูลแสดงความสัมพันธ์ระหว่างผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีตันชนิด favorable outcome และ unfavorable outcome และค่าเฉลี่ย percent การย้อม villin เปรียบเทียบกับ area of liver tissue บนสไลด์ทั้งหมด

	percent of villin staining
ชนิดผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีตัน	Mean +/- SD (%)
favorable outcome	66.36 +/- 41.139
unfavorable outcome	46.87 +/- 26.934

ตารางที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ย percent ของการย้อม villin โดยเปรียบเทียบระหว่างโรคท่อน้ำดีตีตันชนิด favorable และ unfavorable outcome

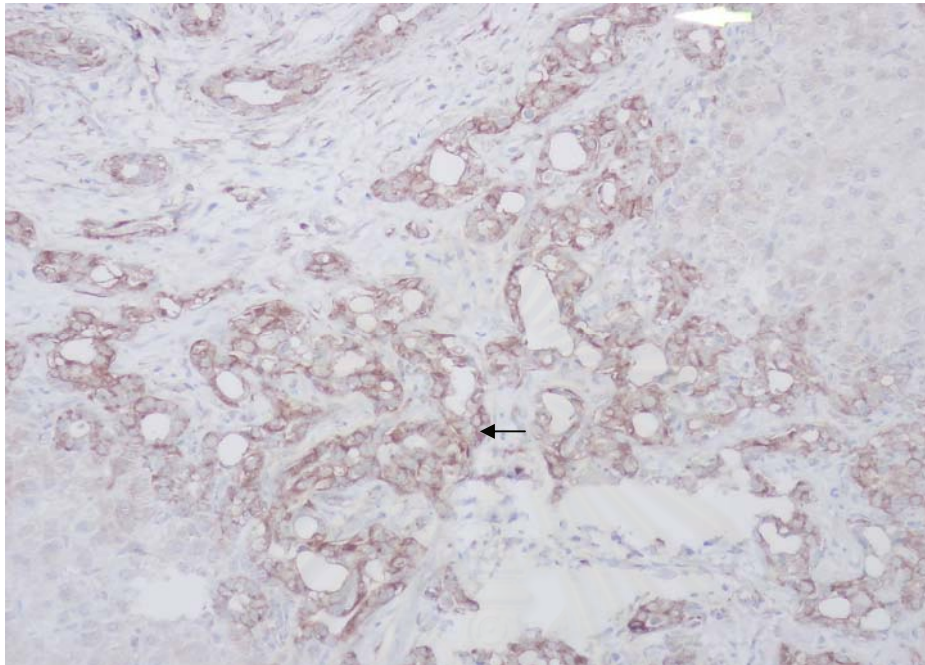
จากการรวบรวมข้อมูล percent ของการย้อม villin โดยเปรียบเทียบระหว่างโรคท่อน้ำดีตีตัน ชนิด favorable และ unfavorable outcome พบว่า ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีตันชนิด favorable outcome มีค่าเฉลี่ย percent ของการย้อม villin 66.36% และผู้ป่วยชนิด unfavorable outcome มีค่าเฉลี่ย percent ของการย้อม villin 46.87% เมื่อเปรียบเทียบชนิดของโรคท่อน้ำดีตีตันทั้ง favorable และ unfavorable outcome และ percent ของการย้อม villin พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ทางสถิติ  $p$  value = 0.228 ( $p$  value > 0.05)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2 ภาพ liver tissue ของกลุ่ม control (ผู้บริจาคตับ) แสดงผลการย้อม villin โดยติดสีน้ำตาลที่บริเวณ bile ductular cell ส่วน apical cell (ลูกศรสีดำ)

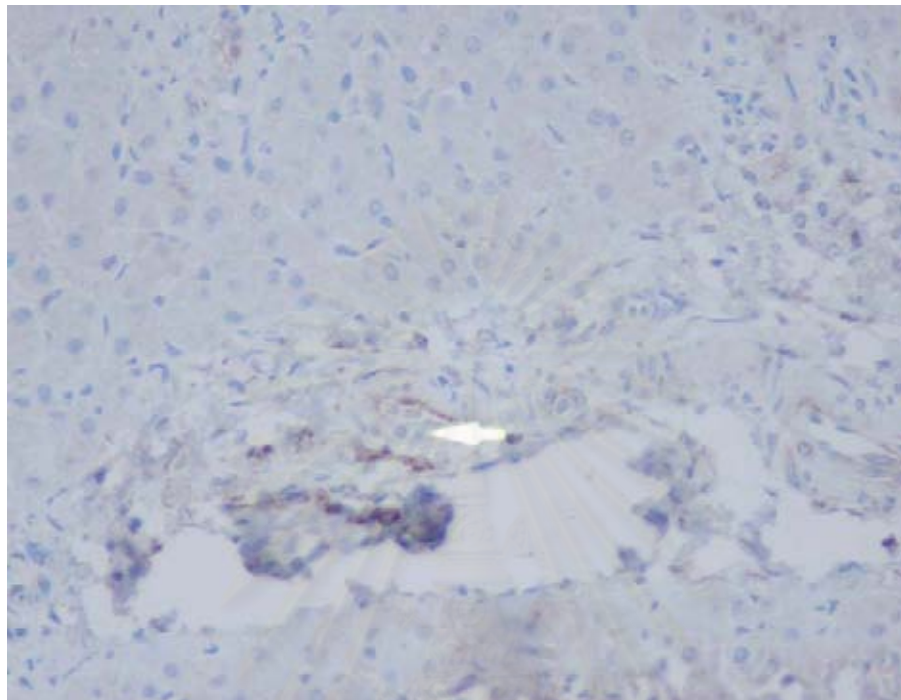
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 3 ภาพ liver tissue ของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน (biliary atresia) แสดงผลการ ย้อม villin โดยติดสีน้ำตาลที่บริเวณ bile ductular cell ทั้งที่ส่วน apical cell และ รอบ cell membrane ของ bile ductular cell (ลูกศรสีดำ) และจากภาพแสดงลักษณะ bile duct proliferation

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





ภาพที่ 4 ภาพ liver tissue ของผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ (choledochal cyst) แสดงผลการย้อม villin โดยติดสีน้ำตาลที่บริเวณ bile ductular cell ที่ส่วน apical cell (ลูกศรสีดำ) ซึ่งลักษณะการติดสีใกล้เคียงกับกลุ่ม control

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาความผิดปกติของการย่อย monoclonal antibody ของ villin ในผู้ป่วยเด็กที่มี cholestatic jaundice ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 25 คน พบว่าเป็นผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน (biliary atresia) จำนวน 21 คน และผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ (non biliary atresia) จำนวน 4 คน โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมาพบแพทย์ในช่วงอายุ 2-6 เดือน จากการเก็บข้อมูลค่าผลการการทำงานของตับ (liver function test) พบว่าค่าเฉลี่ย direct bilirubin ของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน (biliary atresia) และผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ (non biliary atresia) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่าเฉลี่ยของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีค่ามากกว่า

ส่วนผลการย่อย villin มีความสัมพันธ์กับผู้ป่วยที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันและผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและจากการรวบรวมข้อมูลพบว่าค่าความไว (sensitivity) 85.7%, ค่าความจำเพาะ (specificity) 100%, ค่าความแม่นยำ (accuracy) โดยแสดงเป็นค่า positive predictive value ได้ 100%, negative predictive value ได้ 57.14% และพบว่า intensity of villin staining (grading) และ percent การย่อยติดของ villin ไม่มี ความสัมพันธ์ทางสถิติกับโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มี favorable และ unfavorable outcome

#### อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาผู้ป่วยเด็กที่มี cholestatic jaundice ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ มีทั้งผู้ป่วยที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน (biliary atresia) และผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ (non biliary atresia) ซึ่งอายุส่วนใหญ่ของผู้ป่วยที่มาพบแพทย์อยู่ในช่วง 2-6 เดือน ค่าเฉลี่ยของ direct bilirubin ของทั้ง 2 กลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญโดยค่าเฉลี่ยของ direct bilirubin ของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีค่า 9.10 mg/dl และของกลุ่มผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆมีค่า 6.69 mg/dl จากการศึกษาของ Ubol B. และคณะซึ่งศึกษาผู้ป่วยเด็กที่มีภาวะน้ำดีคั่งในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ตั้งแต่ 1 มกราคม 2530 ถึง 31 ธันวาคม 2534 อายุส่วนใหญ่ของผู้ป่วย คือ 2-4 เดือน ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของผู้วิจัย แต่ค่าเฉลี่ยของ direct bilirubin ของการรวบรวมของ Ubol B. และคณะมีค่าที่ใกล้เคียงกันโดยค่าเฉลี่ยของ direct bilirubin ของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีค่า 6.40 mg/dl และของกลุ่มผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มี



น้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่น ๆ มีค่า 6.08 mg/dl (1) ดังนั้นจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ การตรวจค่า direct bilirubin อาจจะมีประโยชน์ช่วยในการวินิจฉัยว่าผู้ป่วยจะเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน หรือเป็นโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่น ๆ ได้

จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้เมื่อนำ liver tissue ของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่น ๆ มาทำการย้อม monoclonal antibody ของ villin พบว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจะมีผลการย้อม villin positive (ย้อมติด villin รอบ cell membrane ของ bile duct cell) เป็นส่วนใหญ่ โดยมีผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน 3 ราย ที่ผลการย้อม villin negative ซึ่งอายุที่ผู้ป่วยมาพบแพทย์ของทั้ง 3 รายนั้น คือ 1-2 เดือน (เป็นเวลาที่มาพบแพทย์เร็ว) ส่วนผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่น ๆ มีผลการย้อม villin negative (ย้อมติดเฉพาะบริเวณด้าน apical cell ของ bile duct cell) และกลุ่มควบคุมมีผลการย้อม villin ใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่น ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ M.J. Phillips และคณะซึ่งศึกษาความผิดปกติของ villin gene ในผู้ป่วยเด็ก progressive cholestatic liver disease โดยการศึกษานี้ได้มีการตรวจชิ้นเนื้อตับด้วยการย้อมทาง immunohistochemistry โดยได้ตรวจ villin จากชิ้นเนื้อตับในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด classic, ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด progressive cholestasis and liver failure, ผู้ป่วยโรคตับชนิด end-stage hepatic failure (primary sclerosing cholangitis, Alagille's syndrome, total parenteral nutrition cholestasis) และกลุ่มควบคุม (normal liver tissue) ซึ่งถ้าเป็น กลุ่มควบคุม, ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน และผู้ป่วย end-stage hepatic failure ผลการย้อม villin จะติดบริเวณ bile canaliculi เป็นลักษณะ typical chicken-wire network of fine channels แต่ถ้าเป็นผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด progressive cholestasis and liver failure ผลการย้อม villin จะไม่แสดงลักษณะ chicken-wire network แต่จะติดเฉพาะบริเวณ background เท่านั้น ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการวิจัยนี้และการวิจัยของ M.J. Phillips และคณะจึงมีความแตกต่างกัน (20)

ส่วนจากการศึกษาของ Athman และคณะพบว่า villin เป็นส่วนประกอบของ hepatocyte-growth-factor-dependent cytoskeleton-remodeling pathway ซึ่งเป็นขบวนการที่มีบทบาทสำคัญในขั้น morphogenesis ของอวัยวะต่างๆรวมทั้งตับและท่อน้ำดี (18) และจากผลพยาธิวิทยาของโรคท่อน้ำดีตีบตันนั้น บริเวณ portal tract มีลักษณะเด่น คือ fibrosis, edema, inflammatory cell infiltration และ ductular proliferation ดังนั้นจากการทบทวนวรรณกรรมจึงน่าจะสนับสนุนว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันซึ่งพบการย้อมติด villin เพราะว่า villin เป็นส่วนประกอบของ hepatocyte-growth-factor-dependent cytoskeleton-remodeling pathway ดังนั้นเมื่อเกิด ductular proliferation ปริมาณของ microvilli ย่อมมากขึ้น ดังนั้น villin ซึ่งเป็น

actin binding protein ที่ส่วนประกอบของ microvilli ของ bile canaliculi จึงพบการยึดม villin ติดที่รอบ cell membrane ของ bile ductular cell ได้จำนวนมาก

ส่วนผลการยึดม villin ในผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆและกลุ่มควบคุมของการวิจัยครั้งนี้พบว่าไม่แตกต่างจากผลการวิจัยของ M.J. Phillips และคณะ (20) คือ ผู้ป่วย 2 กลุ่มนี้เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วย end-stage hepatic failure และกลุ่ม normal liver ของ M.J. Phillips และคณะ ผลการยึดม villin ได้ผลไม่แตกต่างกัน

และจากการวิจัยครั้งนี้พบว่าผลการยึดม villin มีความสัมพันธ์กับผู้ป่วยที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันและผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงนำข้อมูลที่ได้ไปหาค่า sensitivity และ specificity พบว่า ค่า sensitivity 85.7%และ specificity 100% และหาค่า positive predictive value ได้ค่า 100%, negative predictive value ได้ 57.14% ซึ่งแสดงว่าถ้าผลการยึดม villin positive ผู้ป่วยจะเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันทุกคน และถ้าผลการยึดม villin negative แสดงว่า จะมีผู้ป่วย 57.14% ที่ไม่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน

จากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่า villin สามารถเป็น screening test ก่อนที่ผู้ป่วยจะต้องทำ operative cholangiography ได้ แต่ลักษณะการยึดมติด villin ไม่มีความสัมพันธ์กับ prognostic outcome ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

### ข้อเสนอแนะ

1)เนื่องจากการวิจัยนี้มีผู้ป่วยโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ จำนวนน้อย ดังนั้นงานวิจัยนี้คงเป็นข้อมูลนำร่องที่ผู้สนใจศึกษา villin จะทำการศึกษาต่อไป

2)ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยครั้งต่อไป ควรจะศึกษาลงไปถึงระดับ molecular ของ villin เพื่อทราบความผิดปกติของ villin ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

## รายการอ้างอิง

1. Ubol B, Poovorawan Y. Cholestatic jaundice in infancy in Chulalongkorn hospital : วิทยานิพนธ์ตามหลักสูตรเพื่อวุฒิมัธยมศึกษา สาขากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2536: 26.
2. Ryckman FC, Alonso MH, Bucuvalas JC, Balistreri W. Biliary atresia – surgical management and treatment options as they relate to outcome. Liver Transplant Surg 1998;4(suppl):S24-S33.
3. Poovorawan Y, Chongsrisawat V, Tanunyitawongse C, Norapaksunthorn T, Mutirangura A, Chandrakamol B. Extrahepatic biliary atresia in twins: zygosity determination by short tandem repeat loci. J Med Ass Thai 1996;79: S119-S124.
4. Laurent J, Gauthier F, Bernard O, et al. Long-term outcome after surgery for biliary atresia: study of 40 patients surviving for more than 10 years. Gastroenterology 1990;99:1793-7.
5. Perlmutter DH, Shepherd RW. Extrahepatic biliary atresia: a disease or a phenotype? Hepatology 2002;35:1297-304.
6. Chen L, Goryachev A, Sun J, et al. Altered expression of genes involved in hepatic morphogenesis and fibrogenesis are identified by cDNA microarray analysis in biliary atresia. Hepatology 2003;38:567-76.
7. Choe BH, Kim KM, Kwon S, et al. The pattern of differentially expressed genes in biliary atresia. J Korean Med Sci 2003;18:392-6.
8. Desmet VJ. Congenital disease of intrahepatic bile ducts: variations on the theme “ductal plate malformation.” Hepatology 1992;16:1069-83.
9. Vijayan V, Tan CE. Development of human intrahepatic biliary system. Ann Acad Med Singapore 1999;28:105-8.
10. Funaki N, Sasano H, Shizawa S, et al. Apoptosis and cell proliferation in biliary atresia. J Pathol 1998;186:429-33.
11. Bates MD, Bucuvalas JC, Alonso MH, Ryckman FC. Biliary atresia: pathogenesis and treatment. Semin Liver Dis 1998;18:281-93.

12. Balistreri WF, Grand R, Hoofnagle JH, et al. Biliary atresia: current concepts and research directions. *Hepatology* 1996;23:1682-92.
13. Petzinger E. Transport of organic anions in the liver: An update on bile acid, fatty acid, monocarboxylate, anionic amino acid, cholephilic organic anion, and anionic drug transport. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1994;123:47-211.
14. LeBlanc GA. Hepatic vectorial transport of xenobiotics. *Chem Biol Interact* 1994;90:101-20.
15. Nathanson MH, Boyer JL. Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology* 1991;14:551-66.
16. Friederich E, Vancompernelle K, Louvard D, Vanderkerckhove J. Villin function in the organization of the actin cytoskeleton: correlation of in vivo effects to its biochemical activities in vitro. *J Biol Chem* 1999;274:26751-60.
17. Ferrary E, Cohen-Tannoudji M, Pehau-Arnaudet G, et al. In vivo, villin is required for Ca(2+)-dependent F-actin disruption in intestinal brush borders. *J Cell Biol* 1999;146:819-30.
18. Athman R, Louvard D, Robine S. Villin enhances HGF-induced actin cytoskeleton remodeling in epithelial cells. *Mol Biol Cell* Aug 22, 2003. DOI: 10.1091/mbc.E03-02-0091.
19. Pringault E, Robine S, Louvard D. Structure of the human villin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:10811-5.
20. Phillips MJ, Azuma T, Meredith SM, et al. Abnormalities in villin gene expression and canalicular microvillus structure in progressive cholestatic liver disease of childhood. *Lancet* 2003;362:1112-9.
21. Lauwaet T, Oliveira MJ, Callewaert B, et al. Proteolysis of enteric cell villin by *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases. *J Biol Chem* 2003;278:22650-56.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## แบบบันทึกข้อมูล

วันที่ .....

รหัสผู้ป่วย.....

วัน-เดือน-ปี เกิด.....วัน-เดือน-ปี ที่ได้Liver tissue.....

วัน-เดือน-ปี ที่เจาะเลือด.....

### 1.ประวัติ

#### 1.1 ประวัติปัจจุบัน

- ตัวเหลือง-ตาเหลือง.....สีปดาก่อนมารพ.
- ไข้  มี  ไม่มี
- ลักษณะอุจจาระ  เหลืองเข้ม  ขาว  
 เหลืองอ่อน  อื่นๆ(ระบุ).....
- ลักษณะปัสสาวะ  เหลืองปกติ  เหลืองเข้ม
- อาการร่วม  คลื่นไส้  อาเจียน  ท้องเสีย  
 ท้องผูก  น้ำหนักลด  ไม่มี  
 อื่นๆ (ระบุ).....

#### 1.2 ประวัติก่อนคลอดของมารดา

- อายุมารดา.....ปี
- ไข้ออกผื่น  มี  ไม่มี  อื่นๆ(ระบุ).....
- การใช้ยาขณะตั้งครรภ์  มี (ระบุ).....  ไม่มี
- การใช้ยาเสพติด,บุหรี่,สุรา  มี (ระบุ).....  ไม่มี
- โรคประจำตัวมารดา  มี (ระบุ).....  ไม่มี
- การเจ็บป่วยขณะตั้งครรภ์  มี (ระบุ).....  ไม่มี
- การฝากครรภ์  ฝาก(สถานที่,จำนวนครั้ง).....  ไม่ได้ฝากครรภ์

#### 1.3 ประวัติการคลอด

- ครรภ์ที่.....แท้ง.....
- อายุครรภ์.....วิธีการคลอด.....BW.....g Apgar.....

#### 1.4 ประวัติหลังคลอด

- ตัวเหลือง  มี (วินิจฉัย,จำนวนวัน,วิธีการรักษา).....  
 ไม่มี
- การเจ็บป่วยอื่นๆ.....

## 1.5 ประวัติครอบครัว

- คนในครอบครัวมีประวัติตัวเหลือง-ตาเหลือง

มี (ระบุ).....

ไม่มี

## 2. ตรวจร่างกาย

น้ำหนัก.....กิโลกรัม (.....SD) ส่วนสูง.....เซนติเมตร(.....SD)

Abdominal sign.....

อื่นๆ.....

.....

.....

## 3. การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

CBC with plt.....

LFT SGOT.....SGPT.....ALP.....Albumin / Globulin.....

Total bilirubin / Direct bilirubin.....GGT.....

Electrolyte Na.....K.....Cl.....CO2.....

PT, PTT.....

UA .....

Urine Metabolic screening.....

.....

.....

TORCH titer.....

.....

.....

U/S abdomen.....

.....

.....

.....

.....

Liver biopsy       wedge     needle

.....

.....

.....

.....

.....

DISIDA scan.....  
 .....  
 .....

เฉพาะผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น Biliary atresia

- การติดตามและประเมินผู้ป่วยหลังจากที่ได้ทำ Kasai's operation 1 ปี

Direct bilirubin     < 2 mg/dl     ≥ 2 mg/dl

ผล villin จากการย้อม

munohistochemistry.....  
 .....  
 .....  
 .....  
 .....



สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย

การวิจัย เรื่องการศึกษาความผิดปกติของวิลลินในผู้ป่วยเด็กที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันและโรคตับชนิดที่มีน้ำคั่งจากสาเหตุอื่น

วันที่ให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....ปี.....

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อากาที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียดและมีความเข้าใจดีแล้ว

ผู้วิจัยรับรองว่าจะตอบคำถามต่างๆที่ข้าพเจ้าสงสัยด้วยความเต็มใจ ไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ามีสิทธิ์ที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เมื่อใดก็ได้ และเข้าร่วมโครงการนี้ด้วยความสมัครใจ และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยครั้งนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคที่บุตรหลานของข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเกี่ยวกับบุตรหลานของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย การเปิดเผยข้อมูลเกี่ยวกับบุตรหลานของข้าพเจ้าต่อหน่วยงานต่างๆที่เกี่ยวข้องกระทำได้เฉพาะกรณีจำเป็น ด้วยเหตุผลทางวิชาการเท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นแล้วมีความเข้าใจทุกประการ และได้ลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ลงนาม.....ผู้ปกครอง

(.....)

ลงนาม.....พยาน

(.....)

ลงนาม.....ผู้ทำวิจัย

(.....)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ข้อมูลสำหรับผู้ป่วย

ชื่อโครงการ การศึกษาความผิดปกติของวิลลินในผู้ป่วยเด็กทารกที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน และโรคตับชนิดที่มีน้ำดีคั่งจากสาเหตุอื่นๆ

โรคตับชนิดที่มีการคั่งของน้ำดี (Cholestatic liver disease) มีสาเหตุจากความผิดปกติของการสร้างน้ำดีและการขับของน้ำดีทำให้น้ำดีคั่งในร่างกาย ซึ่งมีผลทำลายตับ และเป็นสาเหตุของอาการตัวเหลือง-ตาเหลือง โดยความผิดปกติเหล่านี้อาจเกิดในทารกก่อนหรือหลังคลอดก็ได้ โดยภาวะที่เด็กมีอาการตัวเหลือง-ตาเหลืองจากการคั่งของน้ำดีนั้นยังมีการศึกษาในประเทศไทยจำนวนน้อย ข้อมูลส่วนใหญ่ในการรักษานั้นอาศัยการอ้างอิงจากต่างประเทศซึ่งมีความแตกต่างในด้านพันธุกรรมกับคนไทย ในปัจจุบันพบผู้ป่วยเด็กที่มีภาวะตัวเหลือง-ตาเหลืองจากการคั่งของน้ำดีเป็นจำนวนมากขึ้น โดยโรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นสาเหตุของภาวะนี้มากที่สุด

วิลลิน เป็นโปรตีน ซึ่งมีบทบาทในการสร้างและการขับน้ำดี ซึ่งผู้ป่วยที่มีวิลลินผิดปกติก็มักจะมีความผิดปกติของการสร้างและการขับน้ำดีทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการ ตัวเหลือง-ตาเหลืองได้

บุตรหลานของท่านซึ่งมีอาการตัวเหลือง-ตาเหลือง จะได้รับการตรวจร่างกาย เพื่อการวินิจฉัยและการรักษาตามขั้นตอนปกติจากกุมารแพทย์หากท่านอนุญาตให้บุตรหลานของท่านเข้าร่วมโครงการ บุตรหลานของท่านจะได้รับการตรวจทางห้องปฏิบัติการร่วมด้วย เช่น ตรวจเลือด, ตรวจเลือดเพื่อดูการทำงานของตับ, ตรวจปัสสาวะ, อัลตราซาวด์ ท้อง การตรวจชิ้นเนื้อตับทางห้องปฏิบัติการ โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ แพทย์จะทำการซักประวัติและตรวจร่างกายตามปกติ และจะมีการเจาะเลือดซึ่งเป็นขั้นตอนปกติในการหาสาเหตุของอาการตัวเหลืองและตาเหลืองและในการวิจัยจะเก็บเลือดเพิ่ม 1 หลอดทดลองปริมาณ 3-5 ซีซี เพื่อตรวจหาวิลลินซึ่งเป็นขั้นตอนที่เพิ่มขึ้นมาจากปกติ ถ้าสงสัยว่าเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันนั้นจะแนะนำให้ทำการผ่าตัดรักษาด้วยวิธีตัดต่อท่อน้ำดีลงไปใส่ไส้เล็กเพื่อให้มีการระบายของน้ำดี วิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ เช่นเดียวกับผู้ป่วยโรคตับที่มีการคั่งของน้ำดีที่เกิดจากสาเหตุอื่น ที่ได้ชิ้นเนื้อตับจากการเก็บชิ้นเนื้อตับโดยการใช้เข็มเจาะ ผลข้างเคียงที่ผู้ป่วยอาจจะได้รับจากการวิจัยครั้งนี้จะไม่ต่างจากผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้แต่ไม่ได้เข้าร่วมโครงการวิจัย เนื่องจากระเบียบวิธีการวิจัยทั้งหมด เป็นแนวทางการวินิจฉัยและรักษาที่ต้องทำในผู้ป่วยที่มาด้วยภาวะตัวเหลืองและตาเหลืองอยู่แล้ว ประโยชน์ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ เพื่อจะได้เข้าใจโรคท่อน้ำดีตีบตันและภาวะการคั่งของน้ำดีที่เกิดจากสาเหตุอื่นๆ ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยตัวเหลือง-ตาเหลือง มากขึ้น อาจช่วยในการพยากรณ์โรค บอกความรุนแรงและเป็นแนวทางในการดูแลรักษาผู้ป่วยกลุ่มนี้ต่อไป

การเข้าร่วมการวิจัยในครั้งนี้เป็นไปด้วยความสมัครใจ ผู้ปกครองมีสิทธิ์ที่จะปฏิเสธการเข้าร่วมวิจัยได้ โดยยังมีสิทธิ์ในการได้รับการดูแลจากแพทย์ได้ตามปกติ

ผลการศึกษา นี้ จะใช้สำหรับวัตถุประสงค์ทางวิชาการเท่านั้น โดยข้อมูลต่างๆจะถูกเก็บไว้โดยไม่มีการแพร่กระจายสู่สาธารณชนและจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปแบบที่เป็นสรุปผลการวิจัยเท่านั้น หากท่านมีปัญหาหรือสงสัยประการใด กรุณาติดต่อ พญ. วรนุช จงศรีสวัสดิ์ หรือ พญ. อิงคนิจ ชลไกรสุวรรณ ตึก สก. 11 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย โทร 01-2418675 ซึ่งยินดีให้คำตอบแก่ท่านทุกเมื่อ ขอขอบคุณในความร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

แพทย์หญิงอิงคนิจ ชลไกรสุวรรณ  
ผู้ทำการวิจัย

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

อิงคนิจ ชลไกรสุวัฒน์ เกิดวันที่ 29 เมษายน พ.ศ. 2522 ที่ จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีแพทยศาสตรบัณฑิต คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ปีการศึกษา 2545 หลังจากนั้นเข้ารับราชการเป็นแพทย์สังกัดที่ สถาบันวิจัยทางวิทยาศาสตร์และสุขภาพที่มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก และเข้าทำงานที่โรงพยาบาลอุดรดิตถ์ เป็นเวลา 1 ปี และได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ.2547 ปัจจุบันเป็นแพทย์ประจำบ้าน ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย