

ความสัมพันธ์ของวิตามินดีกับความหนาแน่นกระดูกและภาวะพังผืดในตับผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ASSOCIATION OF VITAMIN D, BONE MINERAL DENSITY AND LIVER FIBROSIS IN BILIARY
ATRESIA

Miss Krittapak Homchan



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

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความสัมพันธ์ของวิตามินดีกับความหนาแน่นกระดูกและ ภาวะพังผืดในตับผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน
โดย	นางสาวกฤตภาค หอมจันทร์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก)

.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ แพทย์หญิงดวงพร วีระวัฒมานนท์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธัญญา ทองตัน)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ พันเอก แพทย์หญิงนภอร ภาวิจิตร)

กฤตภัค หอมจันทร์ : ความสัมพันธ์ของวิตามินดีกับความหนาแน่นกระดูกและภาวะพังผืดในตับ
ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน (ASSOCIATION OF VITAMIN D, BONE MINERAL DENSITY AND
LIVER FIBROSIS IN BILIARY ATRESIA) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. นพ.ยง ภู่วรวรรณ, อ.ที่
ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. ดร. นพ.สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก, 102 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับ 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) ในซีรัม และความ
หนาแน่นกระดูก (bone mineral density, BMD) รวมถึงศึกษาความสัมพันธ์ของระดับ 25(OH)D กับความ
รุนแรงของการสร้างพังผืดตับและสุขภาพกระดูกในผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตัน (Biliary atresia หรือ BA) ที่
ได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัดแบบ Kasai โดยทำการศึกษาในผู้ป่วย BA ที่เข้ามารับการรักษา ณ หน่วย
ทางเดินอาหาร โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์สภากาชาดไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 ถึง 2558 จำนวนทั้งสิ้น 82 ราย
โดยแบ่งผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีภาวะดีซ่านและกลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่าน ในงานวิจัยนี้ใช้การวัด
ระดับ 25(OH)D ในซีรัมด้วยเทคนิค chemiluminescence immunoassay ความยืดหยุ่นตับด้วยเครื่อง
transient elastography และความหนาแน่นกระดูกที่ตำแหน่ง lumbar spine ด้วยเครื่อง dual energy
X-ray absorptiometry (DEXA) พบว่าในผู้ป่วย BA มีระดับ 25(OH)D ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ
ที่ $p=0.02$ (26.9 ± 14.4 และ 38.4 ± 25.4 ng/ml) และในผู้ป่วย BA กลุ่มที่มีภาวะดีซ่านมีระดับ
25(OH)D ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่านอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.001$ (18.5 ± 11.3 และ 30.0 ± 14.1
ng/ml) อีกทั้งในผู้ป่วยกลุ่มที่มีภาวะดีซ่านพบความชุกของผู้ที่มีเกณฑ์ขาดวิตามินดีรุนแรง ($25(OH)D \leq 20$
ng/ml) สูงกว่าในกลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่านอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.001$ โดยในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะดีซ่านมีค่า
lumbar BMD Z-score ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่านอย่างมีนัยสำคัญที่ $p=0.005$ (-2.0 ± 2.2 และ $-0.4 \pm$
 0.9) อีกทั้งในผู้ป่วยกลุ่มที่มีอาการดีซ่านพบความชุกของผู้ที่มีภาวะกระดูกบาง (osteopenia) และภาวะ
กระดูกพรุน (osteoporosis) มากกว่าในกลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่านอย่างมีนัยสำคัญที่ $p=0.002$ โดยพบ 12 ราย
(66.6%) จากกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะดีซ่าน และพบ 5 ราย (20.8%) จากกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะดี
ซ่าน นอกจากนี้ยังพบว่าระดับ 25(OH)D ในซีรัมของผู้ป่วย BA มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับ
albumin ($r=0.35$, $p=0.001$), total bilirubin ($r=-0.46$, $p<0.001$), direct bilirubin ($r=-0.39$,
 $p<0.001$) และค่าความยืดหยุ่นตับ ($r=-0.34$, $p=0.002$) และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับ 25(OH)D
กับ BMD งานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อสนับสนุนการให้วิตามินดีเสริมแก่ผู้ป่วย BA ที่มีอาการรุนแรง
เพื่อช่วยยับยั้งและป้องกันการสร้างพังผืดในตับของผู้ป่วย รวมถึงช่วยลดการเกิดภาวะกระดูกพรุนในผู้ป่วย
ต่อไป

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5674004730 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: BILIARY ATRESIA / JAUNDICE / LIVER STIFFNESS / BONE MINERAL DENSITY / SEVERITY / 25-HYDROXYVITAMIN D

KRITTAPAK HOMCHAN: ASSOCIATION OF VITAMIN D, BONE MINERAL DENSITY AND LIVER FIBROSIS IN BILIARY ATRESIA. ADVISOR: YONG POOVORAWAN, CO-ADVISOR: SITTISAK HONSAWEK, 102 pp.

This study aimed to investigate serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] and bone mineral density (BMD) in postoperative biliary atresia (BA) in children. It also aims to determine the associations between serum 25(OH)D levels with severity of hepatic fibrogenesis and bone health in post-Kasai BA subjects. Eighty-two children with BA from the gastrointestinal clinic of King Chulalongkorn Memorial Hospital between 2010 and 2015 were enrolled in this study. The patients were classified into two groups according to their jaundice status. Serum 25(OH)D concentrations were measured using chemiluminescence immunoassay. Liver stiffness was assessed using transient elastography, and BMD of the lumbar spine was analyzed using dual energy X-ray absorptiometry (DEXA). We found that BA patients had significantly lower serum 25(OH)D level compared to healthy controls (26.9 ± 14.4 vs. 38.4 ± 25.4 ng/ml, respectively; $p=0.02$). Serum 25(OH)D were substantially lower in jaundiced group than non-jaundiced group (18.5 ± 11.3 vs. 30.0 ± 14.1 ng/ml, respectively; $p<0.001$). The prevalence of vitamin D deficiency ($25(OH)D \leq 20$ ng/ml) in BA patients with jaundice was higher than BA patients without jaundice and controls ($p<0.001$). In addition, lumbar spine BMD Z-score was considerably lower in the jaundiced patients compare to non-jaundiced patients (-2.0 ± 2.2 vs. -0.4 ± 0.9 , respectively; $p=0.005$). Twelve jaundiced patients (66.6%) and versus 5 non-jaundiced patients (20.8%) showed osteopenia and osteoporosis ($p=0.002$). Further analysis revealed that serum 25(OH)D levels were significantly correlated with albumin ($r=0.35$, $p=0.001$), total bilirubin ($r=-0.42$, $p<0.001$), direct bilirubin ($r=-0.40$, $p<0.001$) and liver stiffness score ($r=-0.34$, $p=0.002$). No association was found between 25(OH)D levels and BMD. This study highlights the need of vitamin D supplementation and its potential in maintaining bone mass in persistently jaundiced BA children.

Field of Study: Medical Science

Academic Year: 2016

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้จะสำเร็จลุล่วงไม่ได้หากปราศจากโอกาสจาก ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้โอกาสในการศึกษาระดับมหาบัณฑิต ในห้องปฏิบัติการที่ทันสมัยและเพียบพร้อม พร้อมทั้งได้ชี้แนะแนวความคิดของการเป็นนักวิจัยที่ดี รวมถึงกรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา อันมีประโยชน์และคุณค่ายิ่งต่องานวิจัยนี้มาโดยตลอด ผู้วิจัยรู้สึกเป็นเกียรติอย่างมากที่มีอาจารย์เป็นที่ปรึกษา และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ ทรราชเวก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้มอบความรู้ คำปรึกษา และแนวทางการแก้ไขปัญหาแก่ผู้วิจัยเสมอ ตลอดจนให้ความกรุณาตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์ ผู้วิจัยจะระลึกถึงความเมตตาของท่านตลอดไป

ขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้แก่ ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง วิไล ชินธเนศ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ แพทย์หญิงดวงพร วีระวัฒน์กานนท์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธัญญา ทองตัน กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายในมหาวิทยาลัย และรองศาสตราจารย์ พันเอก แพทย์หญิงนภอร ภาวิจิตร กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย ที่ได้สละเวลาอันมีค่ามาดำเนินการสอบวิทยานิพนธ์ รวมถึงให้คำแนะนำและแก้ไขข้อผิดพลาดของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ผู้วิจัย จนบรรลุวัตถุประสงค์ในการศึกษาวิจัยระดับปริญญาโทมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยให้ความช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการในขณะทำการวิจัย และคอยชี้แนะแนวทางการใช้เครื่องมือให้ถูกต้อง ซึ่งมีประโยชน์ต่อผู้ทำวิจัยเป็นอย่างมาก

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษาในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่กรุณาช่วยเหลือให้คำแนะนำด้านทะเบียน และประมวลผลการศึกษาตั้งแต่แรกเข้าศึกษา จนกระทั่งสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ นางสาววิภา หอมจันทร์ มารดาผู้ให้กำเนิด ซึ่งได้วางรากฐานชีวิต และให้โอกาสทางการศึกษา พร้อมทั้งคอยสนับสนุนและให้กำลังใจตลอดมา จนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
สารบัญแผนภาพ.....	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฑ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย.....	1
คำถามงานวิจัย.....	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
สมมติฐานของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
ข้อจำกัดของงานวิจัย.....	4
คำสำคัญ.....	4
คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย.....	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	5
กรอบแนวความคิดของการวิจัย.....	7
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลงานวิจัย.....	8
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	46
รูปแบบการวิจัย	46
ประชากรศึกษา	46
กลุ่มที่ทำการศึกษา (Study groups).....	46
กลุ่มควบคุม (Control group).....	47
การคำนวณขนาดประชากรศึกษา.....	47
เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	48
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	49
โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	49
วิธีการดำเนินการวิจัย	49
1. การตรวจคัดกรอง	49
2. การตรวจวัดค่าระดับวิตามินดี	50
3. การวิเคราะห์หาปริมาณ Procollagen type III.....	50
4. การตรวจวัดค่าความหนาแน่นกระดูก (Bone mineral density measurement)...	51
5. การตรวจวัดค่าความยืดหยุ่นของตับ (Liver stiffness measurement).....	52
6. การวิเคราะห์ข้อมูล.....	52
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	53
ส่วนที่ 1 ข้อมูลพื้นฐานของประชากรในงานวิจัย.....	53
ส่วนที่ 2 การศึกษาความแตกต่างของระดับวิตามินดี [25(OH)D] ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและกลุ่มควบคุม	57
ส่วนที่ 3 การศึกษาความแตกต่างของค่าความหนาแน่นกระดูก (BMD) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน	60
ส่วนที่ 4 การศึกษาความสัมพันธ์ของระดับวิตามินดี [25(OH)D] ในซีรัมกับความหนาแน่นกระดูก (BMD) และภาวะพังผืดตับในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน	63

บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	67
รายการอ้างอิง	72
ภาคผนวก.....	90
ภาคผนวก ก การทดสอบการกระจายข้อมูล (Normality test)	91
ภาคผนวก ข เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าวิตามินดีในซีรัม	100
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	102



สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	ค่าทางชีวเคมีในการตรวจคัดกรองผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน	25
ตารางที่ 2	เกณฑ์ระดับวิตามินดี แบ่งตามความเข้มข้นของ 25(OH)D ในเด็ก	44
ตารางที่ 3	เกณฑ์ในการวินิจฉัย osteoporosis โดย World Health Organization (WHO).....	51
ตารางที่ 4	ข้อมูลพื้นฐาน ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ และระดับ 25(OH)D ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและกลุ่มควบคุม	55
ตารางที่ 5	ข้อมูลพื้นฐาน ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ และระดับ 25(OH)D ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีภาวะดีซ่าน (Jaundiced group) และกลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (Non-jaundiced group).....	56
ตารางที่ 6	ความชุกของผู้ที่มีระดับ 25(OH)D ที่เกณฑ์ต่างๆ ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีภาวะดีซ่าน (Jaundiced group) และไม่มีภาวะดีซ่าน (Non-jaundiced group) และกลุ่มควบคุม.....	59
ตารางที่ 7	ความหนาแน่นกระดูก (BMD) ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีภาวะดีซ่าน (Jaundiced group) และกลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (Non-jaundiced group)	61
ตารางที่ 8	ความชุกของผู้ที่มีสุขภาพกระดูกที่เกณฑ์ต่างๆ ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีภาวะดีซ่าน (Jaundiced group) และกลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (Non-jaundiced group)	61
ตารางที่ 9	ความสัมพันธ์ของระดับ 25(OH)D ในซีรัมกับผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ ค่าความหนาแน่นกระดูก (BMD) และค่าความยืดหยุ่นของตับ (liver stiffness score) ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน.....	64

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 แสดงการจำแนกโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิดที่ 1-3 ตามตำแหน่งการตีบตันของท่อน้ำดี.....	11
รูปที่ 2 แสดงแบบจำลองของกระบวนการกระตุ้น T-cell-mediated autoreactivity โดยไวรัสต่อ การทำลายเยื่อบุผิวท่อน้ำดี.....	23
รูปที่ 3 แสดงลักษณะของการผ่าตัดแบบคาไซและบริเวณ portal hepatitis ที่ใช้ในการผ่าตัดแบบคาไซ.....	28
รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของ vitamin D ₂ และ vitamin D ₃	30
รูปที่ 5 แสดงกระบวนการสร้างและกระบวนการเมแทบอลิซึมของวิตามินดีในการควบคุมสมดุลของแคลเซียมและฟอสฟอรัส และกระบวนการเสริมสร้างกระดูก.....	32
รูปที่ 6 แสดงบทบาทของวิตามินดีในการควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน.....	34
รูปที่ 7 แสดงผลของวิตามินดีต่อภาวะภูมิคุ้มกัน (adaptive immune response).....	34
รูปที่ 8 แสดงการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างตับเมื่อเกิดภาวะสร้างพังผืด (hepatic fibrosis).....	36
รูปที่ 9 แสดงกลไกการควบคุมการแสดงออกของ profibrotic genes.....	39
รูปที่ 10 แสดงหลักการของเทคนิค Chemiluminescence Immunoassay (CLIA).....	45
รูปที่ 11 แสดงความแตกต่างของระดับ 25(OH)D ในซีรัมระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและกลุ่มควบคุม.....	58
รูปที่ 12 แสดงความแตกต่างของระดับ 25(OH)D ในซีรัมระหว่างผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีภาวะดีซ่าน (Jaundiced group) และกลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (Non-Jaundiced group) และกลุ่มควบคุม.....	58
รูปที่ 13 แสดงความชุกของผู้ที่มีเกณฑ์ขาดวิตามินดีรุนแรง (Vitamin D Deficiency) ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีภาวะดีซ่าน (Jaundiced group) และกลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (Non-jaundiced group) และกลุ่มควบคุม.....	59
รูปที่ 14 แสดงความชุกของผู้ที่มีภาวะกระดูกบาง (Osteopenia) และผู้ที่มีภาวะกระดูกพรุน (Osteoporosis) ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน.....	62
รูปที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ของระดับ 25(OH)D กับค่า albumin ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน.....	65

รูปที่ 16 แสดงความสัมพันธ์ของระดับ 25(OH)D กับค่า total bilirubin ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน..... 65

รูปที่ 17 แสดงความสัมพันธ์ของระดับ 25(OH)D กับค่า direct bilirubin ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน..... 66

รูปที่ 18 แสดงความสัมพันธ์ของระดับ 25(OH)D กับค่าความยืดหยุ่นตับ (liver stiffness score) ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน..... 66

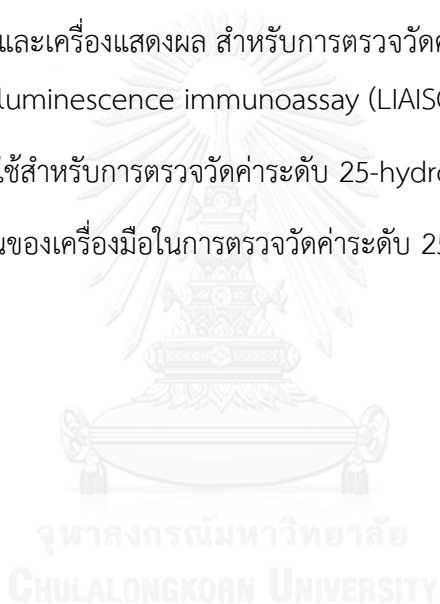
รูปที่ 19 แสดงข้อมูลที่มีการกระจายแบบปกติ (Normal distribution) 93

รูปที่ 20 แสดงข้อมูลที่มีการกระจายแบบไม่ปกติ (Non-normal distribution)..... 99

รูปที่ 21 แสดงเครื่องมือ และเครื่องแสดงผล สำหรับการตรวจวัดค่าระดับ 25-hydroxyvitamin D โดยใช้หลักการ chemiluminescence immunoassay (LIAISON, Diasorin Inc.)..... 100

รูปที่ 22 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการตรวจวัดค่าระดับ 25-hydroxyvitamin D..... 101

รูปที่ 23 แสดงการทำงานของเครื่องมือในการตรวจวัดค่าระดับ 25-hydroxyvitamin D 101



สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่ 1 กรอบแนวความคิดของการวิจัย.....	7
แผนภาพที่ 2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน.....	12
แผนภาพที่ 3 อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน	29



คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
BA	Biliary atresia
BASM	Biliary atresia splenic malformation syndrome
25(OH)D	25-hydroxyvitamin D
1,25(OH)D	1,25-dihydroxyvitamin D
VDR	Vitamin D receptor
RXR	Retinoic acid x-receptor
VDBP	Vitamin D binding protein
BMD	Bone mineral density
<i>P</i> -value (<i>P</i>)	Probability value
CLIA	Chemiluminescence immunoassay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
DXA	Dual energy x-ray absorptiometry
LSM	Liver stiffness measurement
g	Gram
mg	Milligram (10^{-3} gram)
ng	Nonogram (10^{-9} gram)
pg	Picogram (10^{-12} gram)
l	Liter
dl	Deciliter (10^{-1} liter)
ml	Milliliter (10^{-3} liter)
cm ³	Cubic centrimeter
kPa	Kilopascal
IU	International unit

TB	Total bilirubin
DB	Direct bilirubin
AST	Aspartate aminotransferase
ALT	Alanine aminotransferase
ALP	Alkaline phosphatase
GGT	Gamma-glutamyl transferase
APRI	AST-to-platelete ratio index
FIB-4	Fribosis-4
INR	International normalized ratio
PNIIP	Procollagen III N-terminal Propeptide



บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย

โรคท่อน้ำดีตีบตัน (Biliary atresia หรือ BA) เป็นโรคที่พบได้ในเด็กทารกแรกเกิด โดยพบมีการตีบตันในสวนใดส่วนหนึ่งหรือตลอดความยาวของท่อน้ำดีนอกตับ (extrahepatic biliary tree) ทำให้มีการคั่งของน้ำดีในตับ ซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของภาวะตัวเหลือง (cholestasis jaundice) ในทารกแรกเกิดทั่วโลก (1) สำหรับอาการที่พบปรากฏร่วม ได้แก่ ตาเหลือง ปัสสาวะมีสีเข้ม อุจจาระมีสีซีด ตับและม้ามโต และท้องมาน หากไม่ได้รับการรักษาอย่างทันท่วงที ผลของการคั่งสะสมของน้ำดีในตับจะส่งผลให้เกิดพังผืดสะสมขึ้นที่ตับ นำไปสู่ภาวะตับแข็ง และเสียชีวิตในที่สุด ในปัจจุบันสาเหตุของโรคท่อน้ำดีตีบตันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด โดยโรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นโรคที่พบน้อย มีอุบัติการณ์ของการเกิดโรคประมาณ 1 ใน 10,000 – 20,000 ของทารกแรกเกิดทั่วโลก (2) โดยในประเทศไทยพบประมาณ 60-80 รายต่อปี

ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน ส่วนใหญ่จะเข้ารับการรักษาด้วยการผ่าตัด โดยผ่าตัดนำส่วนท่อน้ำดีนอกตับที่มีความผิดปกติออก แล้วนำส่วนของลำไส้เล็กไปต่อกับบริเวณ porta hepatis ของตับ เรียกว่า การผ่าตัดแบบคาสาย (Kasai portoenterostomy) (3) เพื่อให้น้ำดีสามารถระบายออกจากตับลงสู่ลำไส้เล็กได้เป็นปกติ ทำให้ผู้ป่วยสามารถมีชีวิตยืนยาวต่อไปได้ แต่พบว่าการอักเสบของตับยังคงดำเนินไปอย่างต่อเนื่องในผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดแล้ว (4) ซึ่งอาจนำไปสู่ภาวะตับแข็งเมื่อผู้ป่วยมีอายุมากขึ้น อีกทั้งในผู้ป่วยเหล่านี้มักพบปัญหาหลังการผ่าตัดและภาวะแทรกซ้อนมากมาย โดยโรคแทรกซ้อนของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันในระยะยาวที่พบได้บ่อย คือ โรคกระดูกโปรงบาง (osteopenia) และกระดูกพรุน (osteoporosis) จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ในผู้ป่วยโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ โรคระบบทางเดินอาหารอักเสบ (inflammatory bowel disease) (5-9) โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) (10) โรคลูปัส (systemic lupus erythematosus) (11) และโรคข้ออักเสบเรื้อรังในเด็ก (juvenile idiopathic arthritis) (12) จะพบความหนาแน่นของกระดูกต่ำ และส่งผลให้เกิดปัญหาโรคกระดูกพรุนตามมา ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการอักเสบมีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพของกระดูก โดยโรคกระดูกพรุน คือภาวะที่ความหนาแน่นของ

กระดูกลดลง และโครงสร้างของกระดูกเสื่อมลง ส่งผลให้กระดูกเปราะบาง และมีโอกาสหักหรือยุบตัวได้ง่าย (13) โดยสาเหตุของโรคกระดูกในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันนั้น อาจเกิดขึ้นจากสภาวะการขาดวิตามินดีเนื่องมาจากปัญหาการดูดซึมของลำไส้ที่เสียไปในผู้ป่วย และการทำงานของตับที่ลดลง ทำให้มีการสร้าง 25-hydroxyvitamin D ไม่เพียงพอ (14, 15)

วิตามินดีเป็นวิตามินที่ละลายได้ในไขมัน มีความสำคัญต่อกระบวนการเสริมสร้างกระดูก โดยกระบวนการเมแทบอลิซึมของวิตามินดีที่สำคัญเกิดขึ้นที่ตับและไตได้เป็น 25-hydroxyvitamin D และ 1,25-dihydroxyvitamin D ตามลำดับ ผ่านการขนส่งโดยจับกับโปรตีน (vitamin D binding protein หรือ VDBP) ในกระแสเลือด นอกจากนี้ยังพบว่าวิตามินดีมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการควบคุมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย การตอบสนองต่อการอักเสบ รวมถึงกระบวนการไฟโบรเจเนซิส โดยตับที่มีการอักเสบเรื้อรังนั้น เซลล์ตับจะเกิดการบาดเจ็บซ้ำๆ ส่งผลให้เนื้อเยื่อตับมีการตอบสนองโดยการสร้างคอลลาเจนขึ้นเป็นจำนวนมาก จนเกิดเป็นพังผืด (fibrosis) และเกิดเป็นภาวะตับแข็ง (cirrhosis) ในที่สุด (16, 17) มีงานวิจัยมากมายที่แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยโรคตับอักเสบเรื้อรัง ตรวจพบระดับ 25-hydroxyvitamin D ในซีรัมลดลง (18) และพบว่าระดับ 25-hydroxyvitamin D ที่ลดลงนั้นมีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของการอักเสบและการเกิดพังผืดของตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HCV) อย่างมีนัยสำคัญ (19-21) โดย 25-hydroxyvitamin D มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งกระบวนการไฟโบรเจเนซิส ผ่านการควบคุมการแสดงออกของคอลลาเจน และตัวกลางต่างๆ ในวิถีการอักเสบ ทำให้กระบวนการสร้างพังผืดของตับลดลง (17)

เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่พบการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของระดับวิตามินดีกับความรุนแรงของภาวะพังผืดเกาะตับในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันในประเทศไทย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ศึกษาความสัมพันธ์ของระดับวิตามินดีกับความรุนแรงของการเกิดภาวะพังผืดเกาะตับ รวมถึงความหนาแน่นของกระดูกที่เสื่อมลงในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันหลังได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัดแบบ Kasai เพื่อพิสูจน์สมมติฐานของความสัมพันธ์ดังกล่าว อันจะทำให้เกิดองค์ความรู้ใหม่และเป็นแนวทางในการรักษาต่อไป

คำถามงานวิจัย

1. ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันในกลุ่มที่มีอาการรุนแรงและกลุ่มที่ไม่มีอาการรุนแรง และกลุ่มควบคุม มีระดับของวิตามินดีแตกต่างกันหรือไม่ อย่างไร
2. ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันในกลุ่มที่มีอาการรุนแรง และกลุ่มที่ไม่มีอาการรุนแรง มีค่าความหนาแน่นกระดูกแตกต่างกันหรือไม่ อย่างไร
3. การพร่องวิตามินดีส่งผลต่อความรุนแรงของการเกิด liver fibrosis และภาวะกระดูกพรุนในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันหรือไม่ อย่างไร

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความแตกต่างของระดับวิตามินดีในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีอาการรุนแรงและกลุ่มที่ไม่มีอาการรุนแรง และในกลุ่มควบคุม
2. เพื่อศึกษาความแตกต่างของความหนาแน่นกระดูกในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีอาการรุนแรง และกลุ่มที่ไม่มีอาการรุนแรง
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของระดับวิตามินดีกับความรุนแรงของการเกิด liver fibrosis และความหนาแน่นกระดูกในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีอาการรุนแรง และกลุ่มที่ไม่มีอาการรุนแรง

สมมติฐานของการวิจัย

1. ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน กลุ่มที่มีอาการรุนแรง จะพบระดับ 25-hydroxyvitamin D ในซีรัมต่ำที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีอาการรุนแรง และกลุ่มควบคุม
2. ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีอาการรุนแรง จะพบค่าความหนาแน่นกระดูกต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่มีอาการรุนแรง
3. การพร่องวิตามินดีมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของการเกิด liver fibrosis และภาวะกระดูกพรุนที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

ขอบเขตของการวิจัย

Sample population

ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน ที่ได้รับการผ่าตัดแบบคาไซ (Kasai portoenterostomy) และมีอายุไม่เกิน 18 ปี ที่เข้ามารับการรักษา ณ หน่วยทางเดินอาหาร โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์สภากาชาดไทย

ข้อตกลงเบื้องต้น

ไม่มี

ข้อจำกัดของงานวิจัย

1. ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยนี้ไม่ได้เป็นการเก็บใหม่ โดยเป็นตัวอย่างที่เหลือจากโครงการวิจัยก่อนหน้า ซึ่งถูกเก็บไว้ ณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. เนื่องจากไม่มีการเจาะตับในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่เข้ามารับการรักษา จึงไม่สามารถดูระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดตับได้ แต่สามารถประเมินได้โดยการตรวจวัด liver stiffness ด้วยเครื่อง transient elastography

คำสำคัญ

Biliary atresia (BA)
 Vitamin D concentration
 Bone mineral density (BMD)
 Liver stiffness measurement (LSM)
 Osteopenia
 Osteoporosis
 Liver fibrosis
 Cirrhosis

คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการรุนแรง หมายถึง ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีภาวะดีซ่าน (Cholestasis jaundice) จากการคั่งสะสมของน้ำดีในตับ เนื่องมาจากการอุดตันของท่อน้ำดี โดยได้รับการตรวจการทำงานของตับและมีค่า total bilirubin (TB) มากกว่าหรือเท่ากับ 2.0 mg/dl

ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีอาการรุนแรง หมายถึง ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีภาวะซ่าน โดยได้รับการตรวจการทำงานของตับและมีค่า total bilirubin (TB) น้อยกว่า 2.0 mg/dl

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงความสัมพันธ์ของระดับวิตามินดีต่อระดับความรุนแรงของโรคท่อน้ำดีตีบตัน
2. ทราบถึงความแตกต่างของสุขภาพกระดูกในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีอาการรุนแรงและกลุ่มที่ไม่มีอาการรุนแรง
3. มีผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติ สามารถนำความรู้ที่ได้ไปพัฒนาแนวทางการรักษาโรคต่อไปได้ในอนาคต

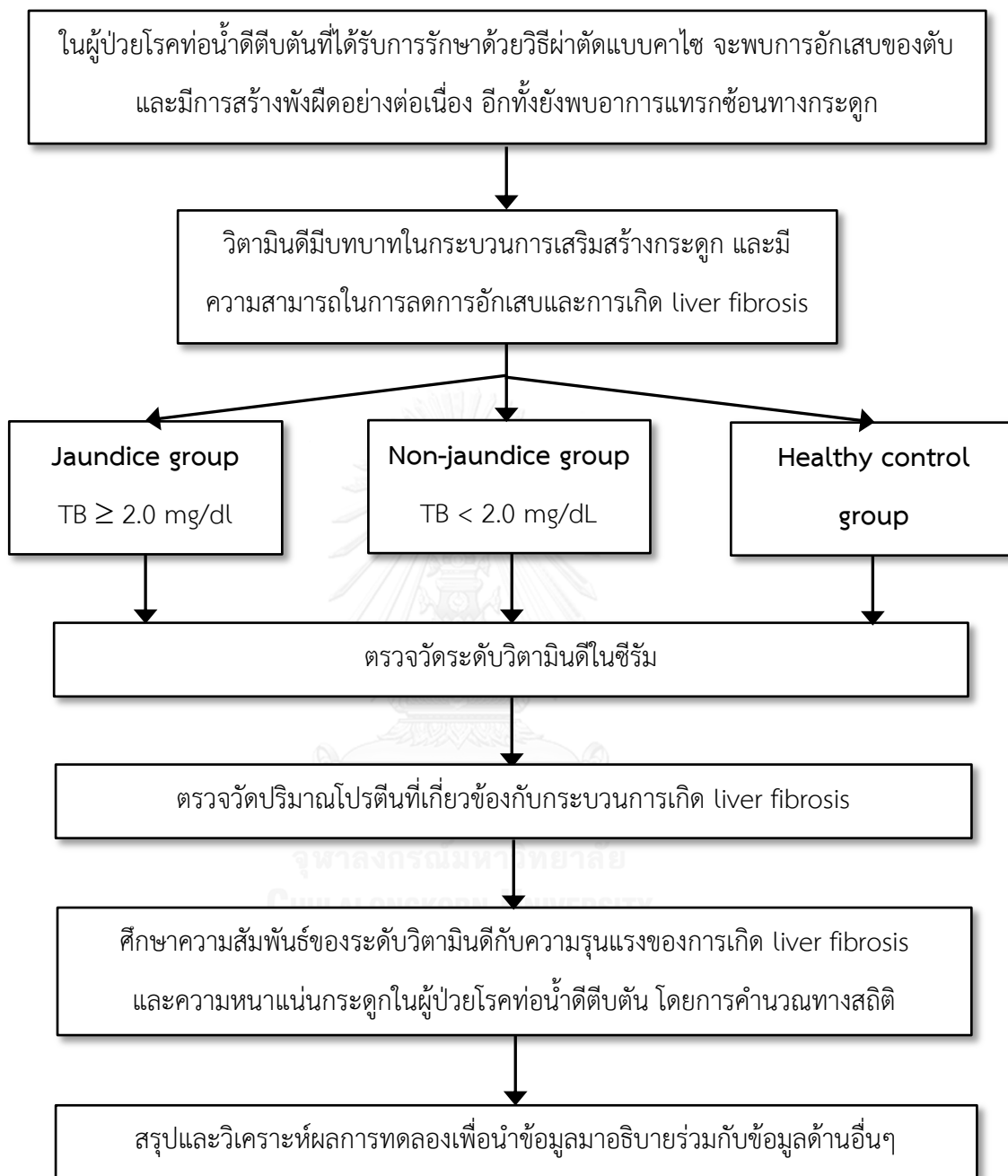
วิธีดำเนินงานวิจัย

1. รวบรวมตัวอย่างซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยเด็กที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน และได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัดแบบคาไซ และกลุ่มเด็กที่มีสุขภาพแข็งแรง ที่มารับบริการ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย
2. ตรวจวัดค่าระดับวิตามินดีโดยการตรวจระดับ 25-hydroxyvitamin D ด้วยวิธี chemiluminescent immunoassay (CLIA)
3. ตรวจวัดปริมาณโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างพังผืดในตับ (fibrotic marker) ได้แก่ procollagen type III ด้วยเทคนิค ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

4. เก็บข้อมูลผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการและประวัติการรักษาของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน จากข้อมูลของงานวิจัยเก่าและเพิ่มประวัติการรักษา
5. รวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ผลทั้งหมดด้วยโปรแกรม SPSS (Version 22.0)



กรอบแนวความคิดของการวิจัย



แผนภาพที่ 1 กรอบแนวความคิดของการวิจัย

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลงานวิจัย

1. ยื่นเสนอโครงร่างวิทยานิพนธ์ต่อคณะกรรมการวิทยานิพนธ์หลักสูตร วท.ม. (สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ยื่นเสนอโครงร่างวิทยานิพนธ์ต่อคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมในการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. ดำเนินการวิจัย รวบรวมข้อมูล สรุปและวิเคราะห์ผลการวิจัย
4. นำเสนอผลงานวิทยานิพนธ์ต่อสาธารณชน และยื่นเสนอวิทยานิพนธ์ต่อคณะกรรมการวิทยานิพนธ์หลักสูตร วท.ม. (สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

โรคท่อน้ำดีตีบตัน (Biliary atresia; BA) (OMIM 210500) เป็นโรคที่พบได้ไม่บ่อยในเด็กทารกแรกเกิด มีอาการเหลืองรุนแรงในทารก จากการตีบตันของท่อน้ำดีนอกตับ (extrahepatic biliary tree) บางส่วนหรือทั้งหมด ทำให้เกิดการอักเสบและเกิดเนื้อเยื่อพังผืดอย่างต่อเนื่องในระบบทางเดินน้ำดี (22) มีสารบิลิรูบินเข้มข้นจำนวนมากที่สร้างขึ้นใหม่และไม่สามารถไหลออกจากตับลงสู่ลำไส้เล็กส่วนต้นได้ ส่งผลให้มีการคั่งสะสมของน้ำดี ทำให้น้ำดีถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดมากขึ้น เกิดเป็นภาวะตัวเหลือง (neonatal hyperbilirubinemia/neonatal jaundice) อูจจาระสีซีด และปัสสาวะสีเข้ม หากไม่ได้รับการรักษาจะเสียชีวิตภายใน 2 ปี จากภาวะตับแข็ง (liver cirrhosis) การรักษาที่ได้ผลคือการผ่าตัดเชื่อมต่อทางเดินน้ำดีหรือการผ่าตัดเปลี่ยนตับ

รูปแบบของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันสามารถจำแนกได้เป็น 2 แบบ ตามระยะของการแสดงอาการ ได้แก่ (23)

1. Non-syndromic BA หรือ perinatal/acquired form พบประมาณร้อยละ 80 ของผู้ป่วย อาการเกิดขึ้นในระยะ 3-6 สัปดาห์นับตั้งแต่แรกคลอด โดยในระยะแรกเด็กจะมีลักษณะปกติ แต่จะถ่ายอุจจาระมีสีซีดเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอกที่เป็นตัวกระตุ้นในการก่อให้เกิดอาการมากขึ้น

2. Syndromic BA หรือ foetal/embryonic form พบประมาณร้อยละ 20 ของผู้ป่วย โดยผู้ป่วยจะแสดงอาการภายในระยะเวลา 3 สัปดาห์นับตั้งแต่แรกคลอด เป็นผลมาจากความผิดปกติที่เกิดขึ้นมาตั้งแต่กำเนิด ซึ่งอาจพบความผิดปกติอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น polysplenia (splenic malformation syndrome), asplenic, cardiac หรือ intra-abdominal defects (situs inversus, pre-duodenal portal vein, absence of retro-hepatic inferior vena cava, intestinal malrotation) เป็นต้น

อุบัติการณ์ของการเกิดโรค

โรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นโรคที่พบได้น้อย โดยพบในอัตราส่วนประมาณ 1 ต่อ 10,000 - 20,000 ของเด็กแรกเกิดมีชีพทั่วโลก และพบได้มากในภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิก ในปัจจุบันมีรายงานตัวเลขอุบัติการณ์ของการเกิดโรคในประเทศได้หวั่น พบอัตราส่วนของทารกที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันต่อเด็กปกติ 1:15,000 (24) สำหรับประเทศญี่ปุ่นมีรายงานพบในอัตราส่วน 1:11,000 (25) และในพอลินีเซีย (French Polynesia) มีรายงานพบในอัตราส่วน 1:26,000 ของเด็กแรกเกิดมีชีพ (26) โดยมีรายงานพบในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย และนอกจากนี้ในการศึกษา time distribution และ space distribution ของโรคท่อน้ำดีตีบตันพบว่าโรคท่อน้ำดีตีบตันสามารถเกิดขึ้นได้ในทุกช่วงเวลาและทุกฤดูกาล (27-29)

ลักษณะทางพยาธิวิทยา

ในระดับจุลภาคของท่อน้ำดีนอกตับ (extrahepatic biliary tree) ที่เกิดการตีบตัน โดยสมบูรณ์จากกลไกการอักเสบและกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ (cicatricial granulation tissue) ในเนื้อเยื่อชั้นตับจะพบเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบมากมาย และพบมีการสร้างพังผืด (fibrosis) อีกทั้งบริเวณชั้นตับยังพบโครงสร้างคล้ายท่อเล็กๆ ซึ่งเชื่อว่าเปลี่ยนแปลงมาจากท่อน้ำดีหลัก โดยท่อเล็กๆ บริเวณชั้นตับเหล่านี้ยังเป็นช่องทางที่สามารถระบายน้ำดีจากตับมายังบริเวณ porta hepatis อีกด้วย (1)

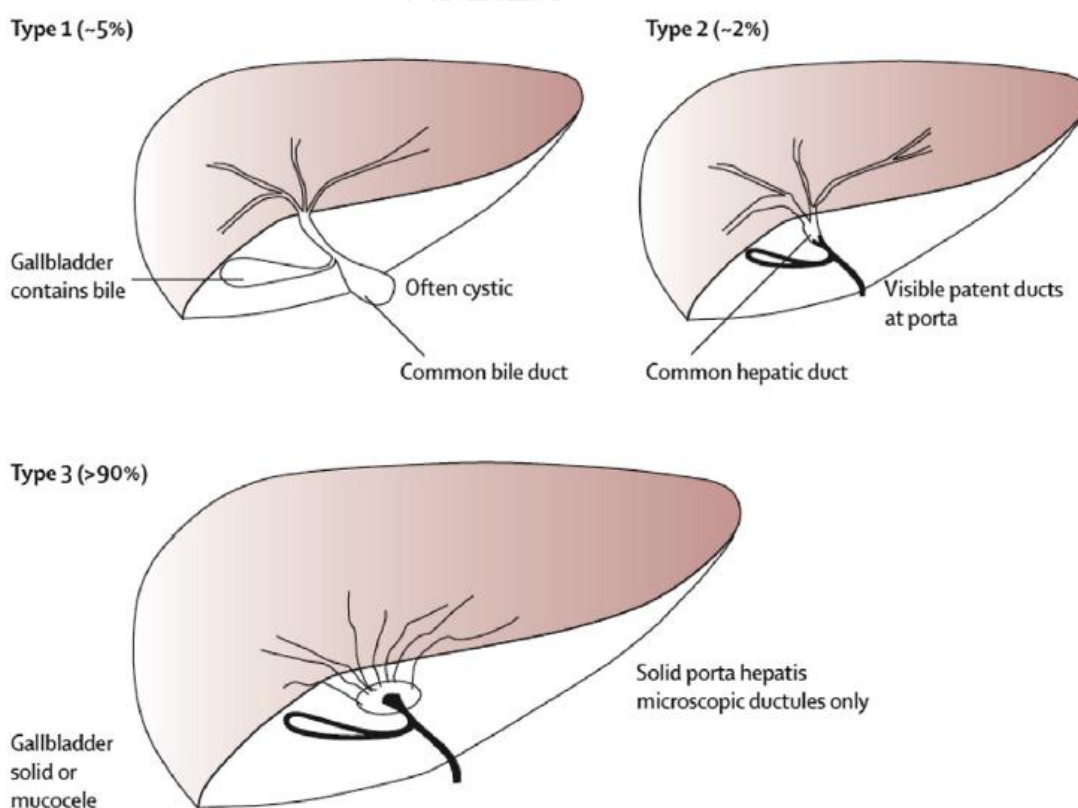
ในผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันจะพบอาการตับโต โดยเนื้อตับมีลักษณะแข็ง สีเขียวคล้ำ และเกิด nodular cirrhosis ในระยะต่อมา ในระดับจุลภาคในระยะแรกพบว่า โครงสร้างของ portal tracts ยังคงปกติ มีเพียง bile pigment ที่แทรกในเนื้อตับและท่อน้ำดีเล็กๆ (bile canaliculi) ซึ่งต่อมาจะกว้างออกและเพิ่มจำนวนมากขึ้น หากการตีบตันไม่ได้รับการรักษา โครงสร้างของ portal tracts จะถูกทำลาย และเกิดภาวะตับแข็งในที่สุด โดยจุลพยาธิสภาพในระยะที่เกิดตับแข็งแล้ว จะพบการตายของเซลล์ตับ และ giant cells เปลี่ยนแปลงรูปร่าง อีกทั้งยังพบ mononuclear cells แทรกในเนื้อตับอีกด้วย ซึ่งพยาธิสภาพในระยะท้ายเหล่านี้พบได้ในผู้ป่วยเด็กกลุ่มโรคตับทั่วไป ทำให้ไม่สามารถวินิจฉัยโรคท่อน้ำดีตีบตันได้จากการตัดชิ้นเนื้อตับมาตรวจทางห้องปฏิบัติการเท่านั้น (30)

พยาธิวิทยาของ extrahepatic biliary system มีความหลากหลายอย่างมาก ซึ่งสามารถจำแนกชนิดของโรคท่อน้ำดีตีบตันโดยใช้ตำแหน่งของการตีบตันเป็นพื้นฐานในการจำแนก แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดดังนี้ (1)

ชนิดที่ 1 มีลักษณะการตีบตันบริเวณ common bile duct ในขณะที่ proximal duct ยังปกติ ซึ่งเป็นการตีบตันเฉพาะส่วนปลายของท่อน้ำดี พบประมาณร้อยละ 5 ของผู้ป่วย

ชนิดที่ 2 มีลักษณะการตีบตันของ common hepatic duct และพบ cystic structure ในบริเวณ porta hepatis เป็นการตีบตันเฉพาะส่วนต้นของท่อน้ำดี พบประมาณร้อยละ 2 ของผู้ป่วย

ชนิดที่ 3 มีลักษณะการตีบตันของ common bile duct รวมทั้ง right และ left hepatic duct ไปจนถึง porta hepatis ซึ่งเป็นการตีบตันตลอดความยาวของท่อน้ำดีในส่วน extrahepatic bile duct ซึ่งพบได้มากกว่าร้อยละ 90 ของผู้ป่วย



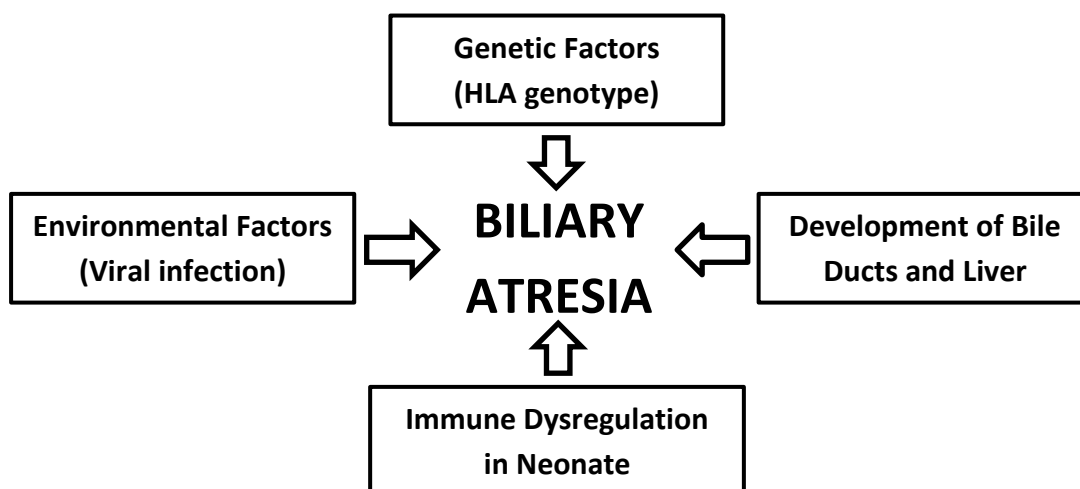
รูปที่ 1 แสดงการจำแนกโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิดที่ 1-3 ตามตำแหน่งการตีบตันของท่อน้ำดี (1)

ลักษณะอาการทางคลินิก

เด็กทารกที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันจะมีภาวะดีซ่าน (jaundice) คือ ผู้ป่วยจะมีอาการตัวเหลือง ตาเหลือง จากการที่มีน้ำดีคั่งสะสมภายในตับ ซึ่งภาวะดีซ่านอาจพบได้ทั่วไปในเด็กทารกแรกเกิด แต่จะสามารถหายเองได้ภายใน 2 สัปดาห์ แต่อาการตัวเหลือง ตาเหลือง ที่มีสาเหตุมาจากโรคตับอาการจะไม่หายไป หรือหายเองได้อาจต้องใช้เวลามากกว่า 2 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังพบภาวะอื่นๆ ร่วมด้วย ได้แก่ ปัสสาวะมีสีเหลืองเข้ม อุจจาระมีสีซีด จากการที่มีปริมาณบิลิรูบินสะสมมากในกระแสเลือด ตับและม้ามโต (hepatosplenomegaly) ซึ่งอาการเหล่านี้ส่งผลต่อกระบวนการดูดซึมสารอาหารประเภทละลายในไขมัน ลักษณะดังกล่าวจะมีการแสดงออกในผู้ป่วยอย่างช้าๆ นอกจากนี้ผู้ป่วยบางรายจะมีอาการโลหิตจาง (anemia) ทุพโภชนาการ (malnutrition) ภาวะความดันในหลอดเลือดดำของตับสูง (portal hypertension) ท้องมาน (ascites) และหลอดเลือดโป่งพองในหลอดอาหาร (esophageal varices) เกิดขึ้นร่วมด้วย

สาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน

ในปัจจุบันสาเหตุของโรคท่อน้ำดีตีบตันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด จากการศึกษาที่ผ่านมาเชื่อว่าสาเหตุของโรคเกิดจากหลายๆ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกัน ดังแสดงในแผนภาพที่ 2 รวมไปถึงปัจจัยก่อนคลอดและหลังคลอดที่เป็นตัวกระตุ้นทำให้เกิดโรค โดยปัจจัยเหล่านี้เกิดขึ้นอย่างจำเพาะเจาะจงในช่วงระยะเวลาที่เหมาะสม คือระหว่างช่วงก่อนคลอดจนถึงอายุ 3 เดือนนับตั้งแต่แรกคลอด (31)



แผนภาพที่ 2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน (31)

โรคท่อน้ำดีตีบตันไม่จัดว่าเป็นโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม จากการศึกษาแบบ discordance ในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นคู่เด็กทารกฝาแฝด (identical twins) พบว่ามีเพียง 1 ใน 2 ราย จากแต่ละกลุ่มตัวอย่างที่ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน (discordant twins) และพบว่าการเกิดซ้ำของโรคท่อน้ำดีตีบตันในครอบครัวเดียวกันนั้น มีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อยมาก (32, 33) สำหรับในประเทศไทยได้มีการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่เป็นฝาแฝดจำนวน 8 คู่ พบว่าผู้ป่วยทุกรายที่เป็นแฝดจะเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันเพียง 1 ราย (discordant twins) โดยที่แฝดอีกคนมีลักษณะปกติ และไม่พบอาการเกี่ยวข้องกับโรคท่อน้ำดีตีบตัน นอกจากนี้ในกลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษามีแฝด 1 คู่ ที่มีลักษณะ dizygotic twins แฝดจำนวน 6 คู่ พบว่ามีหมู่เลือด ABO หมู่เดียวกัน และแฝด 2 คู่ จาก 8 คู่ พบว่ามีหมู่เลือด minor ที่เหมือนกัน (Dec, MM และ Le a-b-) สำหรับแฝดในกลุ่มสุดท้ายได้พิสูจน์โดยใช้วิธี short tandem repeat (STR) ของรหัสพันธุกรรมในพ่อแม่และแฝด พบว่าแฝดทั้ง 2 คู่ที่น่าจะเป็น monozygotic twins ซึ่งมีโอกาสเกิดได้มากกว่าร้อยละ 99.99 ผลการศึกษาดังกล่าวจึงสนับสนุนแนวคิดที่ว่า โรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นโรคที่เกิดขึ้นหลังคลอดมากกว่าที่จะเป็นโรคที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมโดยตรง (34)

นอกจากนี้โรคท่อน้ำดีตีบตันยังไม่จัดว่าเป็นโรคติดต่อ โดยเชื่อว่าโรคท่อน้ำดีตีบตันเกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรม และมีปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องเกิดขึ้นในช่วงของการตั้งครรภ์และช่วงแรกของการคลอด โดยมีทฤษฎีที่อธิบายที่ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค ดังนี้ (35)

1. Defective morphogenesis/genetic factor

จากการศึกษาที่ผ่านมา เชื่อว่าสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันประเภท foetal form เกิดจากความผิดปกติของกระบวนการ morphogenesis ของท่อน้ำดีในระยะ embryogenesis ซึ่งเป็นความผิดปกติแต่กำเนิดเนื่องมาจากพันธุกรรม โดยพบว่าประมาณร้อยละ 10-20 ของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน จะมีความผิดปกติอื่นๆ ตั้งแต่กำเนิดร่วมด้วย เช่น splenic abnormalities (asplenia หรือ polysplenia) total/partial situs inversus, mediopositioned liver, intestinal malrotation, atretic inferior vena cava, preduodenal portal vein และ congenital heart defects โดยกลุ่มอาการดังกล่าวเรียกว่า BASM syndrome ซึ่งเป็นความผิดปกติที่พบในระยะ embryogenesis จากการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนในหนูทดลอง พบความผิดปกติของ visceral organ symmetry ในโรค polysplenia syndrome (36) และโรคท่อน้ำดีตีบตัน

เนื่องจากเกิดการกลายพันธุ์แบบ recessive insertion บริเวณ proximal ของโครโมโซมคู่ที่ 4 และเกิดการกลายพันธุ์แบบ complete deletion ในยีน *Inversion (INV)* มีผลทำให้เกิดความผิดปกติของ hepatobiliary system (37, 38) จากสาเหตุดังกล่าวทำให้ Schon และคณะ (39) ได้ทำการวิเคราะห์ยีน *INV* ในมนุษย์ โดยผลการศึกษา ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *INV* ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันรวมถึงในกลุ่มโรค BASM ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน *INV* ไม่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน สำหรับการศึกษานี้ของ Bamford และคณะ (40) ที่ได้ทำการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด situs defect พบว่ายีน *CFC1* ซึ่งถอดรหัสเป็นโปรตีน CRYPTIC เกิดการกลายพันธุ์ของยีนแบบ heterozygous gene mutation ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการของโรค polysplenia syndrome รวมด้วย จำนวน 9 ราย จากทั้งสิ้น 144 ราย ต่อมา Jacquemin และคณะ (41) ได้ทำการศึกษารายการกลายพันธุ์ของยีน *CFC1* แบบ heterozygous gene mutation ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือดจำนวน 2 ราย ซึ่งประกอบด้วยผู้ป่วยที่เป็น laterality defect และผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน โดยได้รับการถ่ายทอดพันธุกรรมจากมารดาที่มีสุขภาพดี จากลักษณะดังกล่าว ผู้วิจัยจึงได้ข้อสรุปว่ายีน *CFC1* มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรค และเมื่อไม่นานมานี้ พบการกลายพันธุ์บน exon ที่ 5 ของยีน *CFC1* ที่ทำให้เกิดการแทนที่กรดอะมิโน (Ala145Thr) ในเด็กกลุ่มโรค BASM 5 ราย จากทั้งสิ้น 10 ราย (42) จึงสรุปได้ว่าการกลายพันธุ์ของยีน *CFC1* แบบ heterozygous gene mutation มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคกลุ่ม BASM แต่ถึงอย่างไรก็ตาม สาเหตุของการเกิดโรคประกอบไปด้วยหลายปัจจัย ทั้งปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมและปัจจัยทางพันธุกรรมที่ช่วยกระตุ้นทำให้เกิดโรค

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาของ Kohsaka และคณะ (43) ที่ได้ทำการศึกษาบทบาทของยีน *JAGGED1* ที่แสดงออกใน ductal plate epithelia และยีน *HNF6* สำหรับยีน *JAGGED1* เป็นยีนที่แสดงออกให้ nuclear transcription factor ใน North signaling pathway ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการ cell fate ในช่วงการพัฒนาของ extrahepatic bile duct และ gall bladder จากผลการศึกษาพบว่า ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 9 ราย จากทั้งสิ้น 102 ราย มีการกลายพันธุ์ของยีน *JAGGED1* แบบ missense mutation ซึ่งพบว่าผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าว จะมีอาการรุนแรงกว่าผู้ป่วยที่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าว และจากการศึกษาของ Clotman และคณะ (44) ที่ได้ทำการ knockout ยีน *Hnf6* ในหนูทดลอง พบว่าหนูจะมีความผิดปกติ

ปกติของ hepatic artery ต่อมา Campbell และคณะ (45) พบว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีปริมาณ alpha-1-antitrypsin (A1AT) heterozygosity สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ โดยพบว่าอัลลีลที่มีความผิดปกตินี้มีความสัมพันธ์กับการดำเนินของโรคให้เป็นไปอย่างรวดเร็ว และเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยมีอาการรุนแรงและต้องได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายตับ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า A1AT heterozygosity เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรค อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลการศึกษานี้ต่อไป

2. Vascular abnormalities

จากการศึกษาของ Pickett และคณะ (46) ที่เชื่อว่าระบบ intrahepatic bile duct และ extrahepatic bile duct ได้รับเลือดจากระบบหมุนเวียนเลือดของ hepatic artery ดังนั้นหากระบบ hepatic artery ได้รับความเสียหาย อาจส่งผลทำให้เกิด hepatic arterial ischemia จนเป็นสาเหตุทำให้มีการตีบตันของทางเดินน้ำดี จากแนวคิดดังกล่าว Pickett และคณะ จึงได้ทำการทดลองในแกะ โดยทำการผูก hepatic vessels ของแกะในระยะ fetus เป็นผลทำให้แกะมีการคั่งของน้ำดีในตับ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการสังเกตลักษณะของ extrahepatic biliary tree ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน ที่พบว่าผู้ป่วยจะมีความผิดปกติของแขนงหลอดเลือด hepatic artery (46) โดย Pickett และคณะได้อธิบายว่า ความผิดปกติของหลอดเลือดมีผลทำให้เกิด lesion ขึ้นในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน แต่กระบวนการเกิด lesion ยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Clotman และคณะ (44) ที่ทำการศึกษายีน *HNF6* ซึ่งเป็น nuclear transcription factor ที่มีหน้าที่ควบคุมการพัฒนาของ intrahepatic bile duct และ gall bladder ในหนูทดลองที่ทำการ knockout ยีน *HNF6* พบว่าในหนูทดลองเหล่านี้มีความผิดปกติของ ductal plate malformation ร่วมกับความผิดปกติของแขนงหลอดเลือด จึงเป็นการยืนยันถึงความเกี่ยวข้องกันระหว่างโครงสร้างของหลอดเลือดกับการพัฒนาของ intrahepatic bile duct

3. Viral infection

จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาพบว่าสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันน่าจะเกิดจากการติดเชื้อไวรัสหรือการสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนเชื้อไวรัส (29) นอกจากนี้จากการศึกษาทดลองฉีดเชื้อไวรัสเข้าไปในหนูที่เพิ่งเกิดใหม่ เพื่อให้เกิดภาวะติดเชื้อ พบว่าหนูจะสร้าง lesion ที่คล้ายคลึงกับพยาธิสภาพของโรคท่อน้ำดีตีบตัน (47) ในปี ค.ศ. 1974 Landing BH. (48)

นักพยาธิวิทยาโรคเด็กได้เสนอแนวคิดที่ว่า โรคท่อน้ำดีตีบตันจัดเป็นโรคกลุ่ม idiopathic neonatal hepatitis และโรค choledochal cyst ซึ่งเป็นโรคที่มีผลจากการได้รับการบาดเจ็บที่บริเวณต่างๆ ของ hepatobiliary tree นอกจากนี้ Landing BH. ได้เสนอและคิดค้นคำว่า infantile obstructive cholangiopathy และพบว่าสาเหตุของโรคท่อน้ำดีตีบตันน่าจะเกี่ยวข้องกับไวรัสตับอักเสบ แต่จากการศึกษาต่อมาพบว่า ไวรัสตับอักเสบทั้งชนิด เอ บี และซี ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน ทำให้ในปัจจุบันการศึกษาหาสาเหตุของการเกิดโรคจึงมุ่งไปที่ไวรัสชนิดอื่น

จากรายงานการศึกษาพบไวรัสหลายชนิดที่อาจเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคท่อน้ำดีตีบตัน เช่น reovirus, rotavirus, cytomegalovirus (49, 50) human papilloma virus (51, 52), human herpesvirus 6 (50) และ epstein-Barr virus (53) แต่ไวรัสที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในช่วงหลายปีที่ผ่านมาคือ cytomegalovirus, reovirus และ rotavirus (54)

3.1. Cytomegalovirus (CMV)

CMV เป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ จัดอยู่ในวงศ์ *Herpesviridae* เป็นไวรัสชนิดหนึ่งที่มีความสนใจ เนื่องจากนักวิจัยส่วนใหญ่เชื่อว่าสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัส CMV (55, 56) มีรายงานการศึกษาพบว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันส่วนใหญ่จะมีการติดเชื้อไวรัส CMV (57) ในการศึกษาจากประเทศสวีเดน โดย Fischler และคณะ (58) ตรวจพบแอนติบอดีชนิด IgM ของเชื้อไวรัส CMV ในมารดาของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน และพบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส CMV ในเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยจำนวนครึ่งหนึ่งของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ศึกษาทั้งหมด ต่อมาในปี ค.ศ. 2005 มีรายงานการตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส CMV ประมาณร้อยละ 30-40 ในเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและไม่พบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส CMV ในกลุ่มควบคุม (53, 59) อย่างไรก็ตามผลการทดลองยังมีความขัดแย้งกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ไม่สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส CMV ในเนื้อเยื่อตับได้ (60) สำหรับบทบาทของไวรัส CMV กับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันยังคงต้องได้รับการศึกษาต่อไป แต่ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการใช้หนูที่ติดเชื้อ CMV มาใช้เป็นโมเดลในการศึกษาโรคท่อน้ำดีตีบตัน

3.2. Reovirus

Reovirus เป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอสายคู่ จัดอยู่ในวงศ์ *Reoviridae* เป็นไวรัสอีกชนิดหนึ่งที่มีความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากพบว่าเมื่อมีการติดเชื้อ reovirus จะทำให้เกิดการอักเสบบริเวณ intrahepatic bile duct และ extrahepatic bile duct รวมถึงบริเวณตับ ซึ่งลักษณะการอักเสบดังกล่าวคล้ายกับอาการของโรคท่อน้ำดีตีบตัน (61) และรอย lesion ที่เกิดขึ้นจะยังคงอยู่ภายหลังจากการได้รับเชื้อ แม้ว่าจะไม่ตรวจพบแอนติเจนของเชื้อ reovirus แล้วก็ตาม จากการศึกษาของ Morecki และคณะ (62) ในปี ค.ศ. 1982 ได้ทำการตรวจวัดปริมาณแอนติบอดีชนิด igG ต่อเชื้อ reovirus ในซีรัมของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันด้วยวิธี indirect immunofluorescence พบว่าผู้ป่วยจำนวน 9 ราย จากทั้งสิ้น 15 ราย มีแอนติบอดีต่อเชื้อ reovirus และไม่พบแอนติบอดีต่อเชื้อ reovirus ในกลุ่มควบคุม ต่อมา Morecki และคณะ ยังได้ทำการศึกษาโดยการติดตามทารกที่มีภาวะคั่งของน้ำดีจำนวน 167 ราย พบว่าร้อยละ 62 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีแอนติบอดีต่อเชื้อ reovirus สำหรับในกลุ่มผู้ป่วยโรค idiopathic neonatal hepatitis พบประมาณร้อยละ 52 และพบในกลุ่มควบคุมน้อยกว่าร้อยละ 12 (63) อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ยังมีข้อจำกัดที่ว่า ในช่วง 6 เดือนแรกของเด็กทารกแรกคลอดจะได้รับ igG จากมารดาโดยตรงผ่านทางรก ซึ่งผลการวิจัยอาจไม่ได้สะท้อนถึงการติดเชื้อ reovirus อย่างแท้จริง นอกจากนี้ Richardson และคณะ (64) ได้ทำการศึกษาและตรวจพบแอนติบอดีชนิด igM ของเชื้อ reovirus ในทารกที่มีภาวะคั่งของน้ำดี ได้แก่ โรคท่อน้ำดีตีบตัน กลุ่มโรค idiopathic neonatal hepatitis และโรคขาด A1-antitrypsin เป็นต้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อ reovirus ไม่ได้เกิดเฉพาะในโรคท่อน้ำดีตีบตันเท่านั้น นอกจากนี้ในการศึกษาของ Tyler และคณะ (65) ตรวจพบชิ้นส่วนของยีน L1 ของเชื้อ reovirus ในเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน ขณะที่การศึกษาของ Steele และคณะ (66) ไม่พบอาร์เอ็นเอของยีน M3 ของเชื้อ reovirus ในเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 14 ราย แสดงให้เห็นถึงความขัดแย้งจากการศึกษาข้างต้น และจากการศึกษาต่อมาในประเทศญี่ปุ่น (67) มีการรายงานว่าจะไม่สามารถตรวจพบอาร์เอ็นเอของเชื้อ reovirus ในส่วนของยีน L1 ทั้งในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและในกลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นไปได้ว่าประชากรที่ใช้ศึกษาในญี่ปุ่นมีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 8.7 เดือน ซึ่งต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Tyler และคณะ ที่ศึกษาในประชากรที่มีอายุเฉลี่ยเพียง 2.2 เดือน (65) ทำให้การตรวจวัดการติดเชื้อไวรัส อาจไม่ได้ผล เนื่องจากร่างกายสามารถกำจัดเชื้อไวรัสออกจากตับและทางเดินน้ำดีได้ภายในไม่กี่

สัปดาห์หลังติดเชื้อ นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบแอนติเจนของเชื้อ reovirus ที่บริเวณ bile duct remnants ของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน (62, 68) และในลูกลิง rhesus เช่นเดียวกัน (69) และในงานวิจัยของ Steele และคณะ (70) ที่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA ของเชื้อ reovirus ในเนื้อเยื่อตับของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 14 ราย โดยใช้วิธี nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) จากผลการศึกษา ไม่พบการแสดงออกของ mRNA ของเชื้อ reovirus ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน จากผลที่ไม่สอดคล้องกันนี้อาจเกิดจากวิธีการเตรียมเนื้อเยื่อ หรือขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ รวมถึงการเลือกใช้ PCR-primer ในการตรวจสอบชิ้นส่วนยีนของเชื้อ reovirus ที่แตกต่างกัน และหากเชื้อ reovirus มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน ในการศึกษาเชื้อไวรัสชนิดนี้จะต้องมีวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพที่ดีและมีความเหมาะสม อีกทั้งต้องมีเกณฑ์ในการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างที่จะนำมาใช้ในการศึกษา และจำนวนประชากรที่ใช้ในการศึกษาจะต้องมีปริมาณมากเพียงพอ นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 1968 Papadimitriou (71) ได้รายงานพยาธิสภาพของระบบทางเดินน้ำดีในหนูทดลองที่ทำให้ติดเชื้อ rotavirus serotype 3 พบว่า เชื้อไวรัสเพิ่มจำนวนภายในเซลล์เยื่อบุผิวท่อน้ำดี ทำให้เกิดการตายของเยื่อบุผิวท่อน้ำดีแบบ necrosis (72)

3.1 Rotavirus

Rotavirus เป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมแบบอาร์เอ็นเอสายคู่ จัดอยู่ในวงศ์ *Reoviridae* จากการศึกษาของ Riepenhoff-Talty และคณะ (64) ที่ได้ทดลองนำเชื้อ rotavirus group A ฉีดให้หนูทดลองเพื่อทำให้เกิดการติดเชื้อ ผลการทดลองพบว่า มีการตีบตันของ extrahepatic bile duct เกิดขึ้นในหนู และมีลักษณะของเนื้อเยื่อคล้ายกับในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน จากนั้นมีการทดลองนำเนื้อเยื่อบริเวณ hepatobiliary จากผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมาวิเคราะห์หาเชื้อ rotavirus group C ด้วยวิธี RT-PCR ผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 10 ราย จากทั้งสิ้น 18 ราย พบการแสดงออกของ mRNA ของเชื้อ rotavirus group C และไม่พบการแสดงออกของ mRNA ของเชื้อ rotavirus group C ในกลุ่มควบคุม (73)

4. Toxin exposure

จากการศึกษาของ Herper และคณะ (74) ที่ได้ทำการสังเกตการเกิด outbreak ของโรคท่อน้ำดีตีบตันในลูกแกะและลูกวัว ที่มีภาวะดีซ่าน ถ่ายเป็นสีขาวย และตายภายในช่วงอายุ 4

สัปดาห์แรกหลังคลอด โดยพบว่าสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันนี้ เกี่ยวข้องกับการได้รับ สารพิษหรือเชื้อราจากสิ่งแวดล้อมในช่วงแรกเริ่มของการตั้งครรภ์ ซึ่งสารพิษและเชื้อต่างๆ มีผลทำให้ bile duct epithelia ในชั้น submucosa ได้รับการบาดเจ็บและส่งผลให้เกิดการทำลายของ extrahepatic bile ducts แต่อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่พบสารพิษจากสิ่งแวดล้อมใด ที่แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่ามีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันนอกจากการติดเชื้อไวรัส

5. Immune mechanism

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันมาจากกระบวนการ primary inflammatory ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตีบตันของท่อน้ำดี โดยมีรายงานพบ mononuclear cells แทรกซึมอยู่ใน portal tract ในเนื้อตับของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน จากการศึกษาของ Bill และคณะ (75) พบความสัมพันธ์ของ mononuclear inflammatory cells กับการตายแบบ necrosis ของเซลล์เยื่อบุผิวของท่อน้ำดี ซึ่งได้รับการยืนยันจาก Ohya และคณะ (76) ที่พบว่า การเปลี่ยนแปลงของ intrahepatic bile duct มีความสัมพันธ์กับเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แทรกซึมอยู่ใน เซลล์เยื่อบุผิวของท่อน้ำดี

กลไกที่เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายท่อน้ำดียังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด โดย Schreiber และ Kleinmen (77) ได้อธิบายว่า หากมีการติดเชื้อไวรัสหรือได้รับสารพิษในบริเวณ biliary epithelium จะมีผลทำให้เกิดการแสดงของแอนติเจนที่เยื่อบุผิวของท่อน้ำดี ซึ่งเกิดจากการตอบสนองของ macrophage ต่อการทำงานของ T lymphocyte เป็นผลให้บริเวณเยื่อบุผิวของท่อน้ำดีได้รับความเสียหาย จากการพบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งแบบ innate immunity และ acquire immunity ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันตั้งแต่แรกคลอดต่อแอนติเจนบริเวณเยื่อบุผิวท่อน้ำดี ทำให้สามารถอธิบายได้ว่าเหตุใดโรคท่อน้ำดีตีบตันจึงเกิดขึ้นภายใน 3 เดือนแรกของทารกแรกคลอด นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง immune regulatory protein ที่ยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันให้อ่อนแอลงและทำให้เกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน รวมถึงกลุ่มโรคตับที่เกี่ยวข้องกับความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ autoimmune hepatitis, primary sclerosing cholangitis และ primary biliary cirrhosis พบว่าโรคเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับ HLA antigen ที่จำเพาะ โดยเฉพาะโมเลกุล HLA มีหน้าที่แสดงแอนติเจนให้กับ unprimed T lymphocyte

จากการศึกษาของ Silviara และคณะ (78) พบว่าสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันในผู้ป่วยชาวยุโรปมีความสัมพันธ์กับ allotype HLA-B12, haplotype A9-B5 และ haplotype A28-B35 โดยพบในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันร้อยละ 49 และในกลุ่มควบคุมร้อยละ 23 แต่ไม่มีนักวิจัยกลุ่มอื่นที่สนใจศึกษาถึงความสัมพันธ์ดังกล่าว (79, 80) ต่อมานักวิจัยกลุ่มเดียวกันนี้ได้รายงานว่าไม่พบความสัมพันธ์ของ HLA กับโรคท่อน้ำดีตีบตัน (81) ในการศึกษาของประเทศอียิปต์ พบความสัมพันธ์ของ haplotype HLA-B8 และ haplotype HLA-DR3 กับโรคท่อน้ำดีตีบตัน (82) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานสนับสนุนความสัมพันธ์ของ HLA กับโรคท่อน้ำดีตีบตันอย่างชัดเจน ทำให้นักวิจัยมุ่งสนใจไปที่โมเลกุลอื่นในระบบภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องในกลุ่มโรคตับที่เกิดจากความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกัน จากงานวิจัยของ Donaldson และคณะ (81) ไม่พบความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) ของยีน *HLA*, *interleukin-1* และ *interleukin-10* กับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน โดยศึกษาในผู้ป่วยจำนวน 101 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมจำนวน 134 ราย อย่างไรก็ตามการศึกษาลำดับของ MHC class I และ MHC class II เป็นการศึกษาที่ยังไม่สมบูรณ์ เนื่องจากมียีนที่เกี่ยวข้องกับ HLA มากกว่า 100 ยีนในระบบจีโนมของมนุษย์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามีความสัมพันธ์ของ HLA ชนิดอื่นๆ กับกระบวนการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน

ในการศึกษาของ Davenport และคณะ (83) ด้วยวิธี immunohistochemistry พบ CD4+ T lymphocytes และ natural killer cells (CD56+) จำนวนมากในตับและ extrahepatic bile ducts ของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Bezerra และคณะ (84) มีการใช้เทคนิค DNA microarray เพื่อตรวจการแสดงออกของยีนในกระบวนการ proinflammatory immunity ในผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตัน พบมีการแสดงออกของยีนที่สร้าง T-helper I cytokine เพิ่มขึ้น เช่น *interferon- γ* (*IFN- γ*) และมีการแสดงออกของยีนที่สร้าง T-helper II cytokine ลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงบทบาทของ T-helper I cytokine กับการเกิดพยาธิสภาพของโรคท่อน้ำดีตีบตัน

นอกจากนี้เชื่อว่าโรคท่อน้ำดีตีบตันอาจเกิดจากกระบวนการ autoimmune mediated process โดยมีรายงานการศึกษาพบ anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (31) และ alpha-enolase antibodies ในซีรัมของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน (85) ในปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนต่างๆ กับโรคที่

เกี่ยวข้องกับระบบ autoimmunity ซึ่งสามารถใช้ทำนายความเสี่ยงของการเกิดโรคในแต่ละบุคคลได้ โดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมของยีน มีรายงานการศึกษาของ Bernal และคณะ (86) ที่ได้ทำการศึกษาคความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *transforming growth factor beta (TGF-β)* พบว่ามีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดโรค primary sclerosing cholangitis โดยผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Mitchell และคณะ (87) นอกจากนี้ในการศึกษาของ Donaldson และคณะในประเทศอังกฤษ (88) พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *interleukin-1* มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดโรค primary biliary cirrhosis และจากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณ promotor ของยีน *TGF-β*, *IL-1 (IL1B และ IL1RN)* และ *IL-10* ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 101 ราย กับกลุ่มควบคุมจำนวน 96 ราย ผลการศึกษาพบว่าลักษณะจีโนไทป์ อัลลีล และ haplotype block ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากผลการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า ลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *TGF-β* และ interleukin family อาจไม่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน แต่อย่างไรก็ตามปัจจัยทาง autoimmune ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันทำให้นักวิจัยเชื่อว่าน่าจะมียีนอื่นๆ ในกระบวนการควบคุมระบบภูมิคุ้มกันที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับสาเหตุของการเกิดการบาดเจ็บของทางเดินน้ำดีในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

มีการค้นพบว่าโรคท่อน้ำดีตีบตันเกิดจากการอักเสบของทางเดินน้ำดีทั้ง intrahepatic duct และ extrahepatic duct ทำให้ร่างกายตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบ โดยพบ CD4+ T lymphocytes และ macrophages แทรกอยู่ในเนื้อตับ และพบ soluble cellular adhesion molecules เพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยหลังได้รับการผ่าตัดแบบคาไซ จากนั้น Narayanaswamy และคณะ (89) ได้ทำการตรวจวัด inflammatory components ต่างๆ ประกอบด้วย adhesion molecules (sICAM-1 และ sVCAM-1), proinflammatory mediator cytokines ได้แก่ T-helper I (IL-2 และ IFN-γ) และ T-helper II (IL-4 และ IL-10) และ macrophage markers (TNF-α และ IL-18) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ได้รับการผ่าตัดแบบคาไซจำนวน 21 ราย จากผลการศึกษาไม่พบความแตกต่างของระดับ cytokines ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและกลุ่มเด็กปกติที่ไม่มีอาการเกี่ยวข้องกับโรคตับ แต่พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีระดับของ IL-2 และ IL-10 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรค cholestatic diseases

อื่นๆ และพบ sICAM-1 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับทั้งกลุ่มเด็กปกติและกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรค cholestatic diseases อื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันหลังจากได้รับการผ่าตัดแบบคาไซเป็นเวลา 6 เดือน จะพบ adhesion molecules และ cytokines สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้น IL-10 เท่านั้น จากผลการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่า sICAM-1 อาจเป็นตัวบ่งบอกความรุนแรงของโรคท่อน้ำดีตีบตันได้ดีที่สุด โดยพบว่าระดับ sICAM-1 ที่ตรวจวัดหลังได้รับการผ่าตัด 1 เดือน สามารถทำนายว่าผู้ป่วยจะต้องเข้ารับการผ่าตัดปลูกถ่ายตับภายใน 1 ปีแรกหรือไม่ ที่ระดับ cut off level เท่ากับ 1,799 ng/ml โดยมีค่า sensitivity ร้อยละ 87 และค่า specificity ร้อยละ 92 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ปริมาณ sICAM-1 เป็นตัวชี้วัดความเป็นไปของโรคและผลการรักษาได้ ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้มีรายงานพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นของ ICAM-1 ในเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน (90) นอกจากนี้ยังมีรายงานความสัมพันธ์ระหว่างอายุของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดกับปริมาณ sICAM-1 ในซีรัมของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน (91)

ในปี 2007 ได้มีงานวิจัยที่อธิบายถึงหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบ adaptive immune response และ autoimmunity ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดพยาธิสภาพของโรคท่อน้ำดีตีบตัน โดยได้อธิบายกลไกการกระตุ้นของเชื้อไวรัสต่อ T cell-mediated autoreactivity ที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บของเยื่อบุผิวท่อน้ำดีในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันดังแสดงดังรูปที่ 2 (22) ได้แก่

1. Bile duct epithelia (BDE) virus infection

เกิดการติดเชื้อไวรัสที่บริเวณเยื่อบุผิวของท่อน้ำดี

2. Phagocytosis of viral antigen

การติดเชื้อไวรัสที่บริเวณเยื่อบุผิวท่อน้ำดีเป็นสาเหตุให้เซลล์บริเวณนั้นได้รับการบาดเจ็บ โดยส่วนของไวรัสจะถูก phagocytose โดย macrophages หรือ dendritic cells

3. Presentation of viral antigen and T cell activation

macrophages หรือ dendritic cells แสดงแอนติเจนของเชื้อไวรัสต่อ naïve T cell และมีการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนของ CD4+ T cells ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสโดย IL-2 cytokine

4. Effector T cell functions and progressive BDE injury

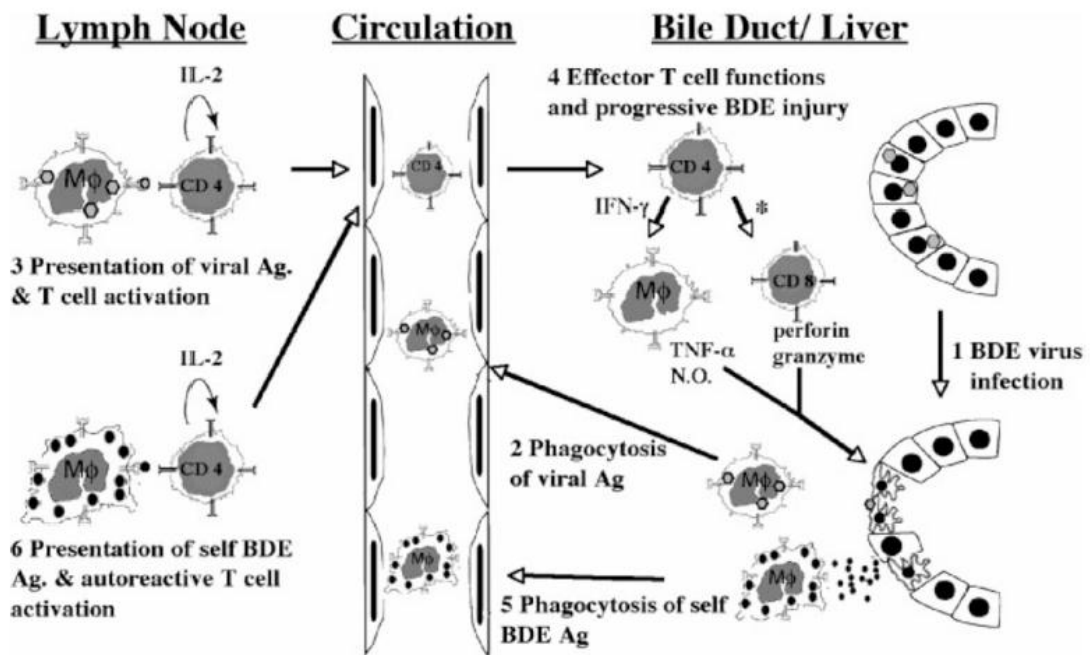
CD4+ T cells ที่ถูกกระตุ้นเดินทางไปยังบริเวณเยื่อบุท่อน้ำดีที่มีการติดเชื้อไวรัส และแสดงบทบาทในการกำจัดเชื้อไวรัสด้วยการกระตุ้น macrophages โดยการเหนี่ยวนำของ IFN- γ และกระตุ้น cytotoxic CD8+ T cells จากนั้น macrophages จะหลั่ง TNF- α , nitric oxide (N.O.) และ reactive oxygen species ขณะที่ CD8+ T cells จะหลั่ง granzyme และ perforin ทำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptotic และ necrotic ซึ่งส่งผลให้เยื่อบุท่อน้ำดีได้รับการบาดเจ็บ

5. Phagocytosis of self BDE Antigen

ต่อมาเยื่อบุท่อน้ำดีที่ได้รับการบาดเจ็บจะกลายเป็นแอนติเจน และถูก phagocytose โดย macrophages หรือ dendritic cells

6. Presentation of self BDE antigen and autoreactive T cell activation

สุดท้าย macrophages หรือ dendritic cells นำเสนอแอนติเจนของเยื่อบุท่อน้ำดีให้น้ำดีให้กับ autoreactive T cell และเกิดกระบวนการกระตุ้น T cell เป็นทอดๆ ส่งผลให้เกิดการทำลายของเยื่อบุท่อน้ำดี



รูปที่ 2 แสดงแบบจำลองของกระบวนการกระตุ้น T-cell-mediated autoreactivity โดยไวรัสต่อการทำลายเยื่อบุท่อน้ำดี (22)

การวินิจฉัยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

โรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นสาเหตุที่พบบ่อยที่สุดในกลุ่มโรคตับที่ทำให้เด็กเสียชีวิตหลังคลอด และเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการผ่าตัดปลูกถ่ายตับในเด็ก (92) โดยการวินิจฉัยที่ล่าช้าเป็นหนึ่งในสาเหตุที่สำคัญในการกำหนดประสิทธิภาพของการผ่าตัดระบายน้ำดีและยังสามารถทำนายความรุนแรงของการดำเนินไปของโรคได้ในอนาคต ปัจจุบันมีวิธีตรวจสอบต่างๆ ที่ช่วยในการวินิจฉัยโรคท่อน้ำดีตีบตัน ได้แก่ การตรวจวัดโดยใช้ serum bile acid, liver biopsy, serum directed bilirubin, urinary sulfated bile acid, fecal bilirubin, stool color card และ radiologic methods (93) โดยปัจจุบันพบว่าการใช้ stool color card เป็นวิธีที่ได้รับความสนใจและเริ่มมีการใช้ในหลายประเทศ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย และมีประสิทธิภาพ โดยผู้ปกครองสามารถตรวจสอบสีอุจจาระได้เอง โดยอุจจาระที่มีสีซีดผิดปกติอาจเป็นผลมาจากการอุดตันของท่อน้ำดี (94)

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

1. การวัดระดับ bilirubin ในเลือด (serum fractionated bilirubin assay) เป็นการวิเคราะห์หาสาเหตุของอาการตัวเหลืองและตาเหลืองในผู้ป่วย โดยค่าที่นำมาใช้เป็นเกณฑ์ในการวิเคราะห์ คือ ค่าบิลิรูบินทั้งหมด (total bilirubin) ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 2 mg/dl และค่า direct bilirubin หรือ conjugated bilirubin โดยผู้ป่วยจะมีระดับ conjugated bilirubin ที่สูงกว่าปกติ (conjugated hyperbilirubinemia) คือมากกว่าร้อยละ 20 ของบิลิรูบินทั้งหมด บิลิรูบินเป็นสารสีเหลือง (bile pigment) เกิดจากการสลายตัวของ heme ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเม็ดเลือดแดง โดยตับจะทำหน้าที่กำจัดบิลิรูบินออกจากกระแสเลือดและขับออกจากร่างกายผ่านน้ำดีและปัสสาวะ ในผู้ป่วยที่เป็นโรคตับหรือโรคทางเดินน้ำดี จะส่งผลให้ระดับบิลิรูบินในเลือดเพิ่มสูงขึ้น วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่สามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามการตรวจวัดระดับบิลิรูบินเป็นการทดสอบที่ไม่จำเพาะ เพราะไม่สามารถบอกสาเหตุของการเกิดที่แท้จริงได้

2. การตรวจวิเคราะห์การทำงานของตับ (liver function test, LFT) โดยตรวจระดับเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST หรือ SGOT) และ alanine aminotransferase (ALT หรือ SGPT) ที่อาจสูงขึ้นเล็กน้อยในผู้ป่วย ซึ่งเกิดจากการที่เซลล์ตับถูกทำลายหรือเกิดการอักเสบ ทำให้มีการรั่วไหลของเอนไซม์จากเซลล์ตับเข้าสู่กระแสเลือด นอกจากนี้ยังตรวจวิเคราะห์ระดับเอนไซม์

alkaline phosphatase (ALP) และ gamma-glutamyl transferase (GGT) ซึ่งเป็นการวัดการทำงานของระบบทางเดินน้ำดีว่ามีการตีตันหรือไม่ หากมีการตีตันของท่อน้ำดีจะทำให้เอนไซม์ทั้งสองชนิดมีระดับสูงกว่าปกติ โดยเอนไซม์ AST สามารถพบได้ในเซลล์ชนิดอื่น เช่น เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เซลล์กล้ามเนื้อลาย ดังนั้นจึงอาจพบสูงขึ้นได้ในโรคที่ไม่เกี่ยวข้องกัตับ ในขณะที่การตรวจวัดเอนไซม์ ALP และ GGT เป็นการวัดการทำงานของระบบทางเดินน้ำดีว่ามีการอุดตันหรือไม่ หากมีการตีตันของท่อน้ำดีจะส่งผลให้ระดับเอนไซม์ทั้งสองชนิดเพิ่มสูงขึ้น โดย GGT เป็นการตรวจเสริมที่ช่วยยืนยันว่าระดับ ALP ที่สูงขึ้นมาจากความผิดปกติของตับและทางเดินน้ำดี เนื่องจากระดับ GGT จะไม่เพิ่มสูงขึ้นหากมีความผิดปกติของกระดูก รก หรือลำไส้ อย่างไรก็ตามการตรวจวัดการทำงานของตับอาจไม่สามารถแยกโรคท่อน้ำดีตีตันออกจากภาวะ severe neonatal hepatitis ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการทั้งหมดยังไม่สามารถบ่งชี้การเป็นโรคได้อย่างชัดเจน

3. การตรวจวัดอัลบูมินในเลือด เนื่องจากอัลบูมินเป็นโปรตีนที่ตับสร้างขึ้น ดังนั้นระดับอัลบูมินที่ลดลงจึงสามารถบ่งชี้ถึงการทำงานของตับที่เสื่อมลงได้ และการวัดเวลาการแข็งตัวของเลือดหรือที่นิยมเรียกว่า prothrombin time (PT) ซึ่งส่วนประกอบหลักที่ทำให้เลือดแข็งตัวเป็นโปรตีนที่สร้างโดยตับ ดังนั้นผู้ป่วยโรคตับที่ตีตันเสื่อมสภาพ การทำหน้าที่สร้างโปรตีนเหล่านี้จะลดลงทำให้เลือดใช้เวลาแข็งตัวนานขึ้น

ตารางที่ 1 ค่าทางชีวเคมีในการตรวจคัดกรองผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีตัน (1)

	Typical concentration at presentation	Normal range
Bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)	>100	<20
Alkaline phosphatase (IU/L)	>600	<500
Gamma-glutamyl transferase (IU/L)	>100	20-40
Aspartate aminotransferase (IU/L)	80-200	15-40
Alanine aminotransferase (IU/L)	80-200	10-55
Albumin (g/L)	Normal at presentation	37-56
Prothrombin time (s)	Normal at presentation	9-13

การตรวจสอบด้านรังสีวิทยา

การทำอัลตราซาวด์ (abdominal ultrasonography) เป็นการตรวจโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง เพื่อตรวจดูอวัยวะตับ ถุงน้ำดี และท่อน้ำดี ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ที่สุดในการวินิจฉัยโรคในเด็กที่มีภาวะ cholestatic jaundice โดยสามารถพบ cystic structure ในผู้ป่วยที่เป็นโรคท่อน้ำดีโป่งพอง (choledochal cyst) และโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิดที่ 1 วิธีนี้เป็นการตรวจวินิจฉัยที่มีความรวดเร็วและสามารถใช้เป็นข้อมูลในการบ่งชี้ภาวะของโรคท่อน้ำดีตีบตันได้ นอกจากนี้ยังสามารถบอกการขาดหายไปหรือการหดตัวของถุงน้ำดี การพบว่าถุงน้ำดีมีขนาดเล็กลงหลังทานนมเป็นการบ่งบอกว่าภาวะตัวเหลืองไม่ได้เกิดจากโรคท่อน้ำดีตีบตัน สำหรับลักษณะเฉพาะของโรคท่อน้ำดีตีบตันคือ จะพบก้อนสามเหลี่ยม (triangular cord) บริเวณ portal tract และไม่พบการขยายของ intrahepatic bile duct นอกจากนี้การตรวจด้วยวิธี ultrasonography ยังสามารถใช้ในการบ่งชี้รูปแบบของโรค polysplenia (preduodenal portal vein, interrupted inferior vena cava (IVC)) โดยการวิเคราะห์ผลตรวจทางอัลตราซาวด์ร่วมกับอาการทางคลินิกและผลการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการสามารถบ่งบอกภาวะของโรคท่อน้ำดีตีบตันได้ถูกต้องและมีความแม่นยำมากขึ้น (95)

การทำ Hepatobiliary scintigraphy

การตรวจทางเวชศาสตร์นิวเคลียร์ในระบบตับและทางเดินน้ำดี (hepatobiliary scintigraphy) เป็นการตรวจความสามารถของตับในการผลิตน้ำดี การไหลของน้ำดี และการอุดตันของระบบทางเดินน้ำดี โดยใช้สารเภสัชรังสี technetium-labeled isotope ร่วมกับอนุพันธ์ของ iminodiacetic acid (IDA) เมื่อสารนี้เข้าสู่กระแสเลือดจะถูกจับโดยเซลล์ตับ (hepatocyte) และขับออกสู่ทางเดินน้ำดีและลำไส้เล็กส่วน duodenum ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ความแม่นยำสูง โดยวิเคราะห์จาก isotope ที่ผ่านลงมายังลำไส้เล็ก หากพบ isotope ในบริเวณลำไส้เล็กจะสามารถสรุปได้ว่าภาวะตัวเหลืองนั้นไม่ได้มาจากโรคท่อน้ำดีตีบตัน แต่หากไม่พบ isotope บริเวณลำไส้จะยังไม่สามารถแยกออกจากโรคกลุ่ม neonatal hepatitis ได้ เนื่องจากในภาวะที่ตับเสียการทำงานไปมาก (severe neonatal hepatitis) ตับจะไม่สามารถจับสาร isotope ลงมายังลำไส้เล็กได้มากพอที่จะถูกตรวจวัดได้ (95)

การทำ Intraoperative cholangiography (IOC)

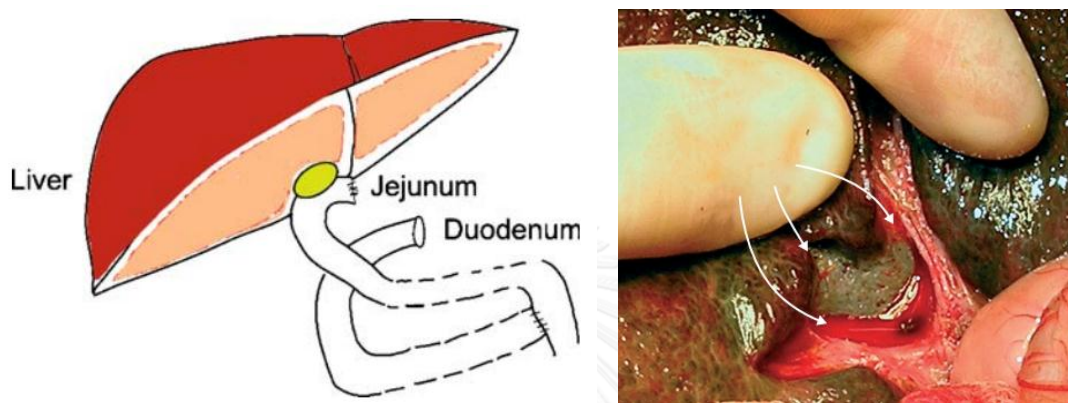
เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการยืนยันผลการวินิจฉัยในกรณีที่ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการข้างต้นไม่สามารถแยกออกจากโรคกลุ่ม neonatal hepatitis ได้ การทำ IOC เป็นการผ่าตัดแบบ mini-exploratory laparotomy โดยฉีดสารรังสีเข้าทางถุงน้ำดี ร่วมกับการทำ coagulogram เพื่อประเมินสภาพของตับและการแข็งตัวของเลือดก่อนการผ่าตัด ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิดที่ 3 ซึ่งเป็นชนิดที่พบบ่อยที่สุดประมาณร้อยละ 90 จะพบถุงน้ำดีมีขนาดเล็กจนไม่สามารถฉีดสารรังสีได้ แต่ในบางรายอาจพบถุงน้ำดีในภาพเอกซเรย์ซึ่งไม่มีทางติดต่อกับทางเดินน้ำดี หากพบว่าผู้ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันจากการทำ IOC ศัลยแพทย์อาจพิจารณาขยายแผลผ่าตัดเพื่อทำการผ่าตัดรักษาโรคท่อน้ำดีตีบตันได้ทันที (95)

นอกจากนี้ยังมีวิธีตรวจวินิจฉัยอื่นๆ ที่ยังไม่เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ การทำ magnetic resonance cholangiopancreatography (MRCP), endoscopic retrograde cholangio pancreaticography (ERCP), duodenal drainage test และ serum lipoprotein-X (95)

การรักษาโรคท่อน้ำดีตีบตัน

ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจะได้รับการผ่าตัดแบบคาไซ (Kasai portoenterostomy) ซึ่งเป็นการผ่าตัดนำส่วน extrahepatic bile duct ที่ตีบตันออกแล้วใช้ลำไส้ส่วน jejunum ประมาณ 30-40 เซนติเมตรไปต่อแทนท่อน้ำดีบริเวณ porta hepatis เป็นการระบายน้ำดีที่สะสมอยู่ในตับลงสู่ลำไส้เล็ก โดยการผ่าตัดแบบคาไซได้เกิดขึ้นในช่วงปี ค.ศ. 1960 โดยนายแพทย์ Morio Kasai ศัลยแพทย์ชาวญี่ปุ่น (3) ที่ได้ทำการตรวจทาง microscopic บริเวณท่อน้ำดีของเด็กทารกที่ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน พบว่ามีรูที่บริเวณ partial hepatis จำนวนมากที่น้ำดีสามารถไหลผ่านได้ การผ่าตัดนำลำไส้มาต่อกับบริเวณนี้ทำให้สามารถระบายน้ำดีออกจากตับลงสู่ลำไส้ได้ ซึ่งการผ่าตัดนี้ส่งผลดีต่อผู้ป่วยโดยเฉพาะอย่างยิ่งหากผู้ป่วยได้รับการรักษาภายในระยะเวลา 8 สัปดาห์นับตั้งแต่แรกคลอด ในปัจจุบันการผ่าตัดแบบคาไซได้รับการยอมรับให้เป็นมาตรฐานในการรักษาอาการของโรคท่อน้ำดีตีบตัน อย่างไรก็ตามการผ่าตัดแบบคาไซเป็นการผ่าตัดเพื่อแก้ไขปัญหาท่อน้ำดีตีบตันในเด็ก แต่วิธีนี้ไม่ใช่การรักษาเพื่อแก้ไขปัญหาท่อน้ำดีตีบตันในระยะยาว ดังนั้นการ

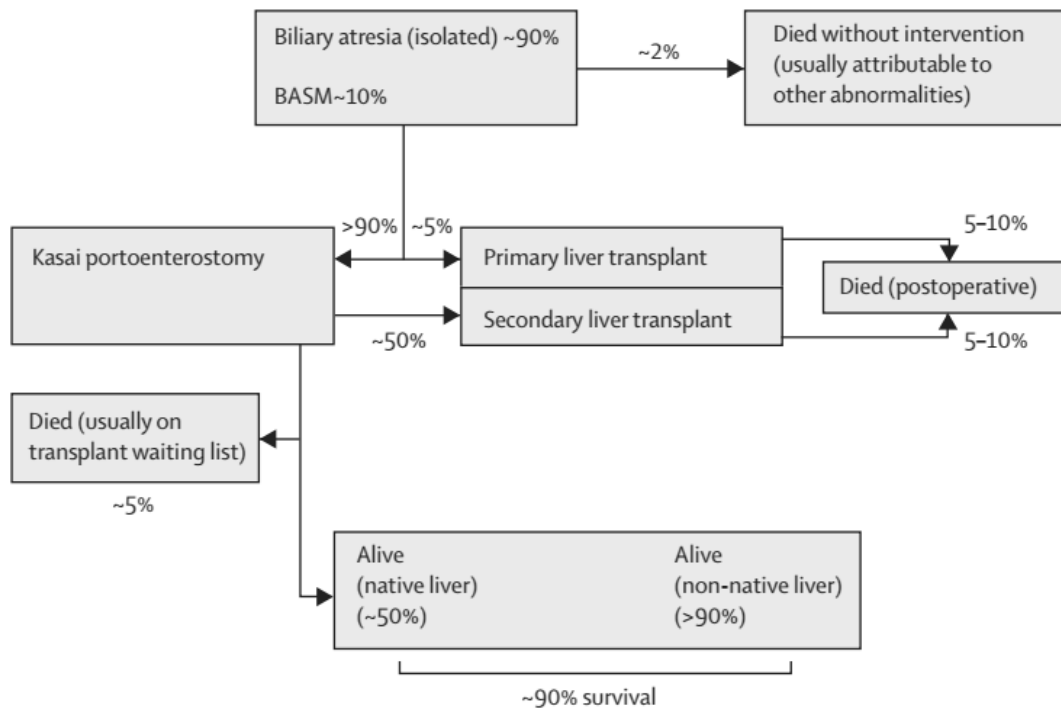
ผ่าตัดปลูกถ่ายตับจึงเป็นวิธีการรักษาในกรณีที่มีการผ่าตัดแบบคาไซไม่ประสบความสำเร็จ นอกจากนี้การผ่าตัดปลูกถ่ายตับยังเป็นวิธีการที่ใช้แก้ปัญหาการคั่งสะสมของน้ำดีที่เกิดร่วมกับการเกิดภาวะตับแข็ง สำหรับการผ่าตัดปลูกถ่ายตับนั้นมีปัญหาด้านค่าใช้จ่ายที่สูงมากและยังมีหน่วยบริการที่จำกัด ทำให้ผู้ป่วยจำนวนมากต้องเสียชีวิตเนื่องจากภาวะแทรกซ้อนที่เกิดจากภาวะตับแข็ง เช่น ภาวะเลือดออกในทางเดินอาหาร (esophageal varices) และตับวาย (liver failure)



รูปที่ 3 แสดงลักษณะของการผ่าตัดแบบคาไซ (ด้านซ้าย) (35) บริเวณ portal hepatis ที่ใช้ในการผ่าตัดแบบคาไซ (ด้านขวา) (1)

โดยปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อผลของการผ่าตัดรักษา ได้แก่ อายุของผู้ป่วยขณะได้รับการผ่าตัด ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการรักษา การได้รับการวินิจฉัยและการผ่าตัดอย่างรวดเร็วที่สุดจึงเป็นสิ่งจำเป็น นอกจากนี้ชนิดของการตีบตันและความรุนแรงของการเกิดพังผืด (fibrosis) ในตับก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการรักษา หากการผ่าตัดแบบ Kasai ล้มเหลว กล่าวคือน้ำดีไม่สามารถไหลลงสู่ลำไส้เล็กได้ หรือผู้ป่วยเกิดภาวะตับแข็งแทรกซ้อน วิธีเดียวที่สามารถทำให้ผู้ป่วยมีชีวิตรอดต่อไปได้คือ การผ่าตัดปลูกถ่ายตับ (liver transplant) ซึ่งโดยปกติจะทำก่อนผู้ป่วยอายุ 2 ปี (96)

อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันพบว่า ผู้ป่วยมีอัตราการรอดชีวิตมากขึ้นภายหลังจากการได้รับการผ่าตัดแบบคาไซ ที่ 5 ปี ประมาณร้อยละ 45-60 และที่ 10 ปี ประมาณร้อยละ 25-35 ซึ่งผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดแบบคาไซอาจพบอาการข้างเคียง เช่น ภาวะท่อน้ำดีอักเสบ (cholangitis) ซึ่งพบประมาณร้อยละ 50 และภาวะความดันในหลอดเลือดดำของตับสูง (portal hypertension) ซึ่งพบมากกว่าร้อยละ 60 ในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดแบบคาไซ (1)

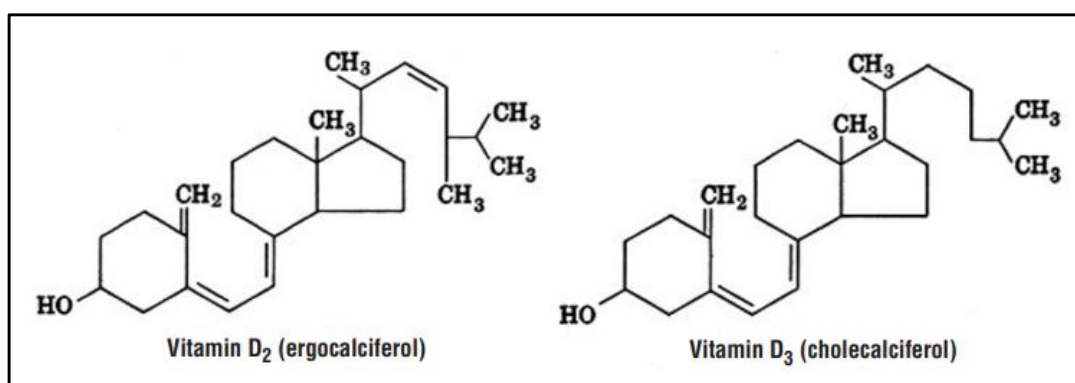


แผนภาพที่ 3 อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน (1)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในผู้ป่วยที่มีอาการบาดเจ็บของ intra และ extrahepatic bile duct ในระยะยาว จะพบมีภาวะอวัยวะ เสบ ภาวะภูมิคุ้มกันตัวเอง และโรคทางเมแทบอลิซึม ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิด cholestatic liver disease ในผู้ป่วย (97) โดยภาวะแทรกซ้อนที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยกลุ่มนี้ ได้แก่ โรคกระดูก ซึ่งอาจเกิดจากความผิดปกติของการดูดซึมวิตามินที่ละลายในไขมัน ได้แก่ วิตามินดี ส่งผลให้ภาวะสมดุลของแคลเซียมและฟอสฟอรัสเสียไป โดยมีงานวิจัยที่แสดงถึงอุบัติการณ์ของการเกิดกระดูกหักในกลุ่มเด็ก cholestatic liver disease พบความหนาแน่นกระดูก (bone mineral density, BMD) ต่ำ ซึ่งส่งผลให้เกิดภาวะกระดูกบาง (98) และพบว่าเมื่อให้แคลเซียมและวิตามินดีเสริมในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง ผู้ป่วยจะมีอาการทางกระดูกที่ดีขึ้น (99) นอกจากนี้ยังพบว่าภาวะ hyperbilirubinemia มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคกระดูกในผู้ป่วยโรคตับ โดยปริมาณบิลิรูบินส่งผลให้เกิดการยับยั้งความสามารถในการแบ่งเซลล์กระดูกอีกด้วย (100, 101)

ความสำคัญของวิตามินดี

วิตามินดีเป็นวิตามินที่ละลายในไขมัน มีความสำคัญในการรักษาสมดุลของระดับแคลเซียมและฟอสฟอรัสในเลือดและกระดูก ผ่านการควบคุมของพาราไธรอยด์ฮอร์โมน (parathyroid hormone, PTH) โดยทั่วไปร่างกายได้รับวิตามินดีจาก 2 แหล่งหลัก ได้แก่ แสงแดด ร้อยละ 80 และจากอาหารร้อยละ 10-20 ซึ่งวิตามินดีในธรรมชาติมี 2 ชนิด ได้แก่ vitamin D₂ (ergocalciferol) พบในยีสต์ เห็ด และพืช และ vitamin D₃ (cholecalciferol) พบในเซลล์คนและสัตว์ โดยผิวหนังมี 7-dehydrocholesterol ซึ่งเมื่อได้รับรังสี ultraviolet B (UVB) จากแสงแดด จะถูกเปลี่ยนเป็น previtamin D₃ และเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วเป็น vitamin D₃ โดยวิตามินดีจากทุกแหล่งที่ร่างกายได้รับจะถูกลำเลียงเข้าสู่กระแสเลือด และจับกับ vitamin D binding protein (VDBP) เพื่อเข้าสู่กระบวนการเมแทบอลิซึม วิตามินดีจะถูกเปลี่ยนแปลงครั้งแรกที่ตับโดยการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 25 ได้เป็น 25-hydroxyvitamin D หรือ calcidiol ซึ่งเป็นรูปแบบของวิตามินดีที่มีปริมาณมากที่สุดในร่างกาย และครั้งที่สองที่ไตโดยเติมหมู่ OH ที่คาร์บอนตำแหน่ง 1 ได้เป็น 1,25-dihydroxyvitamin D หรือ calcitriol ซึ่งเป็น active form ของวิตามินดี โดยการวัดระดับของวิตามินดีในกระแสเลือด นิยมใช้การวัดระดับของ 25-hydroxyvitamin D เนื่องจากเป็นตัวกลางที่มี half-life ยาวนาน (ประมาณ 3 สัปดาห์) และเป็นขั้นที่ไม่มีการควบคุม (102, 103) โดยระดับ 25-hydroxyvitamin D ที่ยอมรับได้ในระดับปกติอยู่ที่ระดับสูงกว่า 75 nmol/L (30 ng/ml) และภาวะขาดวิตามินดีรุนแรงอยู่ที่ระดับต่ำกว่า 25 nmol/L (10 ng/ml) (104)

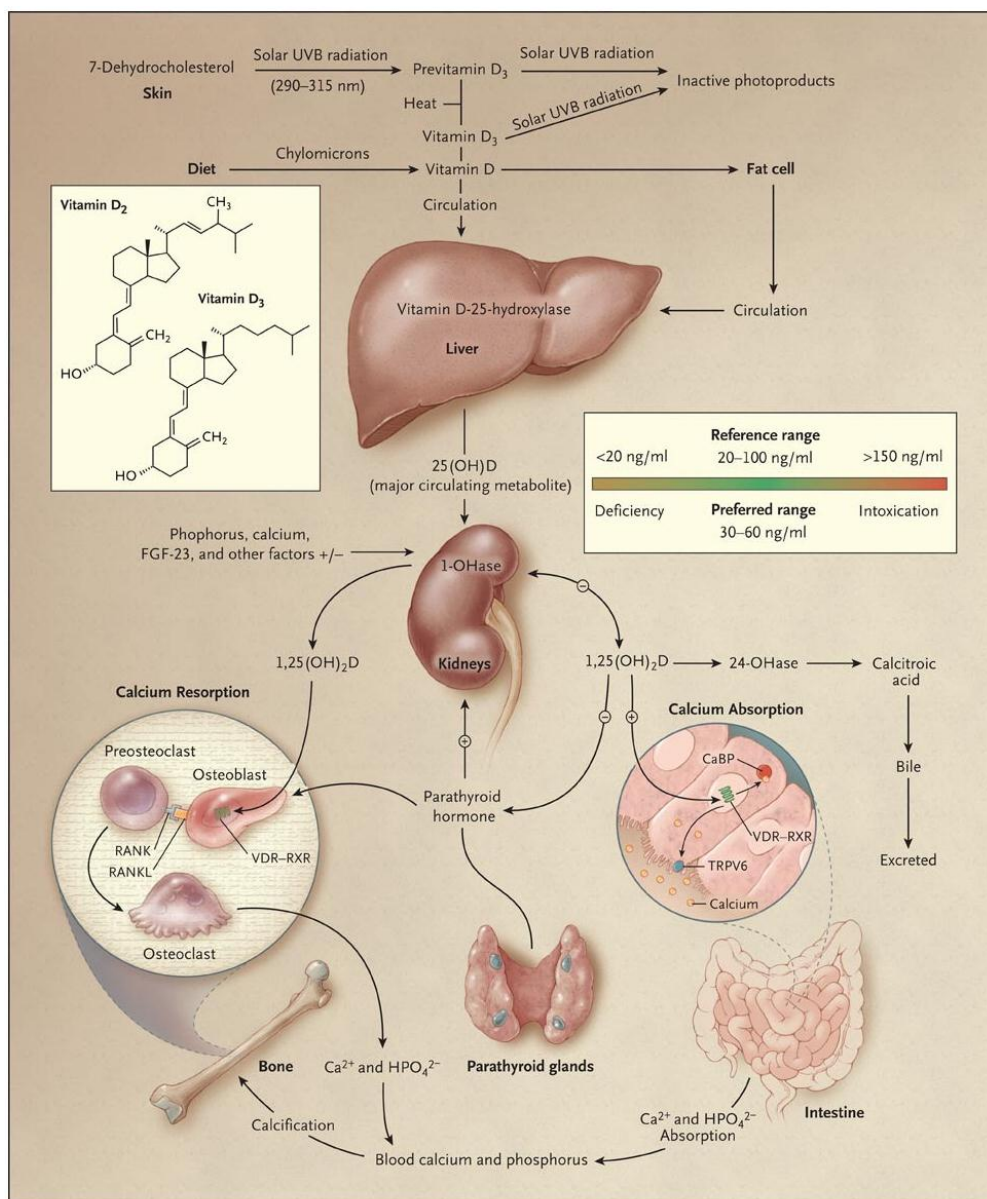


รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของ vitamin D₂ และ vitamin D₃

บทบาทของวิตามินดี

ในภาวะขาดวิตามินดี (vitamin D deficiency) ร่างกายจะสามารถดูดซึมแคลเซียมจากอาหารได้เพียงร้อยละ 10-15 และฟอสฟอรัสได้เพียงร้อยละ 60 (105, 106) โดย 1,25-dihydroxyvitamin D สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมแคลเซียมของลำไส้เล็กได้เพิ่มขึ้นร้อยละ 30-40 และฟอสฟอรัสประมาณร้อยละ 80 โดยการควบคุมของ PTH (107) จากงานวิจัยพบว่าระดับ 25-hydroxyvitamin D ในซีรัม มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความหนาแน่นกระดูก (bone mineral density, BMD) ในคนผิวขาว รวมถึงคนผิวสี และในชาวแมกซิกันและอเมริกัน เมื่อร่างกายมีระดับวิตามินดีเพียงพอที่ระดับ 25-hydroxyvitamin D มากกว่า 40 ng/ml (108) และพบว่าหากมีระดับ 25-hydroxyvitamin D ต่ำกว่า 30 ng/ml ลำไส้เล็กจะดูดซึมแคลเซียมได้น้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ (107) ซึ่งเป็นผลจากระดับ PTH ที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อร่างกายมีภาวะแคลเซียมในเลือดต่ำ (109-111) นอกจากบทบาทของ PTH ในการกระตุ้นให้ลำไส้มีการดูดซึมแคลเซียมมากขึ้นและกระตุ้นการสร้าง 1,25-dihydroxyvitamin D ที่ไตโดยเอนไซม์ 1α -hydroxylase (112) PTH ยังมีบทบาทในการกระตุ้นเซลล์ osteoblasts ให้มีการเปลี่ยน preosteoclasts เป็น mature osteoclasts (113) ซึ่งมีหน้าที่ในการดึงแร่ธาตุจาก collagen matrix ในกระดูก ทำให้เกิดภาวะกระดูกโปร่งบาง (osteopenia) และภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis) และเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดกระดูกหักในผู้ที่มีภาวะขาดวิตามินดี ซึ่งกลไกการควบคุมของ PTH แสดงดังรูปที่ 6 ระดับฟอสฟอรัสและแคลเซียมในกระแสเลือด รวมถึง fibroblast growth factor 23 (FGF-23) และ factors อื่นๆ สามารถกระตุ้นหรือยับยั้งกระบวนการสร้าง 1,25-dihydroxyvitamin D ในไต และเมื่อระดับ 1,25-dihydroxyvitamin D เพียงพอ ตัวมันเองจะควบคุมโดยยับยั้งการสร้างตัวเอง (negative feedback mechanism) และลดการหลั่ง PTH จากต่อมพาราไธรอยด์ รวมถึงเพิ่มการแสดงออกของ 24-hydroxylase เพื่อเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ (biologically inactive calcitric acid) และขับออกทางน้ำดี นอกจากนี้ 1,25-dihydroxyvitamin D ยังเป็นตัวกระตุ้นให้มีการดูดซึมแคลเซียมในลำไส้เล็กมากขึ้น ผ่านการจับกับ vitamin D receptor-retinoic acid x-receptor complex (VDR-RXR) ที่เซลล์ผนังลำไส้เล็ก (enterocyte) เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของ epithelial calcium channel (transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6 [TRPV6]) และ calbindin 9K ซึ่งเป็น calcium binding protein (CaBP) สำหรับในกระดูก 1,25-

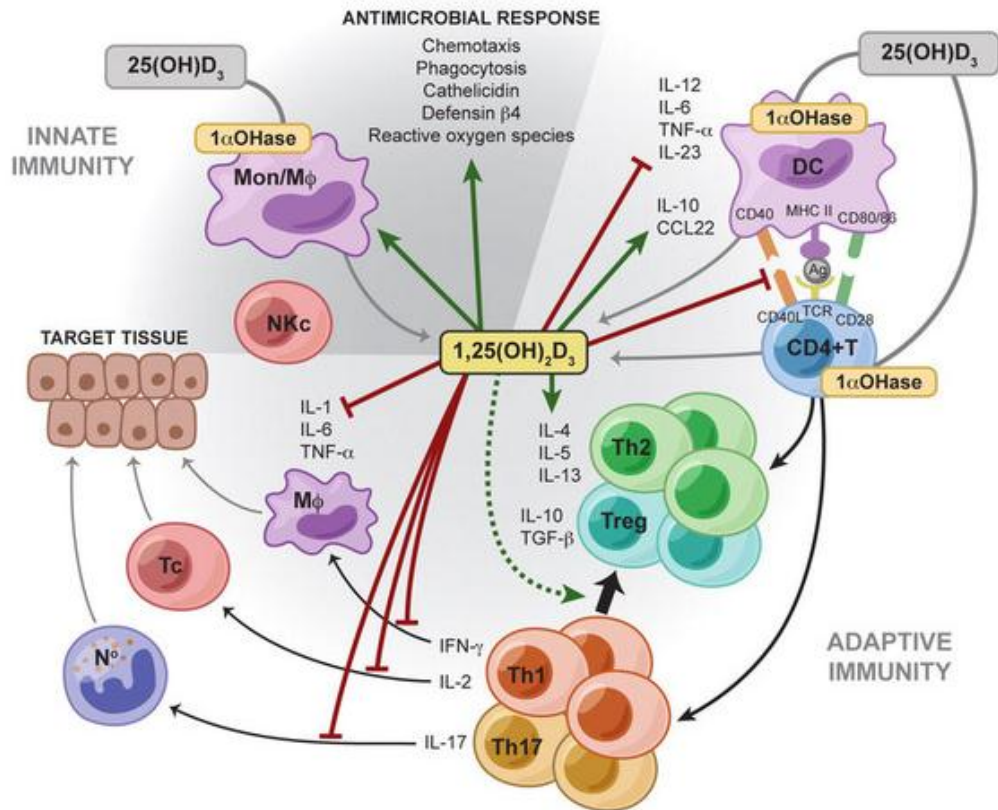
dihydroxyvitamin D จะจับกับ receptor ที่เซลล์ osteoblasts เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของ receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) จากนั้น RANKL จะจับกับ RANK ซึ่งเป็น receptor บนผิวเซลล์ preosteoclasts และเกิดการเหนี่ยวนำให้มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ preosteoclasts เป็น mature osteoclasts โดย mature osteoclasts จะทำหน้าที่ในการดึงแคลเซียมและฟอสฟอรัสออกจากกระดูก เพื่อรักษาระดับแคลเซียมและฟอสฟอรัสในกระแสเลือด (114)



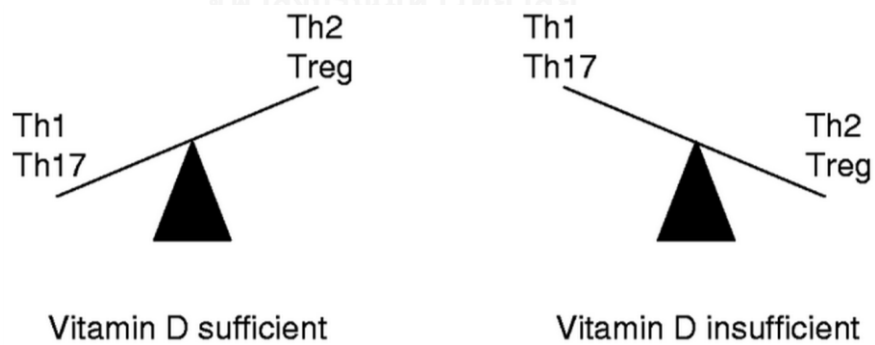
รูปที่ 5 แสดงกระบวนการสร้างและกระบวนการเมแทบอลิซึมของวิตามินดีในการควบคุมสมดุลของแคลเซียมและฟอสฟอรัส และกระบวนการเสริมสร้างกระดูก (114)

นอกจากเซลล์ผนังลำไส้เล็ก (enterocyte) รวมถึงเซลล์กระดูก (osteoblast) และเซลล์ที่ปลายท่อไต (distal renal tubules cell) ยังสามารถพบ vitamin D receptor ในเซลล์ในอวัยวะอื่นๆ ได้แก่ สมอง ต่อมลูกหมาก เต้านม และลำไส้ใหญ่ รวมถึงเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (105, 106, 112, 113) และพบการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์ 1α -hydroxylase ในเซลล์เหล่านี้อีกด้วย (106, 112, 113) โดย 1,25-dihydroxyvitamin D มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีนมากกว่า 200 ชนิด ซึ่งประกอบด้วยยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (cell differentiation) กระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) รวมถึงกระบวนการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) และกระบวนการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) ซึ่งเป็น hallmark ของการเกิดมะเร็ง (115) จากการศึกษาที่ผ่านมาเชื่อว่าการสร้าง 1,25-dihydroxyvitamin D ในอวัยวะเหล่านี้เป็นการควบคุมยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยการเพิ่มการแสดงออกของยีน *p21* และ *p27* รวมถึงลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ angiogenesis และเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ differentiation และ apoptosis (114)

มีงานวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นถึงบทบาทของวิตามินดีในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ นอกจากโรคกระดูกและข้อ รวมถึงความสามารถในการควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน ทั้งชนิด innate และ adaptive immune response กล่าวคือ วิตามินดีสามารถกระตุ้นระบบ innate immunity โดยเพิ่มการทำงานของเซลล์แมคโครฟาจ (macrophage cells) รวมถึงกระตุ้นการสร้าง antimicrobial protein ต่าง ๆ เพื่อเพิ่มความสามารถในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม ขณะที่ยับยั้งการทำงานของวิตามินดีในการควบคุมระบบ adaptive immunity ได้แก่ การยับยั้งการนำเสนอแอนติเจน ผ่านการลดการแสดงออกของ MHC-II-complexed antigen บนผิวเซลล์ antigen presenting cell (APC) และลดการแสดงออกของ co-stimulatory molecules ต่างๆ อีกทั้งยังมีบทบาทในการควบคุม T-cell response ผ่านการยับยั้งการสร้าง Th1 และ Th17 cytokines และกระตุ้นการสร้าง Th2 และ Treg cytokine เพื่อควบคุมกระบวนการอักเสบและกระบวนการตอบสนองภูมิคุ้มกันในร่างกายไม่ให้มากเกินไป (116)



รูปที่ 6 แสดงบทบาทของวิตามินดีในการควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน (116)



รูปที่ 7 แสดงผลของวิตามินดีต่อภาวะภูมิคุ้มกัน (adaptive immune response) (117)

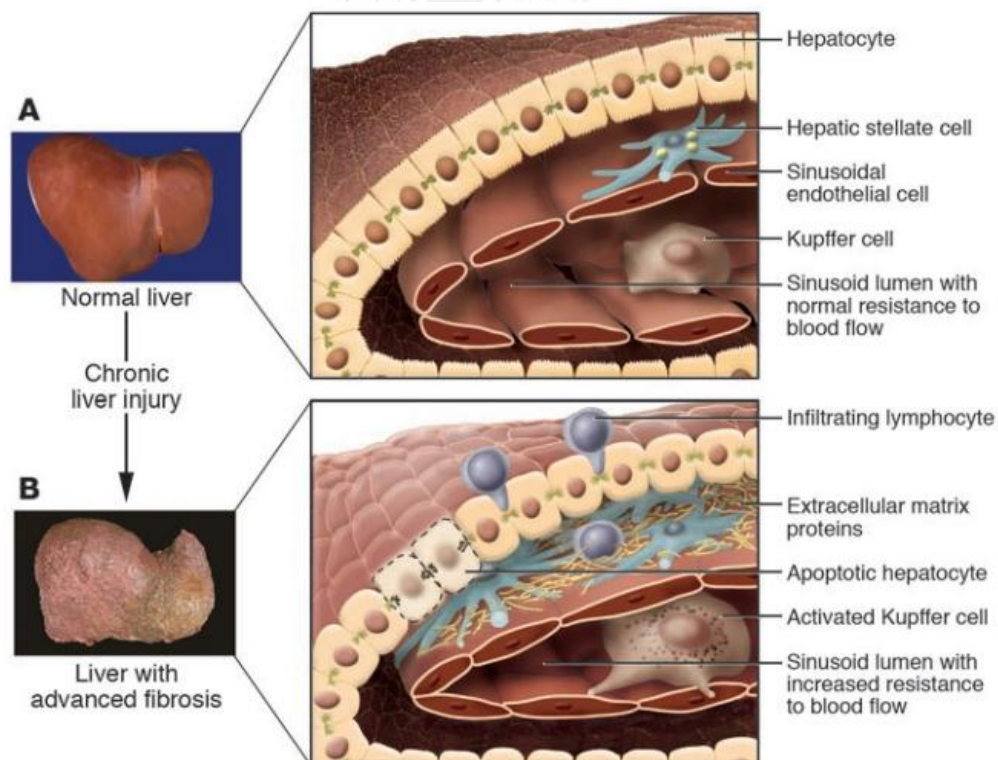
กระบวนการสร้างพังผืดในตับ

การสร้างพังผืดในตับ (liver fibrogenesis) เป็นกระบวนการซ่อมแซมบาดแผลที่เกิดจากการตอบสนองของเซลล์ตับเมื่อได้รับอาการบาดเจ็บในผู้ป่วยที่มีภาวะตับอักเสบเรื้อรัง ทำให้เนื้อเยื่อตับเกิดการบาดเจ็บอยู่ซ้ำๆ เซลล์ตับจะสร้าง extracellular matrix protein (ECM) โดยเฉพาะคอลลาเจนขึ้นเป็นจำนวนมากเพื่อซ่อมแซมเนื้อเยื่อ ส่งผลให้เกิดภาวะพังผืดเกาะตับ จนเกิดภาวะตับแข็ง (cirrhosis) และตับเสียการทำงานในที่สุด (118) โดยเซลล์หลักที่มีบทบาทสำคัญ ได้แก่ hepatic stellate cell (HSC), portal fibroblast และ myofibroblast ที่สร้างจากไซกระตุก ซึ่งเชื่อว่าเซลล์เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการสร้างคอลลาเจน (collagen-producing cell) ขึ้นในตับที่มีอาการบาดเจ็บ โดยการกระตุ้นของ fibrogenic cytokine ต่างๆ เช่น transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), angiotensin II และ leptin (118)

ในระดับเซลล์พบว่าเมื่อตับได้รับอาการบาดเจ็บ เซลล์เยื่อบุผิวของตับ (hepatocyte) จะเกิดกระบวนการตายแบบ necrosis หรือ apoptosis ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นจากการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบและการสะสมของ ECM ในตับ หากอาการบาดเจ็บของตับยังคงอยู่ จะทำให้กระบวนการ regeneration ของตับเสียไป และเซลล์เยื่อบุผิวของตับ (hepatocyte) จะถูกแทนที่ด้วย ECM ซึ่งเป็นเส้นใยคอลลาเจนจำนวนมาก (119) โดยการกระจายตัวของเส้นใยคอลลาเจนขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่ตับได้รับการบาดเจ็บ โดยในผู้ป่วยที่มีภาวะตับอักเสบเรื้อรังจากไวรัสตับอักเสบและผู้ป่วยที่มีภาวะคั่งของน้ำดี เส้นใยคอลลาเจนเหล่านี้จะสะสมอยู่ที่บริเวณ portal tracts ขณะที่ในผู้ป่วยโรคตับที่เกิดจากการดื่มแอลกอฮอล์ เส้นใยคอลลาเจนจะสะสมอยู่ในบริเวณ pericentral และ perisinusoidal (120) และในระยะรุนแรงเส้นใยคอลลาเจนเหล่านี้จะสะสมจนเกิดเป็นพังผืด (liver fibrosis) และเกิดเป็นภาวะตับแข็งในที่สุด (cirrhosis) โดย HSC เป็นเซลล์หลักที่มีบทบาทสำคัญในการสร้างคอลลาเจนและ profibrotic factors ต่างๆ เมื่อตับมีอาการบาดเจ็บ (121) ในภาวะปกติ HSC เป็น non-parenchymal cell ที่อยู่ระหว่าง hepatocyte และ sinusoidal endothelial cell ในชั้น subendothelial (space of Disse) มีหน้าที่หลักในการเก็บสะสมวิตามินเอ เมื่อตับได้รับการบาดเจ็บ HSC จะถูกกระตุ้นและพัฒนาไปเป็น myofibroblast-like cell โดยการเหนี่ยวนำของ Platelet-derived growth factor (PDGF) ซึ่งเป็น fibrogenic mediator ที่สร้างโดย Kupffer cells (122) HSC ที่ถูกกระตุ้นจะเดินทางไปยังสะสมยังบริเวณที่มีการ

ซ่อมแซมเนื้อเยื่อตับ และสร้าง ECM ขึ้นมาเป็นจำนวนมาก รวมถึงยับยั้งกระบวนการสลาย ECM ที่เกิดขึ้นปกติ (123, 124) โดยการสร้างคอลลาเจนของ HSC จะถูกควบคุมในระดับ transcriptional และ post-transcriptional (125) ซึ่งมี SMAD2, 3 เป็น transcription factor ที่สำคัญ (126, 127)

ในระยะรุนแรง ตับจะมี ECM มากกว่าปกติประมาณ 6 เท่า (128) ซึ่งประกอบด้วย collagen (I, III และ IV), fibronectin, undulin, elastin, laminin, hyaluronan และ proteoglycans โดยการสะสมของ ECM ที่มากขึ้นในภาวะที่ตับมีอาการบาดเจ็บ เกิดจากทั้งการสร้าง ECM ใหม่โดย HSC และเกิดจากการสลายของ ECM ที่ลดลง เนื่องจากเอนไซม์ matrix metalloproteinases (MMPs) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายของ ECM ถูกยับยั้งโดย tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) ที่พบแสดงออกสูงเมื่อตับได้รับการบาดเจ็บ (129)



รูปที่ 8 แสดงการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างตับเมื่อเกิดภาวะสร้างพังผืด (hepatic fibrosis) (118)

วิตามินดีกับกระบวนการสร้างพังผืดในตับ

ในกระบวนการสร้างพังผืดตับมี fibrogenic cytokines ที่สำคัญ ได้แก่ TGF- β 1 (130) โดย TGF- β 1 จะจับกับ receptor จำเพาะที่ผิว HSC และทำให้เกิดกระบวนการ phosphorylation ของ cytosolic protein effector ได้แก่ SMAD3 ต่อมา SMAD3 ที่ถูกกระตุ้น จะจับเป็น complex กับ SMAD4 ซึ่งเป็น carrier ของ SMAD3 และเดินทางไปจับกับ receptor จำเพาะในนิวเคลียส (SMAD binding element, SBE) ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำ co-activator ต่างๆ เช่น histone acetylase p300 และ co-repressor เพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครมาติน (131) โดย SMAD3 เป็น transcription factor จะจับกับบริเวณ cis-element บนสายดีเอ็นเอเพื่อกระตุ้นการแสดงออกของ pro-fibrotic gene (132) ดังรูปที่ 10 (A) ในปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาถึงบทบาทของวิตามินดีในการยับยั้งกระบวนการสร้างพังผืดในโรคต่างๆ จากการศึกษาพบว่า myofibroblast เป็นเซลล์หลักที่เกี่ยวข้องกับ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ในการยับยั้งกระบวนการสร้างพังผืดในตับ (133, 134) และพบว่า $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ มีบทบาทในการยับยั้งการกระตุ้นของ TGF- β 1 ที่ทำให้เกิดการสร้างคอลลาเจนขึ้นในตับ โดยกลไกที่สำคัญเกิดจากการ re-programing ของ quiescent HSC ไปเป็น myofibroblast-like phenotype ที่กระตุ้นโดย TGF- β 1/SMADs signaling ส่งผลให้เกิดการสร้าง ECM ขึ้นเป็นจำนวนมากในตับ ดังกล่าวในข้างต้น

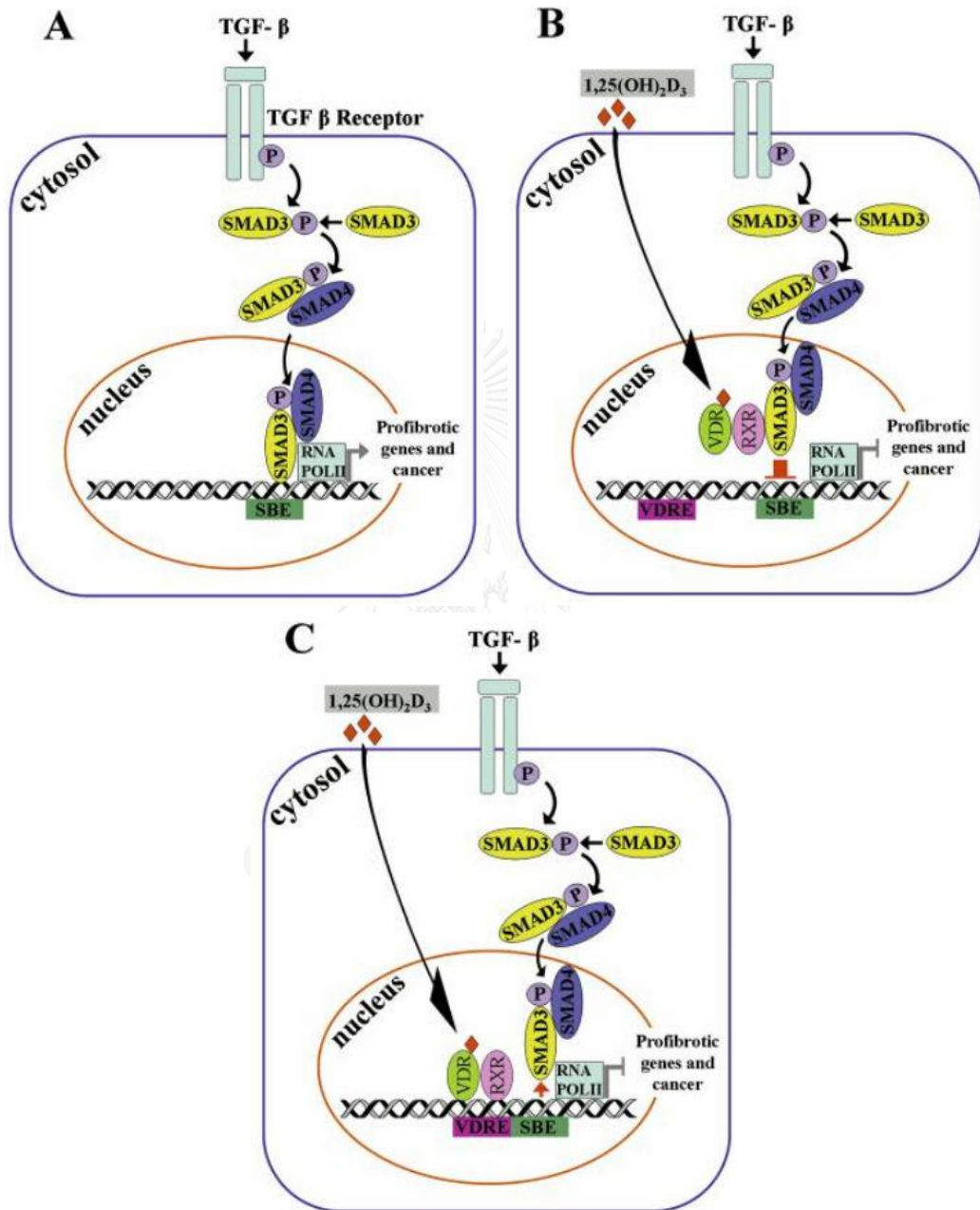
จากการศึกษาของ Ding และคณะ (135) โดยใช้หนูทดลองเป็นโมเดลในการศึกษากระบวนการสร้างพังผืดตับ โดยให้ carbon tetrachloride (CCl_4) ซึ่งเป็น hepatotoxic agent แก่หนูทดลองเพื่อให้เกิดการสร้างพังผืดในตับ พบว่าเมื่อมีการให้ CCl_4 ควบคู่กับ calcipotriol ซึ่งเป็น vitamin D receptor (VDR) สังเคราะห์จะทำให้การสร้างพังผืดตับลดลง โดยพบมี fibrotic scores และการสะสมของคอลลาเจนที่ผิวตับลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าในยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างพังผืด (fibrotic marker genes) เช่น *COL1A1*, *TIMP1* และ *TGF- β 1* มีการแสดงออกลดลง นอกจากนี้เมื่อให้ calcipotriol ก่อนการให้ CCl_4 พบว่าแทบไม่มีการสร้างพังผืดตับในหนูทดลอง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า VDR มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งกระบวนการสร้างพังผืดตับ อีกทั้งยังมีความสามารถในการป้องกันการสร้างพังผืดตับได้อีกด้วย จากนั้น Ding และคณะได้ทำการศึกษาถึงกระบวนการยับยั้งการเกิดพังผืดตับของ VDR โดยใช้หนูทดลองที่ทำการ knockout ยีน *VDR* พบว่าในหนูทดลองที่ไม่มียีน *VDR* สามารถเกิดการบาดเจ็บของตับและเกิดการสร้างพังผืด

ตับได้เอง โดยพบมีการสะสมของคอลลาเจนและพบ hepatocyte necrosis ที่เกิดจากกระบวนการอักเสบในบริเวณ portal tracts แสดงให้เห็นว่ายีน VDR มีบทบาทสำคัญในการช่วยรักษาโครงสร้างของตับให้อยู่ในภาวะปกติ อีกทั้งยังพบว่าเมื่อไม่มียีน VDR จะส่งผลให้เซลล์ตับไม่สามารถควบคุมกระบวนการอักเสบและเสียการควบคุมกระบวนการสร้างพังผืดในตับ

จากการศึกษาโดยใช้ bioinformatic analysis ซึ่งประกอบด้วย genome-wide binding analysis และ ChiP-on-ChiP analysis พบว่า VDR และ SMAD3 มี genomic binding site ที่เหมือนกัน เมื่อ VDR จับกับ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ หรือ synthetic vitamin D analog จากนั้น $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{VDR}$ จะเคลื่อนที่ไปยังนิวเคลียสและเกิดการจับเป็น heterodimer กับ retinoid X receptor (RXR) (136, 137) โดย Ding และคณะ เชื่อว่า VDR/RXR heterodimer สามารถขัดขวาง TGF- β 1/SMAD3 ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่สร้าง profibrotic marker ต่างๆ โดยแย่งจับ SMAD3 กับบริเวณ receptor จำเพาะ (SBE) ดังรูปที่ 10 (B) โดยมีกลไกการขัดขวางจากการเกิด chromatin remodeling ซึ่งทำให้เผย VDR binding site ที่อยู่ในสายดีเอ็นเอจำนวนมาก โดยการกระตุ้นจาก histone acetylation ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงในระดับ post-translation ในบริเวณหางของฮิสโตน (138) โดยมี co-activator ของ TGF- β ที่มีบทบาทสำคัญ ได้แก่ acetyltransferase p300 ซึ่งพบการแสดงออกใน fibroblast และใน myofibroblast ในภาวะการสร้างพังผืดตับ (139, 140) โดยกระบวนการเหล่านี้ทำให้เกิดการกระจายตัวของ VDR binding site (VDR cisrome) ซึ่งอยู่ในบริเวณใกล้เคียงกับ SMAD3 binding response element (SBE) เป็นอย่างมาก นอกจากนี้การจับกันของ VDR และ SMAD3 จะทำให้เกิดการส่งสัญญาณระหว่างกัน และเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับ epigenetic โดยการขดตัวของสายดีเอ็นเอทำให้เกิด VDR-responsive genomic regions (vitamin D receptor element, VDRE) ต่อจาก transcription initiation site ซึ่งทำให้เกิดการ overlap กันของบริเวณ VDRE และ SBE ส่งผลให้ SMAD3 หลุดออกจากออกจาก chromatin site ซึ่งขัดขวางการส่งสัญญาณของ TGF- β 1/SMAD3 ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของ profibrotic marker gene (135)

โดยผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่แสดงให้เห็นว่าวิตามินดีมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งกระบวนการสร้างพังผืด ผ่านการขัดขวางการทำงานของ collagen 1 α promotor ในหนูทดลอง (141) นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Ding และคณะยังพบว่า $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ มี

บทบาทสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ MMP8 มากขึ้น ซึ่งเป็นเอนไซม์ metalloproteinase ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสลายคอลลาเจน (135)



รูปที่ 9 แสดงกลไกการควบคุมการแสดงออกของ profibrotic genes (A) TGF-β ส่งสัญญาณผ่าน SMAD3 เพื่อเพิ่มการแสดงออกของ profibrotic genes (B) VDR ขัดขวางการส่งสัญญาณของ TGF-β/SMAD3 (C) VDR ทำให้ SMAD3 หลุดออกจากบริเวณ SBE เพื่อขัดขวางแสดงออกของ profibrotic genes (142)

การตรวจภาวะพังผืดตับ

การตรวจภาวะพังผืดตับในปัจจุบัน นิยมใช้วิธีการตรวจแบบที่ไม่ต้องมีการเจาะตับ เพื่อประเมินระยะของโรค ประกอบด้วย การตรวจเลือดเพื่อดูค่าบ่งชี้ภาวะพังผืดตับ (serological markers) และการวัดค่าความยืดหยุ่นของตับ (liver stiffness measurement, LSM) โดยใช้เครื่อง transient elastography หรือเครื่อง FibroScan

1. การตรวจเลือดเพื่อดูค่าบ่งชี้ภาวะพังผืดตับ (serological markers) แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มหลัก ได้แก่ (143)

1.1 การเจาะเลือดทั่วไปเพื่อดูค่าการทำงานของตับ (liver function test) และนำมาคำนวณเป็นอัตราส่วนเปรียบเทียบ ได้แก่

- APRI (aspartate aminotransferase (AST) to platelet ratio index) โดยคำนวณจากสูตร $(AST [IU/L]/upper\ normal\ limit\ of\ AST)/platelet\ count [10^9/L] \times 100$
- Fibrotest ซึ่งคำนวณได้จาก $\alpha 2$ -macroglobin, apolipoprotein-A1, haptoglobin, เอนไซม์ glutamyltransferase และ bilirubin
- Forn's index ซึ่งคำนวณโดยใช้อายุ, AST, เอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) และค่าเกร็ดเลือด (platelet count)
- FIB-4 (Fibrosis-4) โดยคำนวณจากสูตร $age\ (years) \times AST [U/L]/(platelet\ count [10^9/L] \times (ALT [U/L])^{1/2})$

1.2 ค่าบ่งชี้การสะสมของ extracellular matrix (ECM) ได้แก่

- hyaluronic acid (HA)
- procollagen
- เอนไซม์ metalloproteinase
- YKL-40

1.3 ค่าการทำงานของตับ (liver function test) ร่วมกับค่าบ่งชี้การสะสมของ ECM

- Fibrometer ซึ่งคำนวณได้จากอายุ, platelet count, prothrombin index, AST, α 2-macroglobin, HA และ urea
- European fibrosis index ซึ่งคำนวณได้จากอายุ, HA และ เอนไซม์ metalloproteinase
- Hepascore ซึ่งคำนวณได้จาก α 2-macroglobin, HA, bilirubin และ เอนไซม์ glutamyltransferase

2. การวัดค่าความยืดหยุ่นตับ (liver stiffness measurement, LSM)

การวัดค่าความยืดหยุ่นของตับ เป็นวิธีการประเมินความรุนแรงของภาวะพังผืดในตับด้วยเครื่อง transient elastography (FibroScan) ซึ่งมีรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 2003 โดย Sandrin และคณะ (144) FibroScan เป็นเครื่องมือที่ใช้หลักการทางอัลตราซาวด์ โดยการทำงานของเครื่องจะส่งคลื่น shear wave เข้าไปในเนื้อตับและใช้ ultrasound probe ตรวจจับความเร็วของคลื่น shear wave ที่กระทบกับเนื้อตับ โดยมีหลักการคือถ้าเนื้อตับแข็งจะส่งคลื่นสะท้อนกลับได้เร็วและค่าที่วัดได้จะมีค่าสูง มีหน่วยเป็น kilopascal (kPa) ค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดของการวัดวิธีนี้คือ 2.5 และ 75 kPa ตามลำดับ โดยค่าปกติของค่าความยืดหยุ่นตับในผู้ที่มีสุขภาพดี มีค่าประมาณ 5.49 ± 1.6 kPa (145)

โดยวิธีการวัดค่าความยืดหยุ่นของตับ ด้วยเครื่อง FibroScan ทำได้โดยให้ผู้ป่วยนอนหงายเหยียดแขนขาให้มากที่สุด ผู้ตรวจจะวางหัวโพรบที่ทำการส่งคลื่นความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ผ่านบริเวณช่องชายโครงด้านขวาซึ่งเป็นตำแหน่งที่ตับวางอยู่ คลื่นดังกล่าวจะวัดความยืดหยุ่นของตับในระดับที่ลึกลงไปจากผิวหนัง 1-2.5 นิ้ว ขนาดเนื้อตับที่วัด 1x4 ตารางเซนติเมตร ซึ่งมีปริมาณมากกว่าการเจาะตับ 100 เท่า (146)

การแปลผลการวัดความยืดหยุ่นของตับด้วยเครื่องไฟโบรสแกนนั้นมีหลักการดังนี้

(146)

1. ทำการตรวจวัดทั้งหมด 10 ครั้ง โดยซอฟต์แวร์ของเครื่องไฟโบรสแกนจะแปลผลจากความเร็วในการสะท้อนกลับของคลื่นทั้ง 10 ครั้งออกมาเป็นค่ามัธยฐาน (Median value) ซึ่งมีหน่วยเป็น kilopascal (kPa)
2. ในทั้ง 10 ครั้งที่ตรวจวัดจะต้องมีอัตราความสำเร็จในการตรวจอย่างน้อยร้อยละ 60
3. ค่ากระจายจากค่ากลาง (Interquartile range) ที่วัดได้ต้องไม่เกินร้อยละ 30

ได้มีการศึกษาความแม่นยำของภาวะพังผืดตับโดยการใช้เครื่องไฟโบรสแกนในผู้ป่วยเด็กที่เป็นโรคตับหลายชนิด โดยใช้ค่าจุดตัดที่ได้จากเครื่องไฟโบรสแกนเทียบกับวิธีมาตรฐานซึ่งก็คือการเจาะตับ พบว่าการใช้เครื่องไฟโบรสแกนมีประสิทธิภาพดี และค่าความยืดหยุ่นของตับที่ได้สามารถบอกถึงระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับ (147, 148) โดยกำหนดให้ค่าความยืดหยุ่นของตับที่สูงกว่า 7.1 kPa ประเมินว่าผู้ป่วยมีพังผืดในเนื้อตับ (significant fibrosis) ตามระบบ Metavir มากกว่าหรือเท่ากับ 2 ($F \geq 2$) (146)

การตรวจวัดค่าระดับวิตามินดี

การประเมินระดับของวิตามินดีในร่างกาย นิยมใช้การตรวจวัดค่า 25-hydroxyvitamin D ในกระแสเลือด เนื่องจากเป็นรูปที่มี half life ยาวนานที่สุดคือประมาณ 3 สัปดาห์ และเนื่องจากเอนไซม์ 25-hydroxylase ของขั้นตอนการเติมหมู่ไฮดรอกซิลในเซลล์ตับไม่มีการควบคุม จึงทำให้ระดับ 25-hydroxyvitamin D ไม่มีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงจากการเหนี่ยวนำของสภาวะต่างๆ โดยค่าระดับ 25-hydroxyvitamin D ที่วัดได้บ่งบอกถึงระดับวิตามินดีที่สร้างขึ้นจากผิวหนังเมื่อได้รับรังสี UVB จากแสงแดดและระดับวิตามินดีที่ได้รับจากอาหาร สำหรับค่า 1,25-dihydroxyvitamin D ไม่นิยมนำมาใช้ประเมินระดับวิตามินดีในกระแสเลือด เนื่องจากเป็นรูปที่มี half life สั้นคือประมาณ 4 ชั่วโมงเท่านั้น และสามารถถูกควบคุมโดยระดับ parathyroid hormone (PTH), calcium และ phosphate (102, 103)

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ระดับ 25-hydroxyvitamin D หลากหลายวิธี ได้แก่ radioimmunoassay (RIA), enzyme immunoassay (EIA), chemiluminescence immunoassay (CLIA), electro-CLIA (ECLIA), high-performance liquid chromatography (HPLC) และ liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (149) โดย FDA (Food and Drug Administration) หลายแห่งในประเทศสหรัฐอเมริกาได้ยอมรับการใช้ immunoassay method ในการประเมินระดับวิตามินดี ประกอบด้วย CLIA methods ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลในปัจจุบัน โดยบริษัท DiaSorin ได้พัฒนาขึ้นมาในปี ค.ศ. 2002 เพื่อตรวจวัด total 25-hydroxyvitamin D (25-hydroxyvitamin D₂ และ 25-hydroxyvitamin D₃) และ hydroxylated vitamin D metabolite อื่นๆ ในซีรัม โดยมีหลักการคือ การใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อวิตามินดีเคลือบที่ผิว magnetic particle (solid phase) และใช้หลักการ competitive immunoassay ซึ่งสัมพันธ์กับ light unit ที่วัดได้ โดยมีขั้นตอนและหลักการการวัดดังรูปที่ 11 (150)

ขั้นตอนการวัดและหลักการของเทคนิค CLIA

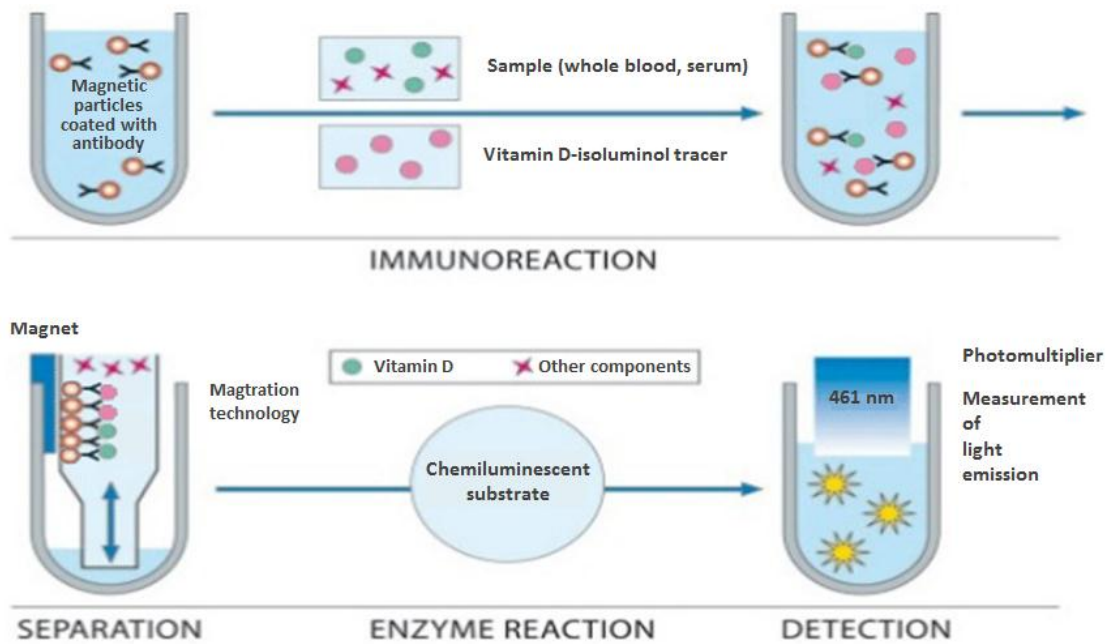
1. ทำการบ่มซีรัม เพื่อให้ 25-hydroxyvitamin D ในซีรัมหลุดออกจาก vitamin D binding protein (VDB) และไปจับกับแอนติบอดีจำเพาะบนผิว magnetic particle
2. เติม vitamin D tracer ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง isoluminol derivative จากนั้น vitamin D tracer จะไปแย่งจับกับแอนติบอดีจำเพาะบนผิว magnetic particle antibody ในบริเวณ binding site ของมัน
3. หลังจากบ่มครั้งที่สอง จากนั้นทำการล้างเพื่อกำจัด vitamin D tracer และสารอื่นๆ ที่ไม่จับกับแอนติบอดี
4. เติม starter reagent เพื่อเริ่มต้นปฏิกิริยาเคมี และทำการวัดแสงที่ได้จากปฏิกิริยาด้วย photomultiplier โดยผลที่ได้จะออกมาเป็นค่า relative light units (RLU) จากนั้นแปลงค่า RLU เป็นค่าความเข้มข้นของวิตามินดีซึ่งคิดเป็นสัดส่วนกลับ (inversely proportional)

โดยในปี 2009 ได้มีรายงานการสำรวจการใช้เทคนิค CLIA โดยผู้เชี่ยวชาญ พบว่าเทคนิค CLIA เป็นเทคนิคที่ให้ผลถูกต้องแม่นยำ และมีความไว (sensitivity) ในระดับสูง (151) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบว่าวิธีที่ดีที่สุดสำหรับการวัดระดับวิตามินดีในซีรัม ได้แก่ เทคนิค chromatography ประกอบด้วย HPLC และ LC-MS/MS เนื่องจากเป็นเทคนิคมีความไวมากกว่าเทคนิคอื่น แต่มีข้อจำกัดคือเป็นเทคนิคที่มีขั้นตอนซับซ้อน และเครื่องมือที่ใช้ในเทคนิค HPLC และ LC-MS/MS มีราคาค่อนข้างสูง อีกทั้งยังต้องอาศัยความชำนาญในการดำเนินการ และใช้เวลามากกว่าวิธี immunoassay method ซึ่งสามารถวัดได้อย่างรวดเร็วและไม่ต้องการผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านในการดำเนินการ (152)

จากความเห็นของผู้เชี่ยวชาญ สามารถแบ่งระดับวิตามินดีโดยพิจารณาจาก biomarker ต่างๆ ได้แก่ ระดับ ALP ความหนาแน่นกระดูก และการดูดซึมแคลเซียมที่ความเข้มข้น 25-hydroxyvitamin D ต่างๆ ในเด็ก ได้ดังนี้ (153)

ตารางที่ 2 เกณฑ์ระดับวิตามินดี แบ่งตามความเข้มข้นของ 25(OH)D ในเด็ก (153)

เกณฑ์ระดับวิตามินดี (Vitamin D status)	ระดับ 25-hydroxyvitamin D (ng/ml)
ระดับปกติ (Sufficiency)	> 30
ภาวะขาดวิตามินดีเล็กน้อย (Insufficiency)	21-30
ภาวะขาดวิตามินดีรุนแรง (Deficiency)	≤ 20



รูปที่ 10 แสดงหลักการของเทคนิค Chemiluminescence Immunoassay (CLIA)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบบ Analytical study ซึ่งได้รับการพิจารณาและผ่านการอนุมัติจริยธรรมจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Institutional Review Board, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University) โครงการวิจัยหมายเลข (IRB No.) 276/58

ประชากรศึกษา

งานวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างซีรัมที่เหลือจากโครงการวิจัยก่อนหน้านี้ หัวข้อเรื่อง “ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของเทโลเมียร์และการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน” IRB No. 279/57 ซึ่งถูกเก็บไว้ ณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยไม่มีการเก็บตัวอย่างใหม่เพิ่มเติมในงานวิจัยนี้

กลุ่มที่ทำการศึกษา (Study groups) คือ ตัวอย่างซีรัมจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์แล้วว่าเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน และได้รับการผ่าตัดแบบคาไซ ที่เข้ามารับการรักษา ณ หน่วยทางเดินอาหาร โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์สภากาชาดไทย ซึ่งมีอายุ 0-18 ปี โดยแบ่งผู้ป่วยออกเป็นสองกลุ่ม ได้แก่

1. Jaundiced group คือ กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีภาวะดีซ่าน โดยได้รับการตรวจการทำงานของตับและมีค่า total bilirubin (TB) มากกว่าหรือเท่ากับ 2.0 mg/dl
2. Non-jaundiced group คือ กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีภาวะดีซ่าน โดยได้รับการตรวจการทำงานของตับและมีค่า total bilirubin (TB) น้อยกว่า 2.0 mg/dl

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้เข้าทำการศึกษา (Inclusion criteria)

1. ตัวอย่างผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน และได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัดแบบคาไซ
2. ตัวอย่างผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันเพศชายและเพศหญิงที่มีอายุไม่เกิน 18 ปี
3. ตัวอย่างผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีผลการตรวจเลือด วัดค่าบ่งชี้การทำงานของตับทั้ง total bilirubin, direct bilirubin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), albumin, alkaline phosphatase (AP), gamma-glutamyl transferase (GGT) และ platelet count

เกณฑ์ในการคัดออก (Exclusion criteria)

1. ตัวอย่างผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีภาวะตับอักเสบจากสาเหตุอื่นร่วมด้วย ได้แก่ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีหรือซี
2. ตัวอย่างผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ได้รับวิตามินดีเสริม ภายในระยะเวลา 3 เดือน ก่อนทำการเจาะเลือด

กลุ่มควบคุม (Control group) คือ ตัวอย่างซีรัมของกลุ่มเด็กที่มีสุขภาพร่างกายสมบูรณ์ แข็งแรงและตรวจสอบประวัติแล้วไม่พบอาการที่เกี่ยวข้องกับโรคท่อน้ำดีตีบตัน ซึ่งมีอายุไม่เกิน 18 ปี

การคำนวณขนาดประชากรศึกษา

เนื่องจากการศึกษาเปรียบเทียบกันทั้งสองกลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน จึงใช้วิธีการคำนวณจำนวนประชากรของกลุ่มตัวอย่างจากการประมาณค่าเฉลี่ย โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{โดย } n = \frac{(Z_{\alpha/2})^2}{4e^2}$$

$$(\alpha = 0.05, Z_{\alpha/2} = 1.96)$$

กำหนด n = ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

Z = ค่า Z score ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

e = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ไม่เกิน 15%

$$\text{ดังนั้น } n = \frac{1.96^2}{4(0.15)^2} = 42.68$$

ดังนั้นต้องมีจำนวนประชากรในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง กลุ่มละ 50 ราย ได้แก่ กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยที่มีภาวะดีซ่าน (jaundiced group) จำนวน 50 ราย กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (non-jaundice group) จำนวน 50 ราย และกลุ่มตัวอย่างเด็กที่มีสุขภาพแข็งแรง (healthy control group) จำนวน 50 ราย จึงจะสามารถประมาณค่าเฉลี่ยโดยมีความผิดพลาดไม่เกินร้อยละ 15 โดยมีการกำหนดอายุและเพศที่ใกล้เคียงกัน (age and sex-match)

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. Automatic adjustable micropipette: (0.1 – 2 μ L), P10 (0.5 - 10 μ L), P20 (5 – 20 μ L), P100 (20 – 100 μ L), P1000 (100 - 1000 μ L) (Eppendorf, Germany)
2. Microcentrifuge tube 1.5 μ L (Axygen, USA)
3. Reagent bottle 1000 mL (Duran, USA)
4. Freezer 4 ° C (Misubishi, Japan)
5. Freezer -20°C (Sanyo, Japan)
6. Parafilm (American Nation Can, USA)
7. Vortex mixer (Scientific industry, USA)
8. Autoclave (Harvey, USA)
9. Pipette rack (Eppendorf, Germany)
10. Pipette tip: 10 μ L, 200 μ L และ 1,000 μ L (Elkay, Ireland)

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. LIAISON 25OH Vitamin D TOTAL Assay (DiaSorin Inc., USA)
2. Procollagen III N-Terminal Propeptide (PIIINP) ELISA Kit (Cloud-Clone Corp., USA)

โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. GraphPad Prism version 6.01 (GraphPad Software, USA)
2. SPSS software for Windows version 22.0 (IBM, USA).

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การตรวจคัดกรอง

ตรวจคัดกรองตัวอย่างซีรัมจากกลุ่มผู้ป่วยโรคพ่น้ำดีตีบตันและกลุ่มควบคุมที่มีซีรัมเพียงพอ คือ มีซีรัมปริมาตรมากกว่า 1 mL และมีข้อมูลค่าบ่งชี้การทำงานตับ ได้แก่

- total bilirubin
- direct bilirubin
- aspartate aminotransferase (AST)
- alanine aminotransferase (ALT)
- albumin
- alkaline phosphatase (AP)
- gamma-glutamyl transferase (GGT)
- platelet count

ร่วมกับการสืบค้นแฟ้มประวัติเพื่อดูการวินิจฉัย ประวัติการรักษา และยาที่ได้รับเป็นประจำ โดยใช้ข้อมูลค่าความหนาแน่นกระดูก ค่าความยืดหยุ่นของตับ จากงานวิจัยเก่า และตัวอย่างที่ผ่านการตรวจคัดกรองเบื้องต้น ซึ่งถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัส

วิทยาคลินิก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จะถูกนำมาตรวจวัดระดับวิตามินดี และปริมาณโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างพังผืด

2. การตรวจวัดค่าระดับวิตามินดี

ใช้การตรวจวัดระดับ 25-hydroxyvitamin D ในซีรัมของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน ด้วยหลักการ chemiluminescence immunoassay (CLIA) โดยใช้เครื่องมือและน้ำยาในการทดสอบจากบริษัท DiaSorin (DiaSorin Inc., Stillwater, Minnesota, USA) ค่าที่ได้มีหน่วยเป็นนาโนกรัม/มิลลิลิตร (ng/ml) โดยแบ่งเกณฑ์ระดับวิตามินดีตามความเข้มข้นของ 25-hydroxyvitamin D ดังแสดงในตารางที่ 2

3. การวิเคราะห์หาปริมาณ Procollagen type III

ใช้การตรวจวัดปริมาณ procollagen III N-terminal propeptide (PIIINP) ในซีรัมของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันด้วยเทคนิค sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยมีขั้นตอนการตรวจวัดดังนี้

- นำตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วย และสารที่ใช้ทดสอบทั้งหมดออกมาไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C จนละลายหมด
- เตรียมสารมาตรฐานความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 8,000 pg/ml ด้วยวิธี serial dilution โดยใช้ stock standard และ standard diluent ซึ่งใช้ความเข้มข้นที่ 0 pg/ml เป็นสารละลาย blank
- เจือจางตัวอย่างซีรัม 100 เท่าด้วย 0.01 mol/l Phosphate-buffered saline (pH 7.0-7.2)
- เติม 100 µl ของ standard, blank และตัวอย่างซีรัมลงใน 96-well plate จากนั้นปิดฝาครอบ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- ล้างด้วย wash solution 350 µl ด้วยเครื่อง autowash 3 ครั้ง จากนั้นเท wash solution ทิ้ง และซับด้วยกระดาษทิชชู

6. เติม 100 μl ของ PIIINP conjugate ในแต่ละ well จากนั้นปิดฝาครอบ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที
7. ล้างด้วย wash solution 350 μl ด้วยเครื่อง autowash 5 ครั้ง จากนั้นเท wash solution ทิ้ง และซับด้วยกระดาษทิชชู
8. เติม TMB substrate 90 μl ลงในแต่ละ well จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15-25 นาที
9. เติม stop solution 50 μl ลงในแต่ละ well
10. ทำการวัด optical density ที่ความยาวคลื่น 450 nm จากนั้นแปลงค่าที่ได้เป็นหน่วย ng/ml

4. การตรวจวัดค่าความหนาแน่นกระดูก (Bone mineral density measurement)

ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันได้รับการตรวจความหนาแน่นกระดูก (bone mineral density, BMD) ที่ตำแหน่ง lumbar spine (L1-L4) โดยใช้วิธีมาตรฐานในการตรวจมวลกระดูกด้วยเครื่อง dual energy x-ray absorptiometry (DXA) จากบริษัท Hologic QDR 2000 (Hologic Inc., Waltham, MA, USA) ค่าที่ได้มีหน่วยเป็นกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (g/cm^2) จากนั้นเปรียบเทียบกับค่าปกติในกลุ่มคนที่มีเพศเดียวกัน อายุใกล้เคียงกัน เชื้อชาติเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน และคำนวณเป็นค่าความแปรผันทางสถิติที่เรียกว่า Z-Score ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้เกณฑ์แบ่งสภาพกระดูกเป็น 3 ประเภทตามองค์การอนามัยโลก ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เกณฑ์ในการวินิจฉัย osteoporosis โดย World Health Organization (WHO)

Z-Score: WHO Definitions Based on Bone Density Levels	
Normal	Bone density is within 1 SD (+1 or -1) of the young adult mean.
Low bone mass	Bone density is between 1 and 2.5 SD below the young adult mean (-1 to -2.5 SD).
Osteoporosis	Bone density is 2.5 SD or more below the young adult mean (-2.5 SD or lower).

5. การตรวจวัดค่าความยืดหยุ่นของตับ (Liver stiffness measurement)

ใช้วิธีการประเมินความรุนแรงของภาวะพังผืดในตับด้วยเครื่อง transient elastography (FibroScan) จากบริษัท Fibrosan (Echosens, Paris, France) เป็นเครื่องมือที่ใช้หลักการทางอัลตราซาวด์ ค่าที่ได้มีหน่วยเป็น kilopascal (kPa) โดยค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดของการวัดวิธีนี้ คือ 2.5 และ 75 kPa ตามลำดับ

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลเชิงปริมาณทั้งหมดแสดงเป็นค่าเฉลี่ยร่วมกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ส่วนข้อมูลพื้นฐานและตัวแปรที่เป็นข้อมูลเชิงคุณภาพ จะนำเสนอในรูปแบบตารางหรือแผนภูมิแท่งโดยแสดงเป็นค่าร้อยละหรือความถี่ โดยวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดด้วยโปรแกรม SPSS (Version 22.0) และกำหนดค่าระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ (95% confident interval)

ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับ 25-hydroxyvitamin D ความหนาแน่นกระดูก ค่าความยืดหยุ่นของตับ และค่าบ่งชี้ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด liver fibrosis ระหว่างในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีภาวะดีซ่าน (jaundiced group) และกลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (non-jaundiced group) และในกลุ่มควบคุม ใช้สถิติ student t-test (unpaired t-test) หรือ Mann-Whitney U test โดยขึ้นกับการกระจายของข้อมูล

ในการประเมินความชุกของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีภาวะพร่องวิตามินดีและภาวะกระดูกพรุน ใช้สถิติ chi-square หรือ Fisher's exact test โดยขึ้นกับลักษณะของข้อมูล

ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ 25-hydroxyvitamin D กับความหนาแน่นกระดูก ค่าความยืดหยุ่นของตับ และค่าบ่งชี้ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด liver fibrosis ใช้สถิติ Pearson correlation coefficient หรือ Spearman's rank correlation โดยขึ้นกับการกระจายของข้อมูล

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ส่วนที่ 1 ข้อมูลพื้นฐานของประชากรในงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาด้วยอย่างซีรัมของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน และได้รับการผ่าตัดแบบคาไซ ที่เข้ามารับการรักษาน หน่วยทางเดินอาหาร โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์สภากาชาดไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 จนถึง พ.ศ. 2558 จำนวนทั้งสิ้น 82 ตัวอย่าง ซึ่งมีอายุตั้งแต่ 1-18 ปี (อายุเฉลี่ย 11 ปี) แบ่งเป็นเพศหญิงจำนวน 44 ราย (53.7%) และเพศชายจำนวน 38 ราย (46.3%) โดยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ได้แก่ กลุ่มเด็กที่มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง และไม่พบอาการเกี่ยวข้องกับโรคท่อน้ำดีตีบตัน ที่มีอายุและเพศใกล้เคียงกัน จำนวนทั้งสิ้น 50 ราย อายุตั้งแต่ 3-18 ปี (อายุเฉลี่ย 9 ปี) แบ่งเป็นเพศหญิงจำนวน 33 ราย (66.0%) และเพศชายจำนวน 17 ราย (34.0%) โดยมีข้อมูลพื้นฐานและผลตรวจทางห้องปฏิบัติการแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ดังตารางที่ 4

นอกจากนี้ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการแบ่งกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันออกเป็น 2 กลุ่ม โดยใช้ค่าระดับ total bilirubin (TB) เป็นเกณฑ์ในการจำแนก ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีภาวะดีซ่าน (jaundiced group, $TB \geq 2$ mg/dl) จำนวนทั้งสิ้น 22 ราย ซึ่งมีอายุตั้งแต่ 1 ถึง 18 ปี (อายุเฉลี่ย 11 ปี) แบ่งเป็นเพศหญิงจำนวน 13 ราย (40.9%) และเพศชายจำนวน 9 ราย (59.1%) และกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (non-jaundiced group, $TB < 2$ mg/dl) จำนวนทั้งสิ้น 60 ราย ซึ่งมีอายุตั้งแต่ 1-18 ปี (อายุเฉลี่ย 11 ปี) แบ่งเป็นเพศหญิงจำนวน 31 ราย (51.7%) และเพศชายจำนวน 29 ราย (48.3%) โดยมีข้อมูลพื้นฐานและผลตรวจทางห้องปฏิบัติการแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ดังตารางที่ 5

เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลพื้นฐานและผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการในระหว่างกลุ่มประชากร โดยใช้สถิติ student t-test เมื่อตัวแปรมีการกระจายข้อมูลแบบปกติ (normal distribution) และสถิติ Mann-Whitney U test เมื่อตัวแปรมีการกระจายข้อมูลแบบไม่ปกติ (non-

normal distribution) จากตารางที่ 4 พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีระดับเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) และเอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ p value น้อยกว่า 0.001 (AST; 101.8 ± 86.5 U/L กับ 27.4 ± 7.1 U/L และ ALT; 90.8 ± 93.0 กับ 11.4 ± 7.4 ตามลำดับ) นอกจากนี้พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีค่าอัตราส่วนของ AST กับ ALT (AST/ALT ratio) และค่าความยืดหยุ่นของตับ (liver stiffness score) สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ p value น้อยกว่า 0.001 (AST/ALT ratio; 1.29 ± 0.55 กับ 3.19 ± 1.88 และ liver stiffness score; 23.0 ± 22.1 กับ 4.5 ± 1.8 ตามลำดับ) และจากตารางที่ 5 พบว่าในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีภาวะดีซ่าน (jaundiced group) มีค่า albumin ต่ำกว่าในกลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (non-jaundiced group) อย่างมีนัยสำคัญที่ p value น้อยกว่า 0.001 (3.7 ± 0.6 g/dl กับ 4.5 ± 0.4 g/dl) และในกลุ่มที่มีภาวะดีซ่าน (jaundiced group) มีค่า total bilirubin, direct bilirubin, AST, ALT, เอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP), เอนไซม์ gamma-glutamyl transferase (GGT), AST/ALT ratio, AST-to-platelet ratio index (APRI), FIB-4 score, international normalized ratio (INR) และ liver stiffness score สูงกว่าในกลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่านอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (total bilirubin; 6.5 ± 4.6 mg/dl กับ 0.6 ± 0.4 mg/dl, P value<0.001, direct bilirubin; 5.5 ± 4.4 mg/dl กับ 0.3 ± 0.3 mg/dl, P value<0.001, AST; 175.1 ± 78.7 IU/L กับ 74.9 ± 73.0 IU/L, P value<0.001, ALT; 135.9 ± 108.0 IU/L กับ 74.3 ± 81.8 IU/L, P value<0.001, ALP; 603.1 ± 169.6 IU/L กับ 294.0 ± 212.9 , P value<0.001, GGT; 371.5 ± 330.7 IU/L กับ 157.1 ± 163.3 IU/L, P value=0.001, AST/ALT ratio; 1.58 ± 0.79 กับ 1.18 ± 0.39 , P value=0.02, APRI; 4.83 ± 3.18 กับ 1.53 ± 2.03 , P value<0.001, FIB-4; 2.24 ± 2.09 กับ 0.71 ± 0.62 , P value=0.003, INR; 1.22 ± 0.14 กับ 1.09 ± 0.09 , P value<0.001 และ liver stiffness score; 50.9 ± 20.5 kPa กับ 12.8 ± 11.1 kPa, P value<0.001 ตามลำดับ) และในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีภาวะดีซ่าน (jaundiced group) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของค่าเกร็ดเลือด (platelet count) และค่า procollagen III N-terminal propeptide (PIIINP) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (non-jaundiced group) (platelet count; 148.0 ± 136.6

($10^9/l$) กับ 171.0 ± 86.4 ($10^9/l$), p value=0.4, PIIINP; 25.7 ± 12.8 ng/ml กับ 29.1 ± 26.9 ng/ml, p value=0.6 ตามลำดับ)

ตารางที่ 4 ข้อมูลพื้นฐาน ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ และระดับ 25(OH)D ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและกลุ่มควบคุม

	กลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน (n=82)	กลุ่มควบคุม (n=50)	p-value
อายุ (ปี)	11.0 ± 5.9	8.9 ± 5.9	0.1
เพศ หญิง n (%)	44 (53.7%)	33 (66.0%)	0.1
ชาย n (%)	38 (46.3%)	17 (34.0%)	
Albumin (g/dl)	4.2 ± 0.6	-	-
Total bilirubin (mg/dl)	2.2 ± 3.5	-	-
Direct bilirubin (mg/dl)	1.7 ± 3.2	-	-
AST (U/l)	101.8 ± 86.5	27.4 ± 7.1	<0.001
ALT (U/l)	90.8 ± 93.0	11.4 ± 7.4	<0.001
ALP (U/l)	377.0 ± 243.8	-	-
GGT (U/l)	198.1 ± 182.9	-	-
Platelet count ($10^9/l$)	164.8 ± 102.1	-	-
AST/ALT ratio	1.29 ± 0.55	3.19 ± 1.88	<0.001
APRI	2.42 ± 2.79	-	-
FIB-4	1.12 ± 1.47	-	-
INR	1.13 ± 0.12	-	-
PNIIP (ng/ml)	27.9 ± 22.9	-	-
Liver stiffness score (kPa)	23.0 ± 22.1	4.5 ± 1.8	<0.001
25-OH vitamin D (ng/ml)	26.9 ± 14.4	38.4 ± 25.4	0.02

ตารางที่ 5 ข้อมูลพื้นฐาน ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ และระดับ 25(OH)D ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีภาวะดีซ่าน (Jaundiced group) และกลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (Non-jaundiced group)

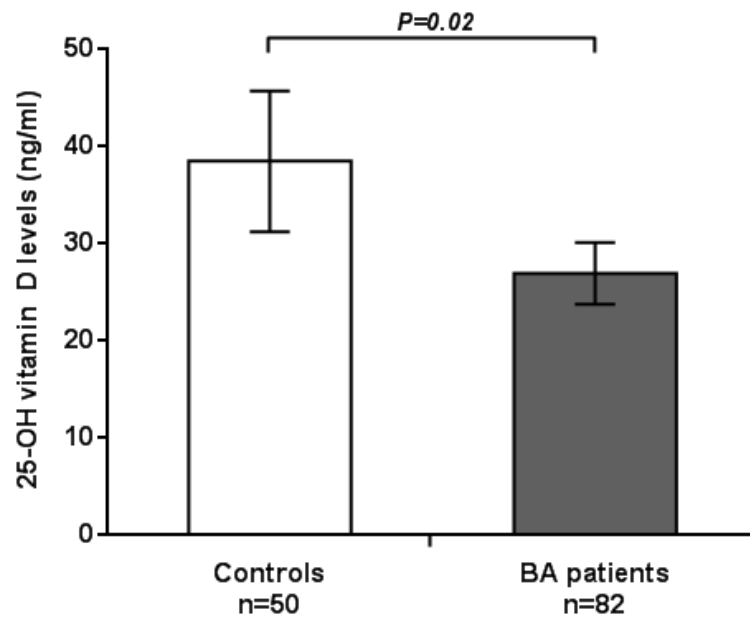
	กลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีภาวะดีซ่าน (n = 22)	กลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (n = 60)	p-value
อายุ (ปี)	10.7 ± 7.1	11.1 ± 5.5	0.8
เพศ หญิง n (%)	13 (40.9%)	31 (51.7%)	0.4
ชาย n (%)	9 (59.1%)	29 (48.3%)	
Albumin (g/dl)	3.7 ± 0.6	4.5 ± 0.4	<0.001
Total bilirubin (mg/dl)	6.5 ± 4.6	0.6 ± 0.4	<0.001
Direct bilirubin (mg/dl)	5.5 ± 4.4	0.3 ± 0.3	<0.001
AST (IU/l)	175.1 ± 78.7	74.9 ± 73.0	<0.001
ALT (IU/l)	135.9 ± 108.0	74.3 ± 81.8	<0.001
ALP (IU/l)	603.1 ± 169.6	294.0 ± 212.9	<0.001
GGT (IU/l)	371.5 ± 330.7	157.1 ± 163.3	0.001
Platelet count (10 ⁹ /l)	148.0 ± 136.6	171.0 ± 86.4	0.4
AST/ALT ratio	1.58 ± 0.79	1.18 ± 0.39	0.02
APRI	4.83 ± 3.18	1.53 ± 2.03	<0.001
FIB-4	2.24 ± 2.09	0.71 ± 0.62	0.003
INR	1.22 ± 0.14	1.09 ± 0.09	<0.001
PNIIIP (ng/ml)	25.7 ± 12.8	29.1 ± 26.9	0.6
Liver stiffness score (kPa)	50.9 ± 20.5	12.8 ± 11.1	<0.001
25-OH vitamin D (ng/ml)	18.5 ± 11.3	30.0 ± 14.1	<0.001

ส่วนที่ 2 การศึกษาความแตกต่างของระดับวิตามินดี [25(OH)D] ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและกลุ่มควบคุม

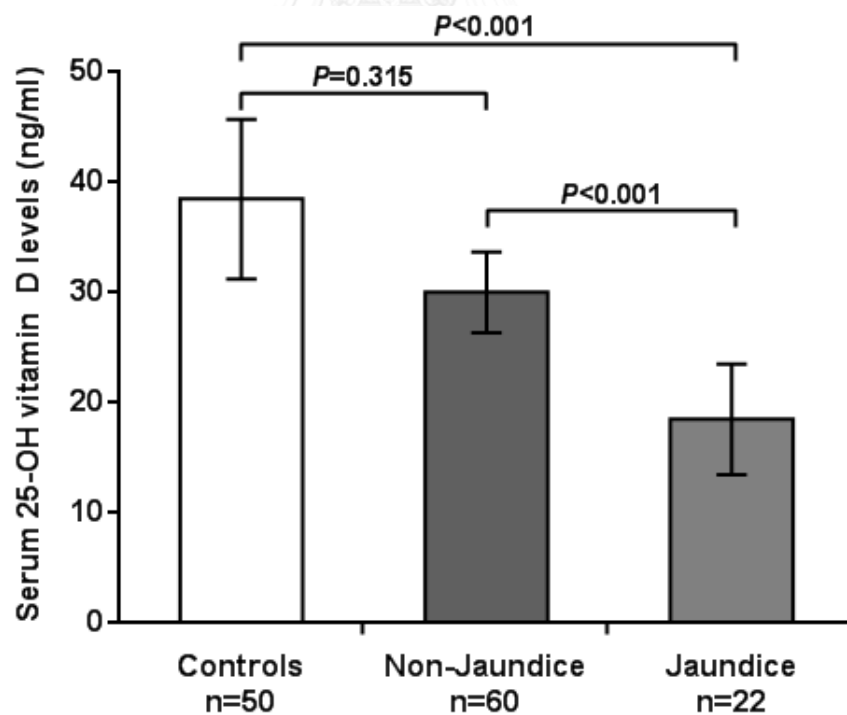
ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและกลุ่มควบคุม พบค่าระดับ 25-hydroxyvitamin D ในซีรัมเฉลี่ยเท่ากับ 26.9 ± 14.4 ng/ml และ 38.4 ± 25.4 ng/ml ตามลำดับ ดังตารางที่ 4 และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับ 25-hydroxyvitamin D ด้วยสถิติ Mann-Whitney U test พบว่า ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีระดับ 25-hydroxyvitamin D ในซีรัมต่ำกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ *P* value เท่ากับ 0.02 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังรูปที่ 11

เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีภาวะดีซ่าน (jaundiced group) และกลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (non-jaundiced group) พบว่ามีระดับ 25-hydroxyvitamin D ในซีรัมเฉลี่ยเท่ากับ 18.5 ± 11.3 ng/ml และ 30.0 ± 14.1 ng/ml ตามลำดับ ดังตารางที่ 4 และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับ 25-hydroxyvitamin D ด้วยสถิติ Mann-Whitney U test พบว่า ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะดีซ่าน (jaundiced group) มีระดับ 25-hydroxyvitamin D ในซีรัมต่ำกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (non-jaundiced group) อย่างมีนัยสำคัญที่ *P* value น้อยกว่า 0.001 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังรูปที่ 12

นอกจากนี้ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะดีซ่าน (jaundiced group) พบผู้ที่มีเกณฑ์ขาดวิตามินดีรุนแรง (vitamin d deficiency) คือ พบค่าระดับ 25-hydroxyvitamin D ในซีรัมต่ำกว่าหรือเท่ากับ 20 ng/ml จำนวนทั้งสิ้น 15 รายจาก 22 ราย คิดเป็น 68.2% ในขณะที่กลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (non-jaundiced group) พบผู้ที่มีเกณฑ์ขาดวิตามินดีรุนแรงจำนวนทั้งสิ้น 9 รายจาก 60 ราย คิดเป็น 15% และในกลุ่มควบคุมพบผู้ที่มีเกณฑ์ขาดวิตามินดีรุนแรงจำนวนทั้งสิ้น 4 รายจาก 50 ราย ซึ่งคิดเป็น 8% ดังตารางที่ 6 และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของจำนวนผู้ที่มีเกณฑ์ขาดวิตามินดีรุนแรงในระหว่างกลุ่มประชากรด้วยสถิติ chi-square พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีภาวะดีซ่าน (jaundiced group) มีความชุกของผู้ที่มีเกณฑ์ขาดวิตามินดีรุนแรงสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญที่ *P* value น้อยกว่า 0.001 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังรูปที่ 13



รูปที่ 11 แสดงความแตกต่างของระดับ 25(OH)D ในซีรัมระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและกลุ่มควบคุม

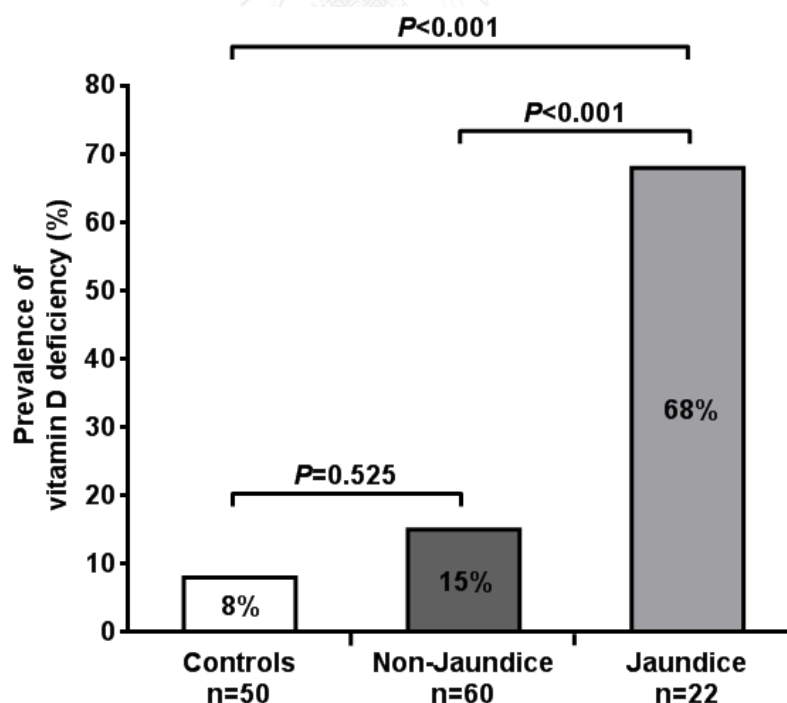


รูปที่ 12 แสดงความแตกต่างของระดับ 25(OH)D ในซีรัมระหว่างผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีภาวะดีซ่าน (Jaundiced group) และกลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (Non-Jaundiced group) และกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 6 ความชุกของผู้ที่มีระดับ 25(OH)D ที่เกณฑ์ต่างๆ ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีตันกลุ่มที่มีภาวะดีซ่าน (Jaundiced group) และไม่มีภาวะดีซ่าน (Non-jaundiced group) และกลุ่มควบคุม

เกณฑ์ระดับ 25-hydroxyvitamin D	กลุ่มควบคุม (n= 50)	กลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีตันที่มีภาวะดีซ่าน (n = 22)	กลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีตันที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (n = 60)
ระดับปกติ (>30 ng/ml)	21 (42.0%)	3 (13.6%)	22 (36.7%)
ภาวะขาดวิตามินดีเล็กน้อย (21-30 ng/ml)	25 (50.0%)	4 (18.2%)	29 (48.3%)
ภาวะขาดวิตามินดีรุนแรง (≤20 ng/ml)	4 (8.0%)	15 (68.2%)	9 (15.0%)

$P < 0.001$ (Chi-squared test)



รูปที่ 13 แสดงความชุกของผู้ที่มีเกณฑ์ขาดวิตามินดีรุนแรง (Vitamin D Deficiency) ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีตันกลุ่มที่มีภาวะดีซ่าน (Jaundiced group) และกลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (Non-jaundiced group) และกลุ่มควบคุม

ส่วนที่ 3 การศึกษาความแตกต่างของค่าความหนาแน่นกระดูก (BMD) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

ในงานวิจัยนี้ มีผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวนทั้งสิ้น 42 รายจากในกลุ่มประชากรศึกษาทั้งหมด ที่ได้มีการประเมินความหนาแน่นของกระดูก (bone mineral density, BMD) ที่ตำแหน่ง lumbar spine (L1-L4) โดยแบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีภาวะดีซ่าน (jaundiced group) จำนวนทั้งสิ้น 18 ราย ซึ่งมีอายุตั้งแต่ 2-18 ปี (อายุเฉลี่ย 12 ปี) แบ่งเป็นเพศหญิงจำนวน 9 ราย และเพศชายจำนวน 9 ราย และกลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (non-jaundiced group) จำนวนทั้งสิ้น 24 ราย ซึ่งมีอายุตั้งแต่ 4-18 ปี (อายุเฉลี่ย 13 ปี) แบ่งเป็นเพศหญิงจำนวน 11 ราย และเพศชายจำนวน 13 ราย พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีภาวะดีซ่าน (jaundiced group) และกลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (non-jaundiced group) มีค่าความหนาแน่นกระดูก (lumbar BMD) เฉลี่ยเท่ากับ $0.48 \pm 0.18 \text{ g/cm}^3$ และ $0.61 \pm 0.17 \text{ g/cm}^3$ ตามลำดับ คิดเป็นค่า lumbar BMD Z-score เท่ากับ -2.0 ± 2.2 และ -0.4 ± 0.9 ตามลำดับ ดังตารางที่ 7

เมื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า lumbar BMD และ lumbar BMD Z-score ด้วยสถิติ student t-test และ Mann-Whitney U test ตามลำดับ พบว่าในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีภาวะดีซ่าน (jaundiced group) มีค่า lumbar BMD และ lumbar BMD Z-score ต่ำกว่าในกลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (non-jaundiced group) อย่างมีนัยสำคัญที่ P value เท่ากับ 0.02 และ 0.005 ตามลำดับ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังตารางที่ 7 นอกจากนี้ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีภาวะดีซ่าน (jaundiced group) พบผู้ที่มีปัญหากระดูกจำนวนทั้งสิ้น 12 รายจาก 18 ราย คิดเป็น 66.6% ประกอบด้วยผู้ที่มีภาวะกระดูกบาง (osteopenia) จำนวนทั้งสิ้น 6 ราย (33.3%) และผู้ที่มีภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis) จำนวนทั้งสิ้น 6 ราย (33.3%) ในขณะที่กลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (non-jaundiced group) พบผู้ที่มีปัญหากระดูกจำนวนทั้งสิ้น 5 รายจาก 24 ราย คิดเป็น 20.8% ซึ่งเป็นเพียงภาวะกระดูกบางเท่านั้น ดังตารางที่ 8 จากการเปรียบเทียบจำนวนของผู้ที่มีปัญหากระดูกในระหว่างกลุ่มประชากรด้วยสถิติ Fisher's exact test พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีภาวะดีซ่าน (jaundiced group) มีความชุกของผู้ที่มีปัญหากระดูกสูงกว่าในกลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (non-jaundiced group) อย่างมีนัยสำคัญที่ P value เท่ากับ 0.002 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังรูปที่ 14

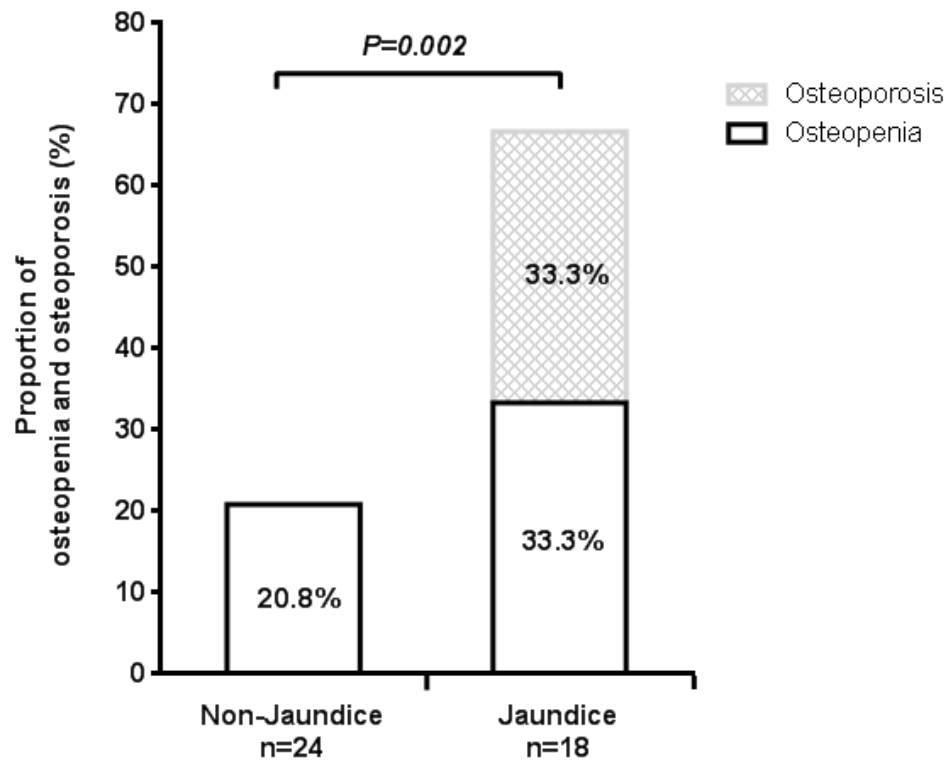
ตารางที่ 7 ความหนาแน่นกระดูก (BMD) ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีภาวะดีซ่าน (Jaundiced group) และกลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (Non-jaundiced group)

	กลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีภาวะดีซ่าน (n = 18)	กลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (n = 24)	p-value
อายุ (ปี)	12.0 ± 1.1	13.0 ± 1.0	0.5
เพศ หญิง n (%)	9 (50.0%)	11 (54.2%)	0.5
ชาย n (%)	9 (50.0%)	13 (45.8%)	
Lumbar BMD (g/cm ³)	0.48 ± 0.18	0.61 ± 0.17	0.02
Lumbar BMD Z-score	-2.0 ± 2.2	-0.4 ± 0.9	0.005
Liver stiffness score (kPa)	46.6 ± 21.3	13.0 ± 7.4	<0.001
25-OH vitamin D (ng/ml)	27.7 ± 13.1	30.4 ± 11.7	0.5

ตารางที่ 8 ความชุกของผู้ที่มีสุขภาพกระดูกที่เกณฑ์ต่างๆ ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีภาวะดีซ่าน (Jaundiced group) และกลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (Non-jaundiced group)

สุขภาพกระดูก	กลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีภาวะดีซ่าน (n = 18)	กลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (n = 24)
ภาวะปกติ (Normal)	6 (33.3%)	19 (79.2%)
ภาวะกระดูกบาง (Osteopenia)	6 (33.3%)	5 (20.8%)
ภาวะกระดูกพรุน (Osteoporosis)	6 (33.3%)	0 (0.0%)

P=0.002 (Fisher's exact test)



รูปที่ 14 แสดงความชุกของผู้ที่มีภาวะกระดูกบาง (Osteopenia) และผู้ที่มีภาวะกระดูกพรุน (Osteoporosis) ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

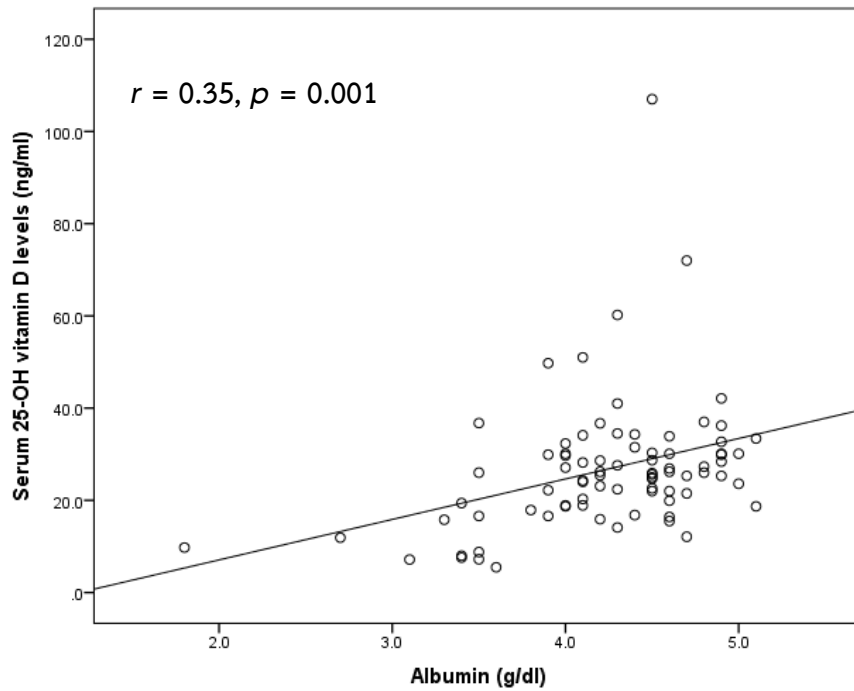
ส่วนที่ 4 การศึกษาความสัมพันธ์ของระดับวิตามินดี [25(OH)D] ในซีรัมกับความหนาแน่นกระดูก (BMD) และภาวะพังผืดตับในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของระดับ 25-hydroxyvitamin D ในซีรัมกับค่าความหนาแน่นกระดูก (BMD) และตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพังผืดตับ (liver fibrosis) ได้แก่ ค่าความยืดหยุ่นของตับ (liver stiffness score), ค่าบ่งชี้การทำงานของตับ และระดับ fibrotic marker ได้แก่ PIIINP โดยใช้สถิติ Pearson correlation coefficient ในตัวแปรที่มีการกระจายข้อมูลแบบปกติ (normal distribution) และสถิติ Spearman's rank correlation ในตัวแปรที่มีการกระจายข้อมูลแบบไม่ปกติ (non-normal distribution) พบว่าระดับ 25-hydroxyvitamin D มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% กับ albumin, total bilirubin, direct bilirubin และ liver stiffness score เท่านั้น ดังตารางที่ 9

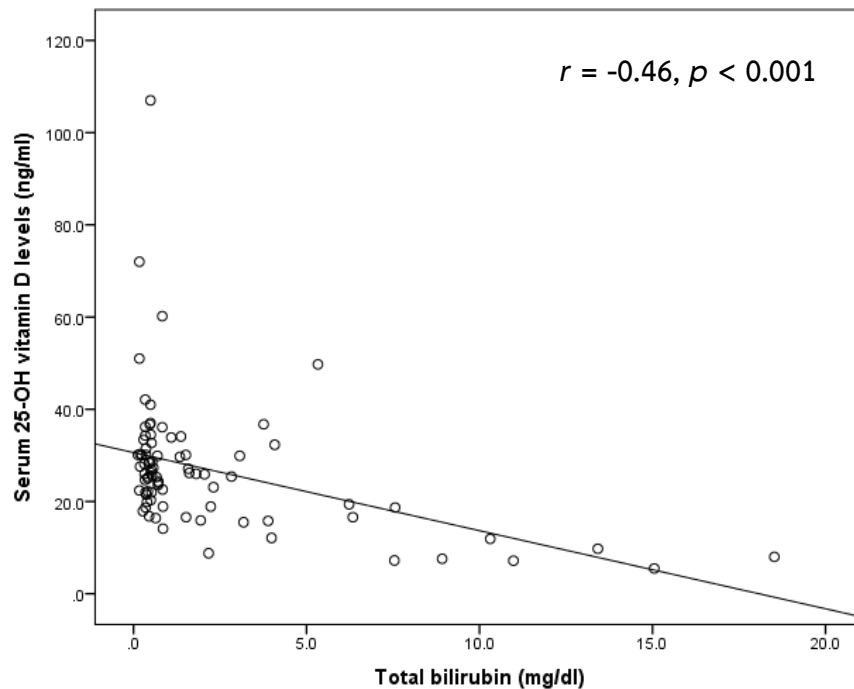
โดยระดับ 25-hydroxyvitamin D ในซีรัมมีความสัมพันธ์ในทางบวกกับ albumin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r=0.35$, p value=0.001) แสดงกราฟความสัมพันธ์ดังรูปที่ 15 และมีความสัมพันธ์ในทางลบกับค่า total bilirubin ($r=-0.46$, p value<0.001) ค่า direct bilirubin ($r=-0.39$, p value<0.001) และค่าความยืดหยุ่นของตับ ($r=-0.34$, $p=0.002$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงกราฟความสัมพันธ์ดังรูปที่ 16-18 ตามลำดับ ในขณะที่งานวิจัยนี้ ไม่พบความสัมพันธ์ของระดับ 25-hydroxyvitamin D ในซีรัมกับทั้งค่าความหนาแน่นกระดูกทั้ง lumbar BMD และ lumbar BMD Z-score

ตารางที่ 9 ความสัมพันธ์ของระดับ 25(OH)D ในซีรัมกับผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ ค่าความหนาแน่นกระดูก (BMD) และค่าความยืดหยุ่นของตับ (liver stiffness score) ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

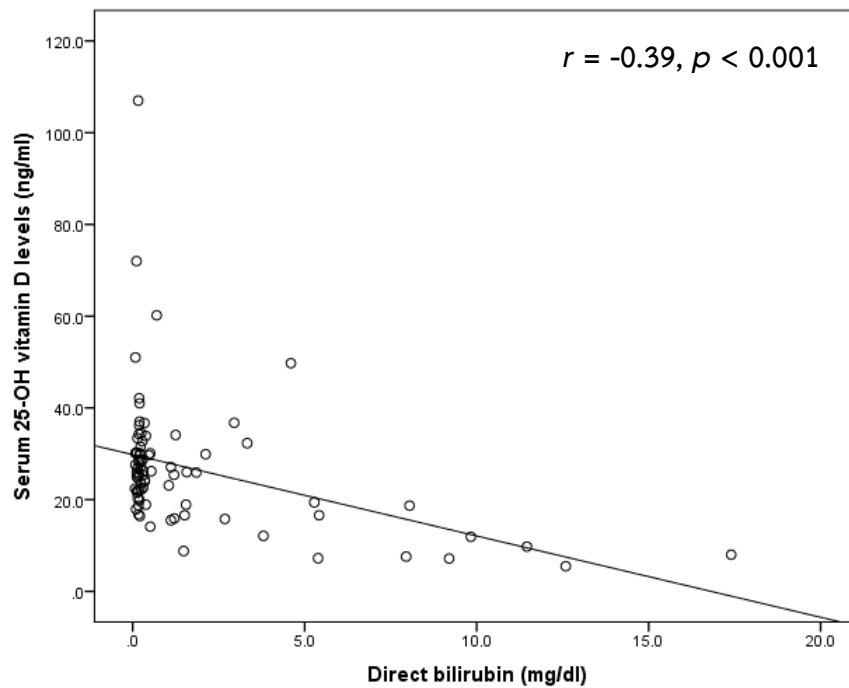
	ค่าความสัมพันธ์กับระดับ 25-OH vitamin D (<i>r</i>)	<i>p</i> -value
อายุ (ปี)	-0.08	0.5
Albumin (g/dl)	0.35	0.001
Total bilirubin (mg/dl)	-0.46	<0.001
Direct bilirubin (mg/dl)	-0.39	<0.001
AST (IU/l)	-0.13	0.2
ALT (IU/l)	-0.10	0.4
ALP (IU/l)	-0.22	0.05
GGT (IU/l)	-0.18	0.1
Platelet count ($10^9/l$)	0.06	0.6
AST/ALT ratio	-0.10	0.4
APRI	-0.15	0.2
FIB-4	-0.07	0.6
INR	-0.34	0.002
PNIIIP (ng/ml)	0.02	0.9
Liver stiffness score (kPa)	-0.34	0.002
Lumbar BMD (g/cm^3)	0.01	1.0
Lumbar BMD Z-score	0.11	0.6



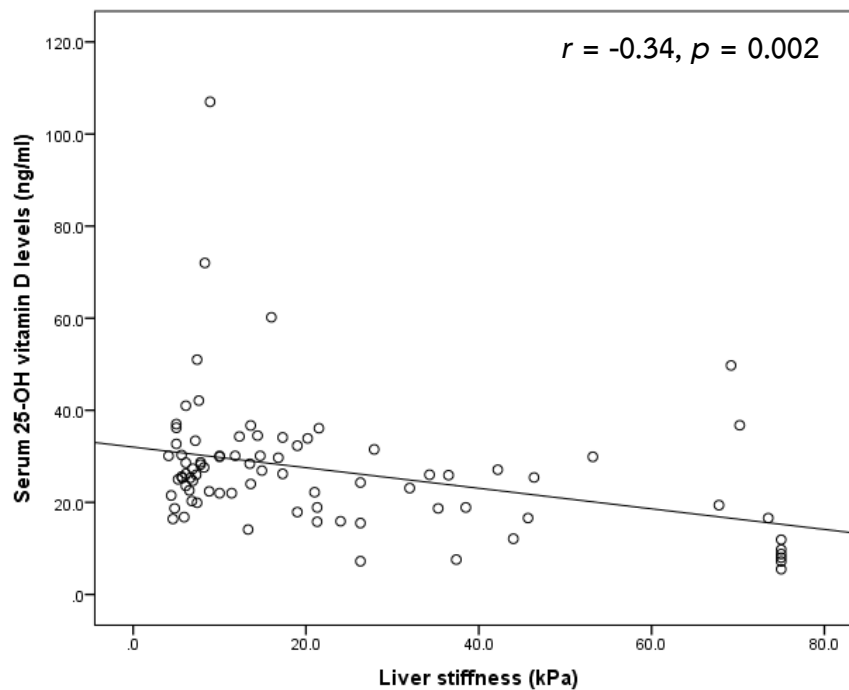
รูปที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ของระดับ 25(OH)D กับค่า albumin ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน (n=82)



รูปที่ 16 แสดงความสัมพันธ์ของระดับ 25(OH)D กับค่า total bilirubin ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน (n=82)



รูปที่ 17 แสดงความสัมพันธ์ของระดับ 25(OH)D กับค่า direct bilirubin ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน (n=82)



รูปที่ 18 แสดงความสัมพันธ์ของระดับ 25(OH)D กับค่าความยืดหยุ่นตับ (liver stiffness score) ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน (n=82)

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

อภิปรายผลการทดลอง

โรคท่อน้ำดีตีบตัน (Biliary atresia, BA) ในเด็กทารกแรกเกิด แม้ว่าจะสามารถพบได้ไม่บ่อยนัก แต่มีความรุนแรงและยังคงเป็นปัญหาหลักของโรคตับในเด็ก เนื่องจากเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เด็กทารกทั่วโลกมีภาวะน้ำดีคั่งในตับ (neonatal cholestasis) จากการตีบตันหรือไม่พบส่วนของ extrahepatic bile duct ทำให้น้ำดีไม่สามารถระบายออกจากตับลงสู่ลำไส้เล็กได้อย่างปกติ ส่งผลให้เด็กทารกมีภาวะตัวเหลือง ท้องมาน และอุจจาระมีลักษณะซีดขาว อีกทั้งยังมีการสร้างพังผืดในตับ (liver fibrosis) ซึ่งก่อให้เกิดภาวะความดันสูงในหลอดเลือดดำของตับ (portal hypertension) นำไปสู่ภาวะตับแข็ง (cirrhosis) และตับเสียการทำงาน จนอาจเสียชีวิตได้ในที่สุด ดังนั้นการวินิจฉัยและรักษาด้วยการผ่าตัดแบบ Kasai ได้อย่างทันท่วงที จะช่วยลดความต้องการในการผ่าตัดปลูกถ่ายตับ (liver transplantation) ซึ่งมักเป็นปัญหาสำคัญต่อมาในผู้ป่วยเด็กที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน (1) นอกจากนี้ยังพบว่า โรคกระดูกเป็นปัญหาแทรกซ้อนที่สำคัญในกลุ่มผู้ป่วยโรคตับเรื้อรัง โดยงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า ในผู้ป่วยเด็กที่มีภาวะน้ำดีคั่งในตับจะมีความหนาแน่นกระดูกต่ำ และพบมีภาวะกระดูกอ่อนบางในผู้ป่วยเด็กเหล่านี้รวมถึงในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันอีกด้วย (98, 101, 154, 155)

ปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของระดับวิตามินดีในซีรัมของผู้ป่วยในกลุ่มโรคตับอักเสบเรื้อรัง ได้แก่ ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (156, 157) และบี (158) ผู้ป่วยกลุ่มโรค non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) (159) และ alcoholic liver disease (ALD) (160) รวมถึงในผู้ป่วย primary biliary cirrhosis (PBC) (161) พบว่าผู้ป่วยเหล่านี้มีระดับวิตามินดีในเกณฑ์ต่ำเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อีกทั้งระดับวิตามินดีที่ลดลงในผู้ป่วยยังมีความสัมพันธ์กับการสร้างพังผืดตับ (liver fibrosis) ที่เพิ่มขึ้น และความหนาแน่นกระดูก (bone mineral density, BMD) ที่ลดลง (162)

ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการศึกษาระดับวิตามินดีในซีรัมของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ได้รับการผ่าตัดแบบคาไซ โดยแบ่งผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันออกเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการรุนแรงหรือยังมีภาวะดีซ่าน (jaundiced group, total bilirubin ≥ 2 mg/dl) และกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีอาการรุนแรงหรือไม่มีภาวะดีซ่าน (non-jaundiced group, total bilirubin < 2 mg/dl) โดยทำการวัดค่าระดับ 25-hydroxyvitamin D ในซีรัม ด้วยเทคนิค chemiluminescence immunoassay (CLIA) และวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของระดับ 25-hydroxyvitamin D ทางสถิติในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและกลุ่มควบคุม จากผลการวิเคราะห์พบว่า ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีระดับวิตามินดีต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีภาวะดีซ่าน (jaundiced group) มีระดับวิตามินดีลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (non-jaundiced group) อย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะดีซ่าน (jaundiced group) ยังพบความชุกของผู้ที่มีเกณฑ์ขาดวิตามินดีรุนแรง (25-hydroxyvitamin D ≤ 20 ng/ml) สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (non-jaundiced group) และในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิตามินดีมีความเกี่ยวข้องกับระดับความรุนแรงของโรค โดยในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีอาการรุนแรง จะพบภาวะน้ำดีคั่งในตับ ทำให้ลำไส้ไม่สามารถดูดซึมวิตามินดีซึ่งเป็นวิตามินที่ละลายในไขมันได้อย่างปกติ และส่งผลให้เกิดปัญหาสุขภาพกระดูก เนื่องมาจากผลของการขาดวิตามินดีโดยตรง ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ต่อมาที่พบว่า ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีภาวะดีซ่าน (jaundiced group) พบความหนาแน่นกระดูกต่ำกว่าในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (non-jaundiced group) อย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีภาวะดีซ่าน (jaundiced group) ยังพบความชุกของผู้ที่มีภาวะกระดูกบาง (osteopenia) และภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis) สูงกว่าในกลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (non-jaundiced group) อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องมาจากการทำงานของเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) ที่ลดลงหรือการทำงานของเซลล์สลายกระดูก (osteoclast) ในการดึงแร่ธาตุจาก collagen matrix ในกระดูกที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน จากการศึกษาในหนูทดลองพบว่า unconjugated bilirubin สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ osteoblast (100, 163) และจากการศึกษาในผู้ป่วยที่มีภาวะดีซ่าน (cholestatic disease) พบว่า unconjugated bilirubin มีบทบาทในการกระตุ้นให้เซลล์ osteoblast เกิดการตายแบบ apoptosis (100, 163) นอกจากนี้ยัง

พบว่า ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายตับ (liver transplantation) จะมีสุขภาพกระดูกดีขึ้น โดยพบค่าบ่งชี้ของ bone formation ที่เพิ่มขึ้นและพบค่าบ่งชี้ของ bone resorption ที่ลดลง (164)

นอกจากนี้ ในงานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของระดับวิตามินดีในซีรัมของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกับค่าบ่งชี้ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของตับ รวมถึงค่าบ่งชี้ของการสร้างพังผืดในตับ ได้แก่ AST-to-platelet ratio index (APRI), Fibrosis-4 (FIB-4), Procollagen type III และค่าความยืดหยุ่นตับ (liver stiffness score) โดยใช้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติ พบว่าระดับวิตามินดีที่ลดลงมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับ total bilirubin (TB) และ direct bilirubin (DB) ที่เพิ่มขึ้น และมีความสัมพันธ์กับ albumin ที่ลดลง โดย TB และ DB เป็นค่าที่ใช้บ่งชี้ระดับความรุนแรงของภาวะดีซ่าน และ albumin เป็นโปรตีนที่ตับสร้างขึ้น ดังนั้นระดับ albumin ที่ลดลงจึงสามารถบ่งชี้ถึงการทำงานของตับที่เสื่อมลงได้ จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า ระดับวิตามินดีในซีรัมมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของภาวะดีซ่านที่เกิดจากภาวะน้ำดีคั่งในตับที่ทำให้ bilirubin ถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดมากขึ้น รวมถึงการทำงานของตับที่เสียไปในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน นอกจากนี้ยังพบว่าระดับวิตามินดีที่ลดลงมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับค่าความยืดหยุ่นตับที่เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการวัดด้วยเครื่อง transient elastography หรือ FibroScan ที่นิยมใช้ประเมินระดับการสร้างพังผืดของตับในปัจจุบัน แสดงให้เห็นว่า ระดับวิตามินดีในซีรัมของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของการสร้างพังผืดในตับ จากการศึกษาในปัจจุบันพบว่า นอกจากบทบาทของวิตามินดีในการรักษาสมดุลของแร่ธาตุในกระดูกแล้ว วิตามินดียังมีบทบาทสำคัญในกระบวนการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน (165, 166) และกระบวนการอักเสบ (167, 168) รวมถึงบทบาทสำคัญในกระบวนการสร้างพังผืดตับอีกด้วย (127, 169, 170) นอกจากนี้ในการศึกษาของ Ogura และคณะ (170) พบว่าวิตามินดียังมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการเกิดภาวะน้ำดีคั่งในตับ (cholestasis) และการเกิดภาวะตับแข็ง (cirrhosis) โดยใช้หนูทดลองเป็นโมเดลในการศึกษา พบว่า vitamin D₃ สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างน้ำดีและการขนส่งน้ำดีในตับ ไต และลำไส้ และยังสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของท่อน้ำดีในหนูทดลอง รวมถึงการศึกษาของ Firincieli และคณะ (169) ที่พบว่า vitamin D receptor (VDR) มีบทบาทสำคัญในการช่วยฟื้นฟูตับและท่อน้ำดีในหนูทดลองที่เหนี่ยวนำให้เกิด

ภาวะน้ำดีคั่งในตับ (Cholestasis) อีกทั้งวิตามินดียังสามารถลดกระบวนการสร้างพังผืดตับในระหว่าง การซ่อมแซมบาดแผลของหนูทดลองที่เหนียวนำไปเกิดการบาดเจ็บที่ตับ ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์ ในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า วิตามินดีอาจมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งความรุนแรงของการอุดตันของ ท่อน้ำดีซึ่งส่งผลให้เกิดภาวะน้ำดีคั่งสะสมในตับ และยับยั้งกระบวนการสร้างพังผืดในตับของผู้ป่วยโรค ท่อน้ำดีตีบตัน

procollagen type III เป็น extracellular matrix (ECM) ชนิดหนึ่งที่สร้างจาก hepatic stellate cell (HSC) ที่ถูกกระตุ้นเมื่อตับได้รับอาการบาดเจ็บ ซึ่งมีสาเหตุมาจากการดื่ม แอลกอฮอล์ หรือการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบวมถึงในผู้ป่วยโรคตับเรื้อรัง โดยการสะสมของ ECM ที่ เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อตับ จะทำให้เกิดภาวะพังผืดเกาะตับ ซึ่งอาจนำไปสู่ภาวะตับแข็งในที่สุด (118) โดย การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในกระบวนการสร้างพังผืดของตับ (liver fibrogenesis) จะพบระดับ collagen type I และ III เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อตับ (171) โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการวัดระดับ Procollagen III N-terminal Propeptide (PIIINP) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน พบว่าในผู้ป่วย โรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีภาวะดีซ่าน (jaundiced group) มีระดับ PIIINP ต่ำกว่าในกลุ่มที่ไม่มีภาวะ ดีซ่าน (non-jaundiced group) ซึ่งผลการทดลองที่ได้ไม่สอดคล้องกับระดับการสร้างพังผืดในตับ ของผู้ป่วย ที่พบว่าในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีภาวะดีซ่าน (jaundiced group) จะพบค่าความ ยืดหยุ่นตับสูงกว่ากลุ่มที่ไม่มีภาวะดีซ่าน (non-jaundiced group) อย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า ผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงจะมีการสร้างพังผืดในตับสูงกว่าในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการรุนแรง จากผลการ วิเคราะห์ที่ไม่สอดคล้องกันนี้ เนื่องมาจากตัวอย่างซีรัมที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นตัวอย่างซีรัมที่เหลือจาก งานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ถูกเก็บไว้ โดยการนำตัวอย่างซีรัมไปใช้ในการทดลองจำนวนหลายครั้ง อาจทำให้ เกิดการเสื่อมสภาพของโปรตีนต่างๆ ในซีรัม รวมถึง PIIINP จึงทำให้ไม่สามารถใช้ระดับ PIIINP ใน ซีรัมของผู้ป่วยในการหาสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคท่อน้ำดีตีบตันในงานวิจัยนี้ได้

โดยในงานวิจัยนี้ ไม่พบความสัมพันธ์ของระดับวิตามินดีกับค่าความหนาแน่นกระดูก ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน เนื่องจากในการศึกษานี้มีข้อมูลค่าความหนาแน่นกระดูกของผู้ป่วยไม่ เพียงพอ จึงไม่สามารถบอกความสัมพันธ์ของวิตามินดีกับความผิดปกติของกระดูกในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดี ตีบตันได้

ข้อจำกัดที่สำคัญในงานวิจัยนี้ คือ ค่าระดับ 25-hydroxyvitamin D ที่ลดลงในซีรัมของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันนั้น อาจได้รับผลกระทบจากความผิดปกติในการหลั่งน้ำดีของผู้ป่วย หรือการทำงานของตับในการเมแทบอลิซึมวิตามินดีที่เสียไป โดยงานวิจัยนี้มีข้อมูลไม่เพียงพอที่สามารถระบุความสัมพันธ์ของระดับวิตามินดีในซีรัมกับความรุนแรงของโรคได้อย่างชัดเจน ดังนั้นในงานวิจัยต่อไป จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีการให้วิตามินดีเสริม เพื่อหาความสัมพันธ์ของการได้รับวิตามินดีเสริมกับความรุนแรงของการสร้างพังผืดในตับของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันได้อย่างชัดเจน โดยข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้ สามารถนำไปใช้เพื่อสนับสนุนการให้วิตามินดีเสริมแก่ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน เพื่อช่วยยับยั้งกระบวนการสร้างพังผืดในตับ และช่วยเสริมสร้างความแข็งแรงของกระดูกให้กับผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการรุนแรงได้ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีระดับวิตามินดีในซีรัมต่ำกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
2. ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีอาการรุนแรงมีระดับวิตามินในซีรัมต่ำกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการรุนแรง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
3. ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีอาการรุนแรงพบความชุกของผู้ที่มีเกณฑ์ขาดวิตามินดี (vitamin D deficiency) สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการรุนแรง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
4. ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีอาการรุนแรงมีความหนาแน่นกระดูกต่ำกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการรุนแรง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
5. ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกลุ่มที่มีอาการรุนแรงพบความชุกของผู้ที่มีภาวะกระดูกบาง (osteopenia) และภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis) สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการรุนแรง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
6. ระดับวิตามินดีในซีรัมมีความสัมพันธ์ทางบวกกับ albumin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีความสัมพันธ์ทางลบกับ total bilirubin, direct bilirubin และค่าความยืดหยุ่นตับ (liver stiffness score) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

รายการอ้างอิง

- [1] Hartley JL, Davenport M, Kelly DA. Biliary atresia. *Lancet* (London, England). 2009;374(9702):1704-13.
- [2] Kelly DA, Davenport M. Current management of biliary atresia. *Archives of disease in childhood*. 2007;92(12):1132-5.
- [3] Kassai M. Surgical treatment of biliary atresia. *Nihon Geka Gakkai zasshi*. 1983;84(9):741-3.
- [4] Shneider BL, Brown MB, Haber B, Whittington PF, Schwarz K, Squires R, et al. A multicenter study of the outcome of biliary atresia in the United States, 1997 to 2000. *The Journal of pediatrics*. 2006;148(4):467-74.
- [5] Frei P, Fried M, Hungerbuhler V, Rammert C, Rousson V, Kullak-Ublick GA. Analysis of risk factors for low bone mineral density in inflammatory bowel disease. *Digestion*. 2006;73(1):40-6.
- [6] Bartram SA, Peaston RT, Rawlings DJ, Walshaw D, Francis RM, Thompson NP. Multifactorial analysis of risk factors for reduced bone mineral density in patients with Crohn's disease. *World journal of gastroenterology*. 2006;12(35):5680-6.
- [7] Walther F, Fusch C, Radke M, Beckert S, Findeisen A. Osteoporosis in pediatric patients suffering from chronic inflammatory bowel disease with and without steroid treatment. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2006;43(1):42-51.
- [8] Gupta A, Paski S, Issenman R, Webber C. Lumbar spine bone mineral density at diagnosis and during follow-up in children with IBD. *Journal of clinical densitometry*. 2004;7(3):290-5.
- [9] Sylvester FA, Wyzga N, Hyams JS, Davis PM, Lerer T, Vance K, et al. Natural history of bone metabolism and bone mineral density in children with inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2007;13(1):42-50.

- [10] Lodder MC, de Jong Z, Kostense PJ, Molenaar ET, Staal K, Voskuyl AE, et al. Bone mineral density in patients with rheumatoid arthritis: relation between disease severity and low bone mineral density. *Annals of the rheumatic diseases*. 2004;63(12):1576-80.
- [11] Lien G, Selvaag AM, Flato B, Haugen M, Vinje O, Sorskaar D, et al. A two-year prospective controlled study of bone mass and bone turnover in children with early juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(3):833-40.
- [12] Lee C, Almagor O, Dunlop DD, Manzi S, Spies S, Chadha AB, et al. Disease damage and low bone mineral density: an analysis of women with systemic lupus erythematosus ever and never receiving corticosteroids. *Rheumatology*. 2006;45(1):53-60.
- [13] Dempster DW, Lindsay R. Pathogenesis of osteoporosis. *Lancet*. 1993;341(8848):797-801.
- [14] Andrews WS, Pau CM, Chase HP, Foley LC, Lilly JR. Fat soluble vitamin deficiency in biliary atresia. *Journal of pediatric surgery*. 1981;16(3):284-90.
- [15] Heubi JE, Hollis BW, Specker B, Tsang RC. Bone disease in chronic childhood cholestasis. I. Vitamin D absorption and metabolism. *Hepatology*. 1989;9(2):258-64.
- [16] Tan X, Li Y, Liu Y. Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;17(12):3382-93.
- [17] Tan X, Li Y, Liu Y. Therapeutic role and potential mechanisms of active Vitamin D in renal interstitial fibrosis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2007;103(3-5):491-6.
- [18] Arteh J, Narra S, Nair S. Prevalence of vitamin D deficiency in chronic liver disease. *Digestive diseases and sciences*. 2010;55(9):2624-8.
- [19] Lange CM, Miki D, Ochi H, Nischalke HD, Bojunga J, Bibert S, et al. Genetic analyses reveal a role for vitamin D insufficiency in HCV-associated hepatocellular carcinoma development. *PloS one*. 2013;8(5):e64053.

- [20] Kitson MT, Dore GJ, George J, Button P, McCaughan GW, Crawford DH, et al. Vitamin D status does not predict sustained virologic response or fibrosis stage in chronic hepatitis C genotype 1 infection. *Journal of hepatology*. 2013;58(3):467-72.
- [21] Petta S, Grimaudo S, Marco VD, Scazzone C, Macaluso FS, Camma C, et al. Association of vitamin D serum levels and its common genetic determinants, with severity of liver fibrosis in genotype 1 chronic hepatitis C patients. *Journal of viral hepatitis*. 2013;20(7):486-93.
- [22] Mack CL. The pathogenesis of biliary atresia: evidence for a virus-induced autoimmune disease. *Seminars in liver disease*. 2007;27(3):233-42.
- [23] Houwen RH, Kerremans, II, van Steensel-Moll HA, van Romunde LK, Bijleveld CM, Schweizer P. Time-space distribution of extrahepatic biliary atresia in The Netherlands and West Germany. *Zeitschrift fur Kinderchirurgie*. 1988;43(2):68-71.
- [24] CY, Chen PH, Chan CF, Chang MH, Wu TC. Biliary atresia in preterm infants in Taiwan: a nationwide survey. *The Journal of pediatrics*. 2013;163(1):100-3.e1.
- [25] Wada H, Muraji T, Yokoi A, Okamoto T, Sato S, Takamizawa S, et al. Insignificant seasonal and geographical variation in incidence of biliary atresia in Japan: a regional survey of over 20 years. *Journal of pediatric surgery*. 2007;42(12):2090-2.
- [26] Girard M, Jannot AS, Besnard M, Leutenegger AL, Jacquemin E, Lyonnet S, et al. Polynesian ecology determines seasonality of biliary atresia. *Hepatology*. 2011;54(5):1893-4.
- [27] Danks DM, Campbell PE, Jack I, Rogers J, Smith AL. Studies of the aetiology of neonatal hepatitis and biliary atresia. *Archives of disease in childhood*. 1977;52(5):360-7.
- [28] Strickland AD, Shannon K. Studies in the etiology of extrahepatic biliary atresia: time-space clustering. *The Journal of pediatrics*. 1982;100(5):749-53.

- [29] Yoon PW, Bresee JS, Olney RS, James LM, Khoury MJ. Epidemiology of biliary atresia: a population-based study. *Pediatrics*. 1997;99(3):376-82.
- [30] Khalil BA, Perera MT, Mirza DF. Clinical practice: management of biliary atresia. *European journal of pediatrics*. 2010;169(4):395-402.
- [31] Sokol RJ, Mack C, Narkewicz MR, Karrer FM. Pathogenesis and outcome of biliary atresia: current concepts. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2003;37(1):4-21.
- [32] Hyams JS, Glaser JH, Leichtner AM, Morecki R. Discordance for biliary atresia in two sets of monozygotic twins. *The Journal of pediatrics*. 1985;107(3):420-2.
- [33] Schweizer P, Kerremans J. Discordant findings in extrahepatic bile duct atresia in 6 sets of twins. *Zeitschrift fur Kinderchirurgie*. 1988;43(2):72-5.
- [34] Poovorawan Y, Chongsrisawat V, Tanunythawongse C, Norapaksunthorn T, Mutirangura A, Chandrakamol B. Extrahepatic biliary atresia in twins: zygosity determination by short tandem repeat loci. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 1996;79 Suppl 1:S119-24.
- [35] Mieli-Vergani G, Vergani D. Biliary atresia. *Seminars in immunopathology*. 2009;31(3):371-81.
- [36] Davenport M, Savage M, Mowat AP, Howard ER. Biliary atresia splenic malformation syndrome: an etiologic and prognostic subgroup. *Surgery*. 1993;113(6):662-8.
- [37] Mazziotti MV, Willis LK, Heuckeroth RO, LaRegina MC, Swanson PE, Overbeek PA, et al. Anomalous development of the hepatobiliary system in the Inv mouse. *Hepatology*. 1999;30(2):372-8.
- [38] Yokoyama T, Copeland NG, Jenkins NA, Montgomery CA, Elder FF, Overbeek PA. Reversal of left-right asymmetry: a situs inversus mutation. *Science*. 1993;260(5108):679-82.
- [39] Schon P, Tsuchiya K, Lenoir D, Mochizuki T, Guichard C, Takai S, et al. Identification, genomic organization, chromosomal mapping and mutation analysis of the human INV gene, the ortholog of a murine

- gene implicated in left-right axis development and biliary atresia. *Human genetics*. 2002;110(2):157-65.
- [40] Bamford RN, Roessler E, Burdine RD, Saplakoglu U, dela Cruz J, Splitt M, et al. Loss-of-function mutations in the EGF-CFC gene CFC1 are associated with human left-right laterality defects. *Nature genetics*. 2000;26(3):365-9.
- [41] Jacquemin E, Cresteil D, Raynaud N, Hadchouel M. CFC1 gene mutation and biliary atresia with polysplenia syndrome. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2002;34(3):326-7.
- [42] Davit-Spraul A, Baussan C, Hermeziu B, Bernard O, Jacquemin E. CFC1 gene involvement in biliary atresia with polysplenia syndrome. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2008;46(1):111-2.
- [43] Kohsaka T, Yuan ZR, Guo SX, Tagawa M, Nakamura A, Nakano M, et al. The significance of human jagged 1 mutations detected in severe cases of extrahepatic biliary atresia. *Hepatology*. 2002;36(4 Pt 1):904-12.
- [44] Clotman F, Lannoy VJ, Reber M, Cereghini S, Cassiman D, Jacquemin P, et al. The onecut transcription factor HNF6 is required for normal development of the biliary tract. *Development*. 2002;129(8):1819-28.
- [45] Campbell KM, Arya G, Ryckman FC, Alonso M, Tiao G, Balistreri WF, et al. High prevalence of alpha-1-antitrypsin heterozygosity in children with chronic liver disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2007;44(1):99-103.
- [46] Pickett LK, Briggs HC. Biliary obstruction secondary to hepatic vascular ligation in fetal sheep. *Journal of pediatric surgery*. 1969;4(1):95-101.
- [47] Sokol RJ, Mack C. Etiopathogenesis of biliary atresia. *Seminars in liver disease*. 2001;21(4):517-24.
- [48] Landing BH. Considerations of the pathogenesis of neonatal hepatitis, biliary atresia and choledochal cyst--the concept of infantile obstructive cholangiopathy. *Progress in pediatric surgery*. 1974;6:113-39.

- [49] Mohanty S, Shah I, Bhatnagar S. Evolving biliary atresia with cytomegalovirus. *Indian pediatrics*. 2011;48(8):644-6.
- [50] Domiati-Saad R, Dawson DB, Margraf LR, Finegold MJ, Weinberg AG, Rogers BB. Cytomegalovirus and human herpesvirus 6, but not human papillomavirus, are present in neonatal giant cell hepatitis and extrahepatic biliary atresia. *Pediatric and developmental pathology*. 2000;3(4):367-73.
- [51] Drut R, Drut RM, Gomez MA, Cueto Rua E, Lojo MM. Presence of human papillomavirus in extrahepatic biliary atresia. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 1998;27(5):530-5.
- [52] Drut R, Gomez MA, Drut RM, Cueto RE, Lojo M. [Human papillomavirus, neonatal giant cell hepatitis and biliary duct atresia]. *Acta gastroenterologica Latinoamericana*. 1998;28(1):27-31.
- [53] Fjaer RB, Bruu AL, Nordbo SA. Extrahepatic bile duct atresia and viral involvement. *Pediatric transplantation*. 2005;9(1):68-73.
- [54] Kahn E. Biliary atresia revisited. *Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society*. 2004;7(2):109-24.
- [55] Fischler B, Woxenius S, Nemeth A, Papadogiannakis N. Immunoglobulin deposits in liver tissue from infants with biliary atresia and the correlation to cytomegalovirus infection. *Journal of pediatric surgery*. 2005;40(3):541-6.
- [56] Soomro GB, Abbas Z, Hassan M, Luck N, Memon Y, Khan AW. Is there any association of extra hepatic biliary atresia with cytomegalovirus or other infections? *JPMA The Journal of the Pakistan Medical Association*. 2011;61(3):281-3.
- [57] Xu Y, Yu J, Zhang R, Yin Y, Ye J, Tan L, et al. The perinatal infection of cytomegalovirus is an important etiology for biliary atresia in China. *Clinical pediatrics*. 2012;51(2):109-13.
- [58] Fischler B, Ehrnst A, Forsgren M, Orvell C, Nemeth A. The viral association of neonatal cholestasis in Sweden: a possible link between

- cytomegalovirus infection and extrahepatic biliary atresia. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 1998;27(1):57-64.
- [59] De Tommaso AM, Andrade PD, Costa SC, Escanhoela CA, Hessel G. High frequency of human cytomegalovirus DNA in the liver of infants with extrahepatic neonatal cholestasis. *BMC infectious diseases*. 2005;5:108.
- [60] Jevon GP, Dimmick JE. Biliary atresia and cytomegalovirus infection: a DNA study. *Pediatric and developmental pathology*. 1999;2(1):11-4.
- [61] Bangaru B, Morecki R, Glaser JH, Gartner LM, Horwitz MS. Comparative studies of biliary atresia in the human newborn and reovirus-induced cholangitis in weanling mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1980;43(5):456-62.
- [62] Morecki R, Glaser JH, Cho S, Balistreri WF, Horwitz MS. Biliary atresia and reovirus type 3 infection. *The New England journal of medicine*. 1984;310(24):1610.
- [63] Glaser JH, Balistreri WF, Morecki R. Role of reovirus type 3 in persistent infantile cholestasis. *The Journal of pediatrics*. 1984;105(6):912-5.
- [64] Richardson SC, Bishop RF, Smith AL. Reovirus serotype 3 infection in infants with extrahepatic biliary atresia or neonatal hepatitis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 1994;9(3):264-8.
- [65] Tyler KL, Sokol RJ, Oberhaus SM, Le M, Karrer FM, Narkewicz MR, et al. Detection of reovirus RNA in hepatobiliary tissues from patients with extrahepatic biliary atresia and choledochal cysts. *Hepatology*. 1998;27(6):1475-82.
- [66] Steele MI, Marshall CM, Lloyd RE, Randolph VE. Reovirus 3 not detected by reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction analysis of preserved tissue from infants with cholestatic liver disease. *Hepatology*. 1995;21(3):697-702.
- [67] Saito T, Shinozaki K, Matsunaga T, Ogawa T, Etoh T, Muramatsu T, et al. Lack of evidence for reovirus infection in tissues from patients with biliary atresia and congenital dilatation of the bile duct. *Journal of hepatology*. 2004;40(2):203-11.

- [68] Morecki R, Glaser JH, Johnson AB, Kress Y. Detection of reovirus type 3 in the porta hepatis of an infant with extrahepatic biliary atresia: ultrastructural and immunocytochemical study. *Hepatology*. 1984;4(6):1137-42.
- [69] Rosenberg DP, Morecki R, Lollini LO, Glaser J, Cornelius CE. Extrahepatic biliary atresia in a rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Hepatology*. 1983;3(4):577-80.
- [70] Steele TA, Cox DC. Reovirus type 3 chemoimmunotherapy of murine lymphoma is abrogated by cyclosporine. *Cancer biotherapy*. 1995;10(4):307-15.
- [71] Papadimitriou JM. The biliary tract in acute murine reovirus 3 infection. Light and electron microscopic study. *The American journal of pathology*. 1968;52(3):595-611.
- [72] Szavay PO, Leonhardt J, Czech-Schmidt G, Petersen C. The role of reovirus type 3 infection in an established murine model for biliary atresia. *European journal of pediatric surgery*. 2002;12(4):248-50.
- [73] Riepenhoff-Talty M, Gouvea V, Evans MJ, Svensson L, Hoffenberg E, Sokol RJ, et al. Detection of group C rotavirus in infants with extrahepatic biliary atresia. *The Journal of infectious diseases*. 1996;174(1):8-15.
- [74] Harper P, Plant JW, Unger DB. Congenital biliary atresia and jaundice in lambs and calves. *Australian veterinary journal*. 1990;67(1):18-22.
- [75] Bill AH, Haas JE, Foster GL. Biliary Atresia: histopathologic observations and reflections upon its natural history. *Journal of pediatric surgery*. 1977;12(6):977-82.
- [76] Ohya T, Fujimoto T, Shimomura H, Miyano T. Degeneration of intrahepatic bile duct with lymphocyte infiltration into biliary epithelial cells in biliary atresia. *Journal of pediatric surgery*. 1995;30(4):515-8.
- [77] Schreiber RA, Kleinman RE. Genetics, immunology, and biliary atresia: an opening or a diversion? *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 1993;16(2):111-3.

- [78] Silveira TR, Salzano FM, Donaldson PT, Mieli-Vergani G, Howard ER, Mowat AP. Association between HLA and extrahepatic biliary atresia. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 1993;16(2):114-7.
- [79] Broome U, Nemeth A, Hultcrantz R, Scheynius A. Different expression of HLA-DR and ICAM-1 in livers from patients with biliary atresia and Byler's disease. *Journal of hepatology*. 1997;26(4):857-62.
- [80] Kobayashi H, Tamatani T, Tamura T, Kusafuka J, Yamataka A, Lane GJ, et al. Maternal microchimerism in biliary atresia. *Journal of pediatric surgery*. 2007;42(6):987-91; discussion 91.
- [81] Donaldson PT, Clare M, Constantini PK, Hadzic N, Mieli-Vergani G, Howard E, et al. HLA and cytokine gene polymorphisms in biliary atresia. *Liver*. 2002;22(3):213-9.
- [82] HH AK, El-Ayyouti M, Hawas S, Abdalla A, Al-Tonbary Y, Bassiouny M, et al. HLA in Egyptian children with biliary atresia. *The Journal of pediatrics*. 2002;141(3):432-3.
- [83] Davenport M, Gonde C, Redkar R, Koukoulis G, Tredger M, Mieli-Vergani G, et al. Immunohistochemistry of the liver and biliary tree in extrahepatic biliary atresia. *Journal of pediatric surgery*. 2001;36(7):1017-25.
- [84] Bezerra JA, Tiao G, Ryckman FC, Alonso M, Sabla GE, Shneider B, et al. Genetic induction of proinflammatory immunity in children with biliary atresia. *Lancet*. 2002;360(9346):1653-9.
- [85] Lu BR, Brindley SM, Tucker RM, Lambert CL, Mack CL. alpha-enolase autoantibodies cross-reactive to viral proteins in a mouse model of biliary atresia. *Gastroenterology*. 2010;139(5):1753-61.
- [86] Bernal W, Moloney M, Underhill J, Donaldson PT. Association of tumor necrosis factor polymorphism with primary sclerosing cholangitis. *Journal of hepatology*. 1999;30(2):237-41.
- [87] Mitchell SA, Grove J, Spurkland A, Boberg KM, Fleming KA, Day CP, et al. Association of the tumour necrosis factor alpha -308 but not the

- interleukin 10 -627 promoter polymorphism with genetic susceptibility to primary sclerosing cholangitis. *Gut*. 2001;49(2):288-94.
- [88] Donaldson P, Agarwal K, Craggs A, Craig W, James O, Jones D. HLA and interleukin 1 gene polymorphisms in primary biliary cirrhosis: associations with disease progression and disease susceptibility. *Gut*. 2001;48(3):397-402.
- [89] Narayanaswamy B, Gonde C, Tredger JM, Hussain M, Vergani D, Davenport M. Serial circulating markers of inflammation in biliary atresia-- evolution of the post-operative inflammatory process. *Hepatology*. 2007;46(1):180-7.
- [90] Dillon P, Belchis D, Tracy T, Cillely R, Hafer L, Krummel T. Increased expression of intercellular adhesion molecules in biliary atresia. *The American journal of pathology*. 1994;145(2):263-7.
- [91] Davenport M, Gonde C, Narayanaswamy B, Mieli-Vergani G, Tredger JM. Soluble adhesion molecule profiling in preoperative infants with biliary atresia. *Journal of pediatric surgery*. 2005;40(9):1464-9.
- [92] Anderson CD, Turmelle YP, Lowell JA, Nadler M, Millis M, Anand R, et al. The effect of recipient-specific surgical issues on outcome of liver transplantation in biliary atresia. *American journal of transplantation*. 2008;8(6):1197-204.
- [93] Bassett MD, Murray KF. Biliary atresia: recent progress. *Journal of clinical gastroenterology*. 2008;42(6):720-9.
- [94] Hsiao CH, Chang MH, Chen HL, Lee HC, Wu TC, Lin CC, et al. Universal screening for biliary atresia using an infant stool color card in Taiwan. *Hepatology*. 2008;47(4):1233-40.
- [95] Cauduro SM. [Extrahepatic biliary atresia: diagnostic methods]. *Jornal de pediatria*. 2003;79(2):107-14.
- [96] Otte JB, de Ville de Goyet J, Reding R, Hausleithner V, Sokal E, Chardot C, et al. Sequential treatment of biliary atresia with Kasai portoenterostomy and liver transplantation: a review. *Hepatology*. 1994;20(1 Pt 2):41s-8s.

- [97] Balistreri WF, Heubi JE, Suchy FJ. Immaturity of the enterohepatic circulation in early life: factors predisposing to "physiologic" maldigestion and cholestasis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 1983;2(2):346-54.
- [98] Fisher L, Fisher A. Vitamin D and parathyroid hormone in outpatients with noncholestatic chronic liver disease. *Clinical gastroenterology and hepatology*. 2007;5(4):513-20.
- [99] Holt RI, Broide E, Buchanan CR, Miell JP, Baker AJ, Mowat AP, et al. Orthotopic liver transplantation reverses the adverse nutritional changes of end-stage liver disease in children. *The American journal of clinical nutrition*. 1997;65(2):534-42.
- [100] Janes CH, Dickson ER, Okazaki R, Bonde S, McDonagh AF, Riggs BL. Role of hyperbilirubinemia in the impairment of osteoblast proliferation associated with cholestatic jaundice. *The Journal of clinical investigation*. 1995;95(6):2581-6.
- [101] Chongsrisawat V, Ruttanamongkol P, Chaiwatanarat T, Chandrakamol B, Poovorawan Y. Bone density and 25-hydroxyvitamin D level in extrahepatic biliary atresia. *Pediatric surgery international*. 2001;17(8):604-8.
- [102] Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;79(3):362-71.
- [103] Mosekilde L. Vitamin D and the elderly. *Clinical endocrinology*. 2005;62(3):265-81.
- [104] Mytton J, Frater AP, Oakley G, Murphy E, Barber MJ, Jahfar S. Vitamin D deficiency in multicultural primary care: a case series of 299 patients. *The British journal of general practice*. 2007;57(541):669-70.
- [105] DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;80(6 Suppl):1689s-96s.

- [106] Holick MF. VITAMIN D STATUS: MEASUREMENT, INTERPRETATION AND CLINICAL APPLICATION. *Annals of epidemiology*. 2009;19(2):73-8.
- [107] Heaney RP, Dowell MS, Hale CA, Bendich A. Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *Journal of the American College of Nutrition*. 2003;22(2):142-6.
- [108] Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *The American journal of clinical nutrition*. 2006;84(1):18-28.
- [109] Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, Arnaud S, Galan P, Hercberg S, et al. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporosis international*. 1997;7(5):439-43.
- [110] Holick MF, Siris ES, Binkley N, Beard MK, Khan A, Katzer JT, et al. Prevalence of Vitamin D inadequacy among postmenopausal North American women receiving osteoporosis therapy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(6):3215-24.
- [111] Thomas MK, Lloyd-Jones DM, Thadhani RI, Shaw AC, Deraska DJ, Kitch BT, et al. Hypovitaminosis D in medical inpatients. *The New England journal of medicine*. 1998;338(12):777-83.
- [112] Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *American journal of physiology Renal physiology*. 2005;289(1):F8-28.
- [113] Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(8):2062-72.
- [114] Holick MF. Vitamin D deficiency. *The New England journal of medicine*. 2007;357(3):266-81.
- [115] Kragballe K, Barnes L, Hamberg KJ, Hutchinson P, Murphy F, Moller S, et al. Calcipotriol cream with or without concurrent topical corticosteroid in psoriasis: tolerability and efficacy. *The British journal of dermatology*. 1998;139(4):649-54.
- [116] Mathieu C. Vitamin D and the immune system: Getting it right. *IBMS BoneKEy*. 2011;8(4):178-86.

- [117] Hewison M. Vitamin D and immune function: an overview. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2012;71(1):50-61.
- [118] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(2):209-18.
- [119] Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *Journal of hepatology*. 2003;38 Suppl 1:S38-53.
- [120] Pinzani M. Liver fibrosis. *Springer seminars in immunopathology*. 1999;21(4):475-90.
- [121] Gabele E, Brenner DA, Rippe RA. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Frontiers in bioscience*. 2003;8:d69-77.
- [122] Lemoine S, Cadoret A, El Mourabit H, Thabut D, Housset C. Origins and functions of liver myofibroblasts. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1832(7):948-54.
- [123] Marra F. Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. *Journal of hepatology*. 1999;31(6):1120-30.
- [124] Milani S, Herbst H, Schuppan D, Kim KY, Riecken EO, Stein H. Procollagen expression by nonparenchymal rat liver cells in experimental biliary fibrosis. *Gastroenterology*. 1990;98(1):175-84.
- [125] Lindquist JN, Marzluff WF, Stefanovic B. Fibrogenesis. III. Posttranscriptional regulation of type I collagen. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2000;279(3):G471-6.
- [126] Kisseleva T, Brenner DA. Inactivation of myofibroblasts during regression of liver fibrosis. *Cell Cycle*. 2013;12(3):381-2.
- [127] Ding N, Yu RT, Subramaniam N, Sherman MH, Wilson C, Rao R, et al. A vitamin D receptor/SMAD genomic circuit gates hepatic fibrotic response. *Cell*. 2013;153(3):601-13.
- [128] Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? *Gut*. 2000;46(4):443-6.
- [129] Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2000;279(2):G245-9.

- [130] Meng X-m, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nature Reviews Nephrology*. 2016;12(6):325-38.
- [131] Massagué J. TGF β signalling in context. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13(10):616-30.
- [132] Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF-beta and the TGF-beta Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2016;8(5).
- [133] Pattanaik D, Brown M, Postlethwaite BC, Postlethwaite AE. Pathogenesis of systemic sclerosis. *Frontiers in immunology*. 2015;6.
- [134] Tao Q, Wang B, Zheng Y, Jiang X, Pan Z, Ren J. Vitamin D prevents the intestinal fibrosis via induction of vitamin D receptor and inhibition of transforming growth factor-beta1/Smad3 pathway. *Digestive diseases and sciences*. 2015;60(4):868-75.
- [135] Ding N, Ruth TY, Subramaniam N, Sherman MH, Wilson C, Rao R, et al. A vitamin D receptor/SMAD genomic circuit gates hepatic fibrotic response. *Cell*. 2013;153(3):601-13.
- [136] Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. *Physiological reviews*. 2016;96(1):365-408.
- [137] Long MD, Sucheston-Campbell LE, Campbell MJ. Vitamin D Receptor and RXR in the Post-Genomic Era. *Journal of cellular physiology*. 2015;230(4):758-66.
- [138] Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.
- [139] Bhattacharyya S, Ghosh AK, Pannu J, Mori Y, Takagawa S, Chen G, et al. Fibroblast expression of the coactivator p300 governs the intensity of profibrotic response to transforming growth factor β . *Arthritis & Rheumatology*. 2005;52(4):1248-58.

- [140] Ghosh AK, Varga J. The transcriptional coactivator and acetyltransferase p300 in fibroblast biology and fibrosis. *Journal of cellular physiology*. 2007;213(3):663-71.
- [141] Abramovitch S, Dahan-Bachar L, Sharvit E, Weisman Y, Ben Tov A, Brazowski E, et al. Vitamin D inhibits proliferation and profibrotic marker expression in hepatic stellate cells and decreases thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Gut*. 2011;60(12):1728-37.
- [142] Shany S, Sigal-Batikoff I, Lamprecht S. Vitamin D and Myofibroblasts in Fibrosis and Cancer: At Cross-purposes with TGF-beta/SMAD Signaling. *Anticancer research*. 2016;36(12):6225-34.
- [143] Nunes D, Fleming C, Offner G, Craven D, Fix O, Heeren T, et al. Noninvasive markers of liver fibrosis are highly predictive of liver-related death in a cohort of HCV-infected individuals with and without HIV infection. *The American journal of gastroenterology*. 2010;105(6):1346-53.
- [144] Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, et al. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound in medicine & biology*. 2003;29(12):1705-13.
- [145] Roulot D, Czernichow S, Le Clesiau H, Costes JL, Vergnaud AC, Beaugrand M. Liver stiffness values in apparently healthy subjects: influence of gender and metabolic syndrome. *Journal of hepatology*. 2008;48(4):606-13.
- [146] Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2005;128(2):343-50.
- [147] de Ledinghen V, Le Bail B, Rebouissoux L, Fournier C, Foucher J, Miette V, et al. Liver stiffness measurement in children using FibroScan: feasibility study and comparison with Fibrotest, aspartate transaminase to platelets ratio index, and liver biopsy. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2007;45(4):443-50.

- [148] Breton E, Bridoux-Henno L, Guyader D, Danielou H, Jouan H, Beuchee A, et al. [Value of transient elastography in noninvasive assessment in children's hepatic fibrosis]. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie*. 2009;16(7):1005-10.
- [149] Kwak HS, Chung HJ, Cho DH, Park MH, Ku ES, Park EJ, et al. Efficacy of the measurement of 25-hydroxyvitamin D2 and D3 levels by using PerkinElmer liquid chromatography-tandem mass spectrometry vitamin D kit compared with DiaSorin radioimmunoassay kit and Elecsys vitamin D total assay. *Annals of laboratory medicine*. 2015;35(2):263-5.
- [150] Arneson WL, Arneson DL. Current Methods for Routine Clinical Laboratory Testing of Vitamin D Levels. *Laboratory Medicine*. 2013;44(1):e38-e42.
- [151] Horowitz G, Roberts WL. CAP 2009 letter. Measurements of 25-OH vitamin D concentrations. http://www.cap.org/apps/docs/committees/chemistry/measurements_25_OH_vitamin_d.pdf. Accessed on June 19, 2017.
- [152] Wallace AM, Gibson S, de la Hunty A, Lamberg-Allardt C, Ashwell M. Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: current procedures, performance characteristics and limitations. *Steroids*. 2010;75(7):477-88.
- [153] Misra M, Pacaud D, Petryk A, Collett-Solberg PF, Kappy M. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. *Pediatrics*. 2008;122(2):398-417.
- [154] Lin L, Chang MH, Tsai WY, Tsai KS, Li YW. Bone fractures in children with chronic cholestasis. *Zhonghua Minguo xiao er ke yi xue hui za zhi*. 1997;38(5):360-4.
- [155] Toki A, Todani T, Watanabe Y, Sato Y, Ogura K, Yoshikawa M, et al. Bone mineral analysis in patients with biliary atresia after successful Kasai procedure. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 1997;181(1):213-6.
- [156] Luo YQ, Wu XX, Ling ZX, Cheng YW, Yuan L, Xiang C. Association between serum vitamin D and severity of liver fibrosis in chronic hepatitis C

- patients: a systematic meta-analysis. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2014;15(10):900-6.
- [157] Petta S, Camma C, Scazzone C, Tripodo C, Di Marco V, Bono A, et al. Low vitamin D serum level is related to severe fibrosis and low responsiveness to interferon-based therapy in genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2010;51(4):1158-67.
- [158] Farnik H, Bojunga J, Berger A, Allwinn R, Waidmann O, Kronenberger B, et al. Low vitamin D serum concentration is associated with high levels of hepatitis B virus replication in chronically infected patients. *Hepatology*. 2013;58(4):1270-6.
- [159] Kwok RM, Torres DM, Harrison SA. Vitamin D and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): is it more than just an association? *Hepatology*. 2013;58(3):1166-74.
- [160] Trepo E, Ouziel R, Pradat P, Momozawa Y, Quertinmont E, Gervy C, et al. Marked 25-hydroxyvitamin D deficiency is associated with poor prognosis in patients with alcoholic liver disease. *Journal of hepatology*. 2013;59(2):344-50.
- [161] Agmon-Levin N, Kopilov R, Selmi C, Nussinovitch U, Sanchez-Castanon M, Lopez-Hoyos M, et al. Vitamin D in primary biliary cirrhosis, a plausible marker of advanced disease. *Immunologic research*. 2015;61(1-2):141-6.
- [162] Mohammadi B, Najafi M, Farahmand F, Motamed F, Ghajarzadeh M, Mohammadi J, et al. Prevalence of vitamin D deficiency and rickets in children with cholestasis in Iran. *Acta medica Iranica*. 2012;50(7):482-5.
- [163] Ruiz-Gaspa S, Dubreuil M, Guanabens N, Combalia A, Peris P, Monegal A, et al. Ursodeoxycholic acid decreases bilirubin-induced osteoblast apoptosis. *European journal of clinical investigation*. 2014;44(12):1206-14.
- [164] Teisseyre M, Pawlowska J, Kryskiewicz E, Karczmarewicz E, Czubkowski P, Dadalski M, et al. Bone mineral metabolism in children with biliary atresia after living related liver transplantation. Evaluation of selected parameters. *Annals of transplantation*. 2007;12(2):19-25.

- [165] Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(9):685-98.
- [166] Peelen E, Knippenberg S, Muris AH, Thewissen M, Smolders J, Tervaert JW, et al. Effects of vitamin D on the peripheral adaptive immune system: a review. *Autoimmunity reviews*. 2011;10(12):733-43.
- [167] Timms PM, Mannan N, Hitman GA, Noonan K, Mills PG, Syndercombe-Court D, et al. Circulating MMP9, vitamin D and variation in the TIMP-1 response with VDR genotype: mechanisms for inflammatory damage in chronic disorders? *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2002;95(12):787-96.
- [168] Willheim M, Thien R, Schratlbauer K, Bajna E, Holub M, Gruber R, et al. Regulatory effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on the cytokine production of human peripheral blood lymphocytes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999;84(10):3739-44.
- [169] Firrincieli D, Zuniga S, Rey C, Wendum D, Lasnier E, Rainteau D, et al. Vitamin D nuclear receptor deficiency promotes cholestatic liver injury by disruption of biliary epithelial cell junctions in mice. *Hepatology*. 2013;58(4):1401-12.
- [170] Ogura M, Nishida S, Ishizawa M, Sakurai K, Shimizu M, Matsuo S, et al. Vitamin D3 modulates the expression of bile acid regulatory genes and represses inflammation in bile duct-ligated mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2009;328(2):564-70.
- [171] Trivedi P, Dhawan A, Risteli J, Risteli L, Mirza M, Cheeseman P, et al. Prognostic value of serum hyaluronic acid and type I and III procollagen propeptides in extrahepatic biliary atresia. *Pediatric research*. 1995;38(4):568-73.



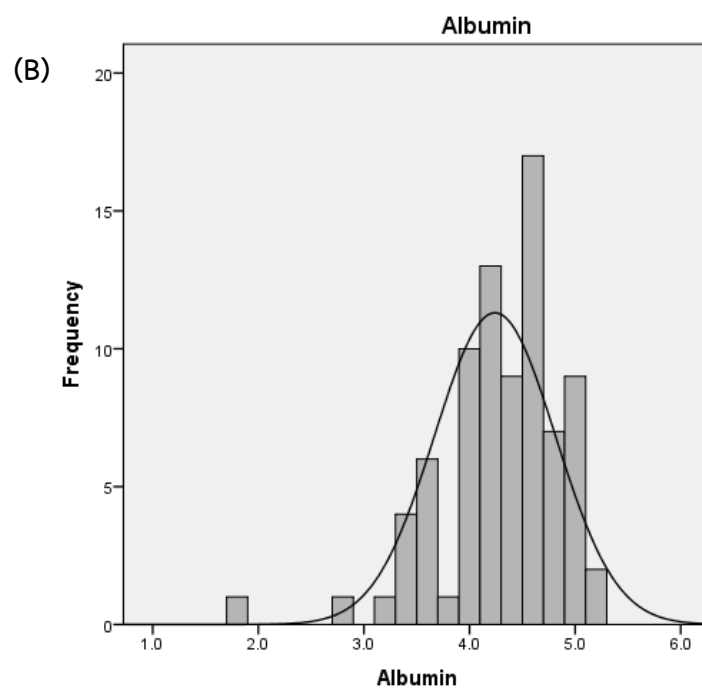
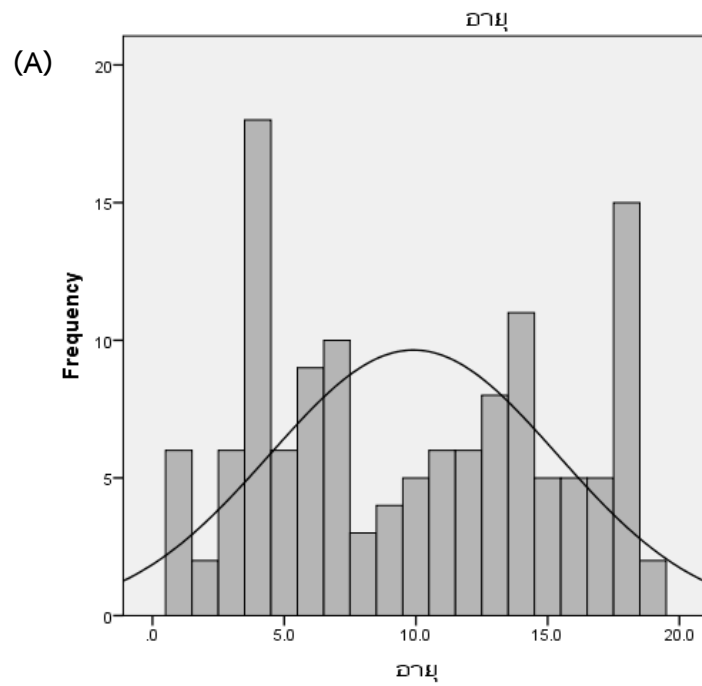
ภาคผนวก

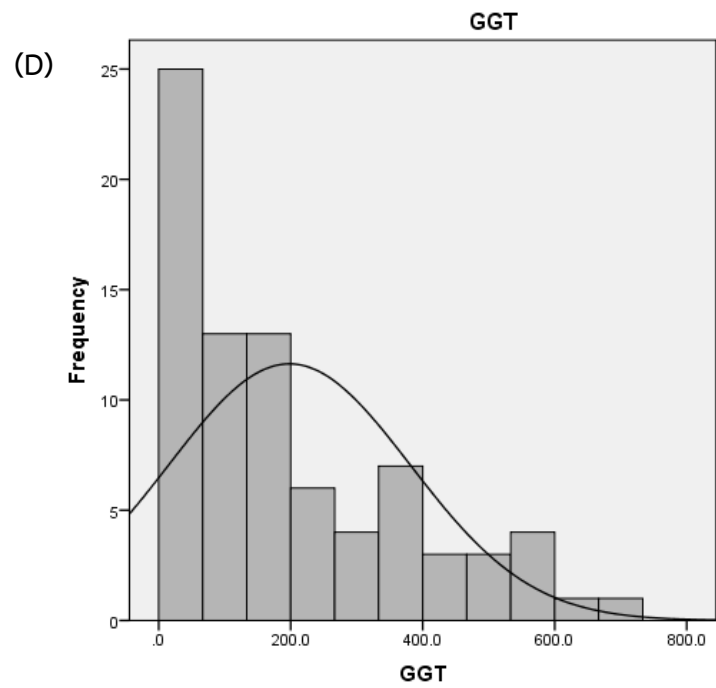
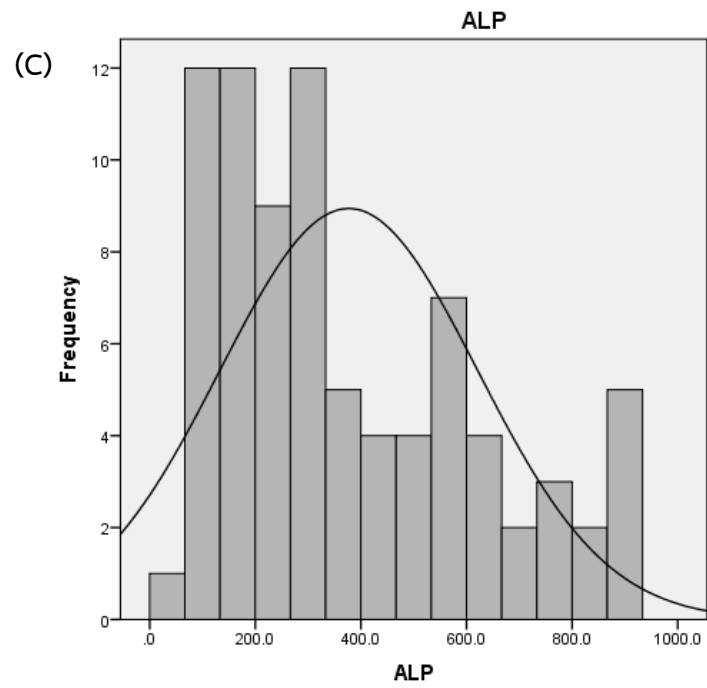
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

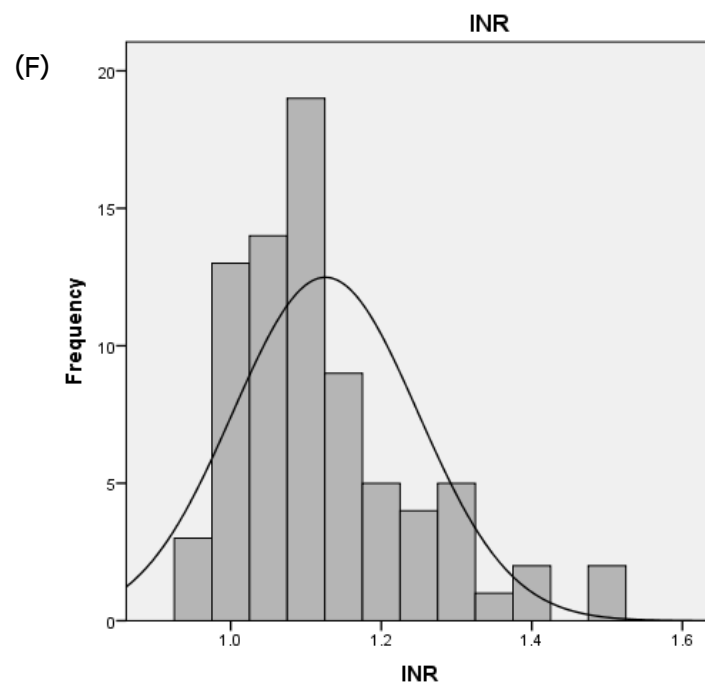
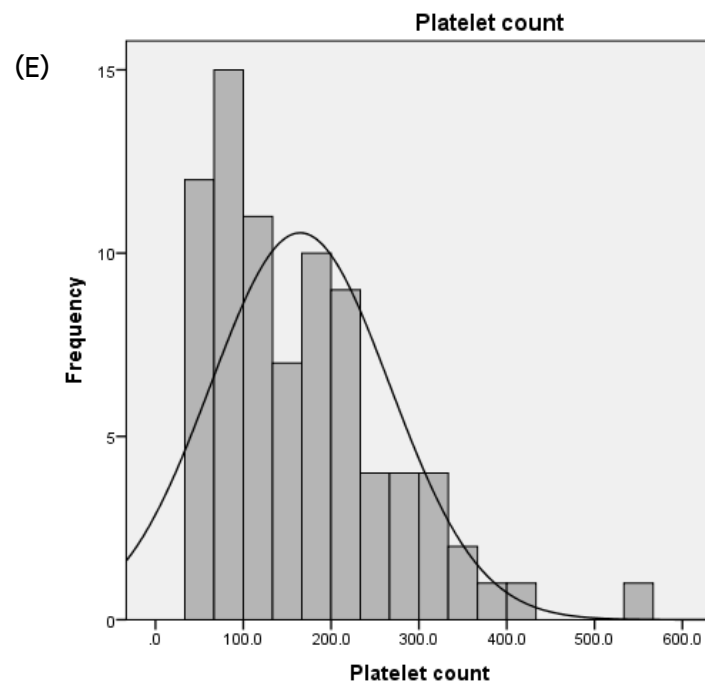
ภาคผนวก ก

การทดสอบการกระจายข้อมูล (Normality test)

1. ข้อมูลที่มีการกระจายแบบปกติ (Normal distribution)

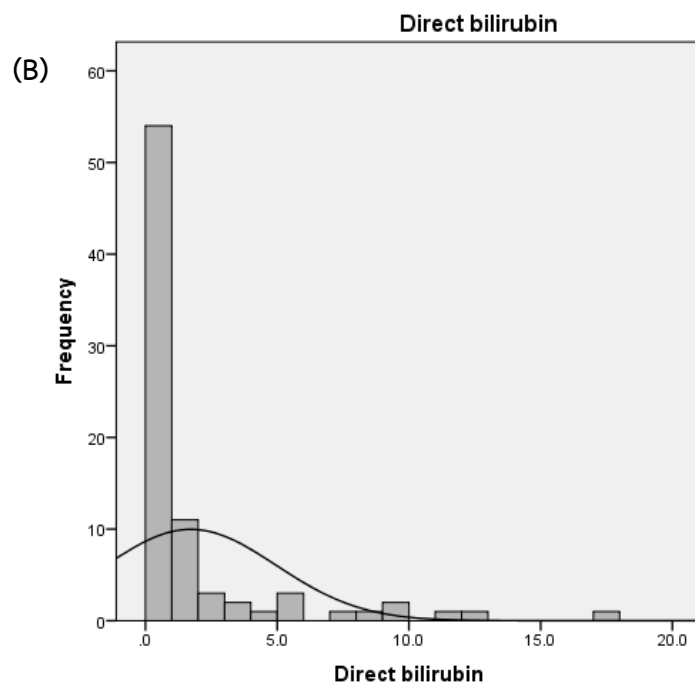
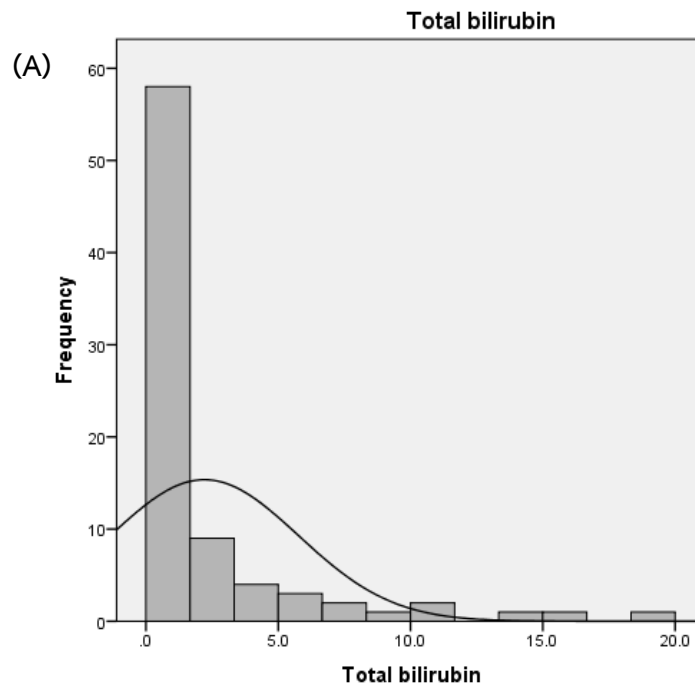


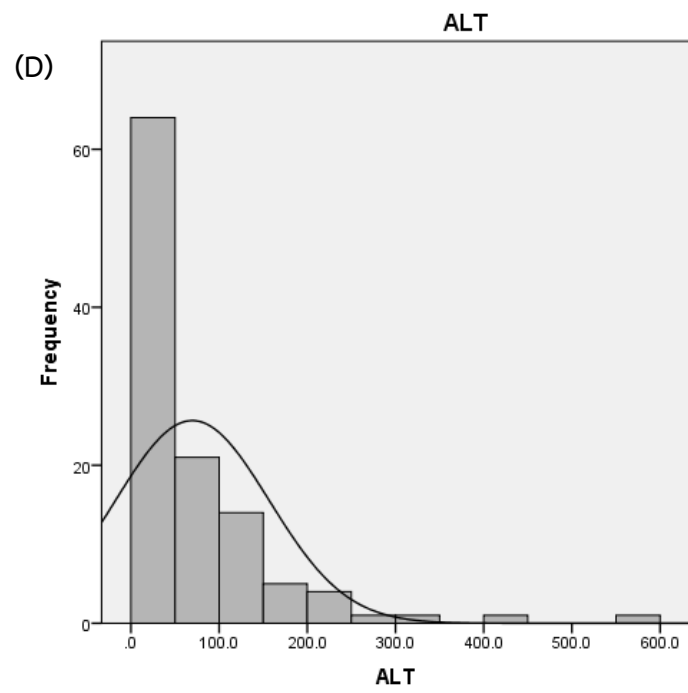
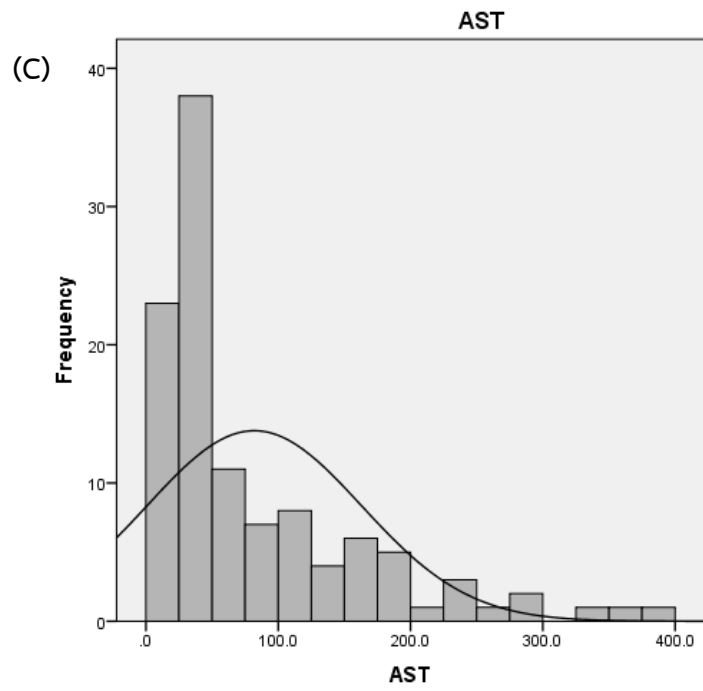


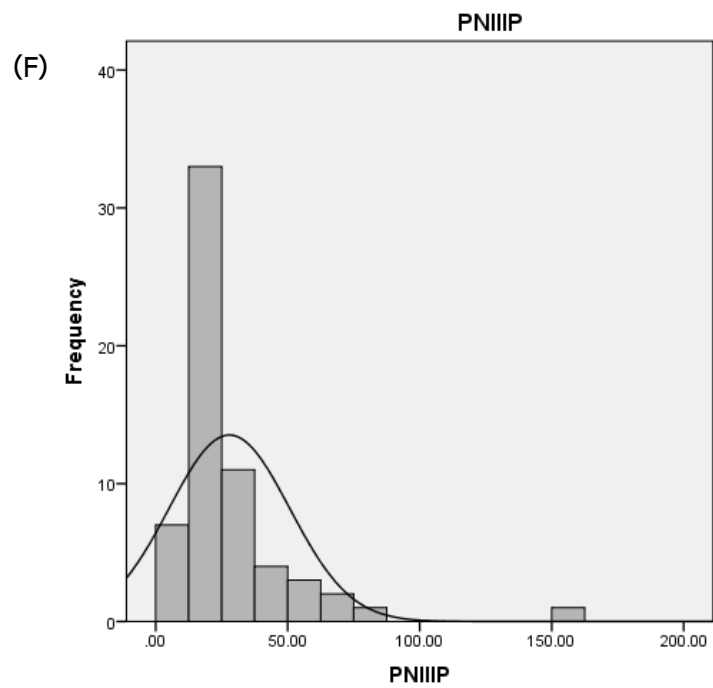
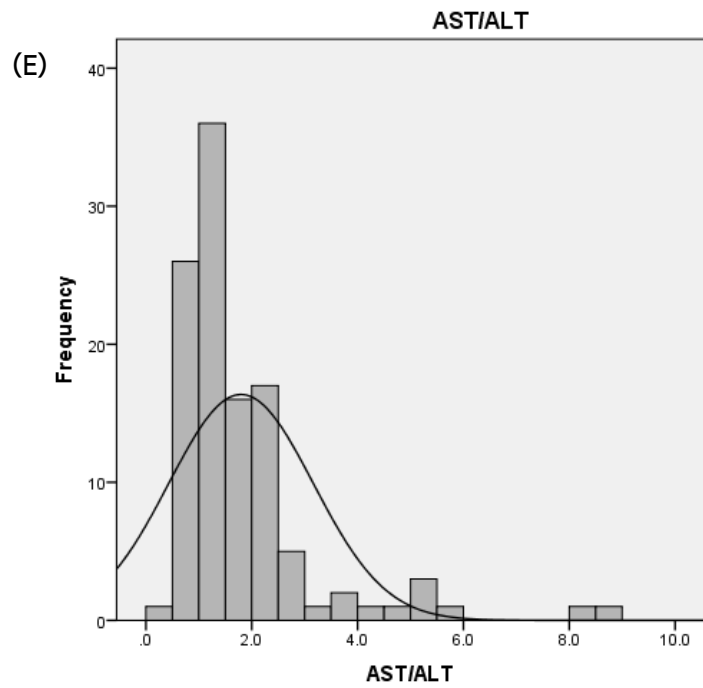


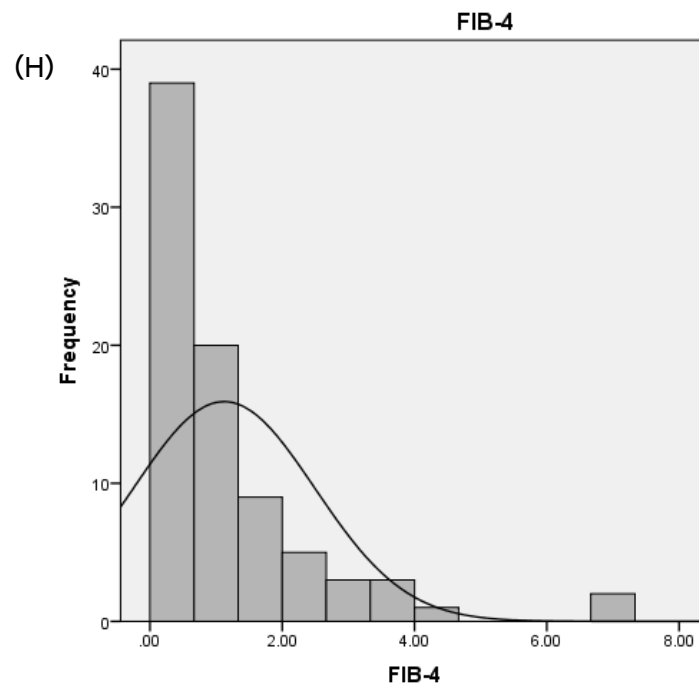
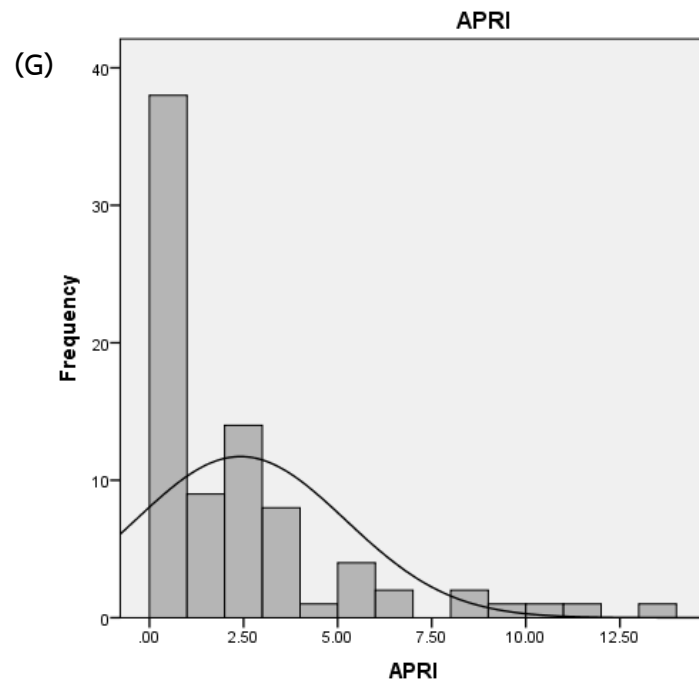
รูปที่ 19 (A-F) แสดงข้อมูลที่มีการกระจายแบบปกติ (Normal distribution)

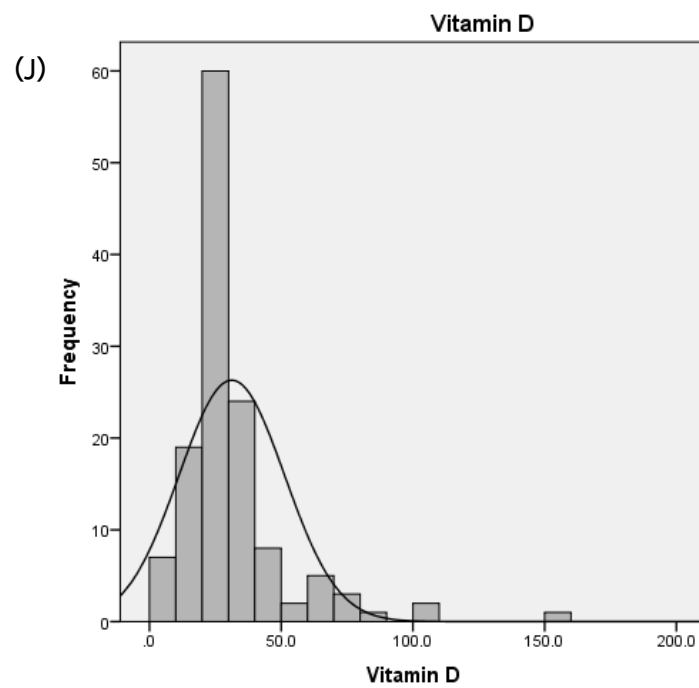
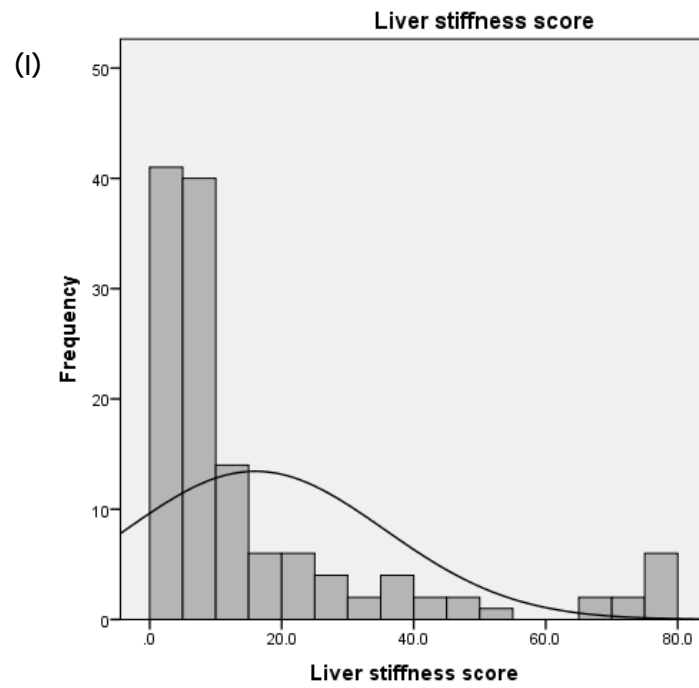
2. ข้อมูลที่มีการกระจายแบบไม่ปกติ (Non-normal distribution)

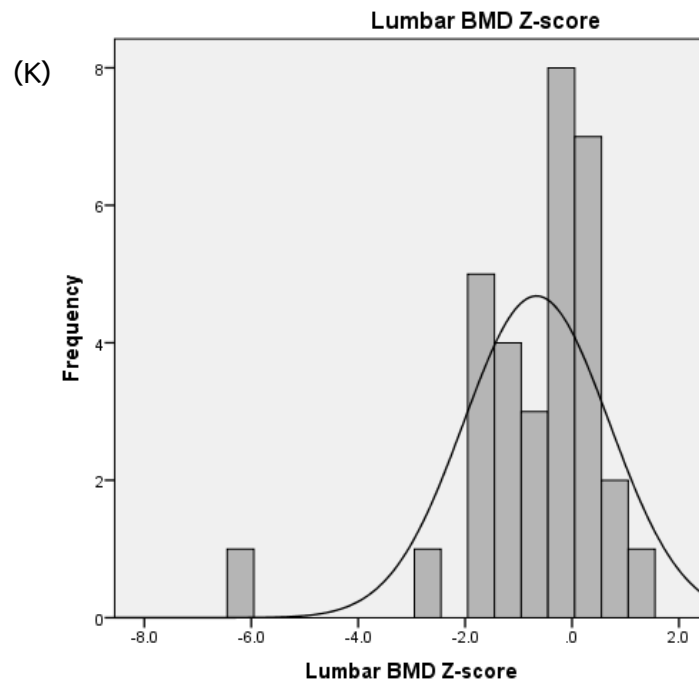










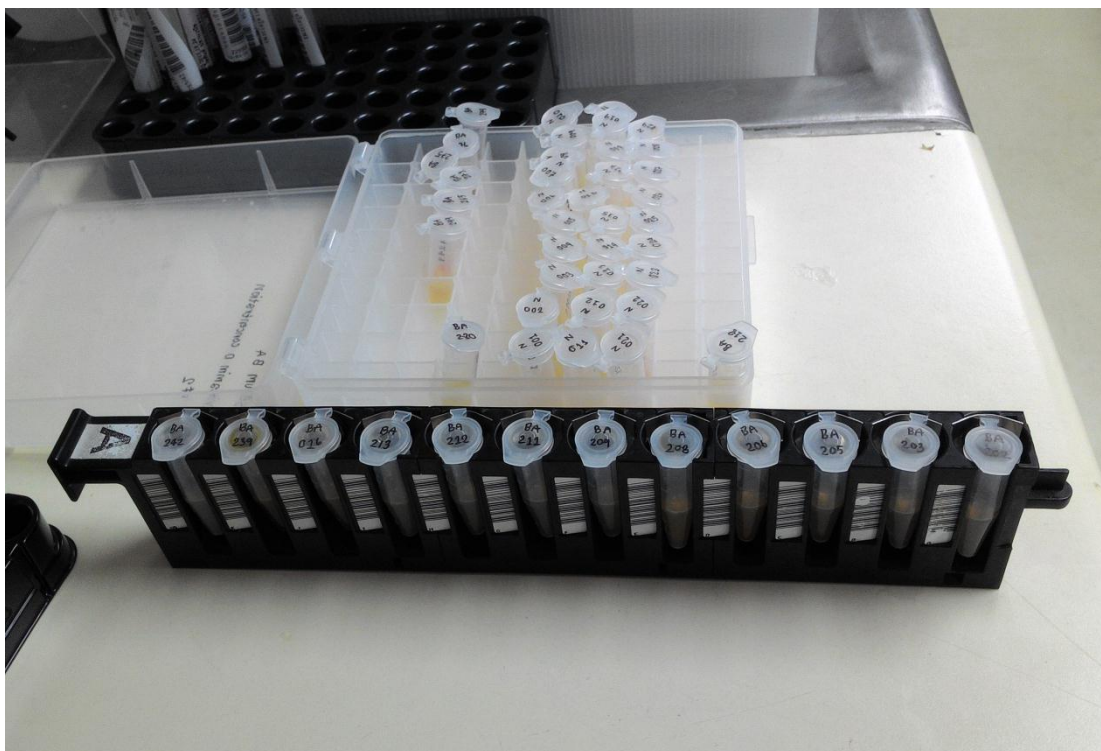


รูปที่ 20 (A-K) แสดงข้อมูลที่มีการกระจายแบบไม่ปกติ (Non-normal distribution)
ด้วยโปรแกรม SPSS

ภาคผนวก ข
เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าวิตามินดีในซีรัม



รูปที่ 21 แสดงเครื่องมือ และเครื่องแสดงผล สำหรับการตรวจวัดค่าระดับ 25-hydroxyvitamin D โดยใช้หลักการ chemiluminescence immunoassay (LIAISON, Diasorin Inc.)



รูปที่ 22 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการตรวจวัดค่าระดับ 25-hydroxyvitamin D



รูปที่ 23 แสดงการทำงานของเครื่องมือในการตรวจวัดค่าระดับ 25-hydroxyvitamin D

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวกฤตภาค หอมจันทร์

(ภาษาอังกฤษ) Miss Krittapak Homchan

เกิดวันที่ 19 มิถุนายน พ.ศ. 2532

ที่อยู่ปัจจุบัน 62/7 หมู่ 11 ตำบลปากแพรก อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี 71000

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) เกียรตินิยมอันดับ 1 (เหรียญทอง)
สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2550-2554

ระดับปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) หลักสูตรวิทยาศาสตรการแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2556-ปัจจุบัน

ผลงาน

วิจัยร่วมในผลงานวิจัย หัวข้อเรื่อง: Lack of Associations between TNF- α
Polymorphisms and Cervical Cancer in Thai Women ตีพิมพ์ในวารสาร Asian Pacific
Journal of Cancer prevention ปี ค.ศ. 2016

ผลงานวิจัย หัวข้อเรื่อง: Low bone mineral density and the severity of
cholestasis in biliary atresia ตีพิมพ์ในวารสาร World Journal of Hepatology ปี ค.ศ.
2017