

รายงานการวิจัย

เรื่อง

ปัจจัยของอายุกับรูปแบบของ Acetylcholinesterase activity ใน
ชิ้นเนื้อที่คูดจากลำไส้ส่วน rectum ของเด็กที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค Hirschsprung
(Age and Pattern of Acetylcholinesterase activity in suction rectal
biopsy from children with Hirschsprung's disease)

ทพ.วิจัรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์

ประจำปี 2534 ครั้งที่ 2

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้วิจัย

วิไล ชื่นธเนศ

สุทธิพร จิตต์มิตรภาพ

วีระ กสวนติกุล

เมษายน 2536



๕๐๕



กิ่ง
 ณ
 เลขที่ ๑๕๔๙๖ ๒๕๓๖
 เลขทะเบียน ๔๗๗๑๕-๒๕๓๖-๑
 วันที่โอน ๒๗ ก.ค. ๓๖

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Project title Age and Pattern of Acetylcholinesterase activity
 in suction rectal biopsy from children with
 Hirschsprung's disease

Name of the Investigators

Vilai Chentanez

Sootthiporn Chittmittrapap

Veera Kasantikul



Year 1993

Abstract

The reliable Acetylcholinesterase (AChE) stained method was used to find the pattern of AChE activity in rectal suction biopsies of newborn to 3 year old children with Hirschsprung's disease (HD). They were divided into 3 age groups : newborn to 1 month, from 1 month to 6 months, and from 6 months to 3 years. The patient collection had occurred through the year of 1992. From this research, in less than 1 month patients, we found only thick nerve trunks in submucosa. From 1 month to 6 month patients, the AChE activity increased in all layers. Fine or coarse nerve fibers were found in lamina propria, muscularis mucosae, and thick nerve trunk in submucosa. In the third group, more coarse nerve fibers were found in all layers. But in 2 cases, only thick nerve trunks in submucosa were seen. We conclude that, there was no unique pattern of AChE activity in patients older than 1 month, but 90.5% (19 from 21 cases) thick nerve trunk occurred in submucosal layer.

ชื่อโครงการวิจัย บัญชีของอายุกับรูปแบบของ Acetylcholinesterase activity
ในชั้นเนื้อที่คูดจากลำไส้ส่วน rectum ของเด็กที่ได้รับการวินิจฉัยว่า
เป็นโรค Hirschsprungd

ชื่อผู้วิจัย วิไล ชินธเนศ
 สุทธิพร จิตต์มิตรภาพ
 วีระ กสานติกุล

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ เมษายน 2536

บทคัดย่อ

ได้ทำการวิจัยเพื่อหารูปแบบของ Acetylcholinesterase (AChE) activity ในชั้นเนื้อลำไส้ใหญ่ของเด็กที่เป็นโรค Hirschsprung (HD) ที่มีอายุตั้งแต่แรกเกิดจนถึง 3 ปี โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มช่วงอายุ คือ ตั้งแต่แรกเกิดจนถึง 1 เดือน 1 เดือนจนถึง 6 เดือน และ 6 เดือนจนถึง 3 ปี โดยมีระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง 1 ปี คือ ตั้งแต่มกราคม 2535 ถึง ธันวาคม 2535 จากผลการวิจัยพบว่า ในกลุ่มที่มีอายุน้อยกว่า 1 เดือน พบการเพิ่มขึ้นของ AChE activity เพียงชั้นเดียว โดยจะพบ thick nerve trunk ในชั้น submucosa ในกลุ่มที่มีอายุตั้งแต่ 1 เดือนจนถึง 6 เดือน พบการเพิ่มขึ้นของ AChE activity โดยจะพบเป็น fine or coarse nerve fibers ในชั้น lamina propria muscularis mucosae และ thick nerve trunk ในชั้น submucosa และในกลุ่มที่มีอายุตั้งแต่ 6 เดือน จนถึง 3 ปี พบว่ามี AChE activity เพิ่มขึ้นมาก โดยจะพบ coarse nerve fibers ตลอดชั้น lamina propria muscularis mucosae และ thick nerve trunk ในชั้น submucosa แต่มี 2 รายที่พบเฉพาะ thick nerve trunk ในชั้น submucosa จากผลดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่ารูปแบบของ AChE activity ในผู้ป่วย HD ที่มีอายุมากกว่า 1 เดือน มีรูปแบบที่ไม่แน่นอน แต่อย่างไรก็ตาม ผู้ป่วย 19 รายจากผู้ป่วยทั้งหมด 21 ราย (คิดเป็น 90.5%) จะพบ thick nerve trunk ในชั้น submucosa

กติกกรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง อรศรี รมชะนั้นันท์ หัวหน้าภาควิชากายวิภาคศาสตร์ที่อนุญาตให้ใช้สถานที่ และให้ความสนับสนุนแก่งานวิจัยนี้มาตลอด หัวหน้าภาควิชาพยาธิวิทยาและหัวหน้าภาควิชานิติเวชที่อนุญาตให้ใช้เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Cryostat) ขอขอบคุณ คุณมังกร ฉางทรัพย์ และ คุณพูลลาภ ชีพสุนทร นิสิตปริญญาโท-วิทยาศาสตรจารย์การแพทย์ที่ให้ความช่วยเหลือทางด้านการตัดชิ้นเนื้อและย้อม คุณสุนันท์ ทองมาก ช่วยพิมพ์ต้นฉบับ และฝ่ายวิจัยคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนให้เงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

จากงานวิจัยเรื่องการตรวจวินิจฉัยโรค Hirschsprung (HD) โดยการตรวจหา acetylcholinesterase activity⁽¹⁾ ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์ไปแล้วนั้น พบว่า มีผู้ป่วยทารกแรกคลอดบางรายซึ่งจากการวินิจฉัยโดยอาการ และการทำ Barium enema บ่งบอกว่าเป็น Hirschsprung's disease แต่ผล acetylcholinesterase activity ให้ผลลบ แต่เมื่อได้ติดตามคนไข้ต่อไป และทำ biopsy ใหม่ พบว่า ให้ผลบวก เมื่อเด็กโตขึ้น นอกจากนี้ในบางราย acetylcholinesterase (AChE) ให้ผลบวก ทั้งชั้น lamina propria, muscularis mucosae และ submucosa แต่ในบางรายให้ผลบวก เฉพาะใน muscularis mucosa และ submucosa ซึ่งมีผู้เสนอให้เรียกเป็น Type A และ Type B ตามลำดับ⁽²⁾ ในทารกแรกเกิดมักจะเป็นแบบ Type B จากเหตุผลดังกล่าว ทำให้คณะผู้วิจัยต้องการจะศึกษาต่อไปว่ารูปแบบของ acetylcholinesterase activity ในคนไข้ที่ให้การวินิจฉัยว่าเป็นโรค Hirschsprung จะเปลี่ยนแปลงไปอย่างไรตั้งแต่แรก เกิดจนถึงอายุ 3 ขวบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วง 3 สัปดาห์แรก ทั้งนี้เพื่อให้ได้ผลถูกต้อง แม่นยำและได้ประโยชน์มากที่สุด

Hirsig และพวก⁽³⁾ ได้รายงานว่ AChE positive fibers จะเริ่มงอกเข้ามาในชั้น lamina propria เมื่อทารกที่เป็นโรค Hirschsprung อายุได้ 2-3 สัปดาห์ ต่อมา Goto และพวก⁽⁴⁾ ก็ได้รายงานว่ การไม่พบ AChE ในชั้น lamina propria ไม่สามารถ exclude โรค Hirschsprung ในทารกแรกคลอด การวินิจฉัยโดยวิธีนี้ควรจะทำในทารกที่มีอายุตั้งแต่ 3 สัปดาห์ขึ้นไป และชั้นเนื้อที่ตัดออกมาควรจะมีทั้งชั้น muscularis mucosa และ submucosa ด้วย De Brito และ Maksoud⁽⁴⁾ ก็ได้พบว่มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของ AChE innervation ในอายุต่างว ในเด็กที่เป็น HD รูปแบบที่เป็น neonatal pattern จะมีเส้นประสาทใหญ่ว ในชั้น muscularis mucosa และ submucosa แต่ไม่พบใน lamina propria ซึ่งแบบนี้จะพบในเด็กอายุต่ำกว่า 3 เดือน และพบใน lamina propria เมื่ออายุเด็กมากกว่า 1 ปี เด็กที่อายุน้อยที่สุดที่พบในชั้น lamina propria คืออายุ 7 เดือน แต่จากรายงานของ Athow และพวกในปี 1990⁽⁵⁾ พบว่ สามารถพบรูปแบบนี้ได้ ในทารกอายุ 4 เดือนหรือต่ำกว่านี้ ดังนั้น จะเห็นว่รูปแบบของ Acetylcholinesterase ในเด็กอายุต่ำกว่า 1 ปี ยังไม่แน่นอน คณะผู้วิจัยจึงต้องทำการศึกษานี้ขึ้นเพื่อหารูปแบบของ Acetylcholinesterase activity ในอายุต่างว ตั้งแต่แรกเกิดถึง 3 ปี ในเด็กโตห้ที่ได้รับการวินิจฉัยว่เป็นโรค Hirschsprung

วิธีการวิจัย

1. วัสดุ

ชิ้นเนื้อลำไส้ใหญ่ที่ได้จากการทำ suction rectal biopsy ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยทางคลินิกว่าเป็นโรค Hirschsprung ในช่วงเดือนมกราคม 2535 ถึง เดือนธันวาคม 2535 โดยแบ่งผู้ป่วยออกเป็น 3 กลุ่ม ตามอายุ

กลุ่ม 1 (G1) เด็กที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค HD ที่มีอายุน้อยกว่า 1 เดือน มีจำนวน 3 ราย

กลุ่ม 2 (G2) เด็กที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค HD ที่มีอายุตั้งแต่ 1 เดือนถึง 6 เดือน มีจำนวน 5 ราย และ

กลุ่ม 3 (G3) เด็กที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค HD ที่มีอายุตั้งแต่ 6 เดือนถึง 3 ปี มีจำนวน 13 ราย

2. วิธีการ

ตัดชิ้นเนื้อโดยใช้เครื่อง cryostat และทำการย้อมเพื่อดู activity ของ AChE ที่เพิ่มขึ้น โดยมีขั้นตอน (ภาพที่ 1) ตามรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.1 นำชิ้นเนื้อลำไส้ใหญ่จากข้อ 1 มาจุ่มลงใน isopentane ที่เย็นจนเป็นวัน (ภาชนะที่บรรจุ isopentane จะหล่อด้วย liquid nitrogen) เป็นเวลา 20 วินาที แล้วจึงฝังลงในสาร OCT compound แล้วนำไปแช่เย็นจนสาร OCT compound แข็งตัว จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ถูกหุ้มด้วยสาร OCT compound มาตัดโดยผ่านกระบวนการแช่แข็งให้มีความหนาของชิ้นเนื้อ 6 μm นำมาติดบนแผ่นสไลด์ที่ชุบด้วย chromalum solution จำนวน 10 แผ่น สำหรับการย้อมหา AChE activity และ 2 แผ่นสำหรับการย้อม H&E

2.2 นำแผ่นสไลด์ทั้งหมดที่ย้อมหา AChE activity มา fix ใน 4% formaldehyde เป็นเวลา 30 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง เป็นเวลา 10 วินาที

2.3 นำแผ่นสไลด์จากข้อ 2.2 จำนวน 8 แผ่น มาใส่ใน solution A สำหรับสไลด์อีก 2 แผ่น ใส่ใน solution A ที่ไม่มี acetylthiocholine iodide เพื่อใช้เปรียบเทียบกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

incubate สไลด์ทั้งสองชุดไว้ที่ 37 องศา C. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง (10 วินาที)

2.4 นำสไลด์จากข้อ 2.3 ทั้งสองชุดมาใส่ใน 0.05% diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) เป็นเวลา 45 นาที ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ละ 10 วินาที

2.5 นำสไลด์จากข้อ 2.4 มาย้อมด้วย 1% osmium tetroxide (OsO_4) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

2.6 นำสไลด์ทั้งหมดมาผ่านขั้นตอนการ dehydration clear และ mount

3. การอ่านผล

3.1 ตรวจสอบเนื้อที่ย้อมด้วย H&E ว่ามีชั้น submucosa หรือไม่

3.2 ตรวจสอบ activity ของ AChE ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละชั้นของชั้นเนื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.3 บันทึกผลพร้อมทั้งถ่ายภาพ

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

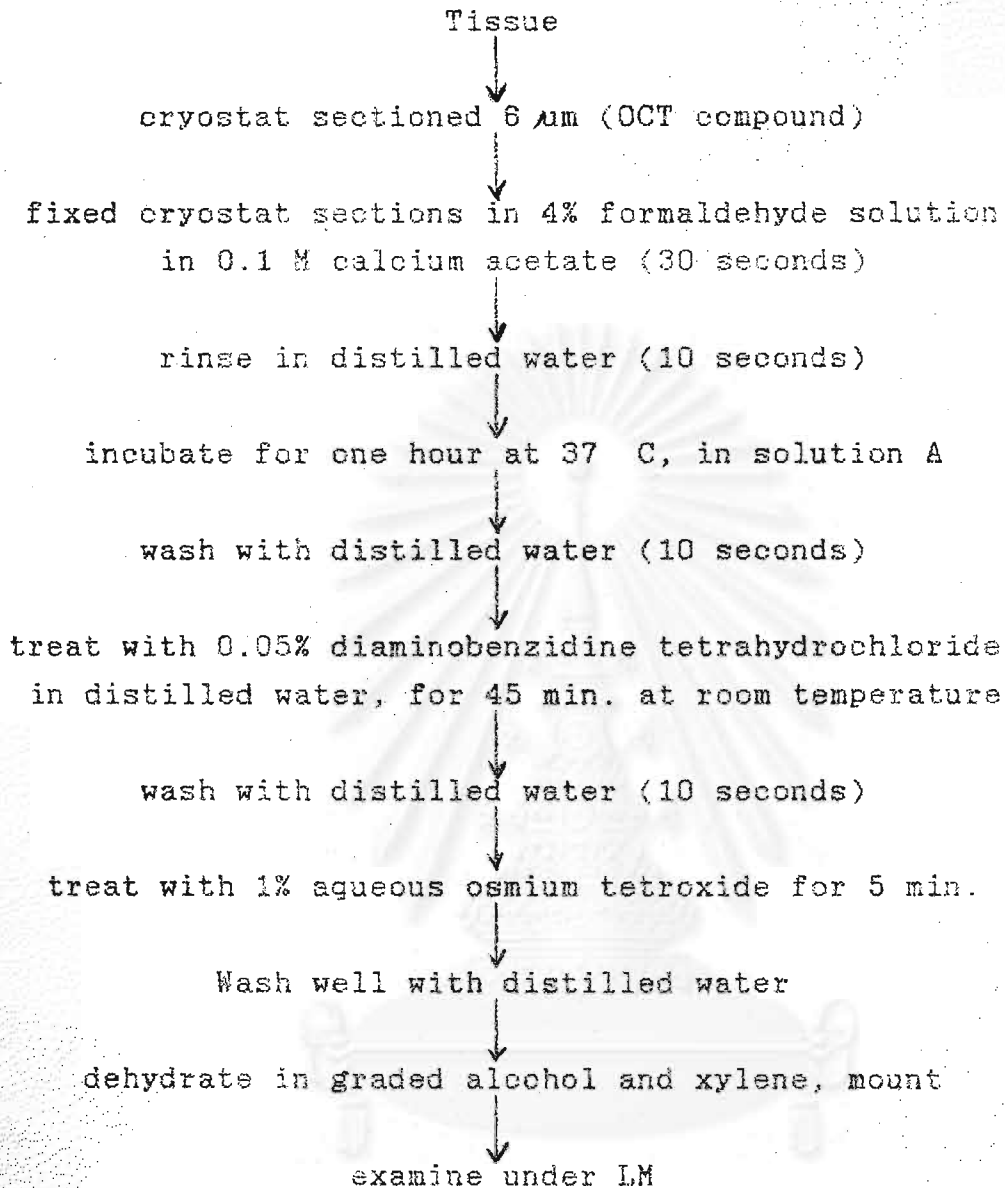


Figure 1 Steps in AChE-staining

Solution A composed of

5 mg acetylthiocholine iodide
6.5 ml of 0.1 M acetate buffer pH 6.0
0.5 ml of 0.1 M sodium citrate
1.0 ml of 3.0 mM copper sulfate

5.0 ml distilled water
1.0 ml 5 mM potassium ferricyanide
0.2 ml 4 mM tetraisopropyl
Pyrophosphoramide

ผลการวิจัย

กลุ่มที่ 1 (G1) มีผู้ป่วย 3 ราย เป็นเพศหญิง 2 ราย เพศชาย 1 ราย อายุ 7 วัน 26 วัน และ 27 วัน ตามลำดับ ในชั้นเนื้อที่ระดับ 2 ซม. และ 5 ซม. เห็น pectinate line พบว่ามี AChE activity เพิ่มขึ้นเพียงชั้นเดียว คือ ชั้น submucosa โดยจะพบ thick nerve trunks ที่ติดสีเข้มและชคไปมา (รูปที่ 2-4)

กลุ่มที่ 2 (G2) มีผู้ป่วยทั้งหมด 5 ราย เป็นเพศหญิง 3 ราย และเพศชาย 2 ราย อายุ 1 เดือน 7 วัน, 1 เดือน 14 วัน, 2 เดือน, 4 เดือน และ 5 เดือน 20 วัน ตามลำดับ พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ AChE activity ดังนี้ (รูปที่ 5-10)

ในชั้น lamina propria พบการเพิ่มขึ้นของ AChE fibers ที่ติดสีเข้ม กระจายตัวอยู่อย่างเบาบางในเนื้อเยื่อประสานของชั้นเนื้อ หรือพบเฉพาะในส่วนล่างของชั้นที่ติดกับชั้น muscularis mucosae

ในชั้น muscularis mucosae จะพบเป็น coarse nerve fiber ที่ติดสีเข้ม และในชั้น submucosa พบ thick nerve trunk

กลุ่มที่ 3 (G3) มีผู้ป่วยทั้งหมด 13 ราย เป็นเพศหญิง 6 ราย และเพศชาย 7 ราย ผู้ป่วยมีอายุตั้งแต่ 6 เดือน จนถึง 3 ปี พบว่ามีการเพิ่มของ AChE activity ดังนี้ (รูปที่ 11-24)

ในชั้น lamina propria พบการเพิ่มขึ้นของ AChE activity มาก โดยพบเป็น coarse nerve fibers ติดสีเข้ม กระจายตัวอยู่ในเนื้อเยื่อประสานตลอดความยาวของชั้นนี้ หรือพบกระจายตัวอยู่ในครึ่งล่างของชั้น มีหนึ่งรายที่ไม่พบมีการเพิ่มขึ้นของ AChE activity ในชั้นนี้เลย

ในชั้น muscularis mucosae จะพบ coarse nerve fibers ติดสีเข้ม กระจายอยู่ทั่วไป และมีหนึ่งรายที่ไม่พบว่ามี การเพิ่มขึ้นของ AChE activity

ในชั้น submucosa พบ thick nerve trunks ติดสีเข้มทุกราย และบางรายมี coarse nerve fibers บนอยู่ด้วย

การอภิปรายผล

จากผลของงานวิจัยดังกล่าวพบว่ารูปแบบการเพิ่มขึ้นของ AChE activity ที่ได้จากทั้ง 3 กลุ่มช่วงอายุนั้น มีเพียงกลุ่มที่ 1 (อายุน้อยกว่า 1 เดือน) เพียงกลุ่มเดียวเท่านั้นที่มีรูปแบบการเพิ่มขึ้นของ AChE activity เหมือนกันในผู้ป่วยทุกราย คือ พบเฉพาะ thick nerve trunks ในชั้น submucosa สำหรับในผู้ป่วยกลุ่มที่ 2 (อายุตั้งแต่ 1 เดือน จนถึง 6 เดือน) มีทั้งที่พบการเพิ่มของ AChE activity ตลอดชั้น lamina propria และพบในบริเวณครึ่งล่างของชั้น lamina propria โดยเฉพาะที่ติดกับชั้น muscularis mucosae ซึ่งเมื่อเทียบกับรูปแบบ AChE activity 2 รูปแบบ ที่จัดจำแนกไว้โดย Chow และ Chan(7) ก็คือ Type B พบ coarse nerve fibers ที่ติดสีเข้ม กระจายตัวอยู่ในในสวนครึ่งล่างของชั้น lamina propria ที่ติดกับชั้น muscularis mucosae ในชั้น muscularis mucosae และชั้น submucosae หรือพบแต่ในชั้น muscularis mucosae และชั้น submucosa เท่านั้น ซึ่ง Huntley และคณะ(2) ได้รายงานไว้ว่ารูปแบบนี้จะพบได้ใน male infants ที่มีอายุ 1 เดือนหรือน้อยกว่า แต่จากผลการวิจัยพบว่า มีผู้ป่วย 3 รายจากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดในกลุ่มที่ 2 5 ราย และ 1 ราย จากทั้งหมด 13 ราย ในกลุ่มที่ 3 มีรูปแบบที่สอดคล้องกับ Type B และทั้ง 4 รายนี้เป็นเพศหญิง และอายุมากที่สุดที่พบรูปแบบนี้คือ 8 เดือน และจะไม่พบรูปแบบนี้เลยในผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 1 เดือน (กลุ่มที่ 1) ในผู้ป่วยกลุ่มที่ 3 ในผู้ป่วยกลุ่มที่ 2 จำนวน 2 รายจะให้ AChE staining มีรูปแบบสอดคล้องกับ Type A คือพบ coarse nerve fibers ที่ติดสีเข้มกระจายอยู่ทั่วไปในชั้น mucosa และชั้น submucosa ซึ่ง Huntley และคณะ ได้รายงานไว้ว่า Type A จะพบได้ในทุกกลุ่มอายุทั้งสองเพศ แต่จากงานวิจัยพบว่าทั้ง 11 ราย เป็นเพศหญิง 4 ราย และอายุน้อยที่สุดที่พบรูปแบบนี้คือ 4 เดือน

เมื่อนำผลการวิจัยที่ได้มาเทียบกับรูปแบบการเพิ่มขึ้นของ AchE activity ที่ทำการศึกษาโดย De Brito และ Maksound(5) พบว่าผู้ป่วยในกลุ่มที่ 1 จะมีรูปแบบการเพิ่มขึ้นของ AChE activity คล้ายกับ Pattern I (newborn pattern) ที่พบ thick nerve trunks เฉพาะในชั้น muscularis mucosae และชั้น submucosa

และพบในผู้ป่วยที่มีอายุต่ำกว่า 3 เดือน แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าในกลุ่มที่ 1 ทั้ง 3 ราย และผู้ป่วย 2 รายในกลุ่มที่ 3 จะพบแต่ thick nerve trunks ในชั้น submucosa เท่านั้น ไม่พบในชั้น muscularis mucosae ในกลุ่มที่ 2 พบว่าผู้ป่วยทุกรายมีรูปแบบการเพิ่มขึ้นของ AChE activity คล้ายกับ Pattern IIIA คือพบทั้ง thick nerve trunks ในชั้น muscularis mucosae และชั้น submucosa เหมือนกับที่พบใน newborn pattern และจะพบ small nerve fibers ในชั้น lamina propria เล็กน้อย มักจะพบในผู้ป่วยที่มีอายุต่ำกว่า 1 ปี แต่จากงานวิจัยนั้นนอกจากผู้ป่วยทุกรายในกลุ่มที่ 2 แล้วยังพบผู้ป่วยในกลุ่มที่ 3 จำนวน 4 รายที่มีรูปแบบดังกล่าวด้วย และอายุมากที่สุดที่พบรูปแบบนี้คือ 3 ปี และมีผู้ป่วยอยู่จำนวน 6 ราย จาก 9 รายที่มีรูปแบบดังกล่าวที่อายุน้อยกว่า 1 ปี (คิดเป็น 67%) ซึ่งใกล้เคียงกับที่ De Brito และ Maksound รายงานไว้ว่า 75% ของผู้ป่วยที่เป็นโรค Hirschsprung ที่มี Pattern IIIA จะมีอายุต่ำกว่า 1 ปี สำหรับผู้ป่วยในกลุ่มที่ 3 พบว่ามีผู้ป่วย 5 ราย ที่มีรูปแบบ AChE activity สอดคล้องกับ Pattern IIIB คือมีลักษณะคล้ายกับ Pattern IIIA แต่พบว่ามี small nerve fibers ในชั้น lamina propria มากกว่า และถือว่าเป็นลักษณะที่เด่นกว่าที่พบใน Pattern IIIA และอายุน้อยที่สุดที่พบรูปแบบนี้คือ 1 เดือน 7 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยในกลุ่มที่ 3 จำนวน 2 ราย ที่พบมีรูปแบบเหมือน Pattern II (classical pattern) คือพบ coarse nerve fibers ในชั้น muscularis mucosae และชั้น submucosa และพบว่ามี small nerve fibers ในชั้น lamina propria ด้วย และส่วนใหญ่จะพบในเด็กที่มีอายุมากกว่า 1 ปี แต่จากงานวิจัยนี้พบว่าอายุน้อยที่สุดที่พบคือ 7 เดือน

นอกจากรูปแบบการเพิ่มขึ้นของ AChE activity มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มช่วงอายุตามที่ได้กล่าวมาแล้ว ยังพบว่ามีความสอดคล้องกันระหว่างปริมาณของ เอ็น ไซม์ AChE ที่เพิ่มขึ้นกับความรุนแรงของอาการที่แสดงออกทางคลินิกของผู้ป่วยด้วย ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็นสองลักษณะคือ พวกที่มีการเพิ่มขึ้นของ AChE activity มาก จะมีอาการของโรค Hirschsprung ตั้งแต่แรกคลอดหรือหลังคลอดไม่นานนัก เช่น ที่พบในผู้ป่วย G3/1 G3/2 G3/3 G3/4 G3/5 (รูปที่ 12-16) เป็นต้น และอีกพวกเป็นพวกที่มีการเพิ่มขึ้นของ AChE activity น้อยกว่าพวกแรกอย่างชัดเจน จะมีอาการของโรค Hirschsprung เมื่ออายุมากขึ้น เช่น ที่พบในผู้ป่วย G3/7 G3/11 G3/12 G3/13 G3/6 และ G3/8 นอกจากนี้พบว่ามีผู้ป่วย 2 ราย จากกลุ่มที่ 3 ที่มีรูปแบบการเพิ่มขึ้นของ AChE activity

แตกต่างไปจากลักษณะที่พบในผู้ป่วยส่วนใหญ่ของกลุ่มที่ 3 คือพบเฉพาะ AChE activity ในชั้น submucosa เพียงชั้นเดียว โดยพบเป็น thick nerve trunks คัดสีเข้ม คือผู้ป่วย G3/6 และ G3/8 (รูปที่ 17, 19) ซึ่งผู้ป่วยรายแรกมีอายุ 10 เดือน เริ่มมีอาการท้องอืดและท้องผูกเมื่ออายุ 5 เดือน ลักษณะอาการที่ไม่รุนแรงของโรค Hirschsprung และตรวจพบเมื่อตอนโต กับรูปแบบ AChE ที่ได้ ซึ่งเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในชั้น submucosa นั้นน่าจะมีความสัมพันธ์กัน

ตามรายงานของ Schofield และคณะ (๑) ที่กล่าวถึงยืนยันผลการศึกษาของ De Brito และ Maksound (1987) ที่ว่าการหายไปของ ganglion cells จะทำให้เกิด dichotomization ของ preganglionic nerve fibers ออกไปเรื่อยๆ และแขนงดังกล่าวจะกระจายเข้าไปในชั้น lamina propria และผลจากงานวิจัยก็สอดคล้องกับรายงานดังกล่าว แต่เนื่องจากตัวอย่างผู้ป่วยจากงานวิจัย ไม่มีผู้ป่วยที่ทำ biopsy ซ้ำ 2 ครั้ง โดยในครั้งแรกอยู่กลุ่มอายุหนึ่ง และในครั้งที่สองอยู่อีกกลุ่มอายุหนึ่ง นอกจากผู้ป่วยราย G3/7 (รูป 18) ซึ่งเป็นผู้ป่วยในกลุ่มที่ 3 และได้ทำการตรวจการเพิ่มขึ้นของ AChE activity สองครั้ง ครั้งแรกเมื่อผู้ป่วยมีอายุ 10 เดือน และอีกครั้งเมื่ออายุ 1 ปี ซึ่งผลในครั้งหลังพบว่า coarse nerve fibers กระจายอยู่ทั่วไปในชั้น lamina propria ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะไม่พบจากการตรวจครั้งแรก

จากการศึกษาทาง immunohistochemistry ในผนังลำไส้ของคนปกติของ Kato และคณะ (๑) เพื่อดูความแตกต่างระหว่าง supporting cells ของ extrinsic component (เป็น peripheral nerve ที่เข้ามา innervate ลำไส้ ซึ่งก็คือ parasympathetic preganglionic, sympathetic postganglionic, sensory fibers และ schwann cells) และของ intrinsic component (ซึ่งประกอบด้วย neural tissue ของ enteric nervous system และ supporting cells หรือ enteric glia) ซึ่งมี immunoreactivity ทั้งของ CNS glia และ PNS schwann cells โดยใช้ glial fibrillary acidic protein (GFAP) ซึ่งเป็น specific marker สำหรับ astrocytes ใน CNS S-100 ซึ่งเป็น markers ของ astrocytes oligodendrocytes ใน CNS และ glutamine synthetase (GS) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกระบวนการ amino detoxication และ glutamate metabolism ใน CNS ซึ่งพบว่าเป็น supporting cells ของ intrinsic

component จะพบ immunoreactive ทั้ง 3 ตัว คือ GFAP S-100 และ GS แต่ใน supporting cells ของ extrinsic component จะไม่พบ immunoreactive ของ GS หรือพบได้น้อยมากเมื่อเทียบกับที่พบใน intrinsic component และเมื่อทำการวัด immunoreactivity ของ supporting cells ที่อยู่ในผนังลำไส้ส่วนที่เป็น aganglionic portion ของผู้ป่วยที่เป็นโรค Hirschsprung พบว่า GS immunoreactivity จะน้อยมาก และคล้ายกับที่พบใน supporting cells ของ extrinsic component ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ส่วนที่พบ immunoreactivity ของ aganglionic portion ของผู้ป่วยที่เป็นโรค Hirschsprung นั้นเป็น extrinsic component ของ enteric nervous system ไม่ใช่ intrinsic component ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Tam และ Boyd⁽¹⁰⁾ เกี่ยวกับ intramural pathway ของ abnormal enteric nerve fibers ในผนังของลำไส้ของผู้ป่วยที่เป็นโรค Hirschsprung ด้วยวิธี wholemount immunohistochemistry โดยใช้ neuron-specific enolase (NSE) และ vasoactive intestinal peptide (VIP) เป็น markers พบว่า thick nerve trunks ที่พบในลำไส้ส่วนที่เป็น aganglionic portion นั้นเป็น extrinsic component ที่เข้ามาเลี้ยงผนังลำไส้ โดยมากับหลอดเลือดที่มาเลี้ยงผนังลำไส้ มีส่วนต้นเป็น nerve fibers ขนาดเล็ก แล้วจึงค่อยขยายใหญ่ขึ้น และมีจุดสิ้นสุดอยู่ในชั้น submucosa และจากผลการศึกษาของทั้งสองคณะข้างต้น แสดงให้เห็นว่า thick nerve trunks ในชั้น submucosa และ coarse nerve fibers ที่พบในชั้น muscularis mucosae และชั้น lamina propria จากการตรวจการเพิ่มขึ้นของ AChE activity ในชั้นเนื้อที่ได้จากการทำ suction rectal biopsy นั้นเป็น extrinsic cholinergic nerve fibers ที่เข้ามาเลี้ยงผนังลำไส้นั่นเอง แต่จากลักษณะของ nerve fibers ดังกล่าวที่ขีดไปมาในลักษณะต่างๆ กัน คดสีเข้ม และเห็นเป็นช่วงๆ นั้น จะมีลักษณะเหมือนที่ Tam และ Boyd⁽¹⁰⁾ ได้รายงานไว้ว่าใน aganglionic rectum ของผู้ป่วย Hirschsprung's disease นั้น NSE-IR และ VIP-IR nerve fibers ที่พบจะมีลักษณะแตกต่างไปจากที่พบใน ganglionic rectum โดยจะพบเป็นเส้นที่หนากว่าสั้นกว่า และมีลักษณะขดไปมา ขึ้นๆ ลงๆ และยังเชื่อมกันเป็น irregular network เนื่องจากเป็นการศึกษา wholemount ทำให้เห็น pathways ต่างๆ ได้ชัดเจน ซึ่งไม่สามารถเห็นได้จากการศึกษาจากวิธีการตัด section ธรรมดา

เนื่องจากเชื่อกันว่าสาเหตุของโรค Hirschsprung เกิดจากความผิดปกติในการเคลื่อนที่ของ neural crests ในระยะต้นของพัฒนาการของตัวอ่อนมาซึ่งผนังลำไส้ ทำให้ลำไส้บางส่วน ไม่มี ganglion cells หรือเกิดจากสาเหตุอื่นกันแน่ จึง ได้มีผู้ทำการศึกษาใน in vitro เพื่อการกระจายตัวของ basement membrane protein laminin ที่จับตัวอยู่กับองค์ประกอบต่างๆ ใน basement membrane เป็นต้นว่า collagen type IV nidogen และ heparan sulfate proteoglycan ที่มีผลส่งเสริมต่อการเจริญของ neurite และการอยู่รอดของ neurones (11-12) และ basement membrane-specific collagen type IV ที่เกี่ยวข้องกับ neural crest cell migration (13) ซึ่งโปรตีนทั้งสองชนิดทำหน้าที่เป็น extracellular matrix components (ECM) ที่สำคัญต่อการเกิด neural migration maturation และ survival ระหว่างขบวนการ embryogenesis (11, 14, 15) จากการศึกษาด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่า neural crests ที่ระดับต่างๆ กัน สามารถเจริญได้ใน terminal bowel ของหนูทดลองกลุ่มควบคุม แต่จะไม่เจริญใน terminal bowel ที่เป็น aganglionic segment ของหนูที่ทำให้เกิด lethal spotted mutant ซึ่งมี segmental mesenchymal defect ใน terminal bowel (16) และยังพบว่ามี intense immunohistochemistry ทั้งของโปรตีน laminin และ collagen type IV ใน smooth muscle ของ human embryonic gut ในช่วงเวลาที่มีการงอกของ axon จาก neural crest cells หลังจากที่มีการรวมกันเป็น ganglia และเป็นเครื่องบ่งชี้ว่า การเกิด axonal outgrowth และ neuronal differentiation ในผนังลำไส้ของคนนั้นน่าจะอยู่ภายใต้อิทธิพลของ ECM proteins ในระหว่างขบวนการ embryogenesis (17) และจากสาเหตุดังกล่าว ซึ่งจะนำไปสู่ Microenvironmental theory ที่กล่าวไว้ว่า สภาพแวดล้อมที่ผิดปกติไปของลำไส้จะทำให้เกิด segmental ECM abnormalities ซึ่งมีผลต่อขบวนการ migration และ development ของ neural crest cells ในผนังลำไส้ ซึ่งอาจจะ เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรค Hirschsprung ในคนได้ และจากการศึกษาของ Parikh และคณะ (18) พบว่าการกระจายตัวของโปรตีน laminin และ collagen type IV ในผู้ป่วย Hirschsprung จะแตกต่างจากที่พบในคนปกติที่เป็นกลุ่มควบคุม โดยจะพบว่ามี intense immunoreactivity ของโปรตีนทั้งสองตัว ซึ่งให้ผลเหมือนกันใน basement membrane ของ smooth muscle ของชั้น muscularis mucosae และของชั้น muscularis externa แต่ในผู้ป่วย

Hirschsprung จะพบ more intense immunoreactivity ในบริเวณ innermost circular layers และจะค่อยๆ ลดลงตามลำดับเมื่อถึงชั้น outer smooth muscle layer ของชั้น muscularis externa และพบกระจายอยู่เป็นหย่อมๆ นอก basement membrane ของชั้น muscularis externa ซึ่งผลที่ได้นี้จะเหมือนกับผลการศึกษาใน developing gut ของหนูที่เป็น homozygous lethal spotted mutant (18) ซึ่งผลดังกล่าวจะสนับสนุนต่อ Microenvironment hypothesis ต่อการเกิด pathogenesis ของโรค Hirschsprung

สรุปผลการทดลอง

รูปแบบ AChE activity ที่ตรวจพบในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยทางคลินิกว่าเป็นโรค Hirschsprung ที่มีอายุมากกว่า 1 เดือนนั้น มีรูปแบบที่ไม่แน่นอน แต่อย่างไรก็ตาม จากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 21 ราย มี 19 ราย (คิดเป็น 90.5%) ที่ตรวจพบการเพิ่มขึ้นของ AChE activity ในชั้น submucosa เหมือนกันทุกรายนั่นคือ จะพบ thick nerve trunks ที่ตีสีเข้มกระจายอยู่ทั่วไปในชั้นดังกล่าว

ข้อเสนอแนะ และ งานที่จะดำเนินการต่อไป

ชั้นเนื้อที่นำมาตรวจ โดยวิธีการเพิ่มขึ้นของ AChE activity จำเป็นต้องมีชั้น submucosa โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีอายุต่ำกว่า 1 เดือน ซึ่งจะพบแต่ thick nerve trunks ในชั้น submucosa เท่านั้น และถ้าตรวจพบว่าการเพิ่มขึ้นของ AChE activity ในชั้น mucosa ไม่ว่าจะมียหรือไม่มีชั้น muscularis mucosae และ/หรือ ชั้น submucosa ในผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 1 เดือน จะสามารถสรุปได้ว่า ผู้ป่วยเป็นโรค Hirschsprung แต่ถ้าตรวจไม่พบการเพิ่มขึ้นของ AChE activity ในชั้น mucosa และชั้นเนื้อ ไม่มีชั้น submucosa จะไม่สามารถสรุปได้ว่า ผู้ป่วยเป็นโรค Hirschsprung

เนื่องจากในปัจจุบันมีความก้าวหน้าทางด้าน immunohistochemistry สูงมาก และได้มีผู้นำเอาวิธีนี้มาช่วยในการวินิจฉัย ศึกษาสาเหตุการดำเนิน ไปของ โรค Hirschsprung กันอย่างแพร่หลาย ประกอบกับความจำเพาะของวิธีดังกล่าว ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์มากขึ้นถ้าได้มีการทดลองนำมาใช้ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในการช่วยวินิจฉัยโรค Hirschsprung เป็นต้นว่าการใช้ monoclonal D7 antibody ซึ่งเป็น marker สำหรับ autonomic nervous system โดยจะมีผลต่อ non-myelin-forming schwann cells ของ

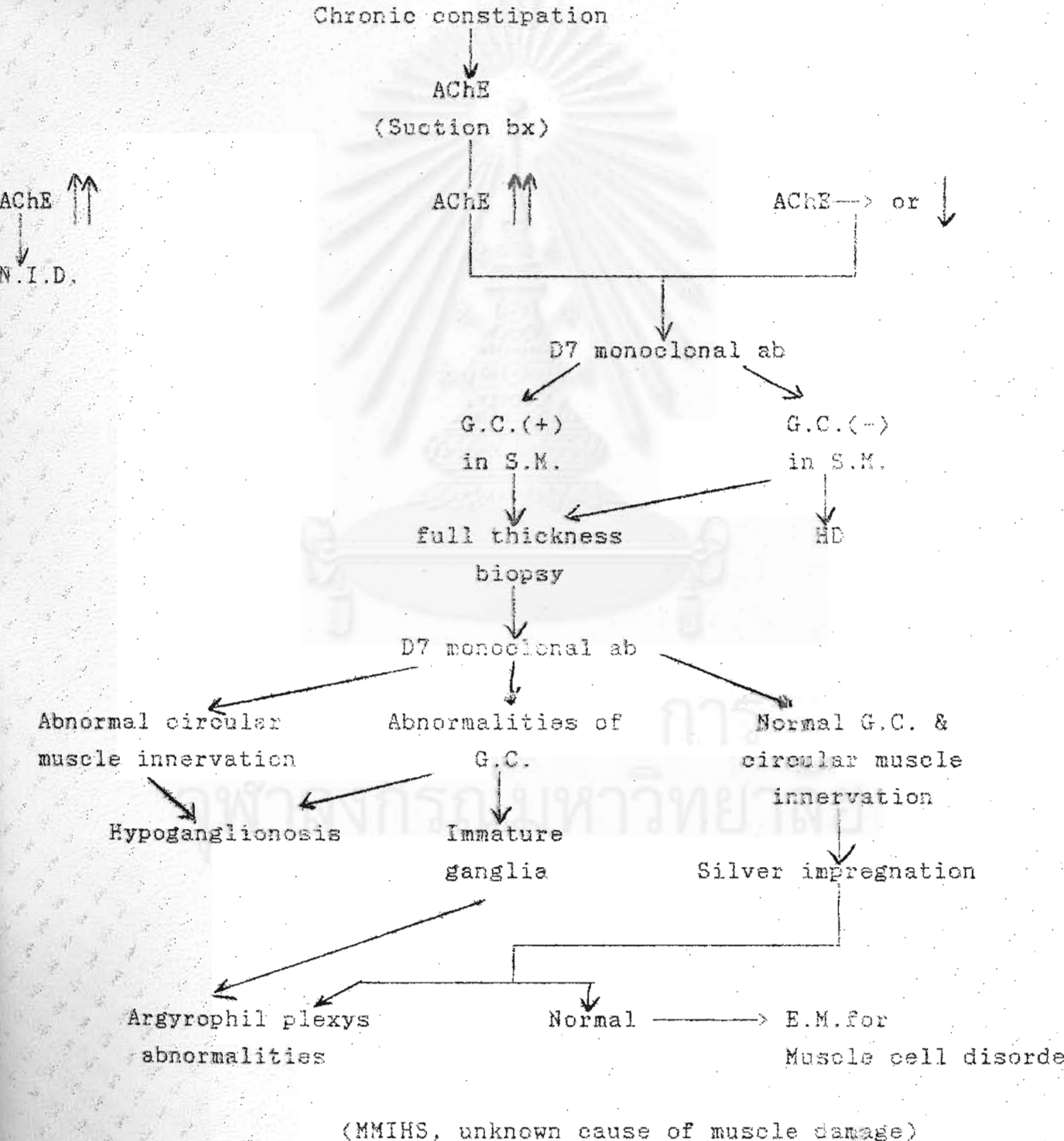
PNS และที่สำคัญคือสามารถแยก ganglion cells จากโครงสร้างต่างๆ ใน enteric nervous system ได้เป็นต้นว่า supporting enteric glial cells และ interconnecting nerve fibers ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวจำเป็นต่อการวินิจฉัยแยกโรคที่มีอาการคล้ายคลึงกับอาการของโรค Hirschsprung เป็นต้นว่า neuronal intestinal dysplasia หรือ abnormalities innervation ของ circular muscle และการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายใน myenteric และ submucosal ganglia เช่น ภาวะ immature ganglia หรือ hypoganglionosis ซึ่ง Puri และ Fukimoto (20) ได้ทำ diagnostic flow chart ในการใช้ D7 monoclonal antibody ร่วมกับวิธีการตรวจหา AChE activity ที่เพิ่มขึ้นในชั้นเนื้อของลำไส้ที่ได้จากการทำ suction rectal biopsy การใช้วิธี silver impregnation และ การตรวจกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ในการแยกโรคที่มีอาการแสดงคล้ายคลึงกับโรค Hirschsprung ตามแผนภาพดังต่อไปนี้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 25 แสดงแผนภาพของ Puri และ Fujimoto (1988) ที่ใช้ในการวินิจฉัยแยกโรค Hirschsprung และ โรคอื่น ๆ ที่มีอาการคล้ายคลึงกัน

G.C., ganglion cells : L.P., lamina propria : S.M., smooth muscle : HD, Hirschsprung's disease : MMIHS, megacystis microcolon intestinal hypoperistalsis syndrome



เอกสารอ้างอิง

1. Chittmittrapap S, Chentanez V, Kasantikul V. An Appraisal of histochemically demonstrated acetylcholinesterase activity in suction rectal specimens as an aid to diagnosis of Hirschsprung's disease.
2. Huntly CC, Svcaffner L, Challa VR. Histochemical diagnosis of Hirschsprung's disease. *Pediatrics* 1982; 69:775-761
3. Hirsig J, Briner J, Rickham PP. Problems in the diagnosis of acetylcholinesterase reaction in suction biopsy of neonates. *Z.Kinderchir* 1979; 26:242-247.
4. Goto S, Ikeda I, Toyohara T. Histochemical confirmation of the acetylcholinesterase activity in rectal suction biopsy from neonates with Hirschsprung's disease *Z.Kinderchir* 1983;39:246-249.
5. De Brito IA, Marksound J. Evaluation with age of the acetylcholinesterase activity in rectal suction biopsy in Hirschsprung's disease. *J Pediatr. Surg* 1987; 22:425-430.
6. Athow AC, Filipe MI, Drake DP. Problems and advantages of Acetylcholinesterase histochemistry of rectal suction biopsies in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *J Pediatr.Surg* 1990; 25(5) :520-526.
7. Chaw CW, Chan WC. Histochemical criteria for the diagnosis of Hirschsprung's disease in rectal suction biopsies by acetylcholinesterase activity *J Pediatr Surg* 1977; 12(Oct) :675-680
8. Schofield DE, Devine. W, Yunis EJ. Acetylcholinesterase stained suction rectal biopsies in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990; 11:221-228

9. Kato H, Yemamoto T, Yamamoto H, Ohi R, So N, Iwasaki Y.
Immunocytochemical characterization of supporting cells
in the Enteric nervous system in Hirschsprung's disease.
J Pediatr Surg 1990; 25(5):514-519
10. Tam PKH, Boyd GP. Origin, Course and Endings of abnormal
enteric nerve fibers in Hirschsprung's disease defined by
whole-mount immunohistochemistry. J Pediatr Surg 1990;25(4)
: 457-461
11. Lander AD, Fujii Du, Reichardt LF. Laminin is associated with
the neurite outgrowth-promoting factors found in conditioned
media. Proct Natl Sci USA 1985; 82:2183-2187
12. Edgar D, Timpl R, Thoenen H. The heparin-binding domain of
lamina in reponsible for its effects on neurite outgrowth
and neuronal survival. EMBO J 1984; 3:1463-1468
13. Grllnberg JH, Seppa S, Seppa H. Hewitt AT. Role of Collagen and
fibronectin in neural crest cell adhesion and migration.
Dev Biol 1981; 87:259-266
14. Erickson CA, Turley EA, Substrata formed by combinations of
extracellular matrix components alter neural crest motility
in vitro. J Cell Sci 1983;61:299-333
15. Halfter W, Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP. The effect of
tenascin and embryonic basal lamina on the behavior and
morphology of neural crest cells in vitro. Dev Biol 1989;
132:14-25
16. Jacobs-Cohen RJ, Payette RF, Gershon MD, Rothman TP. Inability of
neural crest cells to colonize the presumptive aganglionic
bowel of ls/ls mice : Requirement for a permissive local
microenvironment. J Comp Neurol 1987; 255:425-428

17. Fujimoto T, Hata J, Yokoyama S, Mitomi T. A study of the extra cellular matrix protein as the migration pathway of neural crest cells in the gut : analysis in human embryos with special to the pathogenesis of Hirschsprung's disease, *Pediatr Surg* 1989;24:550-556
18. Parikh DH, Tam PKH, Velzen DV, Edger D. Abnormalities in the distribution of laminin and collagen Type IV in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology* 1992;102:1236-1241
19. Payette RR, Tennyson VM, Pham TD, Mawe GM, Pomaranze HD, Rothman TP, Gershon MD. Origin and morphology of nerve fibers in the aganglionic colon of the lethal spotted (ls/ls) mutant mouse. *J Comp. Neurol* 1987;257:237-252
20. Puri P, Fujimoto T. Diagnosis of allied functional bowel disorders using monoclonal antibodies and electronmicroscopy. *J Pediatr Surg* 1988;23(6):546-554

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

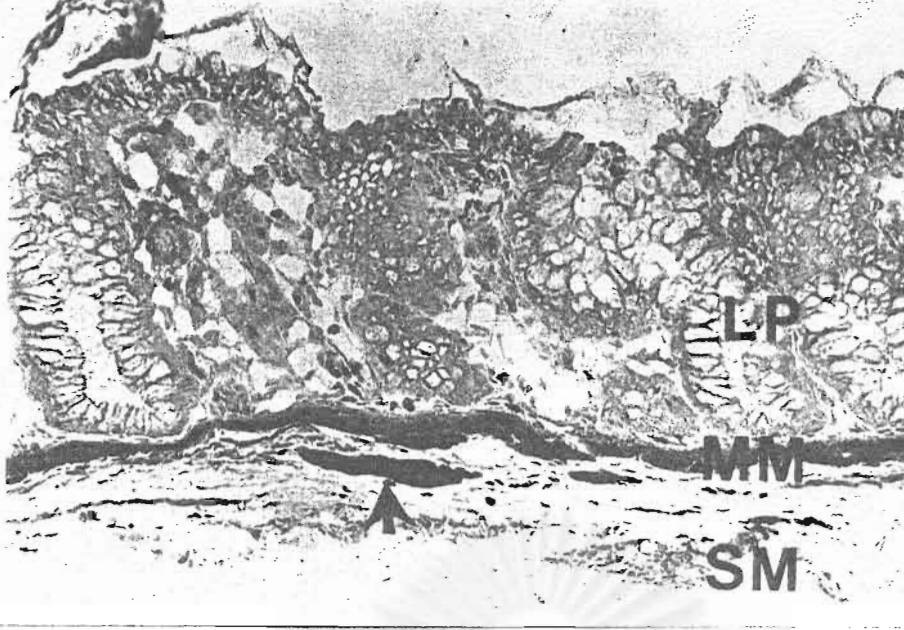


Figure 2 AChE activity in G1

LP = lamina propria,

MM = Muscularis mucosae,

SM = submucosa

(←) Thick nerve trunk

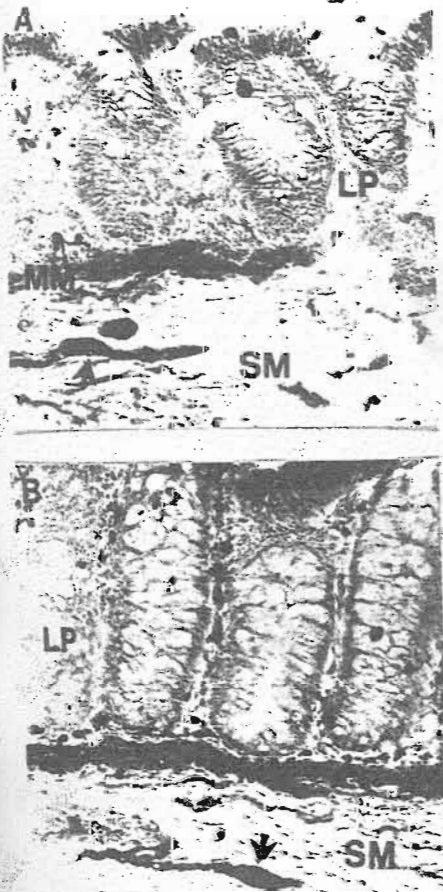


Figure 3 AChE activity in G1/1 (←) indicated thick nerve trunk. A is the section from 2 cm above pectinate line. B is the section from 5 cm above pectinate line.

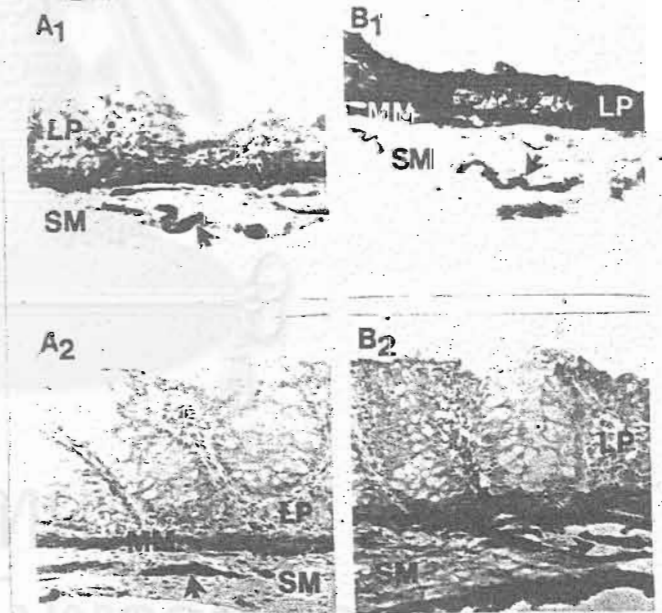


Figure 4 AChE activity in G1/2 (A1, B1)

and G1/3 (A2, B2)

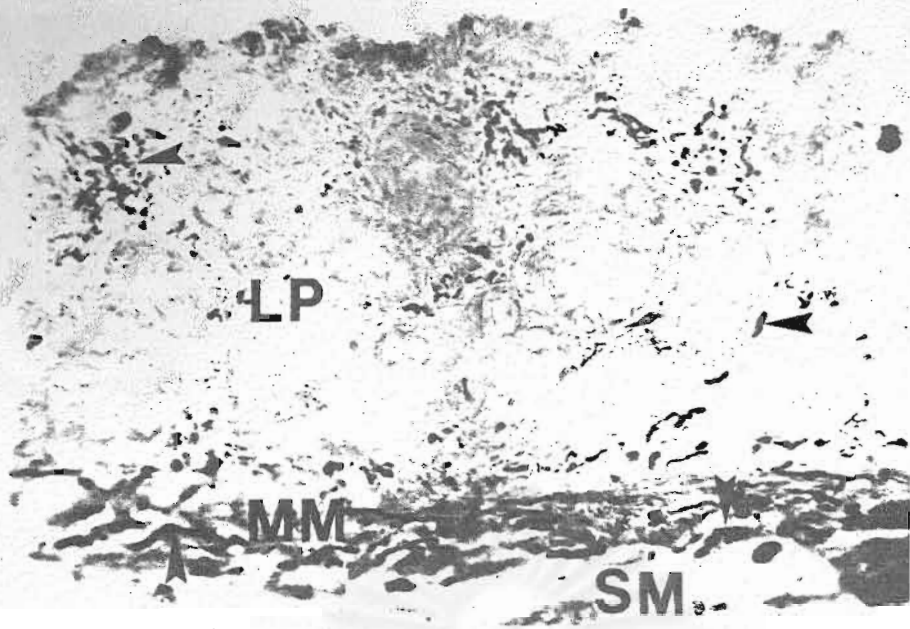


Figure 5 AChE activity in G2 (\blacktriangle) indicated coarse nerve fiber

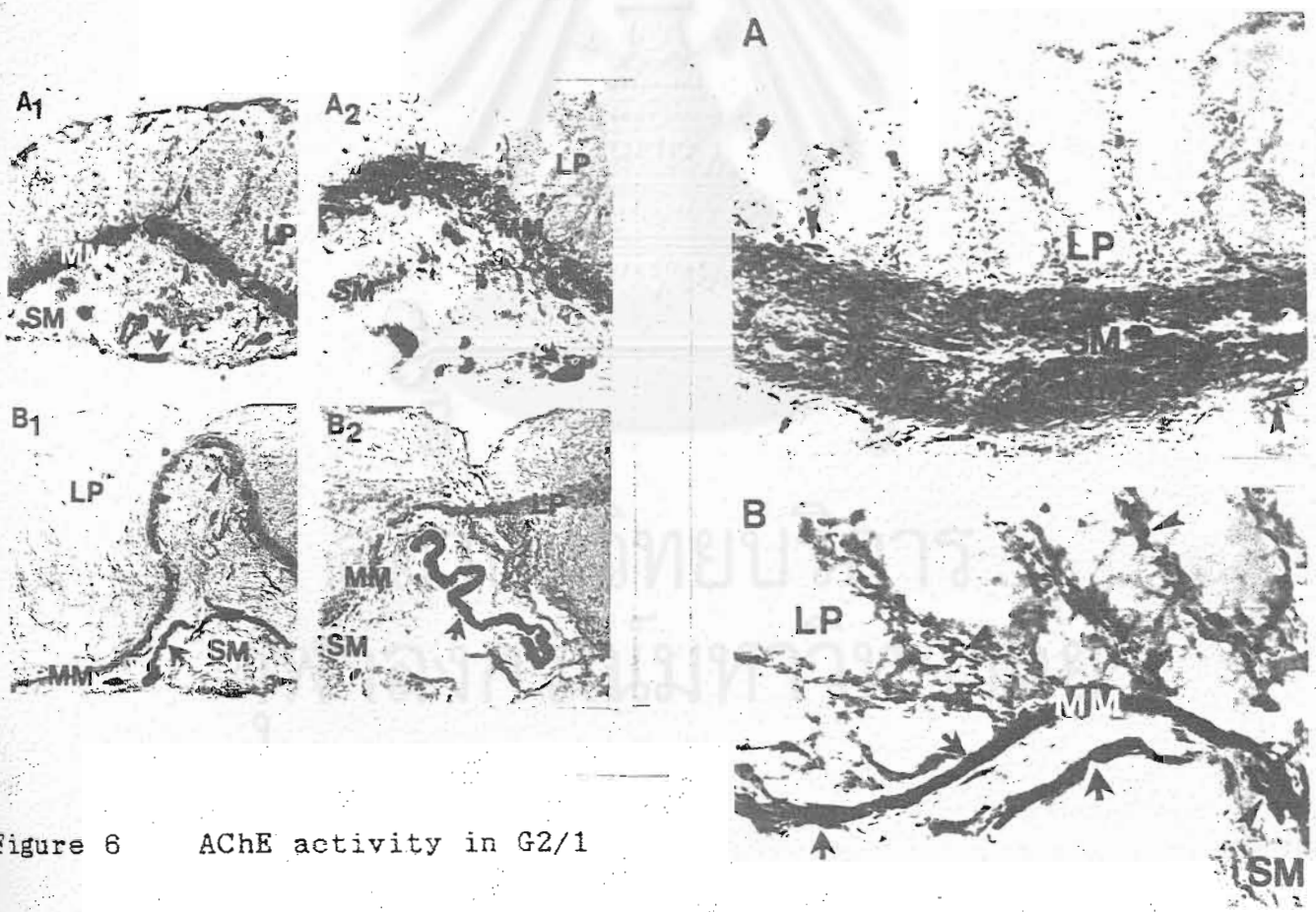


Figure 6 AChE activity in G2/1

Figure 7 AChE activity in G2/2

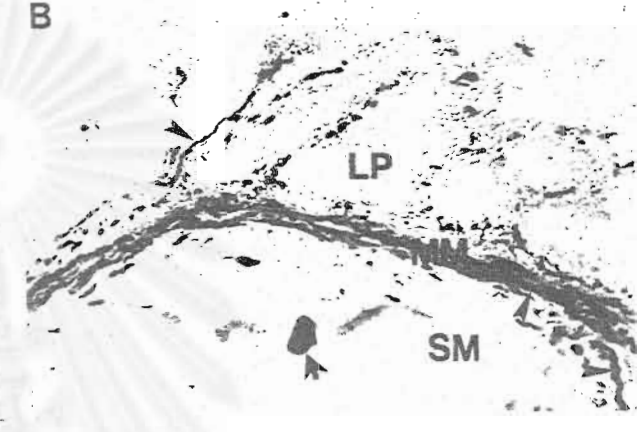
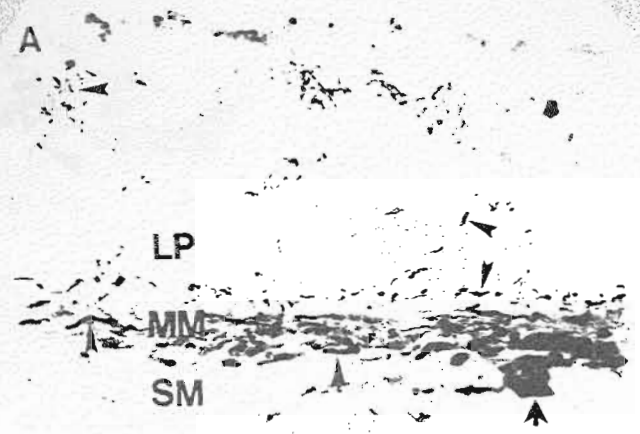
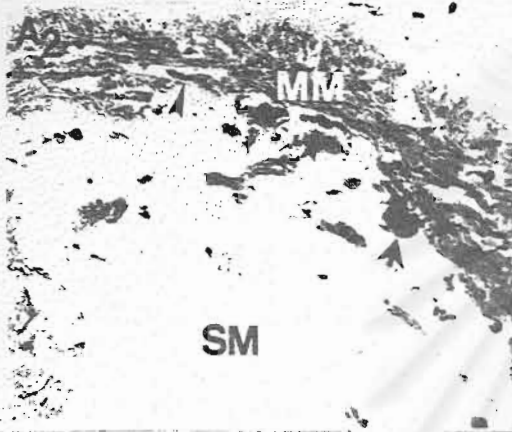
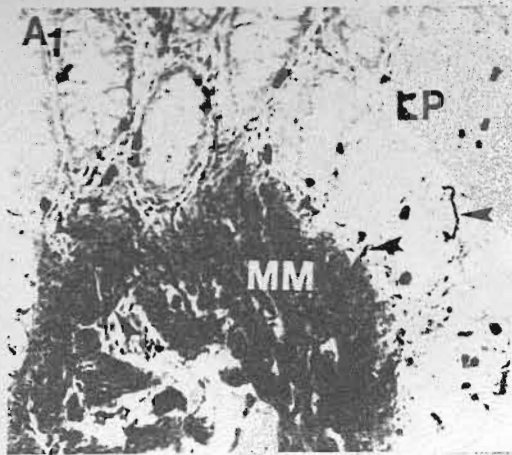


Figure 8 AChE activity in G2/3

Figure 9 AChE activity in G2/4

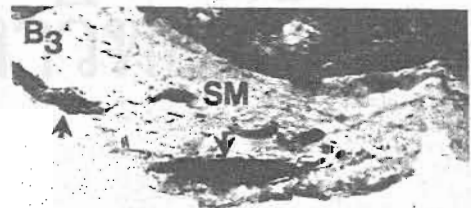
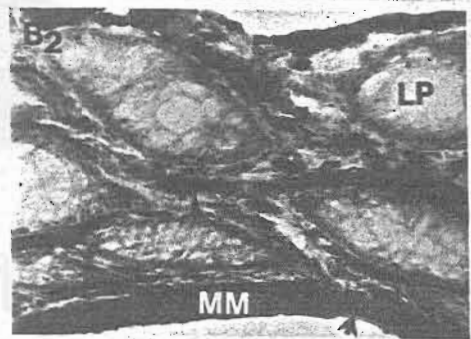


Figure 10 AChE activity in G2/5

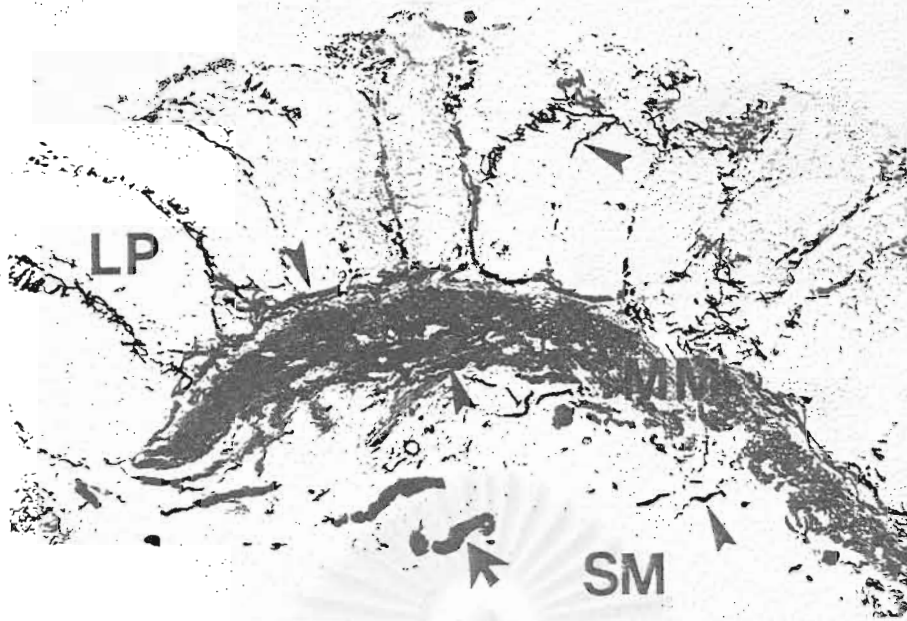


Figure 11 AChE activity in G3

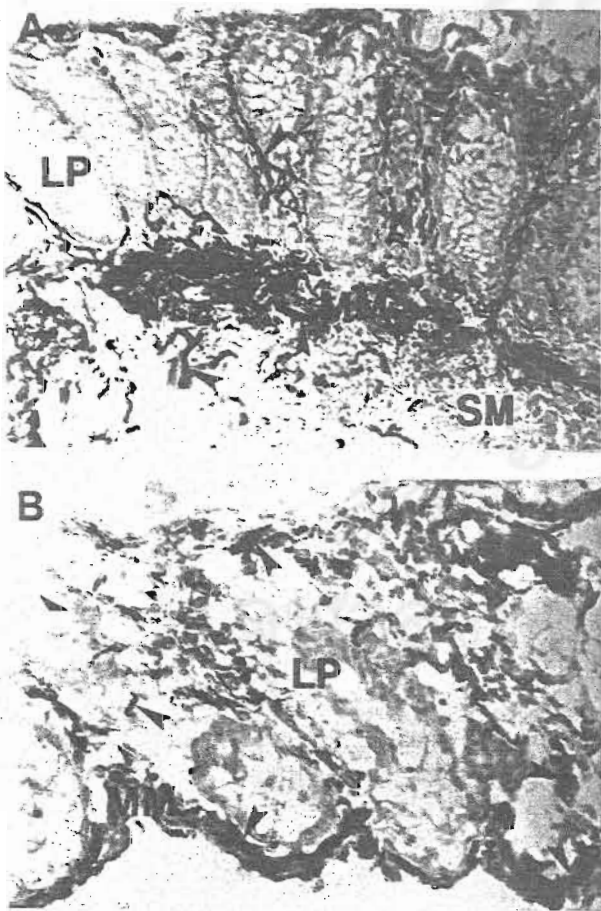


Figure 12 AChE activity in G3/1



Figure 13 AChE activity in G3/2

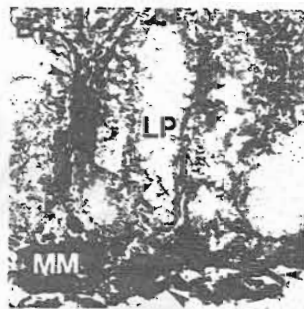
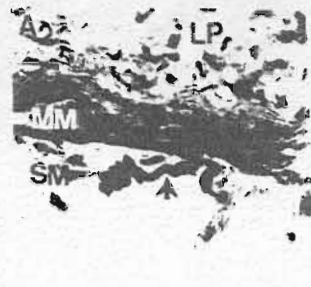
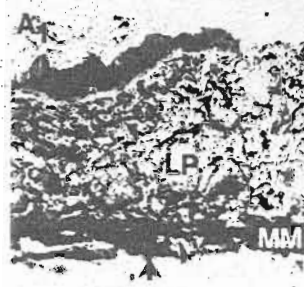
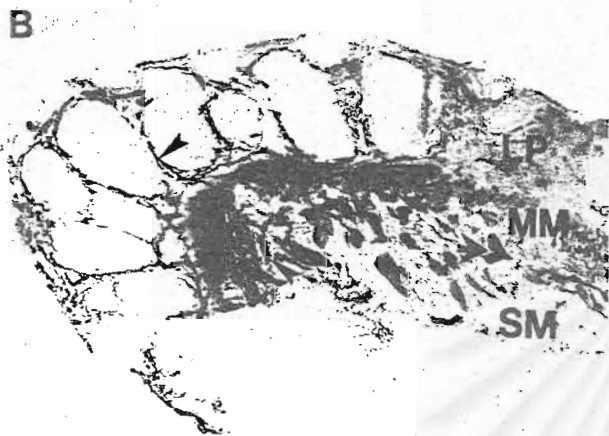
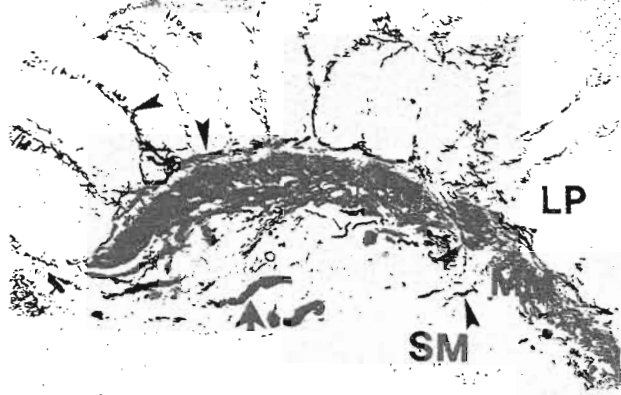


Figure 14 AChE activity in G3/3

Figure 15 AChE activity in G3/4

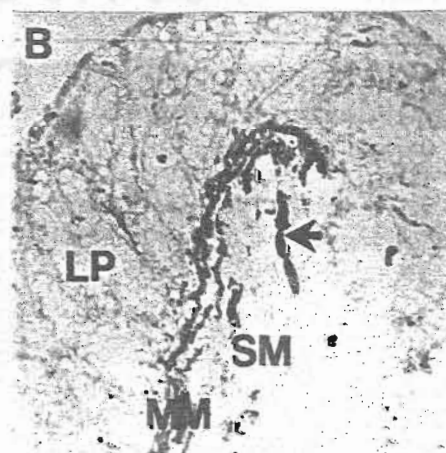
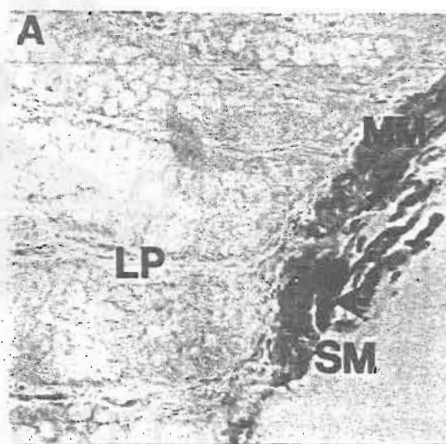
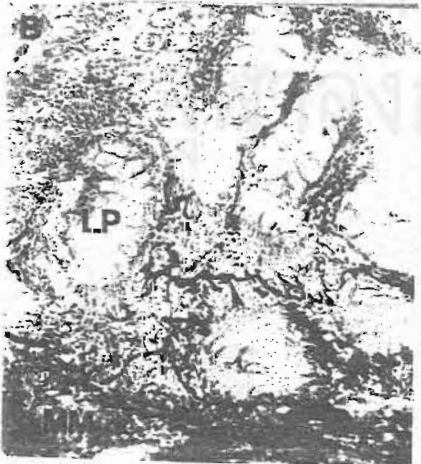
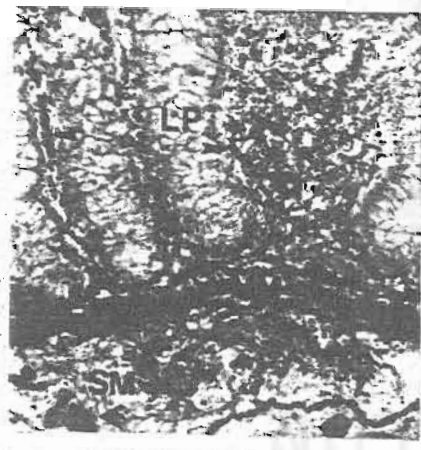


Figure 16 AChE activity in G3/5

Figure 17 AChE activity in G3/6

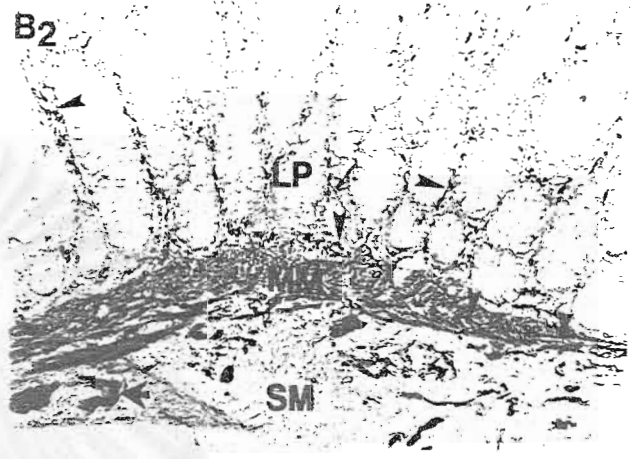
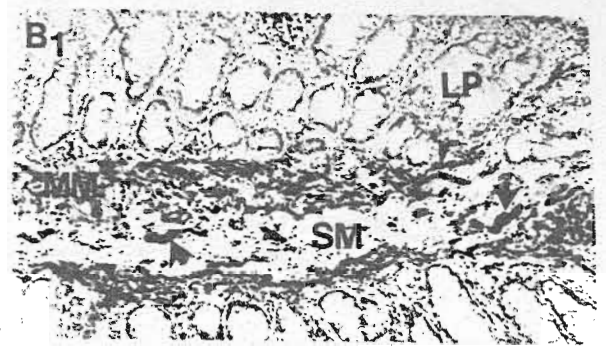
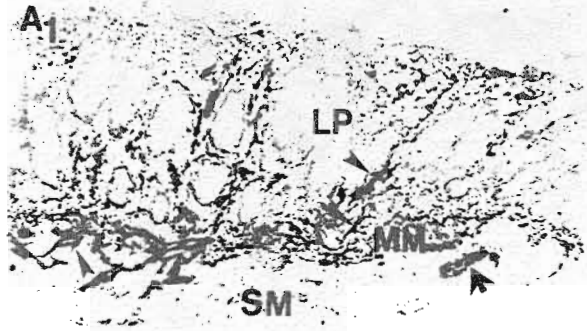


Figure 18 AChE activity in G3/7 (A1,B1-10 month)
(A2,B2-12 month)

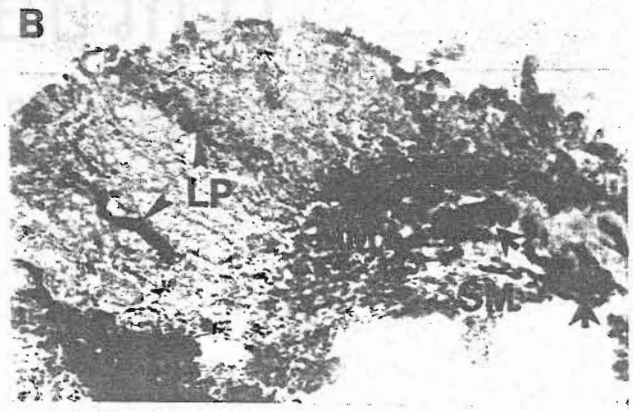
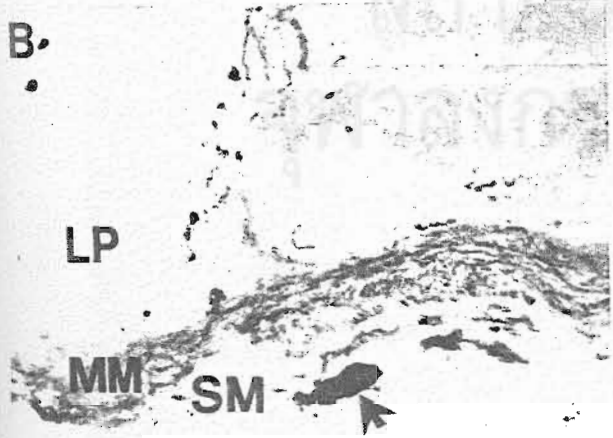
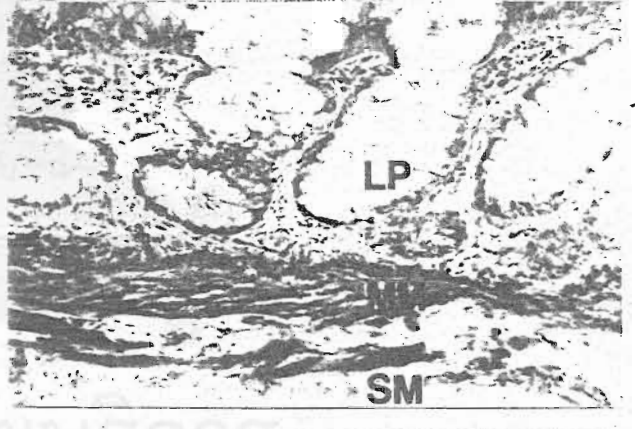
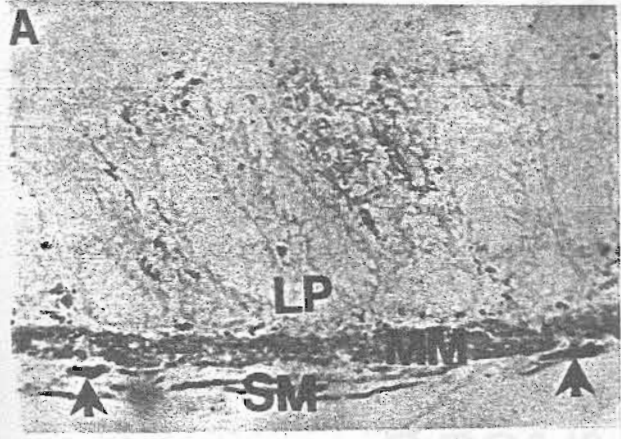


Figure 19 AChE activity in G3/8

Figure 20 AChE activity in G3/8

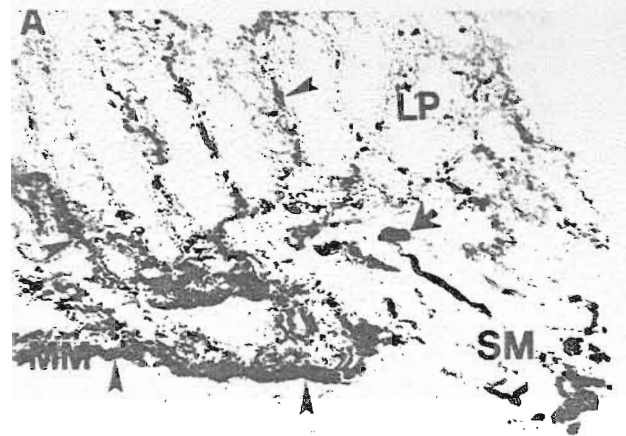
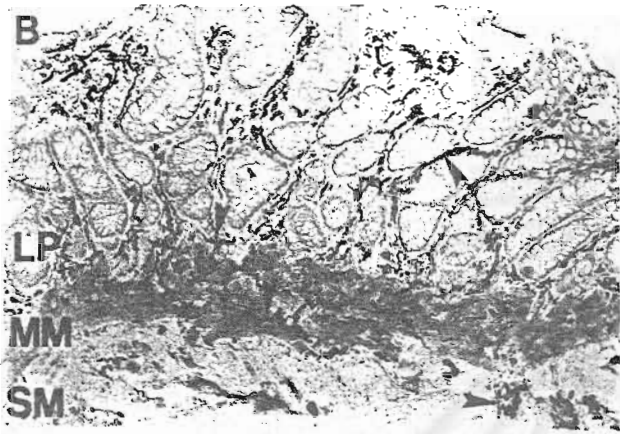
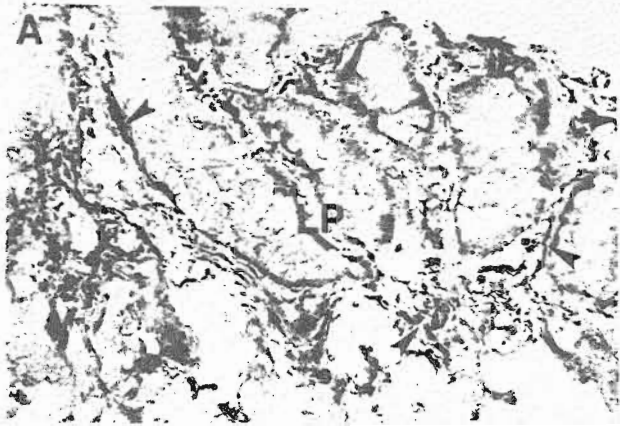


Figure 21 AChE activity in G3/10

Figure 22 AChE activity in G3/11



Figure 23 AChE activity in G3/12 (A₁, A₂, A₃ = 2 cm)

(B = 5 cm)

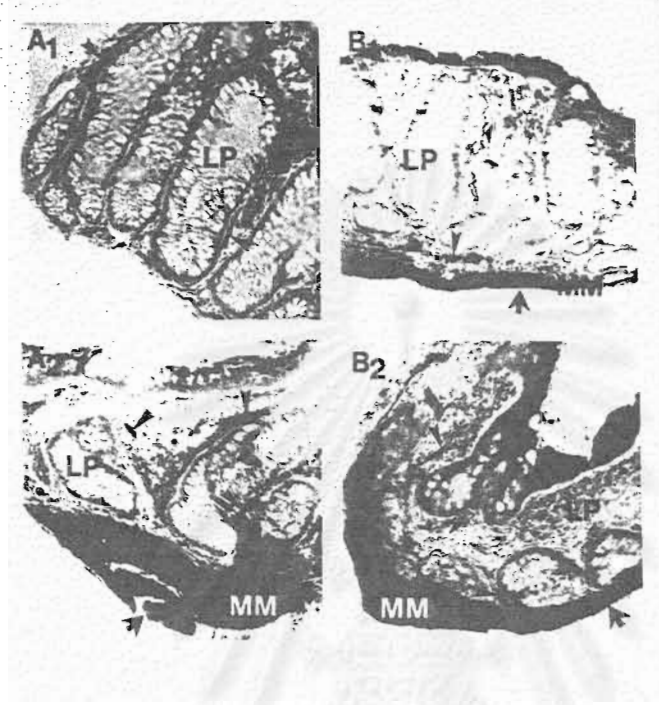


Figure 24 AChE activity in G3/13

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย