

การกระจายตัวในระดับเซลล์ของเอนไซม์โคไลน์อะเซทิลทรานสเฟอเรส เอนไซม์อะเซทิลโคไลน์
เอสเทอเรส และ โปรตีนเวสิคิวลาอะเซทิลโคไลน์ทรานสปอเตอร์ ในโรคต่างขา

ปริญญาานิพนธ์

ของ

นายแพทย์อาชวิน สตางค์มิ่งคณ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาตจวิทยา

กุมภาพันธ์ 2551

กระจายตัวในระดับเซลล์ของเอนไซม์โคเลสเตอรอลทรานสเฟอเรส เอนไซม์อะเซทิลโคเลสเตอรอลทรานสเฟอเรส และ โปรตีนเวสิคิวลาอะเซทิลโคเลสเตอรอลทรานสเฟอร์ ในโรคต่างขา

บทคัดย่อ

ของ

นายแพทย์อาชวิน สตางค์มงคล

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาตจวิทยา

กุมภาพันธ์ 2551

อาชวิน สดางค์มงคล (2551). การแสดงออกและการกระจายตัวในระดับเซลล์ของเอนไซม์โค

ลิโนอะเซทิลทรานสเฟอเรส เอนไซม์อะเซทิลโคลีน เอสเทอเรส และ โปรตีนเวสิคิวลาอะเซทิล

โคลีนทรานสปอร์เตอร์ ในโรคต่างชาวมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ คณะกรรมการควบคุม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิสุทธิ

วิทยาลักษณ์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ คณะกรรมการควบคุม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิสุทธิ

ประดิษฐ์อาชีพ, รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ มนต์รี อุดมเพทายกุล, ศาสตราจารย์นายแพทย์

ปิติ พลังวีริชา.

ภูมิหลัง: สาเหตุของการเกิดโรคต่างชาวยังไม่เป็นที่แน่ชัด มีบางทฤษฎีทางชีวเคมีเชื่อว่าภาวะ oxidative stress กระตุ้นให้เกิดการสร้างสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยับยั้งฤทธิ์ของเอนไซม์อะเซทิลโคลีน เอสเทอเรส (AChE) ทำให้มีระดับของสารอะเซทิลโคลีน (ACh) เพิ่มขึ้นซึ่งจะไปยับยั้งการสร้างเม็ดสีในรอยโรค โดยยังไม่มีรายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของสารในระบบโคลิเนอร์จิกที่เกี่ยวข้องในระดับเซลล์ในรอยโรคต่างชาวมาก่อน

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาถึงการกระจายและการแสดงออกในระดับเซลล์ของเอนไซม์โคลีนอะเซทิลทรานสเฟอเรส (ChAT) เอนไซม์อะเซทิลโคลีน เอสเทอเรส (AChE) และโปรตีนเวสิคิวลาอะเซทิลโคลีนทรานสปอร์เตอร์ (VAChT) ในรอยโรคต่างชาวมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

วิธีการศึกษา: ศึกษาจากผู้ป่วยโรคต่างชาวมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จำนวน 11 รายและอาสาสมัคร 3 ราย โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มตัวอย่างในกลุ่มที่ 1 คือรอยต่างชาวมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กลุ่มที่ 2 คือ ผิวหนังที่ปกติของผู้ป่วยโรคต่างชาวมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และกลุ่มที่ 3 คือผิวหนังที่ปกติของอาสาสมัคร โดยนำชิ้นเนื้อส่วนผิวหนังของแต่ละกลุ่มมาศึกษาการแสดงออกของ ChAT, AChE และ VAChT ในส่วนต่างๆของผิวหนังโดยอาศัยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี

ผลการศึกษา: ในกลุ่มที่ 1 การแสดงออกของ ChAT ที่ระดับ epidermis 2 ราย (18.2%) การแสดงออกของ AChE ที่ระดับ epidermis 5 ราย (45.5%) และ การแสดงออกของ VAChT ที่ระดับ epidermis 4 ราย (36.4%) ในกลุ่มที่ 2 การแสดงออกของ ChAT ที่ระดับ epidermis 1 ราย (9.1%) การแสดงออกของ AChE ที่ระดับ epidermis 6 ราย (54.5%) และ การแสดงออกของ VAChT ที่ระดับ epidermis 3 ราย (27.3%) ในกลุ่มที่ 3 การแสดงออกของ ChAT ที่ระดับ epidermis 3 ราย (100%) การแสดงออกของ AChE ที่ระดับ epidermis 2 ราย (66.7%) และ การแสดงออกของ VAChT ที่ระดับ epidermis 3 ราย (100%) ที่ระดับ sweat glands ทั้ง 3 กลุ่มจะมีการแสดงออกของ ChAT ที่ glandular cells น้อยแต่จะมากที่ sweat ducts ในกลุ่มที่ 3 และน้อยในกลุ่มที่ 1 และ 2 และการแสดงออกของ AChE ทั้ง 3 กลุ่มจะมากที่ sweat ducts โดยจะพบที่ glandular cells มากในกลุ่มที่ 1 และ 2 แต่จะน้อยในกลุ่มที่ 3 โดยที่การแสดงออกของ VAChT ที่ระดับ sweat glands จะพบมากในทั้ง

3 กลุ่มแนวโน้มไม่แตกต่างกัน ที่ sebaceous glands จะมีการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT น้อยมากในกลุ่มที่ 1 และ 2 แต่ AchE จะพบมากที่สุดใน sebaceous glands ของกลุ่มที่ 3 โดย ทั้ง 3 กลุ่มจะมีการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ที่ vessels ใกล้เคียงกัน และ incubation time เฉลี่ยที่ใช้ในการทดลองสำหรับขั้นตอนของการเกิดสีบนเนื้อเยื่อสำหรับ ChAT และ VAChT ของ กลุ่มที่ 1 และ 3 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.023$, $p=0.031$)

สรุปผล: ในผู้ป่วยโรคต่างขามีแนวโน้มลดลงในการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ที่บริเวณชั้น epidermis และ sebaceous glands แต่การแสดงออกของ ChAT มีแนวโน้มลดลงที่ sweat ducts และการแสดงออกของ AchE มีแนวโน้มมากขึ้นที่ sweat glands เป็นที่น่าสนใจว่า โครงสร้างของบริเวณผิวหนังที่เป็นรอยต่างขาและผิวหนังที่ปกติในผู้ป่วยโรคต่างขาเองมีความ ใกล้เคียงกันในการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT

คำสำคัญ: โรคต่างขา อิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ โคลิเนอรัจิก ผิวหนัง เมลาโนไซต์

Expression and Distribution of Choline Acetyltransferase, Acetylcholine Esterase and
Vesicular Acetylcholine Transporter Protein in Vitiligo.

AN ABSTRACT

BY

ARCHAWIN SATANGMONGKOL

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Master of Science Degree in Dermatology

at Srinakharinwirot University

February 2008

Archawin Satangmongkol.(2008). *Expression and Distribution of Choline*

Acetyltransferase, Acetylcholine Esterase and Vesicular Acetylcholine Transporter Protein in Vitiligo. Master thesis, M.S.(Dermatology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assoc.Prof. Wisuit Pradidarcheep, Assoc.Prof. Montree Udompataikul, Prof.Piti Palungwachira.

Background: The etiology of vitiligo is still unclear. The recent studies have been proposed that the oxidative stress generate hydrogen peroxide which inactivate acetylcholine Esterase (AChE) result in higher acetylcholine that inhibits melanin production in vitiligo lesions. Disorders of the biochemical substrate of the cholinergic system are probably crucial in vitiligo. There are so far no reports on cellular expression and distribution of cholinergic substances in vitiligo.

Objectives: To elucidate the expression and distribution of Choline Acetyltransferase (ChAT), Acetylcholine Esterase (AChE) and Vesicular Acetylcholine Transporter protein (VAChT) in skin affected by vitiligo.

Material and Methods: The study included eleven vitiligo patients and three healthy volunteers. The skin biopsies from the patients and volunteers were divided into three groups. The first and second groups contained lesional and non-lesional skin from vitiligo patients, respectively. The third group was skin biopsies from healthy volunteers as controls. Expression and distribution of ChAT, AChE and VAChT of each skin biopsy were investigated by immunohistochemical techniques.

Results: The epidermis of lesional skin of vitiligo group showed staining of ChAT in 2 cases (18.2%), AChE in 5 cases (45.5%) and VAChT in 4 cases (36.4%). The epidermis of non-lesional skin of vitiligo group showed staining of ChAT in 1 cases (9.1%), AChE in 6 cases (54.5%) and VAChT in 3 cases (27.3%). The control group showed staining of ChAT in 3 cases (100%), AChE in 2 cases (66.7%) and VAChT in 3 cases (100%). In the sweat glands, all of three groups showed less staining of ChAT in glandular cell and less staining in sweat ducts in lesional and non-lesional skin of vitiligo groups but showed more staining in the control group. The expression of AChE in sweat ducts is higher in all of three groups and in glandular cells of lesional and non-lesional skin of vitiligo groups and lower in control

group. No different of VAChT expression in sweat glands in all of three groups. The sebaceous glands have scanty expression of ChAT, AchE and VAChT in lesional and non-lesional skin of vitiligo groups. Otherwise, AchE is higher expression in the control group and all of three groups have similar expression of ChAT, AchE and VAChT in the vessels. The mean of incubation time for manifestation of the color of ChAT and VAChT on the tissues was different between lesional skin of vitiligo group and control group in statistically significant ($p=0.023$, $p=0.031$)

Conclusion:The vitiligo patients trend to have decrease in the expression of ChAT, AchE and VAChT in the epidermal layers and sebaceous glands and only ChAT in sweat glands. Although the expression of AchE is trend to higher in sweat glands. Remarkably, in vitiligo patients, expression of ChAT, AchE and VAChT between the lesional and non-lesional skin is not markedly different.

Keywords: Vitiligo, Immunohistochemistry, Cholinergic, Skin, Melanocytes

การกระจายตัวในระดับเซลล์ของเอนไซม์โคไลน์อะเซทิลทรานสเฟอเรส เอนไซม์อะเซทิลโคไลน์
เอสเทอเรส และ โพรตีนเวสิคิวลาอะเซทิลโคไลน์ทรานสปอเตอร์ ในโรคต่างขา

ปริญญาานิพนธ์

ของ

นายแพทย์อาชวิน สตางค์มงคล

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาตจวิทยา

กุมภาพันธ์ 2551

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ประกาศคุณูปการ

ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความช่วยเหลือคำแนะนำอย่างดียิ่งจากคณาจารย์หลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์นายแพทย์ ปิติ พลังวชิรา ประธานควบคุมปริญญาานิพนธ์ รองศาสตราจารย์นายแพทย์ มนต์รี อุดมเพทายกุล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิสุทธิ ประดิษฐ์อาชีพ กรรมการควบคุมปริญญาานิพนธ์ที่ได้ให้คำปรึกษาแก่ผู้วิจัยตลอดการวิจัย และแนะนำแนวทางการอภิปรายและสรุปผลตลอดจนชี้แนะวิธีการศึกษาวิจัยครั้งนี้อย่างใกล้ชิด เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด รวมถึงแนะนำข้อมูลต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิภาวี อนุพันธ์พิศิษฐ์ และ ศาสตราจารย์นายแพทย์จิโรจ สิ้นธวานนท์ ที่กรุณาร่วมเป็นกรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์ตลอดจนให้คำแนะนำแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ คุณสุมล จิ่งอุดมเจริญ นักวิทยาศาสตร์ระดับ 6 ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำต่างๆในห้องปฏิบัติการ และคุณลำไย ม่วงกล้วย พยาบาลประจำศูนย์ผิวหนัง มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในการนัดหมายผู้ป่วย ตลอดจนให้คำแนะนำผู้ป่วยตลอดการวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในศูนย์ผิวหนัง และเพื่อน ๆ แพทย์ทุกท่านที่ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือผู้วิจัยโดยตลอดทำให้งานวิจัยออกมาสำเร็จด้วยดี

ทำยนี้ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดาและครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนทางการศึกษารวมถึงขอขอบคุณ แพทย์หญิงโชติมา วงศ์กิจการวานิช ผู้ให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยโดยตลอดจนสำเร็จการศึกษา

นายแพทย์อาชวิน สตางค์มิ่งคล

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
ความสำคัญของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
สมมุติฐานในการวิจัย.....	4
กรอบแนวคิดของแผนงานวิจัย (Conceptual framework).....	5
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
โรคต่างขาว (Vitiligo).....	6
ระบบโคลิเนอร์จิก (Cholinergic system).....	14
อิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (Immunohistochemistry).....	27
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	32
การกำหนดประชากรและกลุ่มตัวอย่าง.....	32
อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	33
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	34
วิธีการศึกษา.....	34
การประเมินผล.....	35
สถิติที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูล.....	38
การบริหารงานวิจัยและตารางปฏิบัติงาน (Administration and Time schedule).....	39
งบประมาณการวิจัย.....	40
4 ผลการวิจัย.....	41
ลักษณะโดยทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง.....	41
ผลการทดลองและแสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา.....	46

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	82
อภิปรายผล.....	82
สรุป.....	89
ข้อเสนอแนะ.....	89
บรรณานุกรม.....	93
ภาคผนวก.....	109
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	117

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงวิธีในการรักษาโรคต่างขา.....	13
2 แสดง Muscarinic subtypes ของ Acetylcholine Receptors	26
3 ตารางการเก็บข้อมูลการแสดงออกของ ChAT บริเวณผิวหนังส่วนต่างๆ.....	37
4 ตารางการเก็บข้อมูลการแสดงออกของ AchE บริเวณผิวหนังส่วนต่างๆ.....	37
5 ตารางการเก็บข้อมูลการแสดงออกของ VAChT บริเวณผิวหนังส่วนต่างๆ.....	38
6 แสดงการบริหารงานวิจัยและตารางปฏิบัติงาน (Administration and Time schedule).....	39
7 แสดงงบประมาณการวิจัย (ถัวเฉลี่ยจ่ายทุกรายการ).....	40
8 แสดงลักษณะโดยทั่วไปของกลุ่มผู้ป่วยโรคต่างขา.....	41
9 แสดงลักษณะโดยทั่วไปของอาสาสมัคร.....	44
10 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนาของบริเวณที่ตัดชิ้นเนื้อของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม..	45
11 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนาของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ตามชั้นต่างๆ ของผิวหนังในกลุ่มรอยโรคต่างขา (กลุ่มที่ 1).....	47
12 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนาของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ตามชั้นต่างๆ ของผิวหนังในกลุ่มผิวหนังปกติในผู้ป่วยโรคต่างขา (กลุ่มที่ 2).....	51
13 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนาของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ตามชั้นต่างๆ ของผิวหนังในกลุ่มอาสาสมัคร (กลุ่มที่ 3).....	55
14 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา (ร้อยละ) ของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ในชั้น Epidermis ของผิวหนังในกลุ่มที่ 1.....	56
15 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา (ร้อยละ) ของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ใน Sweat gland ของผิวหนังในกลุ่มที่ 1.....	57
16 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา (ร้อยละ) ของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ใน Sebaceous gland ของผิวหนังในกลุ่มที่ 1.....	58
17 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา (ร้อยละ) ของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ใน Cutaneous vessels ของผิวหนังในกลุ่มที่ 1.....	59
18 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา (ร้อยละ) ของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ในชั้น Epidermis ของผิวหนังในกลุ่มที่ 2.....	61

บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
19 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา (ร้อยละ) ของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ใน Sweat gland ของผิวหนังในกลุ่มที่ 2.....	62
20 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา (ร้อยละ) ของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ใน Sebaceous gland ของผิวหนังในกลุ่มที่ 2.....	63
21 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา (ร้อยละ) ของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ใน Cutaneous vessels ของผิวหนังในกลุ่มที่ 2.....	64
22 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา (ร้อยละ) ของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ในชั้น Epidermis ของผิวหนังในกลุ่มที่ 3.....	66
23 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา (ร้อยละ) ของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ใน Sweat gland ของผิวหนังในกลุ่มที่ 3.....	67
24 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา (ร้อยละ) ของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ใน Sebaceous gland ของผิวหนังในกลุ่มที่ 3.....	68
25 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา (ร้อยละ) ของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ใน Cutaneous vessels ของผิวหนังในกลุ่มที่ 3.....	69
26 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนาของระยะเวลาในการเกิดสีระหว่างการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีและชิ้นเนื้อ (incubation time) ของเอนไซม์แต่ละชนิด.....	70
27 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงวิเคราะห์ของ incubation time ของ ChAT ระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 2.....	70
28 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงวิเคราะห์ของ incubation time ของ ChAT ระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 3.....	71
29 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงวิเคราะห์ของ incubation time ของ ChAT ระหว่างกลุ่มที่ 2 และ 3.....	71
30 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงวิเคราะห์ของ incubation time ของ AchE ระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 2.....	71
31 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงวิเคราะห์ของ incubation time ของ AchE ระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 3.....	71

บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
32 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงวิเคราะห์ของ incubation time ของ AchE ระหว่างกลุ่มที่ 2 และ 3.....	71
33 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงวิเคราะห์ของ incubation time ของ VAchT ระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 2.....	72
34 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงวิเคราะห์ของ incubation time ของ VAchT ระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 3.....	72
35 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงวิเคราะห์ของ incubation time ของ VAchT ระหว่างกลุ่มที่ 2 และ 3.....	72

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แสดงลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรคต่างขา.....	7
2 แสดงขบวนการ Neuronal Cholinergic Pathway.....	15
3 แสดงตำแหน่งที่สังเคราะห์ และ pathway ในการออกฤทธิ์ของสาร Ach ในระบบ ประสาท ส่วนกลาง.....	17
4 แสดงต้นกำเนิดของ Melanocytes การสังเคราะห์ Melanin และ Epidermal Melanin Unit.....	20
5 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Precursors และขั้นตอนการสังเคราะห์ Melanin.....	20
6 โครงสร้างของ AchE จากการศึกษาโดยวิธี computer modelingแสดงตำแหน่ง โปรตีนที่สำคัญในการออกฤทธิ์ที่ถูกทำลายโดย H ₂ O ₂	22
7 แสดงลักษณะโครงสร้างทางโมเลกุลของ Nicotinic receptors.....	23
8 แสดงลักษณะโครงสร้างทางโมเลกุลของ Muscarinic receptors.....	25
9 แสดงเทคนิคทาง Immunohistochemistry โดยอาศัย fluorescence ในการจับ สัญญาณ.....	28
10 แสดงเทคนิคทาง Indirect immunoenzyme method.....	29
11 กราฟแสดงชนิดของโรคต่างขาจำแนกตามการกระจายของรอยต่างขา.....	42
12 กราฟแสดงประวัติที่เคยได้รับการรักษามาก่อน.....	42
13 กราฟแสดงตำแหน่งรอยโรคที่ตัดขึ้นเนื้อ.....	43
14 ผู้ป่วยโรคต่างขา ชนิด Mixed type โดยมีรอยต่างขาที่บริเวณรอบปาก มือ เท้า และลำตัว.....	44
15 การแสดงออกของ ChAT ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในผิวหนังกลุ่ม อาสาสมัคร.....	73
16 การแสดงออกของ AchE ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในผิวหนังกลุ่ม อาสาสมัคร.....	74
17 การแสดงออกของ VAChT ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในผิวหนังกลุ่ม อาสาสมัคร.....	75
18 การแสดงออกของ ChAT ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในรอยต่างขาใน ผิวหนังของผู้ป่วยโรคต่างขา.....	76

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
19 การแสดงออกของ AchE ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในรอยต่างขาวใน ผิวหนังของผู้ป่วยโรคต่างขา.....	77
ภาพประกอบ	หน้า
19 การแสดงออกของ AchE ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในรอยต่างขาวใน ผิวหนังของผู้ป่วยโรคต่างขา.....	77
20 การแสดงออกของ VAChT ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในรอยต่างขาวใน ผิวหนังของผู้ป่วยโรคต่างขา.....	78
21 การแสดงออกของ ChAT ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในผิวหนังปกติของ ผู้ป่วยโรคต่างขา.....	79
22 การแสดงออกของ AchE ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในผิวหนังปกติของ ผู้ป่วยโรคต่างขา.....	80
23 การแสดงออกของ VAChT ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในผิวหนังปกติ ของผู้ป่วยโรคต่างขา.....	81

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

โรคต่างขาเป็นโรคผิวหนังที่เกิดจากการทำลายของเซลล์สร้างเม็ดสีเมลานิน (melanocyte) มักมาด้วยผื่นสีขาว และอาจมีขนสีขาวบริเวณผื่นร่วมด้วย ซึ่งพบว่าเกิดในภายหลังมาได้เป็นมาแต่กำเนิดอาการของโรคมักเริ่มเป็นในช่วงวัยเด็กหรือวัยรุ่นประมาณร้อยละ 50 ของผู้ป่วยจะมีอาการได้ก่อนอายุ 20 ปี (Lerner. 1959; Halder. 1997) อุบัติการณ์การเกิดโรคพบได้ 0.5 ถึง 2 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นกับแต่ละชนชาติ (Lerner ;& Nordlund 1978) และไม่แตกต่างกันในเพศหญิงและชาย ส่วนสาเหตุของการเกิดโรคต่างขายังไม่ทราบแน่ชัด มีทฤษฎีต่างๆที่อธิบายถึงสาเหตุและพยาธิกำเนิดในการลดลงของเซลล์สร้างเม็ดสี ได้แก่

1. ทฤษฎีด้านพันธุกรรม (Genetic theory)

มีการค้นพบยีนที่เป็นตัวควบคุมหรือมีแนวโน้มที่จะเกิดโรคต่างขาเมื่อได้รับปัจจัยจากภายนอกที่มากกว่าต้น (Nath, Majumder; et al. 1994) โดยสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมโดยเฉพาะโรคต่างขาที่เกิดก่อนอายุ 30 ปี ซึ่งมีการค้นพบรูปแบบทางพันธุกรรมที่หลากหลายในการอธิบายการเกิดโรคดังกล่าว

2. ทฤษฎีออโตอิมมูน (Autoimmune theory)

ในโรคต่างขาได้มีการค้นพบแอนติบอดีต่อเซลล์สร้างเม็ดสี (Antimelanocyte Autoantibodies) พบว่าโรคต่างขามีความสัมพันธ์กับโรคออโตอิมมูนหลายชนิด เช่น โรค Thyroiditis, Pernicious anemia, Addison's disease, Diabetes Mellitus, Localized scleroderma, Alopecia areata, Myasthenia gravis, Pemphigus vulgaris, Halo nevus และ Malignant melanoma (Bystryn ;& Naughton. 1985; Bystryn. 1997)

3. ทฤษฎีความเป็นพิษต่อเมลานิน (Theory of autotoxic melanocyte)

มีการค้นพบว่าสารสังเคราะห์ตัวกลาง (Intermediate metabolize) ในขั้นตอนการสร้างเมลานิน (Melanin synthesis) เป็นพิษต่อเมลานินเอง และมีการค้นพบว่ามีสารอนุมูลอิสระ หรือสารจากภายนอกเป็นพิษต่อเมลานิน ทำให้เกิดรอยโรคต่างขา (Riley. 1969)

4. ทฤษฎีของระบบประสาท (Neuronal Theory)

เชื่อว่าสารเคมีบางอย่างที่ออกมาจากระบบประสาท (Neurochemical mediator) เป็นสาเหตุให้การสร้างเมลานินลดลง (Al'Abadie, Senior; et al. 1994) หรือ เกิดมาจากเซลล์ประสาทซึ่งเป็น

เซลล์ต้นกำเนิดเดียวกันกับเมลานินไซท์มีความผิดปกติไปทำให้เซลล์เมลานินไซท์เจริญผิดปกติ (Reedy, Faraco; et al. 1998)

5. ทฤษฎีทำลายตัวเอง (Self destructive Theory)

อธิบายถึงการที่เซลล์เมลานินไซท์มีการสูญเสียกลไกในการป้องกันตัวเองตามธรรมชาติ (Lerner. 1971) ทำให้เกิดการทำลายจากสารต่างๆจากภายนอก

6. ทฤษฎีด้านชีวเคมี (Biochemical theory)

มีการค้นพบสารชีวเคมีหลายอย่างที่เกิดจากการสร้างในปริมาณที่มากเกินไปจนทำลายเมลานินไซท์ในโรคต่างชาว (Schallreuter, Lemke; et al. 1994)

สาเหตุในการเกิดโรคต่างชาวนอกจากปัจจัยด้านพันธุกรรมและจากโรคออโตอิมมูนที่พบได้เป็นส่วนใหญ่แล้ว ชารอยเตอร์และคณะ (Schallreuter KU; et al. 2001) ได้พบว่า ในรอยโรคต่างชาวมียกระดับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระมากขึ้น โดยสารดังกล่าวจะทำลายเอนไซม์อะเซทิลโคลีน เอสเทอเรส (Acetylcholine Esterase Enzyme; AchE) ทำให้มีระดับของสารอะเซทิลโคลีน (Acetylcholine; Ach) มากขึ้นซึ่งการมีสารAch ที่เพิ่มขึ้นจะไปยับยั้งฤทธิ์ของเอนไซม์โดปออกซิเดส (Dopa oxidase enzyme) (ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยน dihydroxyphenylalanine ไปเป็น melanin ในเมลานินไซท์) ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสร้างเม็ดสีในรอยโรคต่างชาว (Rokos, Beazley; et al. 2002)

สาร Ach เป็นสารสื่อประสาทที่มีความสำคัญต่ออวัยวะต่างๆ นอกจากจะหลั่งออกมาจากปลายประสาทโคลิเนอร์จิก (cholinergic) ในระบบประสาทอัตโนมัติ (Autonomic nervous system) (Kurzen. 2004) แล้วยังพบว่ามีการแสดงออกของสาร Ach ตามเนื้อเยื่อต่างๆที่ไม่ใช่ระบบประสาท เช่น เยื่อบุผิวของผิวหนังและอวัยวะต่างๆ เยื่อบุหลอดเลือด เยื่อบุอวัยวะภายใน อวัยวะสืบพันธุ์ เยื่อบุช่องว่าง (Mesothelial) ต่างๆในร่างกาย เซลล์อิมมูน เซลล์ผู้ช่วยเซลล์ประสาท (glia cell) และเส้นใยกล้ามเนื้อ

จากที่กล่าวข้างต้นโรคต่างชาวน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับสารAch ที่อยู่บริเวณผิวหนังซึ่งในขณะนี้ยังมีความรู้ค่อนข้างน้อยเกี่ยวกับการแสดงออกของเอนไซม์ที่ใช้สร้างสาร Ach หรือ ChAT Enzyme โปรตีนที่นำพาสาร Ach เข้าสู่กระเปาะ (vesicles) เพื่อปล่อยสารAch จากเซลล์หรือ VAChT Protein และเอนไซม์ที่ควบคุมหรือยับยั้งฤทธิ์ของสาร Ach หรือ Ach Enzyme

ความมุ่งหมายของการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

1. เพื่อศึกษาถึงการแสดงออกของ เอนไซม์โคลีนอะเซทิลทรานสเฟอเรส (ChAT Enzyme) เอนไซม์ อะเซทิลโคลีน เอสเทอเรส (AChE Enzyme) และ โปรตีนเวสิคิวลาอะเซทิลโคลีนทรานสปอร์เตอร์ (VAChT Protein) ในผิวหนังส่วนต่างๆในรอยต่างขา ผิวหนังปกติในผู้ป่วยโรคต่างขาและผิวหนังปกติในคนปกติ

ความสำคัญของการวิจัย

มีหลายการศึกษาพบว่าสาเหตุของโรคต่างขาส่วนหนึ่งเกิดจากการที่มี oxidative stress ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยภายนอก หรือ ปัจจัยภายในร่างกาย กระตุ้นให้มีสารอนุมูลอิสระคือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไปเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและทำให้เกิดการสูญเสียฤทธิ์ของเอนไซม์อะเซทิลโคลีน เอสเทอเรส (Acetylcholine Esterase: AChE) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำลายสารอะเซทิลโคลีน (Acetylcholine: Ach) ทำให้มีระดับสาร Ach เพิ่มขึ้นในรอยต่างขา โดยสาร Ach นี้จะไปยับยั้งเอนไซม์ในการสร้างเม็ดสี ปัจจุบันมีหลักฐานมากมายในการค้นพบระบบโคลิเนอร์จิก (cholinergic system) ที่บริเวณผิวหนัง ซึ่งเป็นระบบที่สำคัญเกี่ยวกับการเจริญและการแบ่งตัวของเซลล์ การเกิดหลอดเลือดใหม่ การหลั่งเหงื่อ การสื่อสารสัญญาณระหว่างเซลล์ และขบวนการ apoptosis ของเซลล์ มีการค้นพบสาร Ach เอนไซม์โคลีนอะเซทิลทรานสเฟอเรส (Choline Acetyltransferase: ChAT) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สาร Ach เอนไซม์อะเซทิลโคลีน เอสเทอเรส (Acetylcholine Esterase:AChE) ที่ทำลายสาร Ach และ โปรตีนเวสิคิวลาอะเซทิลโคลีนทรานสปอร์เตอร์ (Vesicular Acetylcholine Transporter Protein:VAChT) ที่แสดงออกบริเวณนิวเคลียสของเคอราติโนไซต์และเมลาโนไซต์ โดยมีหน้าที่ในการนำพาสาร Ach

เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาถึงระดับโมเลกุลและการแสดงออกของระบบโคลิเนอร์จิกที่ผิวหนังในรอยโรคต่างขาดังนั้นการทราบถึงการแสดงออกของระบบโคลิเนอร์จิกที่เกี่ยวข้องเช่น เอนไซม์ ChAT, AChE และโปรตีน VAChT ในบริเวณชั้นผิวหนังของรอยโรคต่างขาตำแหน่งต่างๆอาจทำให้ค้นพบหลักฐานหรือสมมุติฐานใหม่ของการเกิดโรคต่างขาและนำไปสู่การพัฒนาค้นคว้าวิจัยและแนวทางการรักษาใหม่ๆในอนาคต

ขอบเขตของการวิจัย

เป็นการศึกษาถึงการแสดงออกระดับเซลล์ของโปรตีนในระบบโคลิเนอร์จิก ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคต่างขาที่มีผื่นตามลำตัวและแขนขา จำนวน 11 คน ที่มารับการตรวจที่ศูนย์ผิวหนัง มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และอาสาสมัครที่มีผิวหนังปกติ จำนวน 3 คน

สมมุติฐานในการวิจัยและกรอบแนวคิดของแผนงานวิจัย (Conceptual framework)

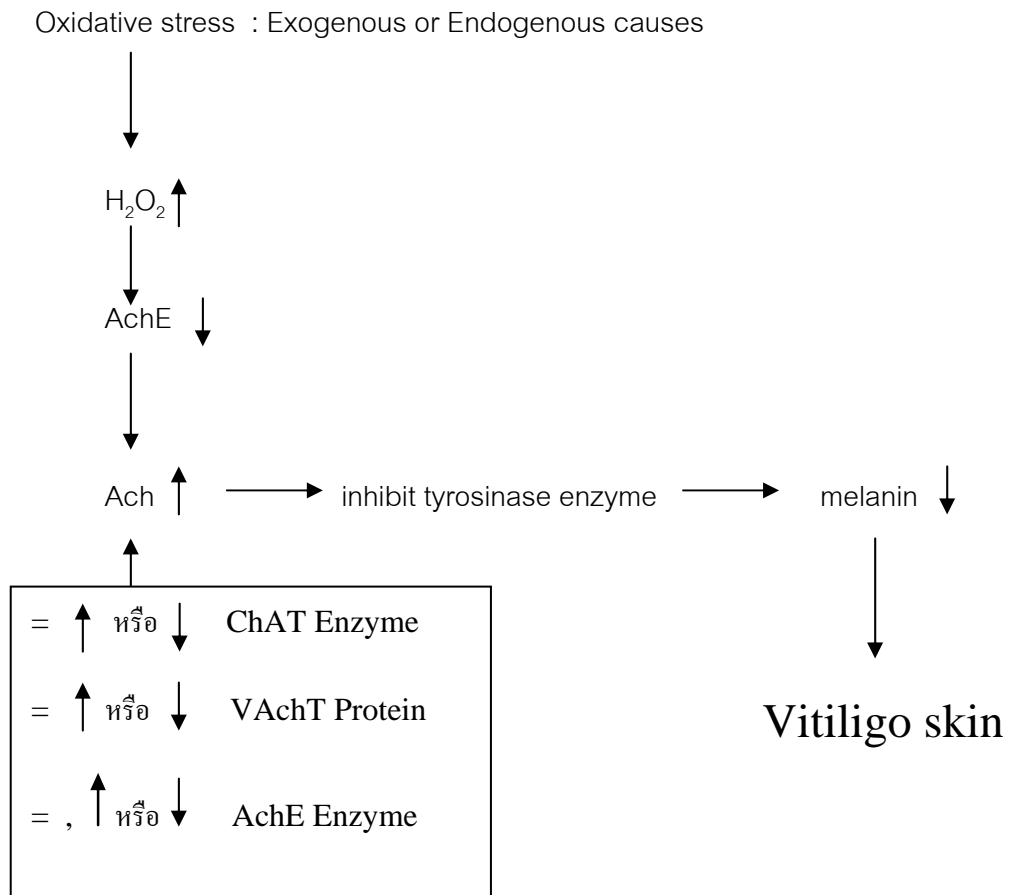
ถ้ากลไกหนึ่งในการเกิดโรคต่างชาวมักเกิดจากการที่มีระดับของสาร Ach ที่เพิ่มขึ้นจริง ดังนั้น

1. ถ้าการแสดงออกของ ChAT มากขึ้นในโรคต่างชาวมักแสดงว่าน่าจะมีปัจจัยใดมากระตุ้นให้มีการเพิ่มขึ้นของ ChAT ทำให้มีการสร้างสาร Ach มากขึ้น และ ถ้ามีการแสดงออกของ ChAT มากขึ้นที่บริเวณใดของผิวหนังอาจบ่งบอกถึงบริเวณที่เป็นต้นกำเนิดในการเกิดโรค

2. ถ้าการแสดงออกของ AchE ลดลงในโรคต่างชาวมักทำให้มีการทำลายของสาร Ach ลดลง ซึ่งอาจเป็นผลมาจาก oxidative stress หรือปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องและ ถ้ามีการแสดงออกของ AchE ลดลงที่บริเวณใดของผิวหนังอาจบ่งบอกถึงบริเวณที่เกิดโรคมากกว่าที่บริเวณอื่น

3. ถ้าการแสดงออกของ VAChT มากขึ้นในโรคต่างชาวมักแสดงว่าน่าจะมี ปัจจัยใดมากระตุ้นให้มีการเพิ่มขึ้นของ VAChT ทำให้มีการเก็บสาร Ach มากขึ้นและทำให้ทราบว่ามีการเก็บสาร Ach ไว้ในรูปของกระเปาะ (vesicles) จริงในบริเวณเซลล์เมลานोไซต์ และ ถ้ามีการแสดงออกของ VAChT มากขึ้นที่บริเวณใดของผิวหนังอาจบ่งบอกถึงบริเวณที่เกิดโรคมากกว่าที่บริเวณอื่น

กรอบแนวคิดของแผนงานวิจัย (Conceptual framework)



โดยศึกษาเปรียบเทียบ แนวโน้มการแสดงออกของ **ChAT, AchE Enzyme** และ **VAchT Protein** ในผิวหนังชั้นต่างๆในรอยต่างชาวมelanin ในผู้ป่วยโรคต่างชาวมelanin และผิวหนังในคนปกติ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. โรคต่างขาว (vitiligo)
2. ระบบโคลิเนอร์จิก (Cholinergic system)
3. อิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (Immunohistochemistry)

1. โรคต่างขาว (vitiligo)

โรคต่างขาวเป็นโรคผิวหนังที่เกิดจากการทำลายของเซลล์สร้างเม็ดสี (melanocyte) ทำให้เกิดรอยโรคเป็นผื่นขอบเขตชัดเจนและเส้นขนบริเวณผื่นอาจพบว่ามี การเปลี่ยนแปลงเป็นสีขาวร่วมด้วย รอยผื่นสีขาวมักไม่แสดงอาการอื่นและมักจะไม่มีผลต่ออายุขัยของผู้ป่วยแต่จะมีผลด้านความสวยงาม สังคม และจิตใจ

1.1 ระบาดวิทยา (Epidemiology)

โรคต่างขาวเป็นโรคที่เกิดในช่วงแรกของชีวิตและพบอุบัติการณ์ในการเกิดโรคประมาณ 0.5 – 2 เปอร์เซ็นต์ของประชากรโลก (Lerner ;& Nordlund. 1978) ซึ่งความชุกของโรคขึ้นอยู่กับเชื้อชาติโดยพบในชนชาติญี่ปุ่น 2 เปอร์เซ็นต์ สหรัฐอเมริกา 1 เปอร์เซ็นต์ และ รัสเซีย 0.14 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น (Nordlund ;& Majumder. 1997) ผู้ป่วยส่วนใหญ่มักเริ่มเป็นโรคต่างขาวก่อนอายุ 20 ปี มีอัตราส่วนของเพศหญิงมากกว่าเพศชายในโรคต่างขาวที่พบในเด็ก แต่ไม่แตกต่างกันในผู้ใหญ่

1.2 อาการแสดงทางคลินิก (Clinical manifestation)

โรคต่างขาวจะมีลักษณะผื่นราบสีขาวไม่มีการกระจายของเม็ดสีในผื่น ขอบเขตชัดเจน โดยระยะเริ่มแรกของรอยโรคมักจะมีขนาดเล็ก ต่อมาอาจจะมารวมกันใหญ่ขึ้นจนกลายเป็นผื่นขาวใหญ่ (ภาพประกอบ 1) รอยโรคมักพบมากตามใบหน้า หลังมือ ข้อมือ รักแร้ หรือรอบสะดือ สำหรับรอยโรคตามรอบตา จมูก ปาก ห้วนม สะดือ และอวัยวะเพศ การดำเนินของโรคและการรักษามักขึ้นกับชนิดของโรคต่างขาว



ภาพประกอบ1 แสดงลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรคต่างขา (Goudie, Wilkieson ;et al.1983)

โรคต่างขาแบ่งตามลักษณะการกระจายตัวของโรคดังนี้ (Bleehen, Pathak ;et al. 1968)

1.2.1 รอยโรคต่างขาที่เกิดเฉพาะที่ (Localized)

1.2.1.1 Focal type มีรอยโรคจำนวนหนึ่งวงหรือมากกว่าเล็กน้อยในบริเวณใดบริเวณหนึ่งของร่างกาย

1.2.1.2 Segmental type รอยโรคเกิดเรียงในแนวเส้นประสาทที่ไปเลี้ยงผิวหนังบริเวณรอยโรค (Dermatome)

1.2.2 รอยโรคต่างขาที่เกิดกระจายทั่วตัว (Generalized)

1.2.2.1 Acrofacial type รอยโรคเกิดบริเวณหน้าและปลายแขน ขา

1.2.2.2 Vulgaris type รอยโรคกระจายสองข้างของร่างกายโดยอาจสมมาตร (Symmetry) หรือไม่ก็ได้ (Asymetry)

1.2.2.3 Universal type รอยโรคกระจายมากเกือบทั่วตัว

1.2.3 Mixed type รอยโรคที่มีลักษณะผสมของ Segmental type และ Acrofacial type

1.3 สาเหตุการเกิดโรค (Etiology)

ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีหลายทฤษฎีที่พยายามอธิบายถึงการเกิดโรคได้แก่

1.3.1 ทฤษฎีด้านพันธุกรรม (Genetic theory)

โรคต่างขามียีนที่ควบคุมการเกิดโรคหรือมีแนวโน้มให้เกิดโรคเมื่อได้รับปัจจัยภายนอกมากระตุ้น โรคต่างขาที่เกิดขึ้นในเด็กมักพบว่ามีประวัติพันธุกรรมในการเกิดโรคในครอบครัว มีการศึกษาใน Bangalore ในประเทศอินเดีย พบว่าในชุมชนที่มีการแต่งงานกันเองในครอบครัวที่มีโรคต่างขา พบการเกิดโรคต่างขาในประชากรถึง 20 % และพบว่าในโรคต่างขาชนิด non segmental จะเริ่มเกิดในวัยเด็ก และมีประวัติครอบครัวเป็นโรคต่างขา (Hann ;& Lee. 1996) มีทฤษฎีรูปแบบของพันธุกรรม (Genetic model) ได้ถอดรหัสพันธุกรรมในครอบครัวที่เป็นโรคต่างขา แบ่งได้เป็น Multifactorial model (Goudie, Wilkieson; et al. 1983) dominant model with incomplete remutation (Hafez, Sharaf; et al. 1983) และ multilocular recessive model (Majumder, Das; et al. 1988) โดยแต่ละ model อาจจะเกี่ยวข้องกันกับอายุที่เริ่มเป็นโรค (Arcos-Burgos, Parodi; et al. 2002) โดยใน dominant model มักอธิบายในคนไข้ที่เกิดโรคต่างขาก่อนอายุ 30 ปี แต่ในคนที่เกิดโรคต่างขาลังอายุ 30 ปี มักถ่ายทอดพันธุกรรมแบบ multilocular recessive model ซึ่งในกลุ่มนี้มักจะมีประวัติการสัมผัสสารเคมีในสิ่งแวดล้อม ยิ่งกว่านั้นได้มีการค้นพบ specific HLA haplotype จะมีความสัมพันธ์กัน ในครอบครัวที่เป็นโรคต่างขา ระดับความรุนแรงของโรคที่ใกล้เคียงกัน อายุที่เริ่มเป็นและโรคต่างขาในแต่ละชนชาติ (Finco, Cuccia; et al. 1991; Ando, Chi; et al. 1993; Zamani, Spaepen; et al. 2001) ยกตัวอย่างเช่นในคนที่เกิดโรคต่างขาที่มีการแสดงออกของยีนที่หลากหลาย (gene polymorphism) ในตำแหน่งของ MHC class II ในตำแหน่งบน HLA พบว่ามักสัมพันธ์กับโรคทางอิมมูน เช่น โรคเบาหวานชนิดที่หนึ่งอินซูลิน (type1 DM) และโรครูมาตอยด์ในเด็ก (Juvenile-onset rheumatoid arthritis) อีกตัวอย่างหนึ่งของระบบ HLA gene ที่เกี่ยวกับโรคต่างขาแต่ละเชื้อชาติ เช่น โรคต่างขาในชนผิวขาวที่เริ่มเป็นก่อนอายุ 30 ปี มักมี HLA gene ที่สร้างที่เอพี-1 (Transporter associated with antiaging- processing) และ subunit ของ immunoproteasome (LMP2/LMP7) (Casp, She; et al. 2003) ในโรคต่างขาที่สัมพันธ์กับโรคทางอิมมูนมักมีความผิดปกติของยีน CTLA-4 (cytotoxic lymphocyte Antigen -4) ที่สร้างโปรตีนยับยั้ง activated T cell ที่ทำหน้าที่ไม่เหมาะสม (Blomhoff, Kemp; et al. 2005) และในโรคต่างขาชนิดที่เกิดเฉพาะมือ เท้า และหน้า (acrofacial vitiligo) มักมีความผิดปกติของยีนที่สร้างเอนไซม์ COMT (catechol-o-methyl transferase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการเมตาบอลิซึมของสารพิษ ยาต่างๆ สารสื่อประสาท เมื่อมีการขาดเอนไซม์ COMT จะทำให้มีการเพิ่มขึ้นของสารเมตาโบไลต์คือ o-quinone ในขบวนการสร้างเมลานิน (melanin synthesis) ทำให้เกิดรอยต่างขาได้ (Tursen, Kaya; et al. 2002) อีกตัวอย่างของการค้นพบความผิดปกติของยีนเช่นในชาวอเมริกาเหนือและชาวอังกฤษผิวขาวที่เป็นโรคต่างขาชนิดกระจายทั่วตัวมักมีการแสดงออกของโครโมโซม 1P31 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ง่ายต่อการเกิดอิมมูน (AIS1; autoimmune susceptibility locus) (Fain, Gowan; et al. 2003)

1.3.2 ทฤษฎีออโตอิมมูน (Autoimmune Theory)

มีหลายการศึกษาเชื่อว่าโรคต่างชาวมักมีความสัมพันธ์กับโรคออโตอิมมูนโดยเป้าหมายของอิมมูนอยู่ที่ เซลล์สร้างเม็ดสีหรือ melanocyte (Ortonne ;& Bose. 1993) ซึ่งมีหลักฐานยืนยันคือ

1.3.2.1 โรคต่างชาวมักเกิดร่วมกับโรค Thyroiditis, Pernicious anemia, Addison's disease, Diabetes Mellitus, localized scleroderma, alopecia areata, Myasthenia gravis, pemphigus vulgaris และ halo nevus ซึ่งมีหลักฐานยืนยันการค้นพบออโตแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลิน ต่อหมวกไต เซลล์หลังกรดในกระเพาะอาหาร (parietal cell) เซลล์ประสาท (nervous cell) และ Malignant melanoma (Bystryń ;& Naughton. 1985; Bystryń. 1997)

1.3.2.2 การรักษาบางอย่าง เช่น การฉายแสง PUVA การทำ steroid และ cytotoxic drug หรือยากดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressors) พบว่าได้ผลในการรักษาโรคต่างชาวมักเกิดร่วมกับโรคออโตอิมมูน โดยเทคนิคในการตรวจหาแอนติบอดีมีหลายอย่างเช่น immunoprecipitation ของ melanocyte-surface antigens, indirect immunofluorescence (Naughton, Eisinger; et al. 1983; Bystryń ;& Naughton. 1985), complement-dependent cytotoxicity (Cui, Arita; et al. 1993; Yu, Kao; et al. 1993) , antibody dependent cellular cytotoxicity (Brostoff. 1969), immunoblotting และ ELISA (Brown, Olkowski; et al. 1977; Harning, Cui; et al. 1991; Gilhar, Zelickson; et al. 1995) ในทฤษฎีออโตอิมมูนจะพบว่าที่บริเวณรอยโรคต่างชาวมักจะมีชนิดของอิมมูน humoral และ/หรือ อิมมูน cellular โดยอาจพบได้ทั้ง T cell และ T suppressor cell โดยยังไม่มียารายงานใดระบุแน่ชัดว่ามีลักษณะใดเด่นกว่ากัน (Ortonne ;& Alario. 1978; Soubiran, Benzaken; et al. 1985; Grimes, Ghoneum; et al. 1986; Durham-Pierre, Walters; et al. 1995) มีการค้นพบว่าอุบัติการณ์และระดับของแอนติบอดีต่อแอนติเจนในบริเวณของผิวของเมลานোসัยต์จะสัมพันธ์กับความรุนแรงของรอยโรค โดยสามารถตรวจสอบระดับแอนติบอดีได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ในโรคต่างชาวมักเกิดร่วมกับโรคออโตอิมมูนน้อยกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวของร่างกาย (Body surface area) แต่จะพบระดับแอนติบอดีได้ถึง 93 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยที่มีรอยโรคมากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวร่างกาย (Naughton, Reggiardo; et al. 1986) โดยที่ระดับของแอนติบอดีต่อเมลานোসัยต์ลดลงหลังจากได้รับการรักษาด้วยการฉายแสง PUVA หลักฐานนี้ยืนยันว่าระดับแอนติบอดีสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคต่างชาวมักเกิดร่วมกับโรคออโตอิมมูน

1.3.3 ทฤษฎีความเป็นพิษต่อเมลานোসัยต์ (Theory of autotoxic melanocyte)

ทฤษฎีนี้มาจากการทดลองและสังเกตพบว่าสารฟีนอล (phenol) และสารอนุพันธ์ของฟีนอล (phenol derivatives) มีผลต่อการสร้างเม็ดสีของเมลานোসัยต์ (Lerner ;& Nordlund. 1978) บ्लीเฮน และคณะ (Bleehen, Pathak; et al. 1968) พบว่าการได้รับสารที่มีส่วนประกอบของฟีนอลหรือสารอนุพันธ์อิสระ

จะทำให้มีการทำลายต่อเมลาโนไซต์ ต่อมา ไรเลย์และคณะ (Riley. 1969) พบว่ารอยโรคในผู้ป่วยโรคต่างขาบบางรายมีการตรวจพบยีนที่ช่วยให้ง่ายต่อการสะสมของระดับสารฟีนอลซึ่งเป็นสารพิษ ทำให้มีการทำลายของเมลาโนไซต์ในผิวหนังกำพืดและหนังแท้ในระดับ papilla และทำให้การเจริญของเมลาโนไซต์ผิดปกติอีกด้วย

ในขบวนการสร้างเมลานินพบว่าเมลาโนไซต์มีกลไกในการป้องกันตนเองจากสารพิษภายนอกโดยจะมีการสร้างสาร dopa, dopaquinone และ 5,6 – dihydroxyindole เพื่อใช้ป้องกันสารพิษจากภายนอก เมื่อมีการสูญเสียของขบวนการสร้างสารที่ปกป้องตนเองก็จะทำให้เกิดการทำลายเซลล์สร้างเม็ดสีในรอยโรคต่างขาบ (Lerner. 1971)

1.3.4 ทฤษฎีระบบประสาท (Neuronal theory)

เมลาโนไซต์เป็นเซลล์ที่เจริญมาจากเซลล์ต้นกำเนิดเช่นเดียวกับระบบประสาทหรือ neural crest ดังนั้นขบวนการทำลายของเมลาโนไซต์อาจจะเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของระบบประสาท (Barnes. 1988) สมมุติฐานที่สำคัญของรอยโรคต่างขาบมีความเกี่ยวข้องกับโรคทางระบบประสาทส่วนกลางบางชนิดเช่นโรค Neurofibromatosis โรค Tuberous sclerosis โรคติดเชื้อแบคทีเรียบางชนิดเช่นซิฟิลิส โรคเรื้อน การติดเชื้อในสมองอักเสบจากไวรัส (viral encephalitis) และโรค Multiple sclerosis พบว่ามีผลต่อการสร้างเม็ดสีของผิวหนังและความผิดปกติของระบบประสาท ซึ่งรอยโรคต่างขาบอาจจะเรียงตัวตามแนวเส้นประสาทมากกว่าหรือเท่ากับหนึ่งตำแหน่ง (Lerner. 1971; Barnes. 1988)

1.3.5 ทฤษฎีทางชีวเคมี (Biochemical theory)

มีหลักฐานหลายอย่างที่สนับสนุนทฤษฎีทางชีวเคมีกับการเกิดโรคต่างขาบ เช่น จากการศึกษาของ ชารอยเตอร์และคณะ (Schallreuter, Lemke; et al. 1994) พบว่าลักษณะการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของโรคต่างขาบภายใต้การส่อง wood's lamp อาจเกิดจากการสะสมของสาร pteridine ในรูป oxidize form 2 ชนิดคือ 6-biopterine ซึ่งจะเรืองแสงสีแดง และ 7-biopterine ซึ่งจะเรืองแสงสีเหลืองเขียว ในปี 1997 ไลและคณะ (Lei, Woodworth; et al. 1997) ได้ค้นพบสาร 6BH₄ ในเมลาโนไซต์และเคอราติโนไซต์ ซึ่งเป็น co-factor ในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ phenylamine-hydroxylase และใช้ในการสร้าง L-tyrosine จาก L-phenylalanine โดยพบว่าจะมีการสะสมของสาร 6BH₄ และ 7 BH₄ มากขึ้นในรอยโรคต่างขาบ ซึ่งในรายงานปัจจุบันพบสาเหตุที่เพิ่มขึ้นของ 6BH₄ น่าจะมาจากได้มีการค้นพบเอนไซม์ GTP-cycle-hydralase 1 ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการสังเคราะห์ 6BH₄ มากขึ้นหรืออาจจะมีผลของความผิดปกติของการกำจัด 6BH₄ โดยมีฤทธิ์ของ 4a-OH tetra-hydropterine (4a-OH-BH₄) ลดลง ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ 7BH₄ และ H₂O₂ ในชั้นหนังกำพืด ซึ่ง 7BH₄ จะยับยั้งเอนไซม์ phenylalanine hydroxylase ทำให้มีความผิดปกติของการสังเคราะห์เมลานิน

จากหลักฐานข้างต้นคูเซนและคณะ (Kurzen; et al.) ได้ค้นพบสาร Ach ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ในหลายๆตำแหน่งของผิวหนัง (Extraneuronal acetylcholine) โดยจะออกฤทธิ์ต่อเซลล์ข้างเคียง ทำหน้าที่เป็นทั้ง autocrine, paracrine และ endocrine โดยจะมีรีเซพเตอร์ที่บริเวณผิวหนังคือ nicotinic receptors (nAch-R) และ muscarinic receptors (mAch-R) นอกจากนี้ยังมีการค้นพบ AchE enzyme ซึ่งทำหน้าที่สลายสาร Ach ในบริเวณนั้นๆร่วมด้วย (Schallreuter, Elwary; et al. 2004) โดยกลไกการเกิดโรคต่างขาวมีสมมุติฐานหนึ่งเชื่อว่าเมื่อเซลล์ผิวหนังสัมผัสกับแสงอัลตราไวโอเล็ตจะเกิดการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่สามารถทำลายเอนไซม์ AchE ทำให้เกิดการคั่งของระดับสาร Ach ซึ่งสาร Ach จะยับยั้งฤทธิ์ของ dopaoxidase enzyme ที่ใช้ในการสังเคราะห์เมลานินของเมลานোসัยต์ จึงทำให้เกิดโรคต่างขาว (Schallreuter, Moore; et al. 1999)

1.4 กลไกในการสร้างเม็ดสีในโรคต่างขาว (Mechanism of Repigmentation of vitiligo)

ในผู้ป่วยโรคต่างขาวบางรายพบว่าสามารถเกิดความเข้มของสีผิวบนรอยโรคได้เองโดยที่ผู้ป่วยส่วนใหญ่มักจะมีการสูญเสียของเมลานোসัยต์อย่างถาวร พบว่ามีผู้ป่วยประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ที่สามารถมีความเข้มสีผิวบนรอยโรคได้หลังได้รับการรักษาด้วย photochemotherapy การเกิดการสร้างเม็ดสีมักมีการเคลื่อนที่ของเมลานোসัยต์ มาจากรอบๆรูขุมขนในส่วนรากผมส่วนนอก (outer root sheath) ของรูขุมขนในส่วนของชั้น basal layer ของผิวหนังที่ติดกับชั้น basement membrane (Le Poole, Das; et al. 1993; Ortonne ;& Bose. 1993; Parsad, Pandhi; et al. 2004) หรือการสร้างเม็ดสีอาจจะเกิดจากบริเวณรอยโรคที่ยังหลงเหลือเมลานোসัยต์ (ซึ่งพบได้น้อยกว่า) แต่ขบวนการ การเคลื่อนที่ของเมลานোসัยต์นั้นสลับซับซ้อนซึ่งกลไกยังไม่แน่ชัด แต่เชื่อว่าน่าจะเกิดจากผลของสารบางอย่าง (Mediators) ที่ช่วยให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดสี (pigment cell) ร่วมกับปฏิกิริยาของเมลานোসัยต์กับ extracellular matrix molecules และ cell surface molecules (Grichnik, Ali; et al. 1996) มีการศึกษาพบว่ามีสารเคมีบางอย่างเช่น 6FGF, leukotriene, endothelial-1 และ stem cell factor น่าจะมีฤทธิ์ต่อการเคลื่อนที่ของเมลานোসัยต์ (Horikawa, Norris; et al. 1995) และพบว่าการเคลื่อนที่แบบเมลานোসัยต์ มักเป็นแบบสุ่มๆ และไม่เป็นระเบียบ ในภาวะผิวหนังปกติ ผิวของเมลานোসัยต์จะมี $\alpha v\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ integrin receptors และ การเคลื่อนที่ของเมลานোসัยต์ในรอยโรคต่างขาวจะพบว่ามียกระดับของ matrix of collagen 4 มากขึ้นและจะมีแอนติบอดีต่อ $\alpha v\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ integrin receptors บนผิวเมลานোসัยต์ (Norris, Horikawa; et al. 1994)

1.5 ลักษณะทางจุลพยาธิ (Histology)

บริเวณรอยโรคต่างขาวในระยะเริ่มแรกจะพบปริมาณเมลานোসัยต์เล็กน้อย เมื่อการดำเนินโรคมากขึ้นจะพบว่าการหายไปของเมลานোসัยต์ โดยบริเวณขอบของรอยโรคมักพบเมลานোসัยต์ขนาดใหญ่ที่มี

เดนไดรติก (dendritic) ที่มีเมลานินสะสมยื่นยาวออกไป จะมีการอักเสบโดยมีการชุมนุมของเซลล์ลิมโฟไซต์และฮิสติโอไซต์ ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงแบบแวคคูลูโอลา (vacuolar degeneration) กระจายเป็นหย่อมๆตามชั้น basal layer ซึ่งจะพบบริเวณขอบๆของรอยโรค การสร้างผิวหนังใหม่ในรอยโรคต่าง ๆ จะเกิดขึ้นเด่นที่บริเวณรอบๆรูขุมขน รูปแบบความเข้มของสีผิวอาจเกิดแบบกระจายหรือตามขอบรอยโรคหรือเกิดร่วมกันขึ้นอยู่กับวิธีการรักษา

1.6 การรักษา (Treatment)

วิธีการรักษาโรคต่างขาวในเด็กและผู้ใหญ่ไม่แตกต่างกัน (ตาราง 1)

ตาราง 1 แสดงวิธีการรักษาโรคต่างขา (Grimes. 1993)

การฉายา	การผ่าตัด	การรักษารวม /การรักษา ทางเลือก
Repigmentation		
Oral PUVA	Autologous Punch Grafts	Broad-spectrum Sunscreens
Topical PUVA	Autologous Suction Blister Grafts	Cosmetic camouflage
Corticosteroids	Pure Melanocyte Cultures	Dermablend
Khellin	Thiersch Grafts	Lydia O'Leary
Tar Emulsions	Micropigmentation (Tattooing)	Clinique
Melagenina	Dermabrasion / 5-Fluorouracil	Fashion Fair Stains
Anapsos		Vitadye
Clofazimine		Chromelin
Cyclophosphamide		Self-tanning Lotions
Cyclosporine		Psychological Counseling
Isoprinosine		
Copper		
UVB Phototherapy		
Vitamin E and PUVA		
Minoxidil and PUVA		
Vitamin D Analogues		
Phenylalanine+UVA		
Pseudocatalase		
Levamisole		
Suplatast tosilate		
Depigmentation		
Monobenzyl Ether of		
Hydroquinone		

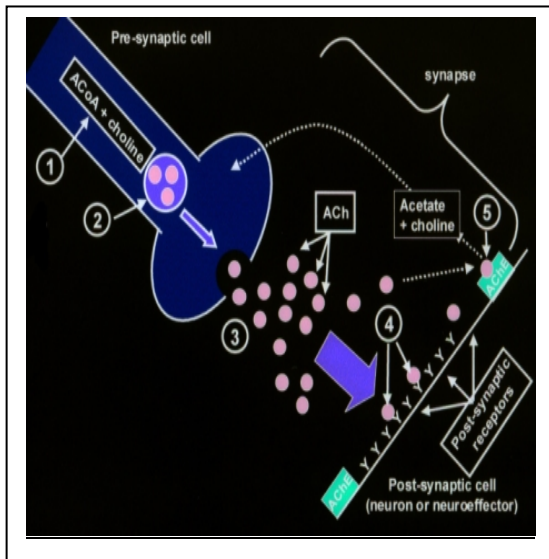
2. ระบบโคลิเนอร์จิก (Cholinergic system)

2.1 สารอะเซทิลโคลีน (Acetylcholine: Ach)

สาร Ach เป็นสารสื่อประสาทในระบบประสาทส่วนกลาง (CNS system) และ ระบบประสาทส่วนปลาย (PNS system) หรือเรียกว่า neuronal acetylcholine ปัจจุบันมีการค้นพบว่าสาร Ach สามารถพบได้ตามอวัยวะหรือระบบอื่นๆ นอกเหนือจากระบบประสาทในมนุษย์หรือเรียกว่า non-neuronal acetylcholine

สาร Ach จะถูกสังเคราะห์มาจากสาร choline และ Acetyl CoA โดยอาศัยเอนไซม์ Choline acetyltransferase (ChAT enzyme) โดยกระบวนการสังเคราะห์สาร Ach จะอาศัยสาร Acetate ที่มาจาก Acetyl CoenzymeA โดย CoenzymeA จะมีหน้าที่นำพา acetate โดยจะมีพันธะ covalent กับ acyl group ใน acetate (ดังภาพประกอบ 2)

สาร Acetyl CoenzymeA ส่วนมากจะถูกสังเคราะห์ในไมโทคอนเดรีย โดยอาศัยเอนไซม์ pyruvate dehydrogenase ซึ่งจะทำหน้าที่สร้างพลังงานใน Krebs cycle แต่ใน cholinergic cells จะผ่าน mitochondrial membrane ไปยังไซโตพลาสซึมโดยจะทำปฏิกิริยากับสาร choline โดยอาศัย เอนไซม์ ChAT (choline acetyl transferase) (เป็นเอนไซม์ที่สังเคราะห์ใน rough endoplasmic reticulum ของ cholinergic cells ซึ่งจะ transport ไปตาม axon terminal เมื่อ ต้องการสังเคราะห์สาร Ach) ได้เป็นสาร Ach และ CoenzymeA จากนั้นสาร Ach จะถูกนำไปเก็บในกระเปาะ (vesicles) รอการกระตุ้นจากสัญญาณประสาทต่อไป โดยสาร Ach จะมีรีเซพเตอร์ 2 ชนิดคือ นิโคตินิค (nicotinic) และ มัสคารินิก (muscarinic) รีเซพเตอร์ ซึ่งทั้งสองรีเซพเตอร์นี้จะแสดงออกตามอวัยวะเป้าหมายต่างๆ เช่น ในสมองระบบประสาทและกล้ามเนื้อ เซลล์เยื่อบุผิวตามระบบต่างๆ เช่น ระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร ระบบหัวใจและหลอดเลือด ระบบโลหิตและไขกระดูก ระบบทางเดินปัสสาวะ และระบบผิวหนัง เป็นต้น นอกจากนี้ สาร Ach ยังสามารถพบได้ตามเซลล์ต่างๆ เช่น เซลล์เม็ดเลือด เกร็ดเลือด glial cells เซลล์เมลานोไซต์ และ เซลล์เคอราติโนไซต์ เป็นต้น



ขบวนการสังเคราะห์สาร Ach

1. การสังเคราะห์ สาร Ach จาก acetyl CoA และ choline
2. การเก็บสาร ACh ใน synaptic vesicles
3. การปล่อยสาร Ach (การหลอมรวมระหว่าง synaptic vesicle กับ presynaptic membrane และหลั่งสาร ACh ไปยัง synapse)
4. การออกฤทธิ์ของสาร ACh เกิดจากการจับกันระหว่าง สาร ACh กับรีเซพเตอร์ (nicotinic และ muscarinic)
5. สาร ACh จะถูกทำลายด้วยเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) ที่อยู่ในบริเวณ synaptic cleft กลายเป็นสาร choline และ acetate

ภาพประกอบ 2 แสดงขบวนการ Neuronal Cholinergic Pathway (Bravo ;& Parsons. 2002)

2.2 Storage organelles

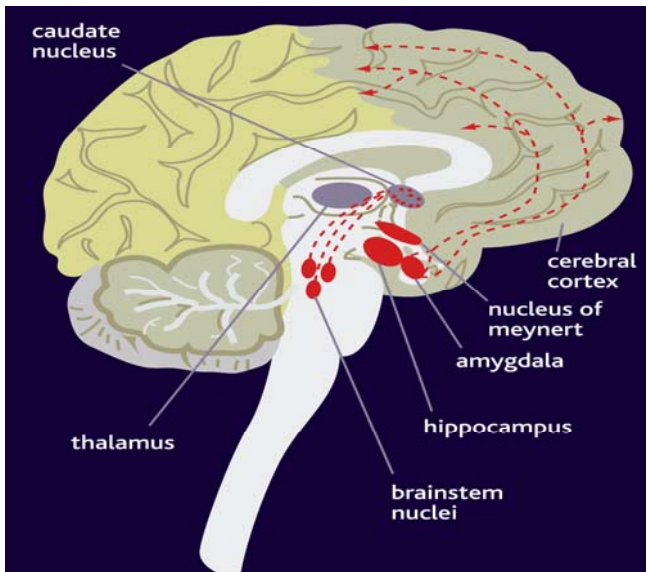
บริเวณปลายประสาท สาร Ach จะถูกเก็บในกระเปาะ (vesicles) โดยอาศัย vesicular acetylcholine transporter (VAChT) protein (Anderson. 1998) VAChT เป็น vesicular transporter ชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่นำพาสารสื่อประสาทมาเก็บไว้ที่ synaptic vesicles โดยอาศัยการแลกเปลี่ยนประจุโปรตอน (Bravo ;& Parsons. 2002) มีการศึกษาด้าน immunohistochemistry ของ VAChT ใช้ในการตรวจหา cholinergic neuron (Schafer, Weihe; et al. 1995; Gilmore, Nash; et al. 1996; Arvidsson, Riedl; et al. 1997; Schafer, Eiden; et al. 1998) มีบางการศึกษานอกจากจะพบ VAChT ใน cutaneous nerve แล้วยังสามารถพบทั้งใน epidermal melanocytes และ keratinocytes และพบสาร Ach และ choline ใน non-neuronal เช่นที่ epidermis ไม่แตกต่างจาก neuronal pathway

2.3 การหลั่งสารอะเซทิลโคลีน (acetylcholine: Ach)

ในระบบประสาทการปล่อยสาร Ach สัญญาณไฟฟ้าที่ส่งต่อมาทางประสาทเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมอิสระ (free calcium) ในไซโตพลาสซึม vesicles ที่บริเวณปลายประสาทจะเคลื่อนที่มาสัมผัสกับ presynaptic membrane และ สาร Ach ที่เก็บอยู่ใน vesicle จะถูกปล่อยออกมาถึง synaptic cleft ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่ใน extracellular space (Monck ;& Fernandez. 1994) แต่ขบวนการปลดปล่อยของสาร Ach จาก non-neuronal cell อื่นๆ เช่น จากเยื่อต่างๆ

และผิวหนัง ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ได้มีการค้นพบว่าสาร Ach หลังจาก secretory granule หรือ endosome ของ epithelial cell มาเชื่อมต่อกับ cell membrane โดยแลกเปลี่ยนกับประจุไฟฟ้า (ionic transporters) และมีการค้นพบ ChAT gene ใน fibroblast (Erickson, Varoqui; et al. 1994) ซึ่งจะสร้าง VAChT protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญที่ช่วยในการหลั่งสาร Ach โดยอาศัยการเพิ่มขึ้นของระดับ intracellular calcium (Fischer, Lukasiewicz; et al. 1998; Hu, Park; et al. 1998; Tint, Slaughter; et al. 1998) เมื่อได้รับการกระตุ้นที่เหมาะสม สาร Ach จะถูกปล่อยออกจากกระเปาะบริเวณปลายประสาทจับกับ nicotinic หรือ muscarinic receptor ที่อวัยวะเป้าหมาย เรียกขบวนการนี้ว่า presynaptic และจะเกิดขบวนการ postsynaptic ตามมา ซึ่งการออกฤทธิ์ของสาร Ach ที่บริเวณ receptor นี้จะสั้นมาก (Brockdorff, Ashworth; et al. 1991; Cooper, Couturier; et al. 1991; Nada, Okada; et al. 1991) โดยมีเอนไซม์ AchE ช่วยควบคุมระดับของ สาร Ach

ระบบ Cholinergic ในระบบประสาท จะเกี่ยวข้องกับระบบประสาทส่วนกลาง ระบบประสาทอัตโนมัติ และ ระบบประสาทส่วนปลายและกล้ามเนื้อ โดยในระบบประสาทส่วนกลาง สาร Ach จะสร้างที่บริเวณ caudate nucleuse โดยจะส่งสัญญาณไปยังก้านสมอง และอีกตำแหน่งจะสร้างที่บริเวณ amygdala ซึ่งจะส่งสารสื่อประสาทไปยัง ส่วนต่างๆ ของสมองส่วนหน้า ทำหน้าที่เกี่ยวกับความจำ และการเรียนรู้ (ดังภาพประกอบ 3)



ภาพประกอบ 3 แสดงตำแหน่งที่สังเคราะห์ และ pathway ในการออกฤทธิ์ของสาร Ach ในระบบประสาท ส่วนกลาง (Erickson, Varoqui; et al. 1994)

ในระบบประสาทอัตโนมัติสาร Ach ส่วนใหญ่จะหลังจาก ปลายประสาท parasympathetic และ ส่วนน้อยจะหลังจากปลายประสาท sympathetic ทำหน้าที่ในระบบต่างๆเช่นระบบหัวใจและหลอดเลือด ระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินปัสสาวะ ระบบอวัยวะสืบพันธุ์ ในระบบประสาท motor และ sensory system เช่น เกี่ยวกับการรับรู้อุณหภูมิ ความเจ็บปวด การรับรู้รส และการเคลื่อนไหว เป็นต้น

2.4 Non-neuronal cholinergic system ที่ผิวหนัง

ในปี 1962 สกอต (Scott. 1962) ได้ค้นพบ สาร Ach ที่ผิวหนังของมนุษย์ครั้งแรกที่บริเวณชั้นหนังแท้ ต่อมาในปี 1993 แกรนด์และคณะ (Grando; et al. 1993) ได้ศึกษาพบว่า epidermal keratinocytes ในมนุษย์สามารถสร้าง cholinergic enzymes ทั้งเอนไซม์ที่สังเคราะห์และทำลายสาร Ach และพบว่ามี การแสดงออกของทั้ง nicotinic และ muscarinic classes ของ cholinergic receptors บนผิวของ epidermal keratinocytes ซึ่งรีเซพเตอร์นี้จะจับกับสาร Ach และเริ่มขบวนการตอบสนองของเซลล์ จากการศึกษาในหลอดทดลอง สาร Ach จะออกฤทธิ์ต่อ keratinocytes ผ่านทาง Autocrine และ paracrine ซึ่งมีผลต่อหน้าที่การทำงานต่างๆของ keratinocytes และ ช่วยคง viability ของ keratinocytes มีการทดลองพบว่า cholinergic drugs สามารถทำให้เกิด keratinocyte proliferation, adhesion, migration และ differentiation สาร Ach จะอาศัย calcium เป็น mediator ช่วยในการออกฤทธิ์ต่อ keratinocytes ซึ่งการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของ calcium จะมีผลต่อ

หน้าที่และการแสดงออกของ cholinergic enzymes and cholinergic receptors ต่อ keratinocytes และที่ระยะต่างๆของการเปลี่ยนแปลงใน keratinocytes อาจจะเป็นผลมาจากการออกฤทธิ์ของ cholinergic enzymes และ ชนิดของ cholinergic receptor นอกจากนี้ยังพบว่า keratinocyte ที่บริเวณต่างๆเช่น basal, prickle และ granular layer ก็มีการตอบสนองต่อสาร Ach แตกต่างกันซึ่งสอดคล้องกับหน้าที่ในแต่ละ stage ของ keratinocyte ที่เจริญในแต่ละชั้นของ epidermis (Grando, Crosby; et al. 1993; Grando, Kist; et al. 1993) ปัจจุบันพบว่าผิวหนังของมนุษย์เป็นส่วนหนึ่งของอวัยวะเป้าหมายของระบบประสาทซึ่งนอกจาก motor และ sensory pathway แล้วยังมี adrenergic และ cholinergic signal transduction Pathways (Grando, Zelickson; et al. 1995; Schallreuter, Lemke; et al. 1995) สาร Ach ที่บริเวณผิวหนังนอกจากจะได้รับมาจากปลายประสาทแล้วยังพบว่าเซลล์เคอราติโนไซต์ และเมลาโนไซต์ก็มีหน้าที่ทั้งสังเคราะห์ และทำลายสาร Ach และ Cathecholamine อื่นๆ โดยกลไกการสังเคราะห์สาร Ach จะคล้ายคลึงกับการสังเคราะห์ในระบบ neuronal cholinergic system (Le Poole, van den Wijngaard; et al. 1994; Grando, Zelickson; et al. 1995; Schallreuter, Lemke; et al. 1995; Schallreuter, Wood; et al. 1996) ต่อมาเมื่อมีการศึกษาในมนุษย์พบว่า สาร Ach มีหน้าที่สำคัญช่วยให้เซลล์เคอราติโนไซต์ และ เมลาโนไซต์ มีการเจริญ แบ่งตัว การเคลื่อนที่ การสื่อสารกันระหว่างเซลล์ ควบคุมการหลั่งเหงื่อ การผลิตไขมัน การไหลเวียนโลหิต การสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) ของผิวหนัง (Longmore, Bradshaw; et al. 1985; Smith, Smith; et al. 1992; Schafer, Nienhaus; et al. 2001; Heeschen, Weis; et al. 2002) นอกจากนั้นสาร Ach ยังมีหน้าที่เป็นสาร apoptotic secretion โดยมีผลให้เซลล์เคอราติโนไซต์ เคลื่อนตัวจากชั้น stratum granulosum ไปที่ชั้น stratum corneum (Nguyen, Ndoye; et al. 2001)

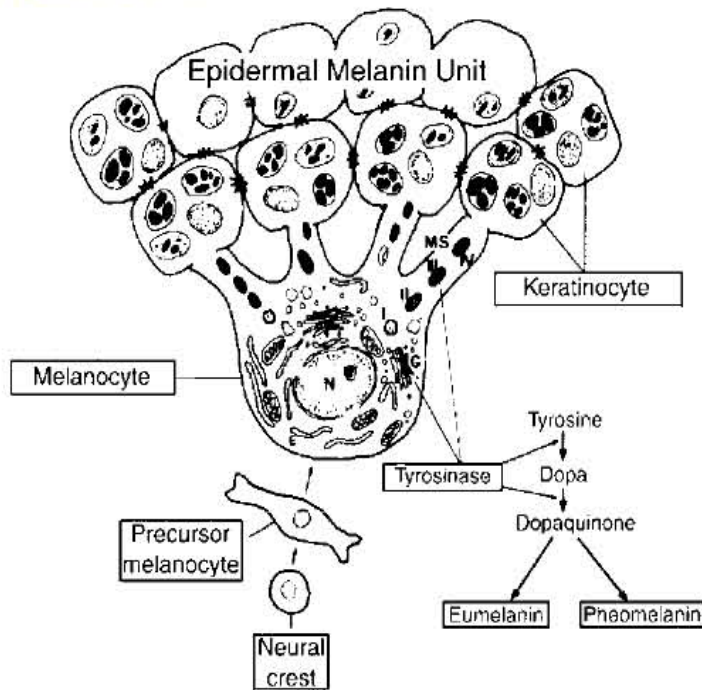
ยกตัวอย่างความผิดปกติของระบบ cholinergic system ที่มีผลต่อโรคผิวหนังในมนุษย์เช่นในโรคตุ่มน้ำพองใสเช่นโรค autoimmune pemphigus, junctional and dystrophic forms of epidermolysis bullosa, thermal burns และ mustard-induced vesication ซึ่งเกิดจากความผิดปกติในหน้าที่ของ Ach ต่อ nicotinic and muscarinic ACh receptors ซึ่งมีผลต่อ KC cell-cell และ cell-matrix adhesion หรือความผิดปกติใน ACh receptor subtypes อื่นที่เกี่ยวข้องกับ intercellular adhesion molecules เช่น classical และ desmosomal cadherins และ integrins mediating KC adhesion ต่อ substrate เป็นผลให้มี signaling pathways ทั้งจากการ กระตุ้น หรือยับยั้ง kinase cascades ซึ่งอาจเป็นผลให้เกิดการ เพิ่มหรือ ลดลงของ regulation ในการแสดงออกของ cell adhesion molecules หรือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขบวนการ phosphorylation status หรือเกิดทั้งสองอย่าง ซึ่งปัจจุบันมีการพัฒนา antiacantholytic therapies โดยใช้ cholinergic drugs ซึ่งมีฤทธิ์ cholinomimetics ในผู้ป่วย pemphigus และ โรคตุ่มน้ำพองใสอื่นๆ ความผิดปกติของสาร Ach ยัง

เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังอื่นอีกหลายชนิดเช่น Acne vulgaris, psoriasis, atopic dermatitis และ vitiligo (Grando. 2006)

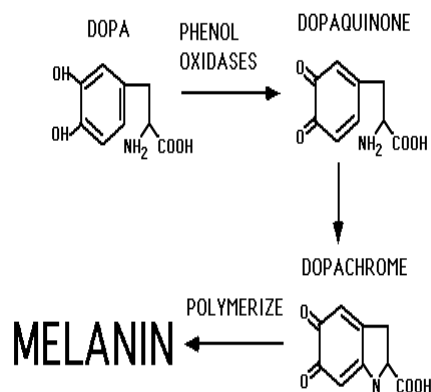
มีการศึกษาของเวสเลอร์และคณะ (Wessler, Reinheimer; et al. 2003) ในความผิดปกติของ cholinergic system ในผู้ป่วย atopic dermatitis (AD) 7 คน และอาสาสมัครที่มีผิวหนังปกติ 12 คน พบว่าจากการตรวจ choline-acetyltransferase (ChAT) ด้วยวิธี anti-ChAT immunohistochemistry และ enzyme assay จาก skin biopsies พบว่า มีการตรวจพบ ChAT enzyme activity ใน homogenized skin และ subcutaneous fat (13 nmol/mg protein/h) และ ChAT immunoreactivity พบว่ามีการแสดงออกที่บริเวณ keratinocytes, hair papilla, sebaceous, eccrine sweat glands, endothelial cells และ mast cells โดยในผู้ป่วย AD ตรวจพบ acetylcholine เพิ่มขึ้นเป็น 14 เท่าในชั้น superficial และ 3 เท่าในชั้นล่างเมื่อเทียบกับในผิวหนังในกลุ่มอาสาสมัคร

ในการศึกษาของแฮคฟอริเซนและคณะ (Hagforsen, Einarsson; et al. 2000) พบว่าผู้ป่วย palmoplantar pustulosis (PPP) มีความเกี่ยวข้องกับ cholinergic system ในการศึกษาด้วยวิธี immunohistochemistry เพื่อดูการแสดงออกของ choline acetyltransferase (ChAT) และ acetylcholinesterase (AChE) ในส่วนของ sweat gland apparatus ในผู้ป่วย palmoplantar pustulosis (PPP) เทียบกับ palmar skin ที่ปกติในอาสาสมัคร healthy non-smokers และ smokers พบว่า sweat gland และ duct จะแสดงออกของ ChAT- และ AChE-like immunoreactivity (LI) ในการความเข้มข้นการติดสีทั้ง 3 กลุ่มพบมากกว่าในชั้น epidermis และ ChAT-LI จะพบที่ coil และใน duct ของ sweat gland ใน Smokers และ ผู้ป่วย PPP จะมีการแสดงออก ChAT+ ใน acrosyringia น้อยกว่าในกลุ่มของ non-smokers แต่ผู้ป่วย PPP จะมีการแสดงออกของ ChAT-LI ใน granulocytes ในตุ่มหนอง และใน papillary dermis และในชั้น stratum corneum มากกว่ากลุ่มอื่น เป็นต้น

ในกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน เอนไซม์ tyrosinase หรือ dopa oxidase enzyme (เป็น glycoprotein และ copper containing oxidase enzyme) จะถูกปล่อยออกมาจาก ER (Endoplasmic reticulum) โดยอาศัยการแลกเปลี่ยนผ่านประจุโปรตอน หรือ proton pump inhibitor ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับพีเอช (PH) ใน intracellular organelle หลังจากนั้นเอนไซม์ tyrosinase จะถูกนำพาไปยัง Golgi และเข้าสู่เมลานินโซม (melanosome) เพื่อนำไปสังเคราะห์เมลานิน โดยจะทำหน้าที่เป็น catalyst โดยขบวนการ rate limiting conversion โดยเปลี่ยน tyrosine เป็น DOPA และเปลี่ยน DOPA เป็น DOPA-quinone และ DOPA-quinone จะถูกเปลี่ยนเป็น DOPA-chrome ซึ่งจะ polymerize ได้สารเมลานินต่อไป (ดังภาพประกอบ 4 และ 5)



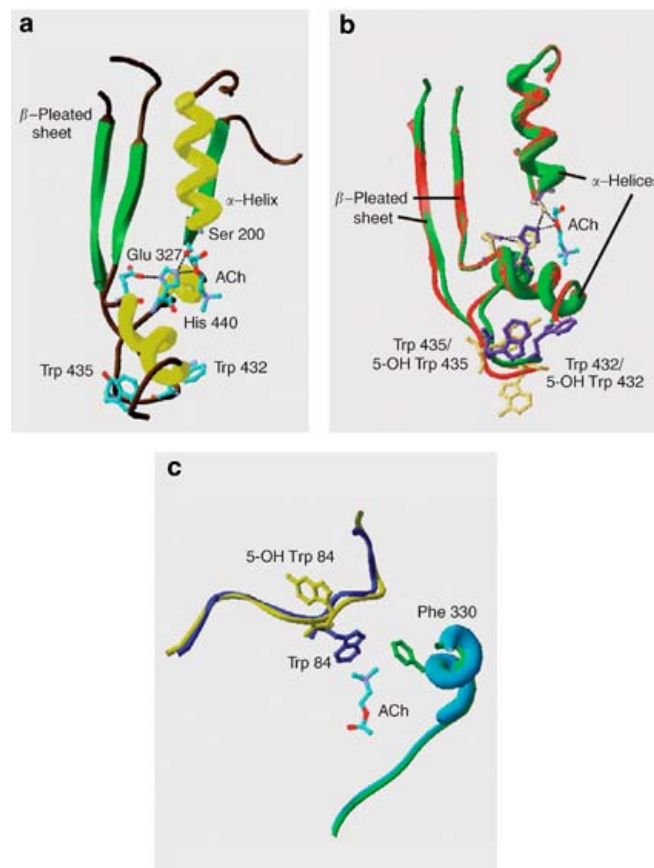
ภาพประกอบ 4 แสดงต้นกำเนิดของ Melanocytes การสังเคราะห์ Melanin และ Epidermal Melanin Unit (Dupin. 2003)



ภาพประกอบ 5 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Precursors และขั้นตอนการสังเคราะห์ Melanin (Dupin. 2003)

จากการศึกษาของ เยนจาร์และคณะ (Iyengar. 1989) ในผู้ป่วยโรคต่างขา 52 รายในการศึกษา ระดับของเอนไซม์ Acetylcholine Esterase (AChE) ด้วยวิธี fluorescence immunohistochemistry พบว่าระดับของเอนไซม์ AChE ในรอยโรคต่ำหรือแทบจะไม่มี เป็นผลให้มีระดับของสาร Ach สูงขึ้น ซึ่งจะมีผลในการยับยั้งฤทธิ์ของเอนไซม์ tyrosinase (aerobic dopa oxidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็น ในการสร้างเม็ดสีของเมลานินไซต์

ต่อมา ในปี ค.ศ. 2001 ชารอยเตอร์และวูด (Schallreuter ;& Wood. 2001) มีการค้นพบว่าในรอยโรคต่างขา จะมีขบวนการเกิด oxidase stress ซึ่งเชื่อว่าเกิดตามหลังการสัมผัสแสงอัลตราไวโอเล็ต การรับประทานอาหารที่มีส่วนประกอบของไขมันชั้นหรือพริก หรืออาจเกิดจากปัจจัยภายในที่ทำให้มีระดับของ H_2O_2 เพิ่มมากขึ้นเช่นการออกฤทธิ์เพิ่มขึ้นของ epidermal monoamineoxidase A, NADPH-oxidase activity ในเม็ดเลือดขาวนิวโตรฟิล ผลของการเพิ่ม manganese superoxide dismutase ทำให้มีการเพิ่มของ $TNF\alpha$ เป็นผลให้มีการสะสมของ H_2O_2 การเกิดขบวนการ photo-oxidation ของ epidermal 6-biopterin และ sepiaterin การเพิ่มของ nitric oxide synthase และพบว่าฮอร์โมนเอสโตรเจน หรือ โปรเจสเตอโรน อาจจะมีผลทำให้เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์มีความไวต่อสารเมตาโบไลต์ของสาร quinone เป็นต้น การมี H_2O_2 มากขึ้น จะมีผลต่อการควบคุมและ signal transduction pathway ของ สารAch และ เอนไซม์ AChE (Schallreuter ;& Wood. 2001) ต่อมาในปี ค.ศ. 2004 ชารอยเตอร์และคณะ (Schallreuter, Elwary; et al. 2004) พบว่าถ้ามีการสะสมของ H_2O_2 มากกว่า $10^{-3}M$ range จะมีผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์ AChE จากการศึกษาดังวิธี computer modeling พบว่า H_2O_2 จะทำให้เกิดการออกซิเดชันของ โปรตีนส่วน Trp(432), Trp(435), Met(436) และ His(440) residue ของเอนไซม์ AChE (ดังภาพประกอบ 6) ทำให้เกิดการสูญเสียฤทธิ์ในการทำลายสาร Ach มีผลทำให้ระดับของสาร Ach มากขึ้นทำให้เกิดรอยต่างขา ซึ่งเมื่อกำจัด H_2O_2 ทำให้สามารถสร้างเม็ดสีใหม่ได้จึงเชื่อว่า H_2O_2 มีส่วนสำคัญในการเกิดโรคต่างขาผ่านทางกลไกดังกล่าว



ภาพประกอบ 6 แสดงโครงสร้างของ AchE จากการศึกษาดังกล่าวโดยวิธี computer modeling แสดงตำแหน่งโปรตีนที่สำคัญในการออกฤทธิ์ที่ถูกทำลายโดย H_2O_2 (ที่มา Nicholas C J Gibbons, John M Wood, Hartmut Rokos and Karin U Schallreuter. Computer Simulation of Native Epidermal Enzyme Structures in the Presence and Absence of Hydrogen Peroxide (H_2O_2): Potential and Pitfalls *Journal of Investigative Dermatology* (2006) 126, 2576–2582.)

2.5. Acetylcholine receptors

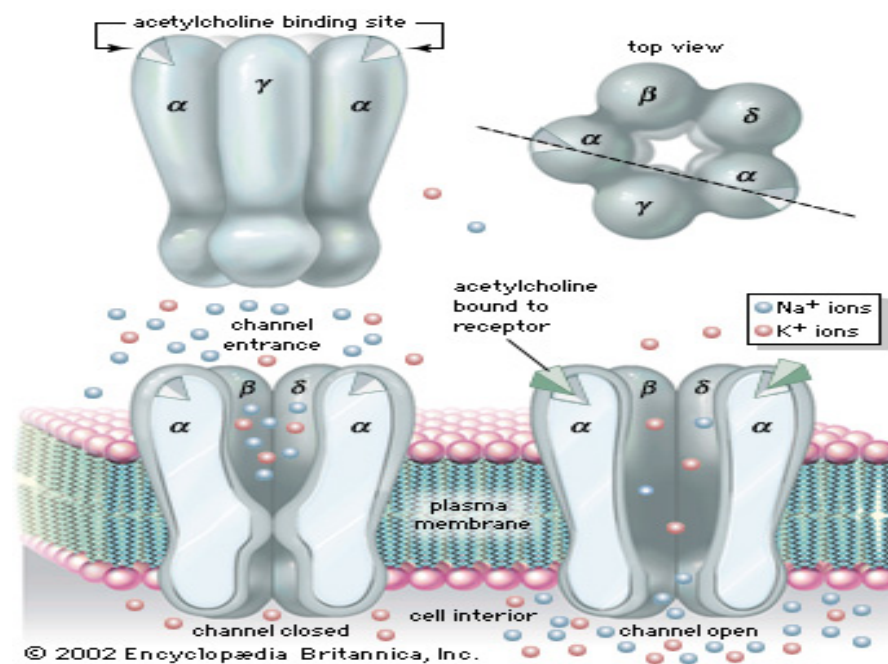
ในผิวหนังมีการค้นพบรีเซพเตอร์ต่อสาร Ach คือ นิโคตินิก (nicotinic:nAch-R) และ มัสคารินิก (muscarinic:mAch-R) รีเซพเตอร์ใน เซลล์เคอราติโนไซต์ (keratinocyte) เมลาโนไซต์ (melanocyte) และ ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ซึ่งในแต่ละอวัยวะจะมีการแสดงออกของแต่ละ รีเซพเตอร์ที่แตกต่างกัน (Grando, Zelickson; et al. 1995; Kurzen, Berger; et al. 2004)

2.5.1 Nicotinic Acetylcholine receptor (nAch-R)

มีการค้นพบ nAch-R subunits ตามอวัยวะต่างๆ ของมนุษย์ เช่น α 1-10, β 1-4, gamma, delta และ epsilon โดยจะแสดงออกที่รอยต่อระหว่างระบบประสาทและกล้ามเนื้อ (neuromuscular junction)

ความสำคัญของ nACh-R แต่ละ subunits ในระบบประสาท จะแบ่งโครงสร้าง เป็น heteropentamer และ homopentamer ซึ่งใน heteropentamer จะมี $\alpha 3$ subunit เป็นส่วนประกอบ เรียกว่า $\alpha 3$ nACh-R ซึ่งจะมีกลไกเกี่ยวกับ Na^+ หรือ K^+ channel และ ใน homopentamer จะมี $\alpha 7$ และ $\alpha 9$ subunit เป็นส่วนประกอบ โดยมีหน้าที่หลักเกี่ยวกับ Gate calcium (Millar 2003) โดย $\alpha 9$ subunit สามารถที่จะรวมกับ $\alpha 10$ subunit เป็นโครงสร้าง heteromeric nACh-R ทำหน้าที่แตกต่างไป ขึ้นกับหน้าที่ต่างๆของเซลล์ โดยหน้าที่ของ nACh-R จะขึ้นอยู่กับ ส่วนประกอบของ subunit 5, ความจำเพาะ และความแข็งแรงในการจับกันระหว่าง สาร Ach (หรือ สารอื่นที่มีโคลิ้นเป็นส่วนประกอบเช่น สารนิโคติน) และ nACh-R (Grando, Zelikson; et al. 1995; Nguyen, Ndoye; et al. 2001; Kurzen, Berger; et al. 2004) (ดังภาพประกอบ 7)

รูปแสดง nicotinic receptor



ภาพประกอบ 7 แสดงลักษณะโครงสร้างทางโมเลกุลของ Nicotinic receptors

(Grando.1997)

ในผิวหนังของมนุษย์มีการตรวจพบ $\alpha 3, 5, 7, 9, 10, \beta 1, 2$ และ $\beta 4$ nACh-R subunits ซึ่งจะพบมากที่สุดคือ $\alpha 3, 5, 7, 9, 10, \beta 1$ nACh-R ในแต่ละชั้นของ epidermis การแสดงออกของ nACh-R subunits ก็แตกต่างกัน เช่น ในชั้น แกรนูลา (granular layer) และ สไปโนซั่ม (spinousum

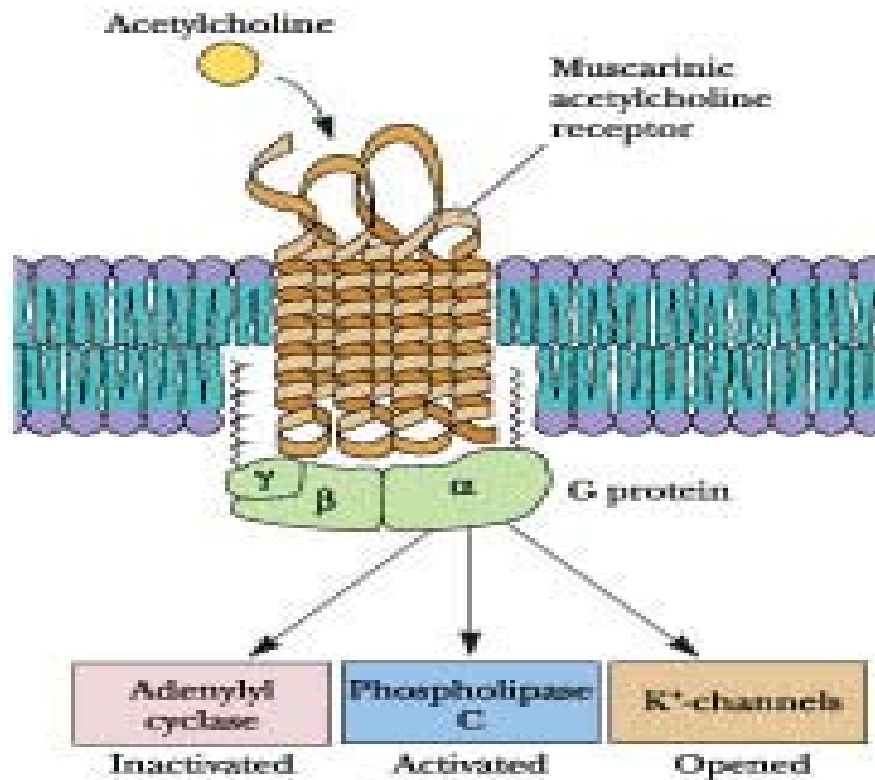
layer) ซึ่งมีปริมาณของ สาร Ach และ แคลเซียมมาก จะมีการแสดงออกของ $\alpha 7$ ซึ่งมีหน้าที่หลักเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงและการเจริญและการตายของเคอราติโนไซต์ (Fuchs. 1990; Dessy, Kelly; et al. 2000; Sando, Zhu; et al. 2003; Kurzen, Berger; et al. 2004) และจะพบ $\alpha 9$, $\alpha 10$, และ $\beta 1$ nAch-R ชั้นเบซัล (basal layer)

ยกตัวอย่างความผิดปกติที่เกี่ยวกับ nAch-R เช่นถ้าผิดปกติที่ SLURP-1 (ซึ่งจัดอยู่ใน super family receptor ของ Ly-6/UPA ซึ่งมีหน้าที่ช่วยให้ nAch-R มีการตอบสนองต่อสาร Ach ได้ดี) ถ้าเกิดความผิดปกติ จะเป็นโรคที่เกี่ยวกับ inflammatory and keratotic palmoplantar skin disorder เช่น Mal de Meleda โดยเป็นโรคที่ถ่ายทอดแบบ Autosomal recessive (Denda, Tomitaka; et al. 2003; Sando, Zhu; et al. 2003) สารนิโคติน ในบุหรี่จะมีผลให้เกิดสิวได้ง่าย เนื่องจากสารโคลีนในนิโคตินจะไปจับกับ nAch-R ที่อยู่ตามต่อมไขมัน (sebaceous gland) ซึ่งจะกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบและการผลิตไขมัน กระตุ้นการเจริญของ sebocytes มากขึ้น ซึ่งในปัจจุบันมีการค้นพบการแสดงออกของ Ach-R subunit gene ได้มากมาย (Kurzen, Berger; et al. 2004)

2.5.2 Muscarinic Acetylcholine receptor (mACh-R)

mACh-R พบอยู่ตามอวัยวะส่วนต่างๆ ของร่างกายเช่น สมอง ระบบประสาทอัตโนมัติ กล้ามเนื้อ ผิวหนัง และอวัยวะภายในต่างๆ หน้าที่ต่างๆขึ้นกับอวัยวะเป้าหมาย เช่นในสมองจะมีหน้าที่เกี่ยวกับการเรียนรู้ ความจำ และการควบคุมตำแหน่งต่างๆของร่างกายให้อยู่ในภาวะสมดุลย์ ที่บริเวณปลายประสาทส่วนปลายจะมีหน้าที่ตามอวัยวะที่ควบคุม เช่น ควบคุมจังหวะการเต้นของหัวใจให้ช้าลง ขยายหลอดเลือด การหดตัวของหลอดเลือดในปอด การหลั่งเอนไซม์ ต่างๆในระบบทางเดินอาหาร เพิ่มการหลั่งสารคัดหลั่งจาก ต่อน้ำตา และต่อมเหงื่อ ช่วยในการหดตัวของ รูม่านตา และ ciliary muscles ของลูกตา เป็นต้น

ต่อมาได้มีการศึกษาด้านเภสัชวิทยา ชีวโมเลกุล และ เทคนิคทางอิมมูโน พบว่า mACh-R มี 5 subtypes (m1-m5) โดยในแต่ละ subtypes จะกระตุ้น second messenger system โดยจับกับ G proteins ที่พบได้ตามส่วนต่างๆของร่างกายเช่นใน ต่อมรับรส รับกลิ่น จอประสาทตา และ ระบบอื่นๆของร่างกาย โดย m2 และ m4 จะจับกับ G proteins ของ Gi family เป็นผลให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ cyclic adenosine monophosphate (cAMP) โดยผ่านทาง เอนไซม์ adenylyl cyclase และ m1, m3 และ m5 subtypes จะจับกับ Gq class ของ G proteins จะกระตุ้น phosphoinositide metabolism ทำให้เกิดการยับยั้ง signaling molecule ของ phospholipase C หรือ D ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับ intracellular calciumโดยที่ m1, m3 และ m5 receptors (ดังภาพประกอบ 8)



ภาพประกอบ 8 แสดงลักษณะโครงสร้างทางโมเลกุลของ Muscarinic receptors (Grando.1997)

โดยในแต่ละ subtypes จะพบตามอวัยวะต่างๆแตกต่างกัน เช่น m1 receptor จะพบที่ สมองส่วนหน้า (forebrain) hippocampus และ cerebral cortex และ m2 receptor จะพบที่ก้านสมอง และ หัวใจ m3 receptor จะพบที่ กล้ามเนื้อเรียบ ต่อมมีท่อ (exocrine gland) และ cerebral cortex m4 receptor จะพบมากที่สมองส่วน neostriatum และ m5 receptor จะพบมากในส่วนของ substantia nigra (ตามตาราง 2)

ตาราง 2 แสดง Muscarinic subtypes ของ Acetylcholine Receptors (Grando.1995)

Muscarinic Acetylcholine Receptors

	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
Distribution	Cortex, hippocampus	Heart	Exocrine glands, GI tract	Neostriatum	Substantia nigra
Antagonists	Pirenzepine	AF-DX 116	pF-HHSiD		
Agonists	Xanomeline, CDD-0097				
G protein	G _{αq/11}	G _{αi/o}	G _{αq/11}	G _{αi/o}	G _{αq/11}
Intracellular response	Phospholipase C β	Adenylyl cyclase inhibition	Phospholipase C β	Adenylyl cyclase inhibition	Phospholipase C β

จากหลายการศึกษาโดยอาศัยเทคนิคทาง polymerase chain reaction นอกจากมีการค้นพบ nicotinic receptors subtypes ต่างๆที่ผิวหนังของมนุษย์แล้ว ยังมีการค้นพบ muscarinic receptors ใน muscarinic receptors ที่พบจะมีอยู่ 5 subtypes คือ m1-m5 ซึ่งแต่ละชั้นของผิวหนังก็มีการแสดงออกของแต่ละ subtype แตกต่างกันโดยจะพบใน epidermal melanocytes ซึ่งมีหน้าที่ควบคุม ขบวนการ melanogenesis โดยอาศัยผ่าน cholinergic signals (Buchli, Ndoye; et al. 2001) m1 และ m4 mACh-R จะพบที่บริเวณ suprabasilar layers แต่ m2, m3 และ m5 mACh-R จะพบที่ บริเวณ basal layers ในส่วนของรูขุมขนในตำแหน่งต่างๆ พบว่าที่ outer root sheath ของรูขุมขน จะพบ mACh-R ทั้งหมดยกเว้น m4 mACh-R, ที่ central cell layers จะพบ m4, m5 mACh-R และที่ inner root sheath จะพบ m1-m4 mACh-R ในตำแหน่งของเซลล์ sebocytes ที่ยังไม่เจริญเต็มที่ พบว่ามี m3-m5 mACh-R แต่ใน sebocytes ที่เจริญเต็มที่แล้วจะพบ m2 และ m4 mACh-R ในต่อมเหงื่อ บริเวณ myoepithelial cells จะพบว่ามี m2-m5 mACh-R แต่ส่วนของ acinar cells จะพบ m1, m3 และ m4 mACh-R เป็นต้น (Kurzen, Berger; et al. 2004)

ในโรคต่างขามีสมมุติฐานในการเกิดโรคได้หลายอย่าง กลไกหนึ่งที่สำคัญคือ สมมุติฐานที่เกี่ยวกับภาวะที่มี oxidative stress ในบริเวณรอยโรค อาจเกิดตามหลังการสัมผัสแสงอัลตราไวโอเล็ต เป็นผลให้มีสาร H₂O₂ เพิ่มมากขึ้นซึ่งสารนี้จะทำลาย เอนไซม์ AchE ทำให้ผิวหนังบริเวณนั้นมีระดับ สาร Ach เพิ่มขึ้น ซึ่งสาร Ach จะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นในการ

สร้างเม็ดสี ของเมลานोไซต์ จึงเกิดเป็นรอยต่างขาว ในปัจจุบัน ยังไม่มีการศึกษาใดที่ศึกษาระบบของ โคลิเนอร์จิก (cholinergic system) ในรอยโรคต่างขาว ดังนั้นการทราบถึงกลไกในระดับโมเลกุลของ cholinergic system เช่นการแสดงออกของ ChAT, AchE Enzyme และ VAChT Protein ในบริเวณ ชั้นผิวหนังของรอยโรคต่างขาวตำแหน่งต่างๆอาจทำให้ค้นพบหลักฐานหรือสมมุติฐานใหม่ของการเกิด รอยโรคต่างขาวและนำไปสู่การพัฒนาค้นคว้าวิจัยและแนวทางการรักษาใหม่ๆในอนาคต

3. อิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (Immunohistochemistry)

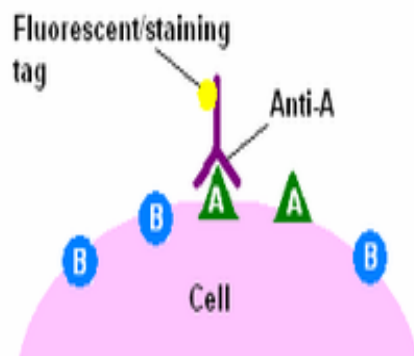
Immunohistochemistry เป็นขบวนการตรวจชิ้นเนื้อโดยอาศัยขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่าง แอนติเจนบนผิวชิ้นเนื้อกับแอนติบอดีที่จำเพาะซึ่งสามารถตรวจการทำปฏิกิริยาได้จากสารที่มาทำ ปฏิกิริยาต่อแอนติบอดี เช่น สาร fluorescence dye, Enzyme, Radioactive element หรือ colloidal Gold

ในปี 1941 อัลเบิร์ตและคณะ (Albert H. Coon; et al. 1941) ได้ค้นพบการศึกษาทางอิมมูโน สำหรับชิ้นเนื้อโดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งเป็นการใช้สารเรืองแสง (Fluorescein) ติดกับ แอนติบอดี วิธีนี้มีข้อจำกัดคือ ต้องใช้เนื้อสด ต้องตัดด้วยเครื่อง cryostat และต้องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์เท่านั้น นอกจากนี้สารเรืองแสงจะเสื่อมสภาพเมื่อถูกแสงสว่าง ต้องเก็บ สไลด์ในตู้เย็น และเก็บได้ไม่นาน จะเก็บได้เฉพาะรูปถ่ายเท่านั้น (Beutner. 1983) ต่อมาในปี 1966 เนกเซนและเพียร์ซ (Nakane ;& Pierce. 1967) ได้นำ enzyme peroxidase และปี 1978 เมซันและ แซมมอน (Mason ;& Sammons. 1978) ได้นำ enzyme Alkaline phosphatase มาเชื่อมติดกับ แอนติบอดีเพื่อใช้แทนสารเรืองแสง ซึ่งเมื่อ enzyme ทำปฏิกิริยากับ substrate เมื่อหยด Chromogen (NBT-BCIP) จะปรากฏสีตรงตำแหน่งของเนื้อเยื่อที่มีแอนติบอดีไปจับอยู่กับแอนติเจน วิธีนี้สามารถ ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และศึกษาจาก paraffin section ได้ และสามารถเก็บสไลด์เป็นสไลด์ถาวรได้

ขบวนการ Immunohistochemistry มีหลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของ specimen ที่ใช้ในการ ตรวจจสอบ และ ระดับความไวที่ต้องการ Immunohistochemistry method แบ่งเป็น

3.1 Direct method

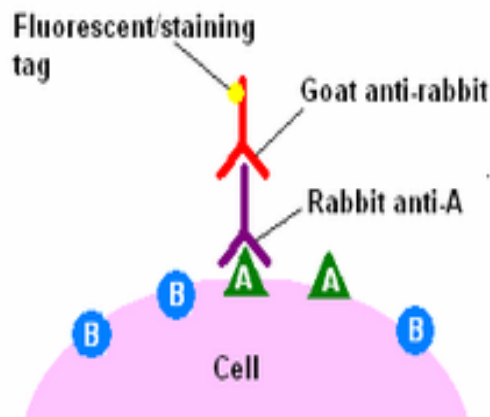
ทำโดยการใช้ แอนติบอดีที่ conjugate กับ enzyme (horse radish peroxidase หรือ alkaline phosphatase) มาจับกับแอนติเจน หรืออาศัยการจับสัญญาณโดย tag fluorescence กับแอนติบอดี วิธีนี้จะมี sensitivity น้อย (ดังภาพประกอบ 9)



ภาพประกอบ 9 แสดงเทคนิคทาง Immunohistochemistry โดยอาศัย fluorescence ในการจับสัญญาณ (Mason.1978)

3.2 Indirect method

ใช้แอนติบอดี สองชนิด ชนิดแรก คือ Primary antibody ที่มีความจำเพาะต่อสิ่งที่ต้องการจะตรวจหา นั่นๆ โดย secondary antibody เป็น IgG ที่ได้จากสัตว์ซึ่งจำเพาะต่อ Primary antibody โดย secondary antibody จะ conjugate enzyme หรือ fluorescent dye เช่น FITC, rhodamine หรือ Texas red เรียกว่า indirect immunofluorescence method และถ้า conjugate enzyme เช่น peroxidase, alkaline phosphatase or glucose oxidase จะเรียกว่า indirect immunoenzyme method ซึ่งวิธีการนี้ทำให้ sensitivity ดีขึ้น (ดังภาพประกอบ 10) โดยสามารถแบ่งได้เป็น



ภาพประกอบ 10 แสดงเทคนิคทาง Indirect immunoenzyme method (Mason.1978)

3.2.1 Unlabelled antibody method

เป็นการใช้ secondary antibody เป็นสะพานเชื่อมระหว่าง primary antibody กับ tertiary antibody ที่มี enzyme complex conjugate อยู่ วิธีการนี้ได้แก่ Peroxidase-antiperoxidase complex (PAP), alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase complex (APAAP) ซึ่งมีความแข็งแรง และมีความไวกว่า peroxidase molecule ที่ไม่ได้ conjugated to the anti IgG molecule ประมาณ 100 ถึง 1000 เท่า ซึ่งสามารถ dilution primary antibody ได้มาก และกำจัด non-specific background staining ได้

3.2.2 (Strept) avidin-biotin technology

เทคนิคนี้จะประกอบไปด้วย ชั้นแรกคือ unlabeled primary antibody ชั้นที่สองคือ biotinylated secondary antibody และชั้นที่สาม คือ complex of avidin-biotin peroxidase โดยอาศัย substrate DAB or substrates อื่นๆ

หลักการของ avidin-biotin technology เป็นวิธีการที่อาศัยคุณสมบัติในการจับตัวกันของ avidin และ biotin ที่จะยึดตัวกันอย่างแน่นหนาและจำเพาะเจาะจง avidin เป็นส่วนประกอบของไข่ขาว structure เป็นรูปสี่เหลี่ยมมี 4 submit ที่จะให้ biotin เกาะได้ส่วน biotin เป็น low molecular weight vitamin ที่สามารถจะ conjugate กับ enzyme เช่น peroxidase หรือ fluorescein ได้ง่าย

จึงทำให้สามารถที่จะใช้ biotin conjugate กับ secondary antibody และสร้าง avidinbiotin enzyme complex เพื่อใช้แทน PAP or APAAP complex ตัว avidin จะมี oligosaccharide residue ของไข่ขาวติดมาด้วยสารตัวนี้มักจะไปจับกับ lecitin บนเนื้อเยื่อได้ทำให้เกิด nonspecific staining จึงมีการทดแทน avidin ด้วยสาร streptavidin ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

Streptomycesavidinii สารตัวนี้ไม่มี oligosaccharide residue และมีคุณสมบัติในการจับกับ biotin เช่นเดียวกับ avidin วิธีการนี้ ได้แก่ avidin-biotin complex (ABC) method, labeled avidin-biotin (LAB) method และ labeled streptavidin-biotin (LSAB) method

3.2.3 Chain polymer-conjugate Technology

เป็นเทคนิคที่ใช้ enzyme (HRP,AP) และ antibody (primary, secondary) มาติดบน spine molecule ของ dextran และใน 1 spine molecule ของ dextran สามารถติด enzyme ได้ 70 molecules พร้อมกับ antibody อีก 10 molecules ด้วยเหตุนี้ เทคนิคนี้จึงช่วยเพิ่ม sensitivity ลดเวลา และขั้นตอนในการทำ IHC ได้ แบ่งได้เป็น

3.2.3.1 DakoCytomation's EnVision Systems

เป็น dextran polymer technology โดยอาศัยการจับกันของเอนไซม์ horseradish peroxidase หรือ alkaline phosphatase กับ secondary antibody ที่มี dextran backbone ข้อดีคือ ทำให้มีความไวเพิ่มขึ้น และลด non-specific background staining และ ลดขั้นตอน ในการทำปฏิกิริยาเมื่อเทียบกับ conventional techniques ขั้นตอนมีดังนี้

3.2.3.1.1 ใส่ primary antibody

3.2.3.1.2 ใส่ enzyme labeled polymer

3.2.3.1.3 ใส่ substrate chromogen

3.2.3.2 Vector's ImmPRESS polymerized reporter enzyme staining system

เป็นวิธีใหม่ที่น่า antibodies มาทำปฏิกิริยากับ polymerizing enzymes ให้เกิดเป็น micropolymers ทำให้มี high density ของ very active enzyme ต่อ secondary antibody ข้อดีคือ เพิ่ม sensitivity, signal intensity, ลด background staining, และลด non-specific binding ขั้นตอนมีดังนี้

3.2.3.2.1 ใส่ primary antibody

3.2.3.2.2 ใส่ enzyme labeled polymer

3.2.3.2.3 ใส่ substrate chromogen

3.2.3.3 CSA Methods From DakoCytomation แบ่งได้เป็น

3.2.3.3.1 CSA Systems

โดยใช้ Tyramide Signal Amplification ข้อดีคือเพื่อที่จะ ตรวจสอบแอนติเจนปริมาณน้อยได้ เพิ่มประสิทธิภาพของ low affinity mouse และ rabbit antibodies และทำให้การทำปฏิกิริยาของ mouse และ rabbit antibodies กับ paraffin embedded tissue sections เข้ากันได้ดีขึ้น

3.2.3.3.1.1 ใส่ primary antibody

3.2.3.3.1.2 ใส่วิธี biotinylated linking antibody

3.2.3.3.1.3 ใส่วิธี Tyramide Amplification Reagent

3.2.3.3.1.4 ใส่วิธี Streptavidin-HRP

3.2.3.3.1.5 ใส่วิธี substrate chromogen

3.2.3.3.2 CSA II - Biotin-free Tyramide Signal Amplification System

เป็นวิธีที่มีความไวในการตรวจสอบสูงโดยใช้วิธี signal amplification method โดยอาศัยเอนไซม์ peroxidase-catalyzed กับ fluorescein-labelled phenolic compound (fluorescyl-tyramide, ตามด้วยปฏิกิริยา secondary reaction ของ a peroxidase-conjugated anti-fluorescein ซึ่งสามารถตรวจสอบปฏิกิริยาได้จาก peroxidase-conjugated anti-fluorescein โดยจะอาศัย diaminobenzidine/hydrogen peroxide เป็น chromogen หรือ substrate ซึ่งสามารถดูได้จาก light microscope เทคนิคนี้สามารถตรวจสอบปริมาณของโปรตีนเป้าหมายที่เล็กมากๆ ได้ดีแม้จะใช้ low affinity antibodies ก็ตาม

3.2.3.4 Multiple Staining Method

ใช้ในการตรวจหาแอนติเจนมากกว่า 1 ชนิดขึ้นไปในชิ้นเนื้อที่ต้องการตรวจโดยจะอาศัยวิธี immunofluorescence method โดยใช้ fluorescent dyes ที่แตกต่างกัน multiple staining สามารถทำได้โดยใช้เอนไซม์ peroxidase conjugated antibodies กับ developed with different chromogen substrates ต่างๆ ซึ่งจะได้ end products ที่มีสีต่างๆกัน

3.2.3.5 EM Immunohistochemical Method

Electron microscopic (EM) immunohistochemical techniques immunostaining ก่อน resin embedding เรียกว่า pre-embedding ซึ่งวิธีนี้จะ immunolabeling หลังจากที่ resin embedding (post-embedding) การที่จะใช้วิธี pre- หรือ post-embedding method เพื่อที่จะตรวจหา antigen ขึ้นกับตำแหน่งของ antigen และลักษณะของ primary antibody โดยก่อนที่จะเริ่มขั้นตอน immuno-EM labeling จะต้องทดสอบ characteristics and dilution of the primary antibody ซึ่งต้องอาศัยการตรวจจาก light microscopy ก่อน

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. การกำหนดประชากรและกลุ่มตัวอย่าง
2. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย
3. วิธีดำเนินงานวิจัย
4. วิธีการศึกษา
5. การประเมินผล
6. สถิติที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูล

การกำหนดประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากร (population) และ กลุ่มตัวอย่าง (sample)

ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคต่างขาที่มีฝืนตามลำตัวและแขนขา จำนวน 11 คน ที่มารับการตรวจที่ศูนย์ผิวหนังนวมมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร และอาสาสมัครที่มีผิวหนังปกติ จำนวน 3 คน

การคำนวณขนาดตัวอย่าง

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาทางด้านพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา และด้วยงบประมาณที่มีจำกัดและจำนวนของผู้ป่วยโรคต่างขาที่มีจำนวนไม่มาก ดังนั้นจำนวนผู้ป่วยที่นำมาศึกษาจึงถูกจำกัดจำนวนที่ 11 คน และอาสาสมัคร 3 คน

การเลือกกลุ่มตัวอย่าง

กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)

1. อายุตั้งแต่ 5 ปีขึ้นไป ไม่จำกัดเพศ
2. ไม่เคยได้รับการรักษาใดมาก่อนอย่างน้อย 6 เดือน
3. มีรอยโรคต่างขาที่บริเวณแขนขา หรือ ลำตัว
4. ผู้ป่วยต้องยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยด้วยความสมัครใจ และลงลายลักษณ์อักษรในใบยินยอมรับการรักษา (Inform consent)

กฎเกณฑ์ในการคัดออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่มีประวัติโรคต่างขาที่ได้รับการรักษาภายในระยะเวลา 6 เดือน
2. ผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวเช่น โรคเบาหวาน, โรคเลือดออกง่าย, โรคทางระบบอ

โตอิมมูนต่างๆ

3. ผู้ป่วยได้รับยา aspirin, anticoagulant หรือมีความผิดปกติในการแข็งตัวของเลือด
4. ผู้ป่วยมีประวัติแพ้ยาเฉพาะที่ ผู้ป่วยที่ได้รับ chemotherapy, radiotherapy ผู้ป่วยที่สูบบุหรี่
5. ผู้ป่วยมีประวัติเป็นเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาลไม่ดี, ติดเชื้อ HIV
6. ผู้ป่วยมีประวัติมีแผลเป็นนูนหรือคีลอยด์

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. กล้องดิจิทัล
2. แบบสอบถาม
3. ชุดตัดชิ้นเนื้อและเย็บแผล
4. ชุดน้ำยาในการคงรูปชิ้นเนื้อ
 - 4.1 น้ำยา 4% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS)
 - 4.2 Ice-cold mixture of methanol: acetone:water (2:2:1;v/v)
5. เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome)
6. poly-L-lysine-coated slides
7. ชุดน้ำยา H&A stain (Haematoxilin and azoploxin)
8. อุปกรณ์และสารเคมีในการเตรียม immunohistochemistry
 - 8.1 xylene
 - 8.2 ethanol
 - 8.3 เครื่อง autoclave
 - 8.4 10 nmol sodium citrate PH 6.0
 - 8.5 TENG-T (10 nmol Tris, 5 nmol EDTA;150 nmol NaCl, 0.25% gelatin, 0.05%Tween20;PH 8.0)
 - 8.6 Goat anti mouse IgG(sigma) or goat anti rabbit IgG (DaKo.Inc.,Glostrup,Denmark)
 - 8.7 Nitroblue Tetrazoliumchloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Toluine salt; DaKo.Inc.,Glostrup,Denmark)

8.8 Antibodies ต่อ ChAT, AchE, VAChT

9. อุปกรณ์ในการวัดความเข้มของการปรากฏของโปรตีนที่ศึกษาด้วยวิธี Immunohistochemistry

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. คัดเลือกผู้เข้าร่วมโครงการตามข้อกำหนดข้างต้นกรอกแบบสอบถามข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย
2. ให้ข้อมูลและขั้นตอนในการปฏิบัติทำความเข้าใจแก่ผู้เข้าร่วมโครงการ
3. ผู้เข้าร่วมโครงการลงลายลักษณ์อักษรยินยอมเข้าร่วมโครงการ (inform consent)
4. ถ่ายภาพรอยโรคก่อนเริ่มตัดชิ้นเนื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์
5. ตัดชิ้นเนื้อผิวหนังบริเวณรอยต่างขาและผิวหนังปกติในผู้ป่วยโรคต่างขาและตัดชิ้นเนื้อผิวหนังที่ปกติของกลุ่มอาสาสมัคร
6. นำชิ้นเนื้อผ่านขบวนการ Immunohistochemistry
7. นำชิ้นเนื้อที่ผ่านขบวนการ Immunohistochemistry มาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์
8. แปรผลการติดสีในตำแหน่งต่างๆของผิวหนัง

วิธีการศึกษา

จะศึกษาจากชิ้นเนื้อของกลุ่มผู้ป่วยโรคต่างขาทั้งที่มีรอยต่างขาและส่วนชิ้นเนื้อที่ปกติและในกลุ่มอาสาสมัครที่มีชิ้นเนื้อปกติ โดยในกลุ่มผู้ป่วยโรคต่างขาจะถูกตัดชิ้นเนื้อ 2 ตำแหน่งคือที่บริเวณรอยโรคและชิ้นเนื้อปกติ ที่บริเวณแขนขาหรือลำตัว ขนาดไม่เกิน 0.5*0.5 ซม. มาตำแหน่งละ 1 ชิ้น และจะตัดชิ้นเนื้อปกติ ในบริเวณเดียวกันในกลุ่มอาสาสมัคร โดยชิ้นเนื้อที่ถูกตัดจะถูกนำมา fix ด้วย 4% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) ที่อุณหภูมิห้องหรือใน Ice-cold mixture of methanol: acetone:water (2:2:1;v/v) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 วัน หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อผ่านขบวนการนำน้ำออกจากชิ้นเนื้อโดยใช้ระดับความเข้มข้นของ ethanol ที่ระดับต่างๆกัน ต่อจากนั้นนำเนื้อเยื่อไป embed ด้วย paraffin และเมื่อ paraffin แข็งตัวจะนำเนื้อเยื่อไปตัดด้วยเครื่อง microtome หนา 7 ไมโครเมตร จากนั้นจะนำชิ้นเนื้อที่ถูกตัดมาวางลงบนสไลด์ และจะหยดน้ำยา poly-L-lysine โดยทุกๆ 15 สไลด์ จะย้อมด้วย haematoxilin และ azophloxin (H&A) ซึ่งเป็นสีย้อมและใช้ในการตรวจสอบวิธีการตัดและวัดระดับของชิ้นเนื้อที่ตัดมา โดยขั้นตอนต่อไปจะคัดเลือกสไลด์ที่มีส่วนของเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษานำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษาด้วยวิธี Immunohistochemistry ต่อไป

ขั้นตอนการย้อม Immunohistochemistry

1. ตัด tissue section จาก paraffin block ด้วย เครื่อง Microtome ให้มีความหนา 7 microns

ลอยในอ่างน้ำอุณหภูมิ ประมาณ 43 องศาเซลเซียส (ห้ามโรยเจลาติน)

2. อบ Slide (เลือกวิธีการใดวิธีการหนึ่ง แล้วแต่สะดวก)
3. Deparaffinization ด้วย Xylene 7 นาที 3 ครั้ง
4. Rehydrate the sections โดยการจุ่มลงใน ethanol series 100%-50% serie ละ 5 นาที
5. ล้างในน้ำกลั่น 5 นาที 3 ครั้ง
6. ล้างใน PBS 5 นาที 3 ครั้ง
7. Incubate the sections in Teng-T/10% Normal Goat serum (NGS) ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที
8. Incubate the sections กับ the primary antibody ที่อุณหภูมิห้อง (dilutions made in Teng-T/10% Normal Goat serum (NGS) ที่อุณหภูมิห้อง
9. นำ sections มาล้างด้วย PBS 5 นาที 3 ครั้ง
10. Incubate the sections กับ the secondary antibody 1.5-2 ชม. (GAM-AP for monoclonal antibodies or GAR-AP for polyclonal antibodies)
GAM-AP คือ Goat-anti-Mouse with Alkaline phosphatase (1:100 in Teng-T/10% NGS)
GAR-AP คือ Goat-anti-Rabbit with Alkaline phosphatase (1:200 in Teng-T/10% NGS)
11. นำ sections มาล้างด้วย PBS 5 นาที 3 ครั้ง
12. Incubate the sections กับ AP-substrate (Dilute NBT/BCIP 1:50 in buffer 2 และเติม levamisol 1/1000 dilute จาก 1 M stock solution)
13. หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น (ประมาณ 0.5 -2 ชม. ขึ้นกับการเกิดสีที่เห็นใน light microscope)
14. Dehydrate the sections โดยการจุ่มลงใน ethanol series 50%-100% อย่างรวดเร็ว
15. ล้างด้วย Xylene 7 นาที 3 ครั้ง
16. Mount the sections ใน Entellan

การตรวจด้วยกล้อง Light Microscope

ชิ้นเนื้อที่ย้อม Immunostained จะถูกนำไปตรวจดูด้วย Nikon Labophot-2 light microscope ด้วยกำลังขยาย 10 และ 40x objectives และภาพจะถ่ายภาพโดย Northern Eclipse 6 software และใช้โปรแกรม Adobe Photoshop 7 และ CorelDraw 11

การประเมินผล

1. ศึกษาถึงการแสดงออกของสาร ChAT, AchE Enzyme และ VAChT Protein ในแต่ละชั้นของผิวหนังระหว่างรอยโรคต่างขาและผิวหนังปกติในผู้ป่วยโรคต่างขาและผิวหนังของคนปกติ

2. ดูแนวโน้มความแตกต่างของความเข้มของการติดสี (staining intensity) จากการทำปฏิกิริยาของ สาร ChAT, AchE Enzyme และ VAChT Protein ต่อ antibody ที่จำเพาะของชิ้นเนื้อในแต่ละบริเวณของผิวหนังภายในกลุ่มเดียวกัน
3. เปรียบเทียบถึงความแตกต่างของความเข้มของการติดสี (staining intensity) จากการทำปฏิกิริยาของสาร ChAT, AchE Enzyme และ VAChT Protein ต่อ antibody ที่จำเพาะในแต่ละชั้นของผิวหนังระหว่างรอยโรคต่างขาและผิวหนังปกติในผู้ป่วยโรคต่างขาและผิวหนังของคนปกติ

วิธีการประเมินผล

1. การประเมินความเข้มของการติดสี (staining intensity) จากชิ้นเนื้อโดยวิธี Immunohistochemistry

โดยในแต่ละกลุ่มทั้งในกลุ่มโรคต่างขาและกลุ่มชิ้นเนื้อปกติจะต้องมีชิ้นเนื้อควบคุม (internal control) โดยจะไม่นำไปย้อม primary antibody ซึ่งการประเมินความเข้มของสีจะประเมินโดยเจ้าหน้าที่เชี่ยวชาญด้าน Immunohistochemistry 2 คน ซึ่งไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับงานวิจัย โดยจะประเมินความเข้มของการติดสีเป็นร้อยละซึ่งจะนำมาหาค่าเฉลี่ยและแบ่งเป็นระดับของการติดสี

เกณฑ์การแบ่งระดับความเข้มของการติดสี

ร้อยละ	ความเข้มของการติดสี	แปลผล
0%	0	ไม่ติดสีเมื่อเทียบกับ internal control
1-25 %	+1	ติดสีเล็กน้อยเมื่อเทียบกับ internal control
26-50 %	+2	ติดสีปานกลางเมื่อเทียบกับ internal control
51-75 %	+3	ติดสีมากเมื่อเทียบกับ internal control
76-100 %	+4	ติดสีมากที่สุดเมื่อเทียบกับ internal control

2. รวบรวมข้อมูลในตารางการเก็บข้อมูล

ตาราง 3 ตารางการเก็บข้อมูลการแสดงผลของ ChAT บริเวณผิวหนังส่วนต่างๆ

ตำแหน่งของผิวหนัง ChAT		Internal control	0	+1	+2	+3	+4
Stratum corneum							
Stratum granulosum							
Stratum spinosum							
Stratum lucidum							
Basal cell layer							
Sebaceous gland							
Sweat gland	Duct						
	Glandular						
Vessel	Endothelial						
	Muscular						

ตาราง 4 ตารางการเก็บข้อมูลการแสดงผลของ AchE บริเวณผิวหนังส่วนต่างๆ

ตำแหน่งของผิวหนัง AchE		Internal control	0	+1	+2	+3	+4
Stratum corneum							
Stratum granulosum							
Stratum spinosum							
Stratum lucidum							
Basal cell layer							
Sebaceous gland							
Sweat gland	Duct						
	Glandular						
Vessel	Endothelial						
	Muscular						

ตาราง 5 ตารางการเก็บข้อมูลการแสดงออกของ VAChT บริเวณผิวหนังส่วนต่างๆ

ตำแหน่งของผิวหนัง VAChT		Internal control	0	+1	+2	+3	+4
Stratum corneum							
Stratum granulosum							
Stratum spinosum							
Stratum lucidum							
Basal cell layer							
Sebaceous gland							
Sweat gland	Duct						
	Glandular						
Vessel	Endothelial						
	Muscular						

สถิติที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูล

1. ใช้สถิติเชิงพรรณนา ดูการแสดงออกของ ChAT, AchE enzyme และ VAChT protein ในแต่ละชั้นของผิวหนังระหว่างรอยโรคต่างๆและผิวหนังปกติในผู้ป่วยโรคต่างๆและผิวหนังของคนปกติ
2. ใช้สถิติเชิงพรรณนา ดูแนวโน้มเปรียบเทียบความเข้มของการติดสี (staining intensity) ทาง Immunohistochemistry ของ ChAT, AchE Enzyme และ VAChT Protein ของชั้นเนื้อในแต่ละบริเวณของผิวหนังภายในกลุ่มเดียวกัน
3. ใช้สถิติเชิงพรรณนา ดูแนวโน้มเปรียบเทียบความเข้มของการติดสี (staining intensity) ทาง Immunohistochemistry ของ ChAT, AchE Enzyme และ VAChT Protein ในแต่ละตำแหน่งของชั้นผิวหนังระหว่างรอยโรคต่างๆและผิวหนังปกติในผู้ป่วยโรคต่างๆและผิวหนังของคนปกติ

การบริหารงานวิจัยและตารางปฏิบัติงาน (Administration and Time schedule)

ตาราง 6 แสดงการบริหารงานวิจัยและตารางปฏิบัติงาน (Administration and Time schedule)

การดำเนินงาน	2550							2551			
	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.
1. ทบทวนวรรณกรรม		→									
2. เขียนและเสนอโครงร่าง		→									
3. เก็บและเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อ ของผิวหนังเพื่อศึกษาด้วยเทคนิค ทางด้านอิมมูโนฮิสโตเคมีสเทอรี			→	→	→	→	→	→			
4. ศึกษาการแสดงออกและการกระจาย ตัวของ ChAT, AchE enzyme และ VAChT protein ของชิ้น เนื้อที่ศึกษา			→	→	→	→	→	→			
5. วิเคราะห์และแปลผลข้อมูล								→	→		
6. ทำรูปเล่มปริญญานีพนธ์									→	→	→

งบประมาณการวิจัย (ถัวเฉลี่ยจ่ายทุกรายการ)

ตาราง 7 แสดงงบประมาณการวิจัย (ถัวเฉลี่ยจ่ายทุกรายการ)

หมวดค่าใช้จ่าย	รายการ	จำนวนเงิน (บาท)
หมวดค่าตอบแทน	ค่าตอบแทนอาสาสมัคร	6,000
หมวดค่าใช้จ่าย	ค่าจ้างเหมาพิมพ์รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์	2,500
	ค่าจ้างสำเนาเข้าปกเย็บเล่มรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์	2,500
	ค่าถ่ายเอกสาร	1,000
หมวดค่าวัสดุ	ค่า primary และ secondary antibody ต่อ ChAT, AchE Enzyme และ VAChT Protein	116,000
	สารที่ใช้สำหรับ histological process	20,000
	ค่าสารเคมีและอุปกรณ์ในการทำ Immunohistochemistry	30,000
	ค่ายาและการพยาบาลผู้ป่วยเมื่อเกิดผลข้างเคียง	10,000
	ค่าวัสดุสำนักงาน	2,000
	Liquid nitrogen	10,000
	รวมงบประมาณ	200,000

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ลักษณะโดยทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคต่างขาจากการซักประวัติ ตรวจร่างกาย ทั้งหมด จำนวน 11 คน และอาสาสมัครที่ไม่มีโรคประจำตัวใด 3 คน โดยแบ่งกลุ่มที่ต้องการศึกษาออกเป็น 3 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 ศึกษาจากรอยต่างขาของผู้ป่วยโรคต่างขา 11 ตัวอย่าง

กลุ่มที่ 2 ศึกษาจากผิวหนังปกติของผู้ป่วยโรคต่างขา 11 ตัวอย่าง

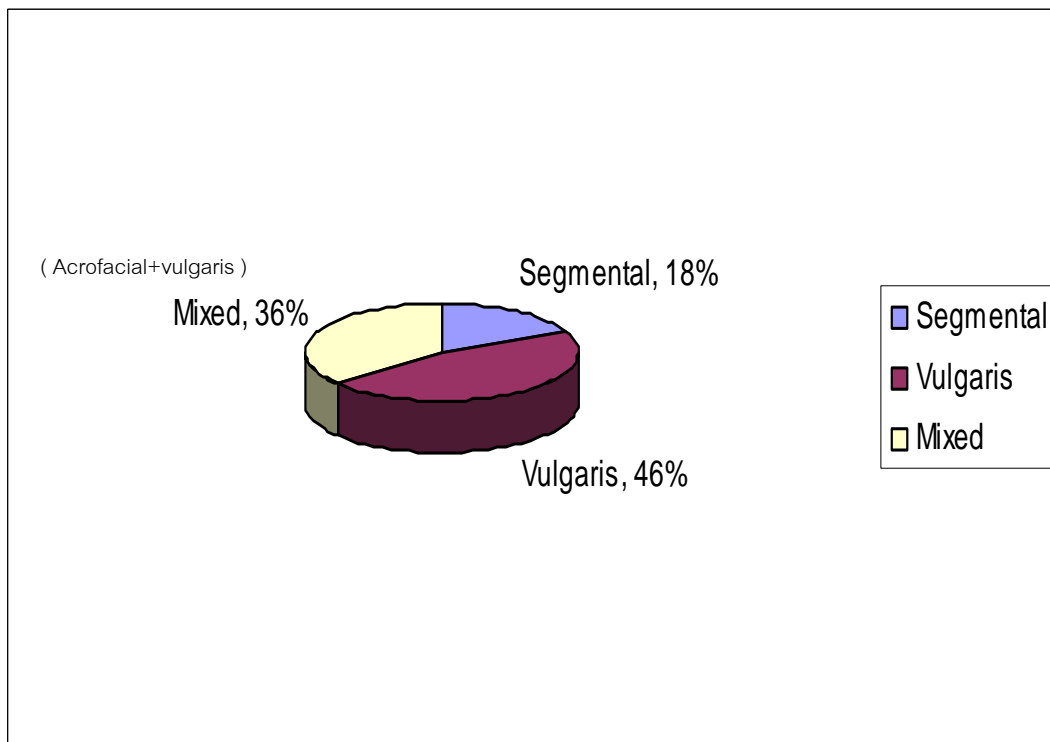
กลุ่มที่ 3 ศึกษาจากผิวหนังปกติของอาสาสมัคร 3 ตัวอย่าง

ลักษณะโดยทั่วไปของกลุ่มผู้ป่วยโรคต่างขา

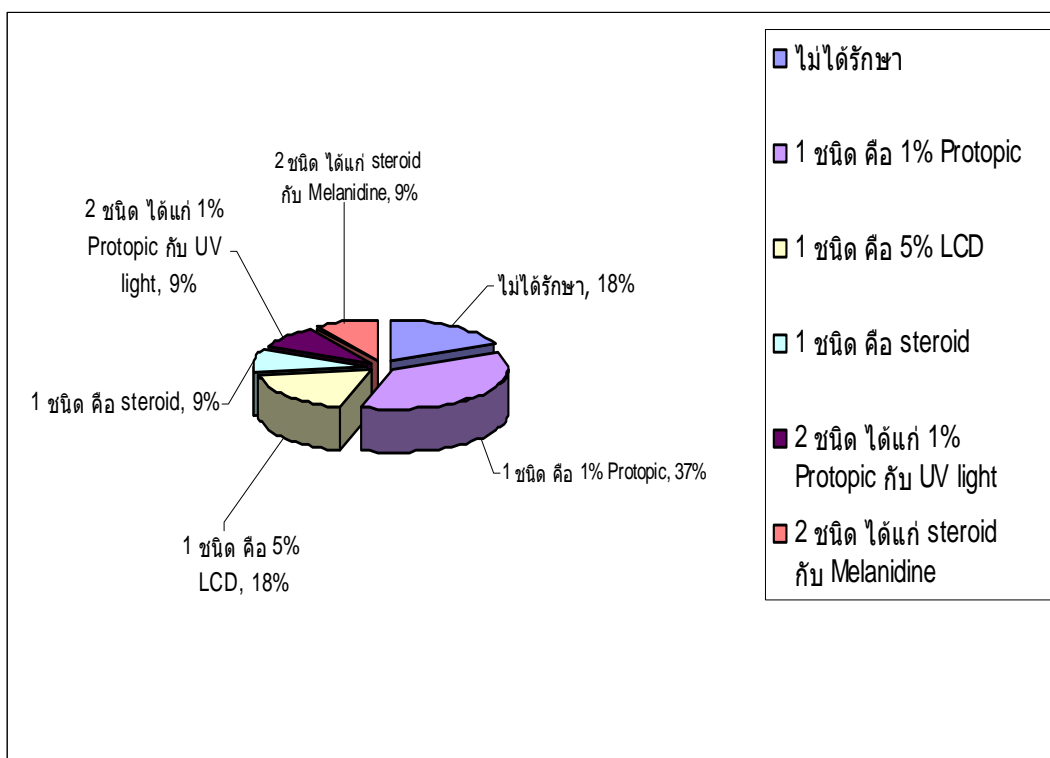
ผู้ป่วยมีลักษณะโดยทั่วไปดังต่อไปนี้

ตาราง 8 แสดงลักษณะโดยทั่วไปของกลุ่มผู้ป่วย

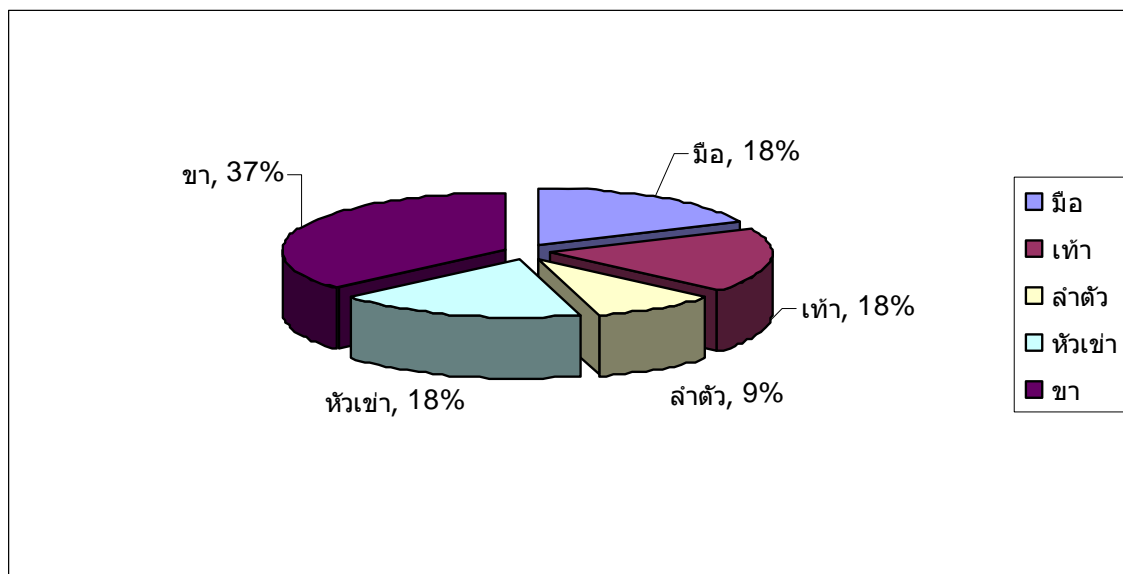
ลำดับที่	อายุ (ปี)	เพศ	ชนิดโรคต่างขา	ระยะเวลาที่เป็น (ปี)	ปัจจัยกระตุ้น	ประวัติครอบครัว	รักษา/หยุด (เดือน)
1	10	ชาย	segmental	4	ปฏิเสธ	ไม่มี	1%Protopic / 6
2	13	หญิง	vulgaris	5	ปฏิเสธ	ไม่มี	5%LCD / 6
3	7	หญิง	vulgaris	4	ปฏิเสธ	ไม่มี	5%LCD / 6
4	10	หญิง	segmental	5	ปฏิเสธ	ไม่มี	Steroid / 6
5	42	หญิง	vulgaris	7	ปฏิเสธ	ไม่มี	ปฏิเสธ
6	56	ชาย	vulgaris	30	ปฏิเสธ	ไม่มี	1%Protopic / 24
7	52	ชาย	vulgaris	35	ปฏิเสธ	ไม่มี	1%Protopic / 24
8	70	ชาย	mixed	40	ปฏิเสธ	ไม่มี	1%Protopic / 24
9	66	หญิง	mixed	15	ปฏิเสธ	มี	1%Protopic / 12 UV light
10	42	หญิง	mixed	9	ปฏิเสธ	มี	Steroid / 6 Melanidine
11	44	หญิง	mixed	7	ปฏิเสธ	ไม่มี	ปฏิเสธ



ภาพประกอบ 11 กราฟแสดงชนิดของโรคต่างชาวจำแนกตามการกระจายของรอยต่างชาว



ภาพประกอบ12 กราฟแสดงประวัติที่เคยได้รับการรักษามาก่อน



ภาพประกอบ 13 กราฟแสดงตำแหน่งรอยโรคที่ตัดขึ้นเนื้อ

จากตาราง 8 สามารถสรุปข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างดังนี้คือ ผู้ป่วยโรคต่างขา 11 ราย ประกอบไปด้วยเพศชายจำนวน 4 คน คิดเป็นร้อยละ 36 ของผู้ป่วยทั้งหมดและเพศหญิงจำนวน 7 คน คิดเป็นร้อยละ 64 ของผู้ป่วยทั้งหมด กลุ่มตัวอย่างมีอายุตั้งแต่ 7 ปีถึง 70 ปี โดยมีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 38 ปี แบ่งชนิดสีผิวตาม Fitz Patrick ชนิดที่ 3 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 27 ชนิดที่ 4 5 รายคิดเป็นร้อยละ 46 และชนิดที่ 5 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 27 ภาพประกอบ 11 กราฟแสดงชนิดของโรคต่างขา จำแนกตามการกระจายของรอยต่างขา แบ่งเป็นชนิด vulgaris 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 46 ชนิด mixed (acrofacial และ vulgaris) 4 รายเพศชาย 3 คน คิดเป็นร้อยละ 36 และชนิด segmental 2 รายคิดเป็นร้อยละ 18 (ตัวอย่างผู้ป่วยโรคต่างขาต่างภาพประกอบ 14) โดยระยะเวลาในการเป็นโรคต่างขาเฉลี่ย 14.6 ปี ผู้ป่วยโรคต่างขาทั้งหมดปฏิเสธปัจจัยกระตุ้นให้โรคต่างขาเป็นมากขึ้น มีประวัติครอบครัวเป็นโรคต่างขา 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 18 โดยมี 1 รายสัมพันธ์กับมารดา พี่สาว และ หลานชาย และอีก 1 รายสัมพันธ์กับพี่ชาย และน้องสาว ภาพประกอบ 12 แสดงกราฟประวัติที่เคยได้รับการรักษามาก่อนของผู้ป่วยโรคต่างขา โดยเคยได้รับการรักษามาก่อน 9 ราย คิดเป็นร้อยละ 82 ไม่ได้ได้รับการรักษา 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 18 แบ่งเป็นรักษาด้วยยา 1 ชนิดคือ 1% Protopic 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 37 5%LCD 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 18 และ Steroid 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 9 และรักษา 2 ชนิด ได้แก่ 1% Protopic ร่วมกับ UV light 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 9 และ Steroid ร่วมกับ Melanidine 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 9 โดยผู้ป่วยทั้งหมดหยุดการรักษาจนเข้าร่วมวิจัยเฉลี่ย 12.67 เดือน ภาพประกอบ 13 แสดงกราฟตำแหน่งรอยโรคที่ตัดขึ้นเนื้อ โดยตำแหน่งรอยโรคที่ตัดขึ้น

เนื้อ ที่ขา 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 37 ที่มือ 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 18 ที่เท้า 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 18 ที่หัว
เข่า 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 18 และที่ลำตัว 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 9



ภาพประกอบ 14 ผู้ป่วยโรคต่างขา ชนิด Mixed type โดยมีรอยด่างขาวที่บริเวณรอบปาก มือ เท้า
และลำตัว

ตาราง 9 แสดงลักษณะโดยทั่วไปของอาสาสมัคร

ลำดับที่	เพศ	อายุ (ปี)	โรคประจำตัว
1	ชาย	28	ปฏิเสธ
2	ชาย	35	ปฏิเสธ
3	หญิง	45	ปฏิเสธ

จากตาราง 9 อาสาสมัครที่เข้าร่วมวิจัยจำนวน 3 คน เพศชายจำนวน 2 คน คิดเป็นร้อยละ 67 และเพศหญิงจำนวน 1 คน คิดเป็นร้อยละ 33 มีอายุตั้งแต่ 28 ปีถึง 45 ปี โดยมีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 36 ปี ทั้งหมดปฏิเสธโรคประจำตัวใด

บริเวณที่ตัดชิ้นเนื้อ

มีรายละเอียดดังนี้

ตาราง 10 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนาของบริเวณที่ตัดชิ้นเนื้อของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 (11 ตัวอย่าง)	กลุ่มที่ 2 (11 ตัวอย่าง)	กลุ่มที่ 3 (3 ตัวอย่าง)
ขาขวา 3 ตัวอย่าง (28%)	ขาซ้าย 3 ตัวอย่าง (28%)	ต้นขาขวา (33%)
ขาซ้าย 1 ตัวอย่าง (9%)	ขาขวา 1 ตัวอย่าง (9%)	ต้นขาขวา (33%)
มือขวา 2 ตัวอย่าง (18%)	มือซ้าย 2 ตัวอย่าง (18%)	ต้นขาขวา (33%)
เข่าขวา 2 ตัวอย่าง (18%)	เข่าซ้าย 2 ตัวอย่าง (18%)	
เท้าขวา 1 ตัวอย่าง (9%)	เท้าซ้าย 1 ตัวอย่าง (9%)	
เท้าซ้าย 1 ตัวอย่าง (9%)	เท้าขวา 1 ตัวอย่าง (9%)	
ลำตัวขวา 1 ตัวอย่าง (9%)	ลำตัวซ้าย 1 ตัวอย่าง (9%)	

จากตาราง 10 แสดงข้อมูลบริเวณที่ตัดขึ้นเนื้อของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม ในกลุ่มที่ 1 จะตัดขึ้นเนื้อบริเวณรอยต่อขาของผู้ป่วยโรคต่างขา ทั้งหมด 11 ตัวอย่าง จะตัดขึ้นเนื้อที่ขาขวา 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 28 ขาซ้าย 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 9 มือขวา 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 18 เข้าขวา 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 18 เข้าขวา 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 9 เข้าซ้าย 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 9 และลำตัวขวา 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 9 ในกลุ่มที่ 2 จะตัดขึ้นเนื้อบริเวณผิวหนังปกติของผู้ป่วยโรคต่างขา ทั้งหมด 11 ตัวอย่าง ผังตรงข้ามที่สมมาตรกับกลุ่มที่ 1 และ ในกลุ่มที่ 3 จะตัดขึ้นเนื้อบริเวณผิวหนังปกติของอาสาสมัคร 3 ตัวอย่าง ที่บริเวณต้นขาหลังด้านขวา

ผลการทดลอง

ผลการแสดงออกของ ChAT, AchE Enzyme และ VAChT Protein ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ ในกลุ่มรอยโรคต่างขา กลุ่มผิวหนังปกติของผู้ป่วยโรคต่างขา และ กลุ่มอาสาสมัคร

ผลการแสดงออกของ ChAT, AchE Enzyme และ VAChT Protein จะแสดงออกมาเป็นความเข้มในการติดสี โดย 0 คือ ไม่มีการติดสี

- 1+ คือ ติดสีน้อย (มีการแสดงออกน้อย)
- 2+ ติดสีปานกลาง (มีการแสดงออกปานกลาง)
- 3+ ติดสีมาก (มีการแสดงออกมาก)
- 4+ ติดสีมากที่สุด (มีการแสดงออกมากที่สุด)
- ตรวจไม่พบชั้นผิวหนังชนิดนั้น

ข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนาของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ตามชั้นต่างๆของผิวหนังในแต่ละกลุ่ม มีรายละเอียดดังนี้

ตาราง 11 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนาของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAchT ตามชั้นต่างๆ ของผิวหนังในกลุ่มรอยโรคต่างขา (กลุ่มที่ 1) (N = 11 คน)

ลำดับ ที่	ชั้นผิวหนัง แอนติเจน	กลุ่มที่ 1									
		Epidermis					Sweat gl.		Sebaceous gl.	vessels	
		sc	sg	ss	sl	sb	glandular	duct		endothelial	muscular
1	ChAT	0	0	0	-	0	-	-	-	2+	0
	AchE	0	0	0	-	0	-	-	-	-	-
	VAchT	0	0	0	-	0	-	-	-	2+	0
2	ChAT	0	0	0	-	0	-	-	-	2+	0
	AchE	0	2+	2+	-	0	2+	2+	-	2+	0
	VAchT	0	0	0	-	0	-	-	-	-	-
3	ChAT	0	0	0	-	0	1+	1+	0	1+	0
	AchE	0	0	0	-	0	3+	3+	0	2+	2+
	VAchT	0	0	0	-	0	3+	3+	0	3+	0

ตาราง 11 (ต่อ)

ลำดับ ที่	ชั้นผิวหนัง แอนติเจน	กลุ่มที่ 1									
		Epidermis					Sweat gl.		Sebaceous gl.	vessels	
		sc	sg	ss	sl	sb	glandular	duct		endothelial	muscular
4	ChAT	0	0	2+	-	2+	1+	1+	0	2+	0
	AchE	0	0	0	-	0	2+	3+	0	2+	0
	VAchT	0	1+	1+	-	1+	2+	3+	0	3+	0
5	ChAT	0	0	0	-	0	1+	1+	0	2+	0
	AchE	0	0	0	-	1+	1+	1+	-	2+	0
	VAchT	0	1+	1+	-	1+	2+	2+	0	2+	-
6	ChAT	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0
	AchE	0	0	0	-	0	0	0	-	2+	0
	VAchT	0	0	0	-	0	3+	3+	2+	3+	0

ตาราง 11 (ต่อ)

ลำดับ ที่	ชั้นผิวหนัง แอนติเจน	กลุ่มที่ 1									
		Epidermis					Sweat gl.		Sebaceous gl.	vessels	
		sc	sg	ss	sl	sb	glandular	duct		endothelial	muscular
7	ChAT	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0
	AchE	0	0	2+	-	2+	3+	3+	-	0	0
	VAchT	0	2+	2+	-	0	1+	1+	0	0	0
8	ChAT	0	0	0	-	0	0	0	0	1+	0
	AchE	0	0	0	-	0	0	0	-	2+	0
	VAchT	0	0	0	-	0	3+	3+	0	1+	0
9	ChAT	0	0	0	-	0	0	0	-	2+	0
	AchE	0	2+	2+	-	1+	3+	3+	-	2+	0
	VAchT	0	0	0	-	0	2+	3+	-	2+	0

ตาราง 11 (ต่อ)

ลำดับ ที่	ชั้นผิวหนัง แอนติเจน	กลุ่มที่ 1									
		Epidermis					Sweat gl.		Sebaceous gl.	vessels	
		sc	sg	ss	sl	sb	glandular	duct		endothelial	muscular
10	ChAT	0	0	0	-	0	0	0	0	1+	0
	AchE	0	0	0	-	0	4+	4+	1+	2+	2+
	VAchT	0	0	0	-	0	2+	2+	0	1+	0
11	ChAT	0	2+	2+	-	2+	0	0	0	2+	0
	AchE	0	2+	2+	-	0	3+	3+	0	2+	1+
	VAchT	0	0	1+	-	0	3+	3+	0	2+	0

(sc: stratum corneum, sg: stratum granulosum, ss: stratum spinosum, sl: stratum lucidum, sb: stratum basale)

จากตาราง 11 แสดงผลของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAchT ตามชั้นต่างๆ ของผิวหนัง เช่น ในระดับ epidermis แบ่งเป็นชั้น sc, sg, ss, sl และ sb ในระดับ sweat gland แบ่งเป็น glandular cell และ sweat duct ในระดับ sebaceous gland และ ในระดับ cutaneous vessels แบ่งเป็น endothelial และ muscular layer ในกลุ่มรอยโรคต่างชาว (กลุ่มที่ 1)

ตาราง 12 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนาของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAchT ตามชั้นต่างๆ

ของผิวหนังในกลุ่มผิวหนังปกติในผู้ป่วยโรคต่างชาว (กลุ่มที่ 2) (N = 11 คน)

ลำดับ ที่	ชั้นผิวหนัง แอนติเจน	กลุ่มที่ 2									
		Epidermis					Sweat gl.		Sebaceous gl.	vessels	
		sc	sg	ss	sl	sb	glandular	duct		endothelial	muscular
1	ChAT	0	0	0	-	0	-	-	-	2+	0
	AchE	0	0	0	-	0	-	-	-	2+	0
	VAchT	0	0	1+	-	0	-	-	-	2+	0
2	ChAT	0	0	0	-	0	-	-	-	2+	0
	AchE	0	1+	1+	-	0	0	0	-	2+	0
	VAchT	0	0	0	-	0	-	-	-	2+	-
3	ChAT	0	0	0	-	0	1+	1+	-	1+	0
	AchE	0	0	0	-	0	3+	3+	-	1+	0
	VAchT	0	0	0	-	0	3+	3+	-	3+	0

ตาราง 12 (ต่อ)

ลำดับ ที่	ชั้นผิวหนัง แอนติเจน	กลุ่มที่ 2									
		Epidermis					Sweat gl.		Sebaceous gl.	vessels	
		sc	sg	ss	sl	sb	glandular	duct		endothelial	muscular
4	ChAT	0	0	0	-	0	1+	1+	0	0	2+
	AchE	0	0	1+	-	1+	2+	2+	0	3+	0
	VAchT	0	0	0	-	0	3+	3+	0	3+	0
5	ChAT	0	0	1+	-	0	1+	1+	2+	1+	0
	AchE	0	0	1+	-	0	2+	2+	2+	1+	0
	VAchT	0	0	0	-	0	2+	2+	0	1+	-
6	ChAT	0	0	0	-	0	-	-	0	1+	0
	AchE	0	0	0	-	0	0	0	2+	3+	0
	VAchT	0	0	0	-	0	2+	2+	1+	3+	0

ตาราง 12 (ต่อ)

ลำดับ ที่	ชั้นผิวหนัง แอนติเจน	กลุ่มที่ 2									
		Epidermis					Sweat gl.		Sebaceous gl.	vessels	
		sc	sg	ss	sl	sb	glandular	duct		endothelial	muscular
7	ChAT	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0
	AchE	0	0	1+	-	1+	3+	3+	-	2+	0
	VAchT	0	2+	2+	-	0	3+	4+	-	3+	0
8	ChAT	0	0	0	-	0	0	0	-	1+	0
	AchE	0	0	0	-	0	0	1+	-	1+	0
	VAchT	0	0	0	-	0	3+	3+	-	2+	0
9	ChAT	0	0	0	-	0	0	2+	-	2+	0
	AchE	0	1+	1+	-	0	3+	3+	-	2+	0
	VAchT	0	0	0	-	0	3+	3+	-	2+	0

ตาราง 12 (ต่อ)

ลำดับ ที่	ชั้นผิวหนัง แอนติเจน	กลุ่มที่ 2										
		Epidermis					Sweat gl.		Sebaceous gl.	vessels		
		sc	sg	ss	sl	sb	glandular	duct		endotheli al	muscular	
10	ChAT	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0
	AchE	0	0	0	-	0	3+	3+	0	2+	2+	2+
	VAchT	0	2+	2+	-	0	3+	3+	0	1+	0	0
11	ChAT	0	0	0	-	0	0	0	-	2+	0	0
	AchE	0	0	1+	-	0	2+	3+	-	2+	0	0
	VAchT	0	0	0	-	0	0	3+	-	1+	0	0

(sc: stratum corneum, sg: stratum granulosum, ss: stratum spinosum, sl: stratum lucidum, sb: stratum basale)

จากตาราง 12 แสดงผลของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAchT ตามชั้นต่างๆ ของผิวหนัง เช่น ในระดับ epidermis แบ่งเป็นชั้น sc, sg, ss, sl และ sb ในระดับ sweat gland แบ่งเป็น glandular cell และ sweat duct ในระดับ sebaceous gland และในระดับ cutaneous vessels แบ่งเป็น endothelial และ muscular layer ในกลุ่มผิวหนังปกติในผู้ป่วยโรคต่างชาว (กลุ่มที่ 2)

ตาราง 13 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนาของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ตามชั้นต่างๆ ของผิวหนังในกลุ่มอาสาสมัคร (กลุ่มที่ 3) (N = 11 คน)

ลำดับ ที่	ชั้นผิวหนัง แอนติเจน	กลุ่มที่ 1									
		Epidermis					Sweat gl.		Sebaceous gl.	vessels	
		sc	sg	ss	sl	sb	glandular	duct		endothelial	muscular
1	ChAT	0	2+	3+	-	2+	0	1+	0	1+	0
	AchE	0	3+	3+	-	4+	0	2+	0	1+	0
	VAChT	0	3+	3+	-	2+	0	1+	0	1+	0
2	ChAT	0	1+	1+	-	3+	3+	3+	2+	2+	0
	AchE	0	0	0	-	0	2+	2+	0	2+	0
	VAChT	0	1+	1+	-	0	3+	3+	0	2+	0
3	ChAT	0	0	0	-	2+	2+	1+	3+	2+	0
	AchE	0	1+	1+	-	2+	0	2+	3+	2+	0
	VAChT	0	2+	2+	-	2+	0	3+	3+	2+	0

(sc: stratum corneum, sg: stratum granulosum, ss: stratum spinosum, sl: stratum lucidum, sb: stratum basale)

จากตาราง 13 แสดงผลของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ตามชั้นต่างๆ ของผิวหนัง เช่น ในระดับ epidermis แบ่งเป็นชั้น sc, sg, ss, sl และ sb ในระดับ sweat gland แบ่งเป็น glandular cell และ sweat duct ในระดับ sebaceous gland และในระดับ cutaneous vessels แบ่งเป็น endothelial และ muscular layer ในกลุ่มอาสาสมัคร (กลุ่มที่ 3)

ตาราง 14 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา (ร้อยละ) ของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ในชั้น Epidermis ของผิวหนังในกลุ่มที่ 1

Epidermis ChAT	sc	sg	ss	sl	sb
	0	11 (100.0%)	10 (90.9%)	9 (81.8%)	0 (0.0%)
1+	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
2+	0 (0.0%)	1 (9.1%)	2 (18.2%)	0 (0.0%)	2 (18.2%)
3+	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
รวม	11 (100.0%)	11(100.0%)	11 (100.0%)	0 (100.0%)	11(100.0%)
AchE	sc	sg	ss	sl	sb
	0	11 (100.0%)	8 (72.7%)	7 (63.6%)	0 (0.0%)
1+	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (18.2%)
2+	0 (0.0%)	3 (27.3%)	4 (36.4%)	0 (0.0%)	1 (9.1%)
3+	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
รวม	11 (100.0%)	11(100.0%)	11 (100.0%)	0 (100.0%)	11(100.0%)
VAChT	sc	sg	ss	sl	sb
	0	11 (100.0%)	8 (72.7%)	7 (63.6%)	0 (0.0%)
1+	0 (0.0%)	2 (18.2%)	3 (27.3%)	0 (0.0%)	2 (18.2%)
2+	0 (0.0%)	1 (9.1%)	1 (9.1%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
3+	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
รวม	11 (100.0%)	11(100.0%)	11 (100.0%)	0 (100.0%)	11(100.0%)

จากตาราง 14 การแสดงออกของ ChAT ในกลุ่มที่ 1 ที่ระดับ epidermis ชั้น s. granulosum 1 ราย (9.1%) ชั้น s. spinosum 2 ราย (18.2%) ชั้น s. basale 2 ราย (18.2%) การแสดงออกของ AchE ในกลุ่มที่ 1 ที่ระดับ epidermis ชั้น s. granulosum 3 ราย (27.3%) ชั้น s. spinosum 4 ราย (36.4%) และชั้น s. basale 3 ราย (27.3%) การแสดงออกของ VAChT ในกลุ่มที่ 1 ที่ระดับ epidermis ชั้น s. granulosum 3 ราย (27.3%) ชั้น s. spinosum 4 ราย (36.4%) และชั้น s. basale 2 ราย (18.2%)

ตาราง 15 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา (ร้อยละ) ของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ใน Sweat gland ของผิวหนังในกลุ่มที่ 1

Sweat gland	Glandular	Duct
ChAT		
0	6 (66.7%)	6 (66.7%)
1+	3 (33.3%)	3 (33.3%)
2+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
3+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
รวม	9 (100.0%)	9 (100.0%)
AchE		
0	2 (20.0%)	2 (20.0%)
1+	1 (10.0%)	1 (10.0%)
2+	2 (20.0%)	1 (10.0%)
3+	4 (40.0%)	5 (50.0%)
4+	1 (10.0%)	1 (10.0%)
รวม	10 (100.0%)	10 (100.0%)
VAChT		
0	0 (0.0%)	0 (0.0%)
1+	1 (11.2%)	1 (11.2%)
2+	4 (44.4%)	2 (22.1%)
3+	4 (44.4%)	6 (66.7%)
4+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
รวม	9 (100.0%)	9 (100.0%)

จากตาราง 15 การแสดงออกของ ChAT ที่ระดับ sweat glands พบที่ sweat glands 3 ราย (33.3%) และ sweat ducts 3 ราย (33.3%) การแสดงออกของ AchE ที่ระดับ sweat glands พบที่ sweat glands 8 ราย (80%) และ sweat ducts 8 ราย (80%) การแสดงออกของ VAChT ที่ระดับ sweat glands พบที่ sweat glands 9 ราย (100%) และ sweat ducts 9 ราย (100%) ตาราง 16 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา (ร้อยละ) ของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ใน Sebaceous gland ของผิวหนังในกลุ่มที่ 1

ChAT	Sebaceous gland
0	8 (100.0%)
1+	0 (0.0%)
2+	0 (0.0%)
3+	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)
รวม	8 (100.0%)
AchE	Sebaceous gland
0	4 (80.0%)
1+	1 (20.0%)
2+	0 (0.0%)
3+	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)
รวม	5 (100.0%)
VAChT	Sebaceous gland
0	7 (87.5%)
1+	0 (0.0%)
2+	1 (12.5%)
3+	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)
รวม	8 (100.0%)

จากตาราง 16 การแสดงออกของ ChAT ไม่มีการแสดงที่ sebaceous glands การแสดงออกของ AchE ที่ sebaceous glands 1 ราย (20%) การแสดงออกของ VAChT ที่ sebaceous glands 1 ราย (12.5%)

ตาราง 17 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา (ร้อยละ) ของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ใน Cutaneous vessels ของผิวหนังในกลุ่มที่ 1

Cutaneous vessels ChAT	Endothelial	Muscular
0	2 (20.0%)	10 (100.0%)
1+	3 (30.0%)	0 (0.0%)
2+	5 (50.0%)	0 (0.0%)
3+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
รวม	10 (100.0%)	10 (100.0%)
Cutaneous vessels AchE	Endothelial	Muscular
0	1 (10.0%)	7 (70.0%)
1+	0 (0.0%)	1 (10.0%)
2+	9 (90.0%)	2 (20.0%)
3+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
รวม	10 (100.0%)	10 (100.0%)
Cutaneous vessels VAChT	Endothelial	Muscular
0	1 (10.0%)	10 (100.0%)
1+	2 (20.0%)	0 (0.0%)
2+	4 (40.0%)	0 (0.0%)
3+	3 (30.0%)	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
รวม	10 (100.0%)	10 (100.0%)

จากตาราง 17 การแสดงออกของ ChAT ที่ระดับ vessels พบที่ endothelial 8 ราย (80%) การแสดงออกของ AchE ที่ระดับ vessels พบที่ endothelial 9 ราย (90%) และ muscular layers 3 ราย (30%) การแสดงออกของ VAChT ที่ระดับ vessels พบที่ endothelial 9 ราย (90%) โดยทั้ง ChAT และ VAChT ไม่มีการแสดงออกที่ muscular layers ของ vessels

ตาราง 18 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา (ร้อยละ) ของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ในชั้น Epidermis ของผิวหนังในกลุ่มที่ 2

Epidermis	sc	sg	ss	sl	sb
ChAT					
0	11 (100.0%)	11 (100.0%)	10 (90.9%)	0 (0.0%)	11 (100.0%)
1+	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (9.1%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
2+	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
3+	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
รวม	11 (100.0%)	11(100.0%)	11 (100.0%)	0 (100.0%)	11(100.0%)
AchE					
0	11 (100.0%)	9 (81.8%)	4 (36.4%)	0 (0.0%)	9 (81.8%)
1+	0 (0.0%)	2 (18.2%)	7 (63.6%)	0 (0.0%)	2 (18.2%)
2+	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
3+	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
รวม	11 (100.0%)	11(100.0%)	11 (100.0%)	0 (100.0%)	11(100.0%)
VAChT					
0	11 (100.0%)	9 (81.8%)	9 (81.8%)	0 (0.0%)	11 (100.0%)
1+	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
2+	0 (0.0%)	2 (18.2%)	2 (18.2%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
3+	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
รวม	11 (100.0%)	11(100.0%)	11 (100.0%)	0 (100.0%)	11(100.0%)

จากตาราง 18 การแสดงออกของ ChAT ในกลุ่มที่ 2 ที่ระดับ epidermis ชั้น s. spinosum 1 ราย (9.1%) การแสดงออกของ AchE ในกลุ่มที่ 2 ที่ระดับ epidermis ชั้น s. granulosum 2 ราย (18.2%) ชั้น s. spinosum 7 ราย (63.6%) และชั้น s. basale 2 ราย (18.2%) การแสดงออกของ VAChT ในกลุ่มที่ 2 ที่ระดับ epidermis ชั้น s. granulosum 2 ราย (18.2%) ชั้น s. spinosum 2 ราย (18.2%)

ตาราง 19 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา (ร้อยละ) ของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ใน Sweat gland ของผิวหนังในกลุ่มที่ 2

Sweat gland	Glandular	Duct
ChAT		
0	5 (62.5%)	4 (50.0%)
1+	3 (37.5%)	3 (37.5%)
2+	0 (0.0%)	1 (12.5%)
3+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
รวม	8 (100.0%)	8 (100.0%)
AchE		
0	2 (22.2%)	1 (11.1%)
1+	0 (0.0%)	1 (11.1%)
2+	3 (33.4%)	2 (22.2%)
3+	4 (44.4%)	5 (55.6%)
4+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
รวม	9 (100.0%)	9 (100.0%)
VAChT		
0	1 (11.1%)	0 (0.0%)
1+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
2+	2 (22.2%)	2 (22.2%)
3+	6 (66.7%)	6 (66.7%)
4+	0 (0.0%)	1 (11.1%)
รวม	9 (100.0%)	9 (100.0%)

จากตาราง 19 การแสดงออกของ ChAT ที่ระดับ sweat glands พบที่ sweat glands 3 ราย (37.5%) และ sweat ducts 4 ราย (50%) การแสดงออกของ AchE ที่ระดับ sweat glands พบที่ sweat glands 7 ราย (77.8%) และ sweat ducts 8 ราย (88.9%) การแสดงออกของ VAChT ที่ระดับ sweat glands พบที่ sweat glands 8 ราย (88.9%) และ sweat ducts 9 ราย (100%)

ตาราง 20 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา (ร้อยละ) ของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ใน Sebaceous gland ของผิวหนังในกลุ่มที่ 2

ChAT	Sebaceous gland
0	4 (80.0%)
1+	0 (0.0%)
2+	1 (20.0%)
3+	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)
รวม	5 (100.0%)
AchE	Sebaceous gland
0	2 (50.0%)
1+	0 (0.0%)
2+	2 (50.0%)
3+	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)
รวม	4 (100.0%)
VAChT	Sebaceous gland
0	3 (75%)
1+	1 (25%)
2+	0 (0.0%)
3+	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)
รวม	4 (100.0%)

จากตาราง 20 การแสดงออกของ ChAT ที่ sebaceous glands 1 ราย (20%) การแสดงออกของ AchE ที่ sebaceous glands 2 ราย (50%) การแสดงออกของ VAChT ที่ sebaceous glands 1 ราย (25%)

ตาราง 21 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา (ร้อยละ) ของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ใน Cutaneous vessels ของผิวหนังในกลุ่มที่ 2

Cutaneous vessels ChAT	Endothelial	Muscular
0	3 (27.2%)	10 (90.9%)
1+	4 (36.4%)	1 (9.1%)
2+	4 (36.4%)	0 (0.0%)
3+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
รวม	11 (100.0%)	11 (100.0%)
Cutaneous vessels AchE	Endothelial	Muscular
0	0 (0.0%)	10 (90.9%)
1+	3 (27.3%)	0 (0.0%)
2+	6(54.5%)	1 (9.1%)
3+	2 (18.2%)	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
รวม	11 (100.0%)	11 (100.0%)
Cutaneous vessels VAChT	Endothelial	Muscular
0	0 (0.0%)	11 (100.0%)
1+	3 (27.2%)	0 (0.0%)
2+	4 (36.4%)	0 (0.0%)
3+	4 (36.4%)	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
รวม	11 (100.0%)	11 (100.0%)

จากตาราง 21 การแสดงออกของ ChAT ที่ระดับ vessels พบที่ endothelial 8 ราย (72.8%) muscular layers 1 ราย (9.1%) การแสดงออกของ AchE ที่ระดับ vessels พบที่ endothelial 11 ราย (100%) ที่ muscular layers 1 ราย (9.1%) การแสดงออกของ VAchT ที่ระดับ vessels พบที่ endothelial 11 ราย (100%) โดยไม่มีการแสดงออกที่ muscular layers ของ vessels

ตาราง 22 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา (ร้อยละ) ของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ในชั้น Epidermis ของผิวหนังในกลุ่มที่ 3

Epidermis	sc	sg	ss	sl	sb
ChAT					
0	3 (100.0%)	0 (0.0%)	3 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
1+	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
2+	0 (0.0%)	1 (33.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (66.7%)
3+	0 (0.0%)	2 (66.7%)	3 (100.0%)	0 (0.0%)	1 (33.3%)
4+	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
รวม	3 (100.0%)	3 (100.0%)	3 (100.0%)	0 (0.0%)	3 (100.0%)
AchE					
0	3 (100.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0 (0.0%)	0(0.0%)
1+	0 (0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0 (0.0%)	0(0.0%)
2+	0 (0.0%)	1(33.3%)	0(0.0%)	0 (0.0%)	2(66.7%)
3+	0 (0.0%)	2(66.7%)	3(100.0%)	0 (0.0%)	0(0.0%)
4+	0 (0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0 (0.0%)	1(33.3%)
รวม	3 (100.0%)	3 (100.0%)	3 (100.0%)	0 (0.0%)	3 (100.0%)
VAChT					
0	3 (100.0%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	0 (0.0%)	2 (66.7%)
1+	0 (0.0%)	2 (66.7%)	2 (66.7%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
2+	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
3+	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (33.3%)
4+	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
รวม	3 (100.0%)	3 (100.0%)	3 (100.0%)	0 (0.0%)	3 (100.0%)

จากตาราง 22 การแสดงออกของ ChAT ในกลุ่มที่ 3 ที่ระดับ epidermis ชั้น s. granulosum 3 ราย (100%) s. spinosum 3 ราย (100%) s. basale 3 ราย (100%) การแสดงออกของ AchE ในกลุ่มที่ 3 ที่ระดับ epidermis ชั้น s. granulosum 3 ราย (100%) ชั้น s. spinosum 3 ราย (100%) และชั้น s. basale 3 ราย (100%) การแสดงออกของ VAChT ในกลุ่มที่ 3 ที่ระดับ epidermis ชั้น s. granulosum 2 ราย (66.7%) ชั้น s. spinosum 2 ราย (66.7%) และชั้น s. basale 1 ราย (33.3%)

ตาราง 23 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา (ร้อยละ) ของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ใน Sweat gland ของผิวหนังในกลุ่มที่ 3

Sweat gland ChAT	Glandular	Duct
0	3 (100.0%)	0 (0.0%)
1+	0 (0.0%)	2 (66.7%)
2+	0 (0.0%)	1 (33.3%)
3+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
รวม	3 (100.0%)	3 (100.0%)
AchE	Glandular	Duct
0	2 (66.7%)	0 (0.0%)
1+	0 (0.0%)	1 (33.3%)
2+	1 (33.3%)	1 (33.3%)
3+	0 (0.0%)	1 (33.3%)
4+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
รวม	3 (100.0%)	3 (100.0%)
VAChT	Glandular	Duct
0	0 (0.0%)	0 (0.0%)
1+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
2+	1 (33.3%)	1 (33.3%)
3+	2 (66.7%)	2 (66.7%)
4+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
รวม	3 (100.0%)	3 (100.0%)

จากตาราง 23 การแสดงออกของ ChAT ที่ระดับ sweat glands พบที่ sweat glands 0 ราย (0%) และ sweat ducts 3 ราย (100%) การแสดงออกของ AchE ที่ระดับ sweat glands พบที่ sweat glands 1 ราย (33.3%) และ sweat ducts 3 ราย (100%) การแสดงออกของ VAchT ที่ระดับ sweat glands พบที่ sweat glands 3 ราย (100%) และ sweat ducts 3 ราย (100%)

ตาราง 24 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา (ร้อยละ) ของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAchT ใน Sebaceous gland ของผิวหนังในกลุ่มที่ 3

ChAT	Sebaceous gland
0	3 (100.0%)
1+	0 (0.0%)
2+	0 (0.0%)
3+	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)
รวม	3 (100.0%)
AchE	Sebaceous gland
0	0 (0.0%)
1+	0 (0.0%)
2+	0 (0.0%)
3+	3 (100.0%)
4+	0 (0.0%)
รวม	3 (100.0%)
VAchT	Sebaceous gland
0	2 (66.7%)
1+	0 (0.0%)
2+	1 (33.3%)
3+	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)
รวม	3 (100.0%)

จากตาราง 24 การแสดงออกของ ChAT ไม่มีการแสดงออกที่ sebaceous glands การแสดงออกของ AchE ที่ sebaceous glands 3 ราย (100%) การแสดงออกของ VAChT ที่ sebaceous glands 1 ราย (33.3%)

ตาราง 25 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนา (ร้อยละ) ของการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ใน Cutaneous vessels ของผิวหนังในกลุ่มที่ 3

Cutaneous vessels ChAT	Endothelial	Muscular
0	0 (0.0%)	3 (100.0%)
1+	3 (100.0%)	0 (0.0%)
2+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
3+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
รวม	3 (100.0%)	3 (100.0%)
AchE	Endothelial	Muscular
0	0 (0.0%)	3 (100.0%)
1+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
2+	3 (100.0%)	0 (0.0%)
3+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
รวม	3 (100.0%)	3 (100.0%)
VAChT	Endothelial	Muscular
0	0 (0.0%)	3 (100.0%)
1+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
2+	3 (100.0%)	0 (0.0%)
3+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
4+	0 (0.0%)	0 (0.0%)
รวม	3 (100.0%)	3 (100.0%)

จากตาราง 25 การแสดงออกของ ChAT ที่ระดับ vessels พบที่ endothelial 3 ราย (100%) การแสดงออกของ AchE ที่ระดับ vessels พบที่ endothelial 3 ราย (100%) การแสดงออกของ VAChT ที่ระดับ vessels พบที่ endothelial 3 ราย (100%) โดยทั้ง ChAT AchE และ VAChT ไม่มีการแสดงออกที่ muscular layers ของ vessels

ตาราง 26 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนาของระยะเวลาในการเกิดสีระหว่างการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีและชิ้นเนื้อ (incubation time) ของเอนไซม์แต่ละชนิด

Enzyme กลุ่ม	ChAT		AchE		VAChT	
	incubation time (min.)		incubation time (min.)		incubation time (min.)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
1 (n=11)	102.55	16.741	65.27	2.412	100.73	15.710
2 (n=11)	98.00	20.732	65.36	1.206	97.55	20.617
3 (n=3)	75.00	13.229	78.33	10.408	76.67	11.547

จากตาราง 26 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงพรรณนาของระยะเวลาในการเกิดสีระหว่างการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีและชิ้นเนื้อ (incubation time) ของเอนไซม์แต่ละชนิดในแต่ละกลุ่มพบว่า incubation time ของ ChAT ในกลุ่มที่ 1 มีค่าเฉลี่ย 102.55 นาที (SD=16.741) ในกลุ่มที่ 2 มีค่าเฉลี่ย 98.00 นาที (SD=20.732) ในกลุ่มที่ 3 มีค่าเฉลี่ย 75.00 นาที (SD=13.229) incubation time ของ AchE ในกลุ่มที่ 1 มีค่าเฉลี่ย 65.27 นาที (SD=2.412) ในกลุ่มที่ 2 มีค่าเฉลี่ย 65.36 นาที (SD=1.206) ในกลุ่มที่ 3 มีค่าเฉลี่ย 78.33 นาที (SD=10.408) incubation time ของ VAChT ในกลุ่มที่ 1 มีค่าเฉลี่ย 100.73 นาที (SD=15.710) ในกลุ่มที่ 2 มีค่าเฉลี่ย 97.55 นาที (SD=20.617) ในกลุ่มที่ 3 มีค่าเฉลี่ย 76.67 นาที (SD=11.547)

ตาราง 27 แสดงข้อมูลวิจัยเชิงวิเคราะห์ของ incubation time ของ ChAT ระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 2

กลุ่มที่ทำการเปรียบเทียบ	Sig.(2-tailed)
กลุ่มที่ 1 และ กลุ่มที่ 2	0.274

จากตาราง 27 พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่าง incubation time ของ ChAT ระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 2

ตาราง 28 แสดงข้อมูลสถิติเชิงวิเคราะห์ของ incubation time ของ ChAT ระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 3

กลุ่มที่ทำการเปรียบเทียบ	Sig.(2-tailed)
กลุ่มที่ 1 และ กลุ่มที่ 3	0.023

จากตาราง 28 พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง incubation time ของ ChAT ระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 3 ($p=0.023$)

ตาราง 29 แสดงข้อมูลสถิติเชิงวิเคราะห์ของ incubation time ของ ChAT ระหว่างกลุ่มที่ 2 และ 3

กลุ่มที่ทำการเปรียบเทียบ	Sig.(2-tailed)
กลุ่มที่ 2 และ กลุ่มที่ 3	0.098

จากตาราง 29 พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่าง incubation time ของ ChAT ระหว่างกลุ่มที่ 2 และ 3

ตาราง 30 แสดงข้อมูลสถิติเชิงวิเคราะห์ของ incubation time ของ AchE ระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 2

กลุ่มที่ทำการเปรียบเทียบ	Sig.(2-tailed)
กลุ่มที่ 1 และ กลุ่มที่ 2	0.896

จากตาราง 30 พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่าง incubation time ของ AchE ระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 2

ตาราง 31 แสดงข้อมูลสถิติเชิงวิเคราะห์ของ incubation time ของ AchE ระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 3

กลุ่มที่ทำการเปรียบเทียบ	Sig.(2-tailed)
กลุ่มที่ 1 และ กลุ่มที่ 3	0.160

จากตาราง 31 พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่าง incubation time ของ AchE ระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 3

ตาราง 32 แสดงข้อมูลสถิติเชิงวิเคราะห์ของ incubation time ของ AchE ระหว่างกลุ่มที่ 2 และ 3

กลุ่มที่ทำการเปรียบเทียบ	Sig.(2-tailed)
กลุ่มที่ 2 และ กลุ่มที่ 3	0.163

จากตาราง 32 พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่าง incubation time ของ AchE ระหว่างกลุ่มที่ 2 และ 3

ตาราง 33 แสดงข้อมูลสถิติเชิงวิเคราะห์ของ incubation time ของ VAchT ระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 2

กลุ่มที่ทำการเปรียบเทียบ	Sig.(2-tailed)
กลุ่มที่ 1 และ กลุ่มที่ 2	0.422

จากตาราง 33 พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่าง incubation time ของ VAchT ระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 2

ตาราง 34 แสดงข้อมูลสถิติเชิงวิเคราะห์ของ incubation time ของ VAchT ระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 3

กลุ่มที่ทำการเปรียบเทียบ	Sig.(2-tailed)
กลุ่มที่ 1 และ กลุ่มที่ 2	0.031

จากตาราง 34 พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง incubation time ของ VAchT ระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 2 ($p=0.031$)

ตาราง 35 แสดงข้อมูลสถิติเชิงวิเคราะห์ของ incubation time ของ VAchT ระหว่างกลุ่มที่ 2 และ 3

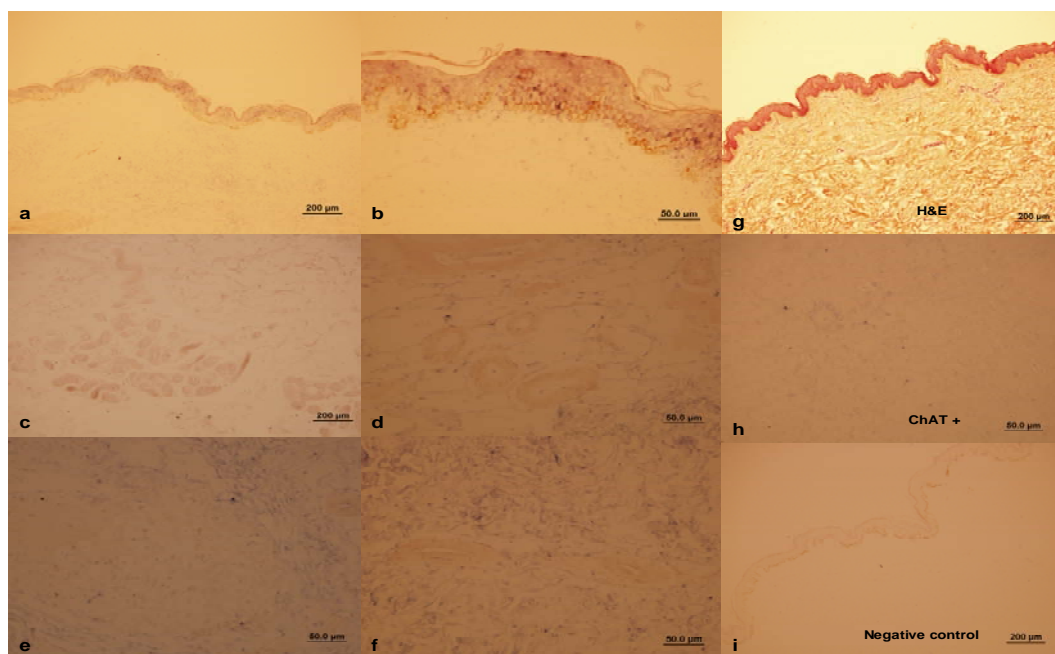
กลุ่มที่ทำการเปรียบเทียบ	Sig.(2-tailed)
กลุ่มที่ 2 และ กลุ่มที่ 3	0.124

จากตาราง 35 พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่าง incubation time ของ VAchT ระหว่างกลุ่มที่ 2 และ 3

อิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้

จากการศึกษาการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ในแต่ละชั้นของผิวหนังของแต่ละกลุ่มที่ศึกษา โดยใช้เทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้

ในกลุ่มอาสาสมัครพบว่า การแสดงออกของ ChAT (ภาพประกอบ15) ที่ epidermis พบมากที่สุดที่ชั้น s. granulosum, s. spinosum และ s. basale (ภาพประกอบ15a, 15b) ที่ sweat glands จะพบมากที่สุดที่ sweat ducts บริเวณ apical site แต่ไม่พบที่ glandular cells (ภาพประกอบ15c, 15d) โดยไม่มีการแสดงออกที่ sebaceous glands (ภาพประกอบ15e) และที่ vessels จะพบในส่วน endothelial แต่ไม่พบที่ muscular layers ของ vessels (ภาพประกอบ15f)



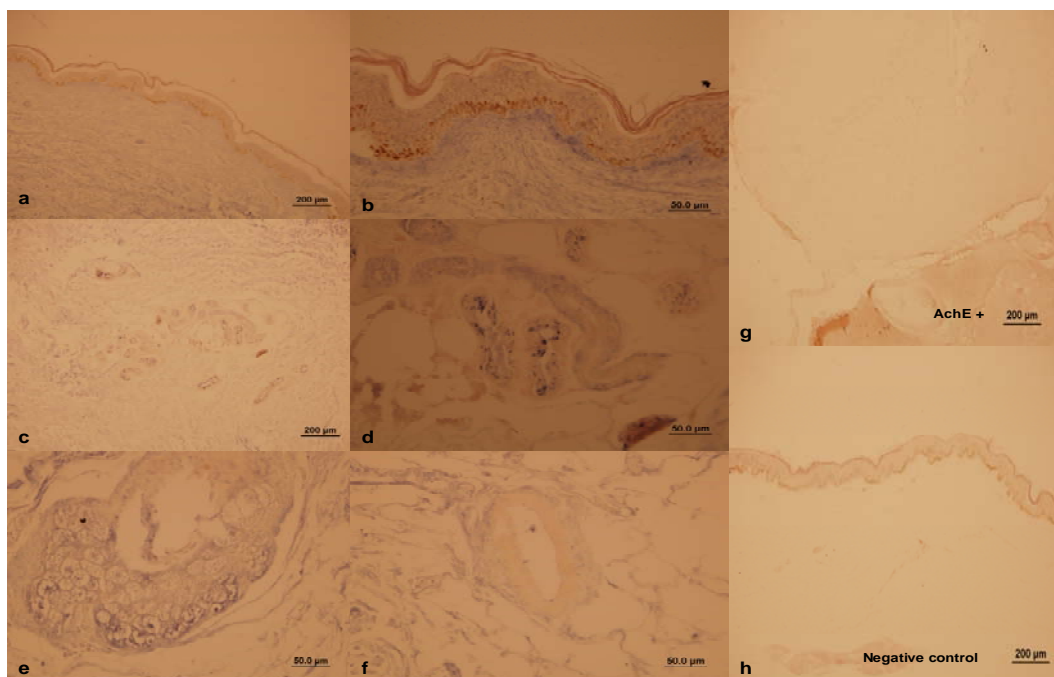
ภาพประกอบ15 การแสดงออกของ ChATด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในผิวหนังกลุ่มอาสาสมัคร

(a,b) ที่ชั้น epidermis (10x, 40x). (c,d) ที่ sweat glands (10x, 40x). (e) ที่ sebaceous glands.

(f) ที่ vessels. (g) H&E. (h) Rat brain (positive control). (i) Negative control.

(10x, bar=200 μm; 40x, bar=50 μm)

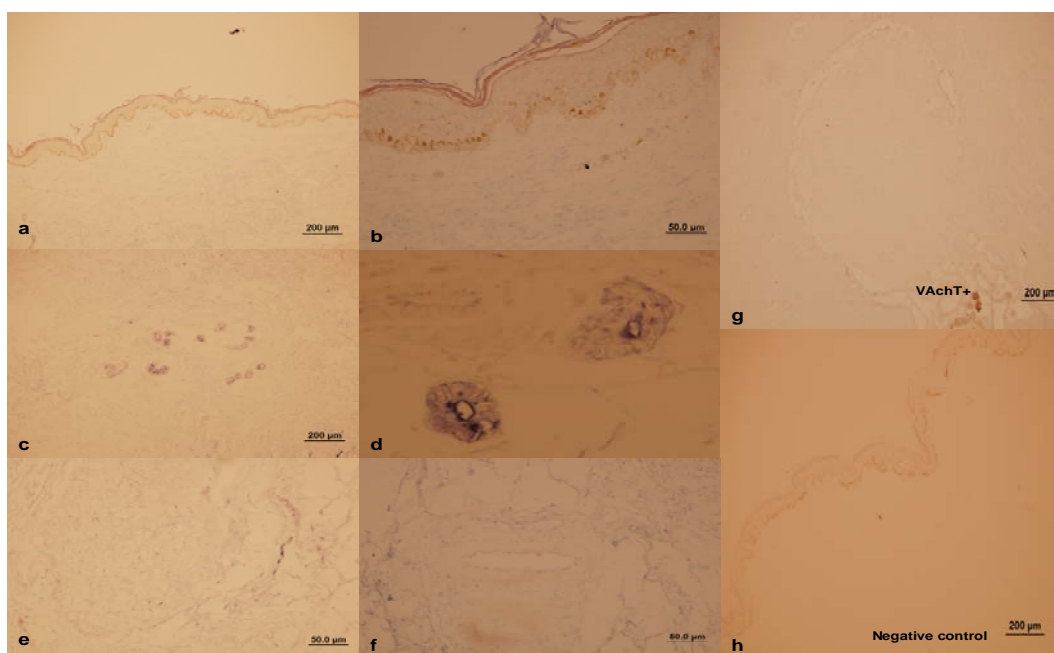
ในกลุ่มอาสาสมัครพบว่า การแสดงออกของ AchE (ภาพประกอบ16) ที่ epidermis พบมากที่ชั้น s. granulosum, s. spinosum และ s. basale (ภาพประกอบ16a, 16b) โดยที่ sweat glands จะพบมากที่ glandular cells และ sweat ducts บริเวณ apical site (ภาพประกอบ16c, 16d) และจะพบมากที่ sebaceous glands (ภาพประกอบ16e) ที่ vessels จะพบในส่วน endothelial แต่ไม่พบที่ muscular layers ของ vessels (ภาพประกอบ16f)



ภาพประกอบ16 การแสดงออกของ AchE ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในผิวหนังกลุ่มอาสาสมัคร

(a,b) ที่ชั้น epidermis (10x, 40x). (c,d) ที่ sweat glands (10x, 40x). (e) ที่ sebaceous glands. (f) ที่ vessels. (g) Rat brain (positive control). (h) Negative control. (10x, bar=200 μ m; 40x, bar=50 μ m)

ในกลุ่มอาสาสมัครพบว่า การแสดงออกของ VAchT (ภาพประกอบ17) ที่ epidermis พบมากที่สุดที่ชั้น s. granulosum และ s. basale (ภาพประกอบ17a, 17b) โดยที่ sweat glands จะพบมากที่สุดที่ glandular cells และ sweat ducts บริเวณ apical site (ภาพประกอบ17c, 17d) โดยจะมีการแสดงออกที่ sebaceous glands น้อย (ภาพประกอบ17e) และที่ vessels จะพบในส่วน endothelial แต่ไม่พบที่ muscular layers ของ vessels (ภาพประกอบ17f)



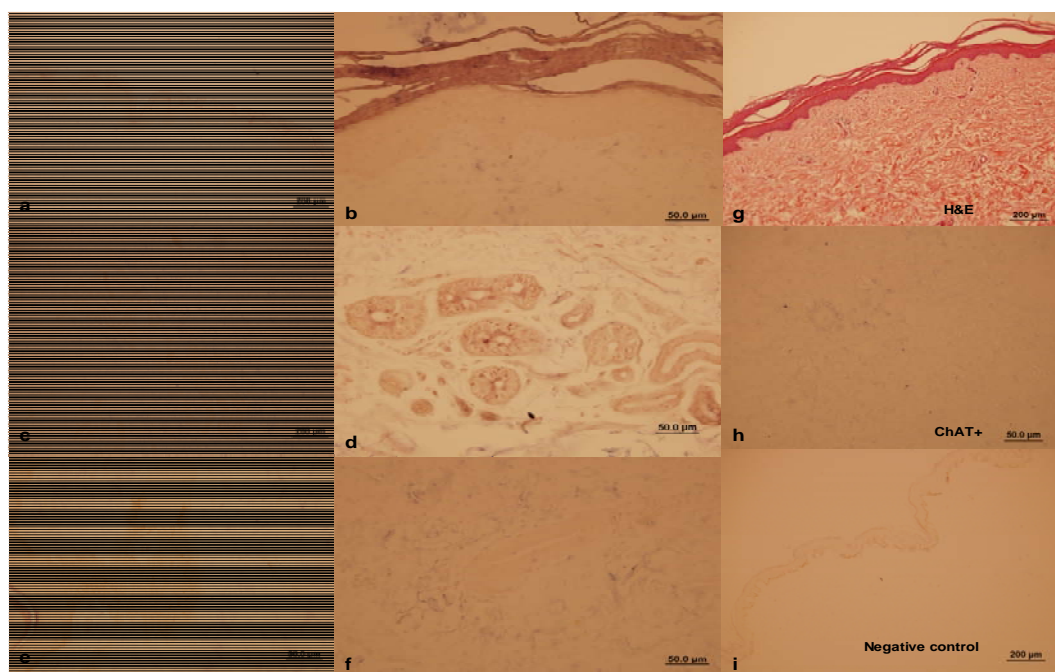
ภาพประกอบ17 การแสดงออกของ VAchT ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในผิวหนังกลุ่มอาสาสมัคร

(a,b) ที่ชั้น epidermis (10x, 40x). (c,d) ที่ sweat glands (10x, 40x). (e) ที่ sebaceous glands.

(f) ที่ vessels. (g) Rat brain (positive control). (h) Negative control.

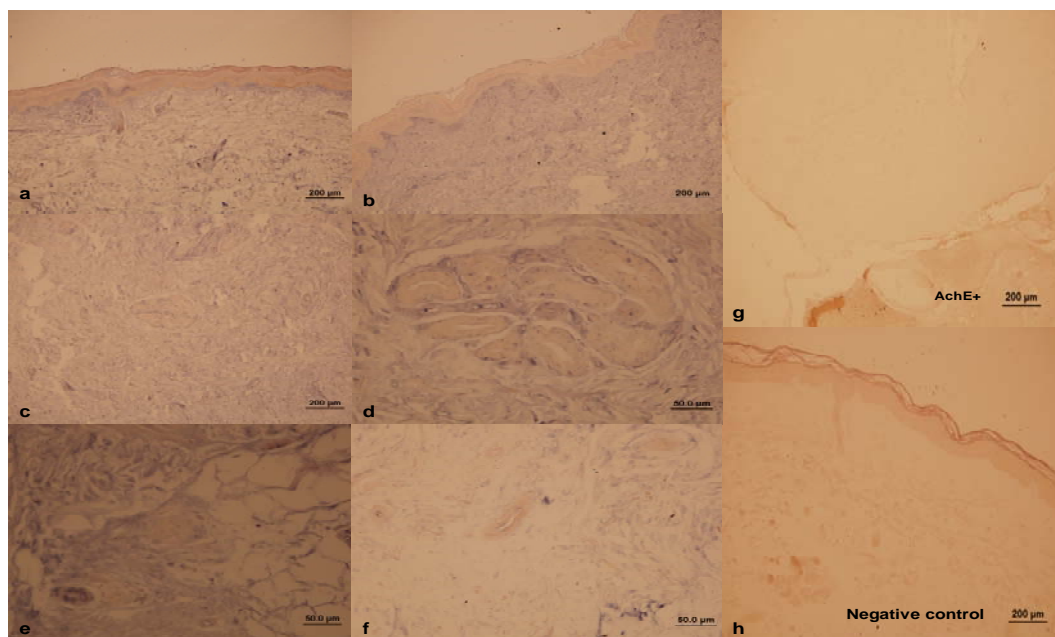
(10x, bar=200 μ m; 40x, bar=50 μ m)

ในกลุ่มรอยต่างขาในผิวหนังของผู้ป่วยโรคต่างขาพบว่า การแสดงออกของ ChAT (ภาพประกอบ18) ลดลงในชั้น epidermis (ภาพประกอบ18a, 18b) และ sweat glands ทั้งในส่วน glandular cells และ sweat ducts (ภาพประกอบ18c, 18d) โดยไม่มีการแสดงออกที่ sebaceous glands (ภาพประกอบ18e) และที่ vessels จะพบในส่วน endothelial แต่ไม่พบที่ muscular layers ของ vessels (ภาพประกอบ18f)



ภาพประกอบ18 การแสดงออกของ ChAT ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรีนอรอยต่างขาในผิวหนังของผู้ป่วยโรคต่างขา
 (a,b) ที่ชั้น epidermis (10x, 40x). (c,d) ที่ sweat glands (10x, 40x). (e) ที่ sebaceous glands. (f) ที่ vessels. (g) H&E. (h) Rat brain (positive control). (i) Negative control.
 (10x, bar=200 μ m; 40x, bar=50 μ m)

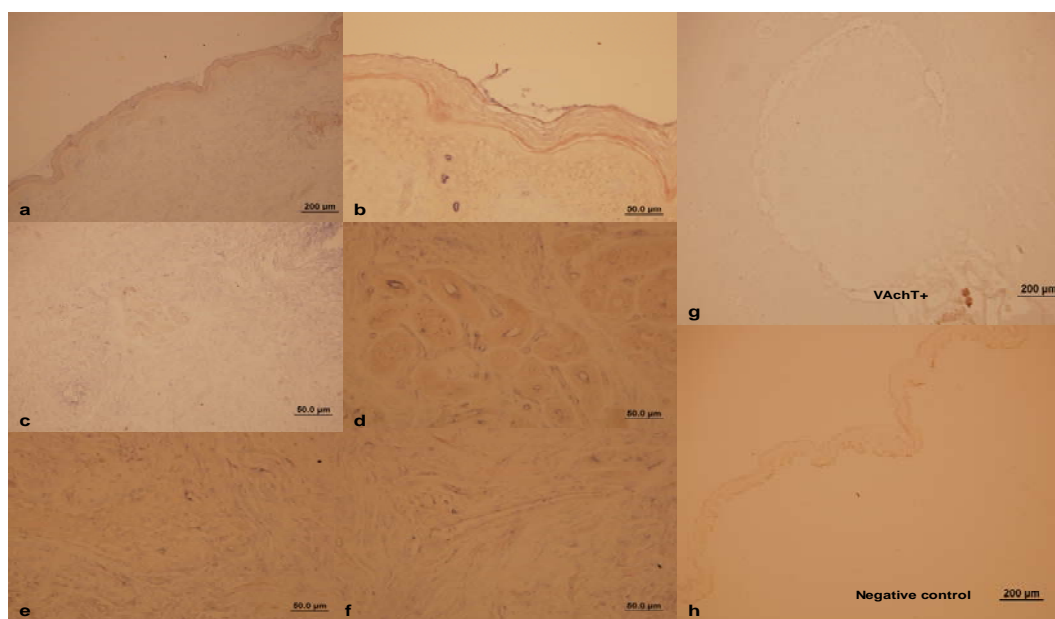
ในกลุ่มรอยต่างขาในผิวหนังของผู้ป่วยโรคต่างขาพบว่า การแสดงออกของ AchE (ภาพประกอบ19) ที่ epidermis พบลดลงในชั้น s. granulosum, s. spinosum และ s. basale (ภาพประกอบ 19a, 19b) โดยที่ sweat glands ยังคงพบมากที่ glandular cells และ sweat ducts บริเวณ apical site (ภาพประกอบ19c, 19d) โดยจะพบการแสดงออกของ AchE ลดลงที่ sebaceous glands (ภาพประกอบ19e) และที่ vessels ยังคงพบมากที่ endothelial และบางรายจะพบที่ muscular layers ของ vessels (ภาพประกอบ19f)



ภาพประกอบ19 การแสดงออกของ AchE ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในรอยต่างขาในผิวหนังของผู้ป่วยโรคต่างขา

(a,b) ที่ชั้น epidermis (10x, 40x). (c,d) ที่ sweat glands (10x, 40x). (e) ที่ sebaceous glands. (f) ที่ vessels. (g) Rat brain (positive control). (h) Negative control. (10x, bar=200 μm; 40x, bar=50 μm)

ในกลุ่มรอยต่างขาในผิวหนังของผู้ป่วยโรคต่างขาพบว่า การแสดงออกของ VAchT (ภาพประกอบ 20) ลดลงในชั้น epidermis (ภาพประกอบ 20a, 20b) แต่ยังคงพบมากที่ sweat glands ทั้งในส่วน glandular cells และ sweat ducts (ภาพประกอบ 20c, 20d) โดยจะมีการแสดงออกที่ sebaceous glands น้อยมาก (ภาพประกอบ 20e) และที่ vessels จะพบในส่วน endothelial แต่ไม่พบที่ muscular layers ของ vessels (ภาพประกอบ 20f)



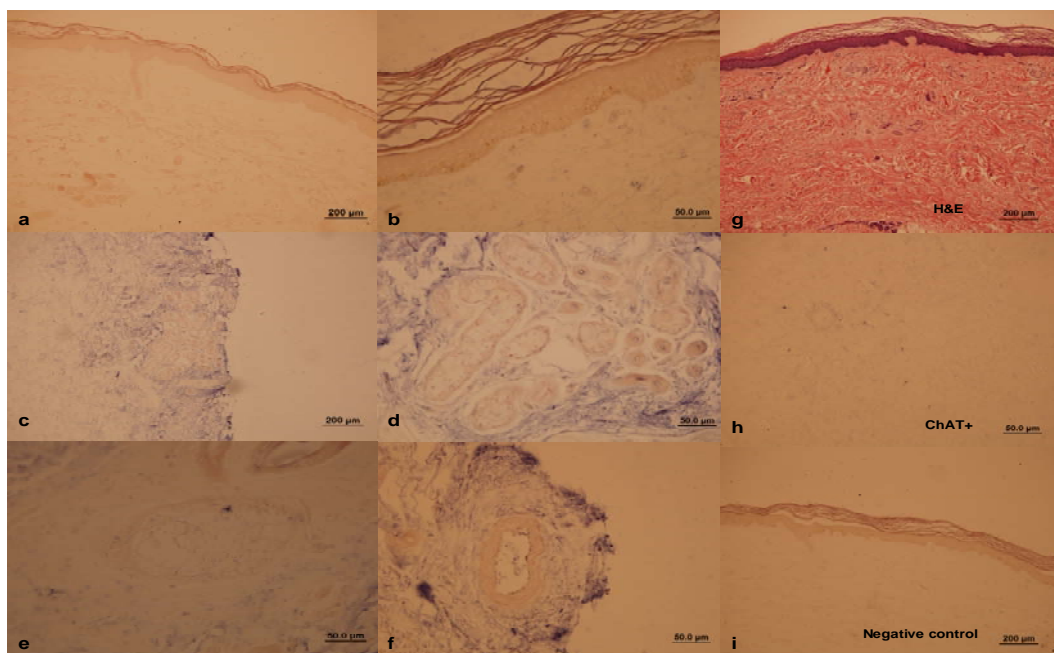
ภาพประกอบ 20 การแสดงออกของ VAchT ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในรอยต่างขาในผิวหนังของผู้ป่วยโรคต่างขา

(a,b) ที่ชั้น epidermis (10x, 40x). (c,d) ที่ sweat glands (10x, 40x). (e) ที่ sebaceous glands.

(f) ที่ vessels. (g) Rat brain (positive control). (h) Negative control.

(10x, bar=200 μm; 40x, bar=50 μm)

ในกลุ่มผิวหนังปกติของผู้ป่วยโรคต่างชาพบว่าการแสดงออกของ ChAT (ภาพประกอบ 21) ยังคงพบน้อยมากในชั้น epidermis (ภาพประกอบ 21a, 21b) และพบน้อยใน sweat glands ทั้งในส่วน glandular cells และ sweat ducts บริเวณ apical site (ภาพประกอบ 21c, 21d) และพบน้อยใน sebaceous glands (ภาพประกอบ 21e) และที่ vessels ยังคงพบมากในส่วน endothelial แต่พบน้อยมากที่ muscular layers ของ vessels (ภาพประกอบ 21f)



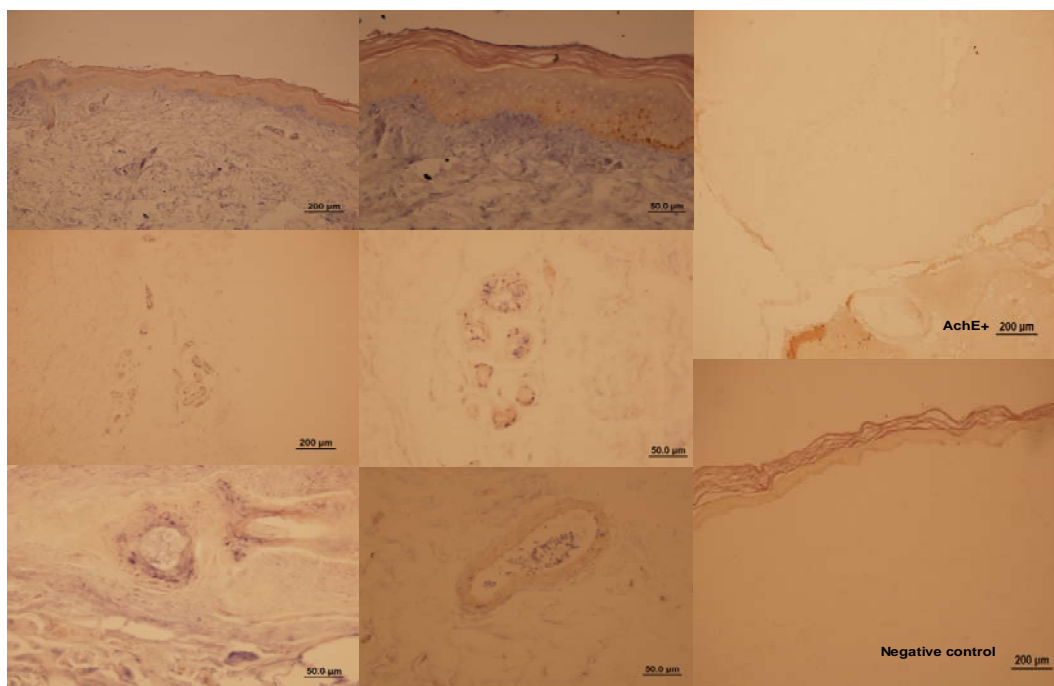
ภาพประกอบ 21 การแสดงออกของ ChAT ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรียในผิวหนังปกติของผู้ป่วยโรคต่างชา

(a,b) ที่ชั้น epidermis (10x, 40x). (c,d) ที่ sweat glands (10x, 40x). (e) ที่ sebaceous glands.

(f) ที่ vessels. (g) H&E. (h) Rat brain (positive control). (i) Negative control.

(10x, bar=200 μm; 40x, bar=50 μm)

ในกลุ่มผิวหนังปกติของผู้ป่วยโรคต่างชาพบว่าการแสดงออกของ AchE (ภาพประกอบ 22) ที่ epidermis จะพบน้อยมากในชั้น s. granulosum และ s. basale แต่พบปานกลางที่ชั้น s. spinosum (ภาพประกอบ 22a, 22b) โดยที่ sweat glands ยังคงพบมากที่ glandular cells และ sweat ducts บริเวณ apical site (ภาพประกอบ 22c, 22d) โดยจะพบการแสดงออกของ AchE ลดลงที่ sebaceous glands (ภาพประกอบ 22e) และที่ vessels ยังคงพบมากที่ endothelial และบางรายพบที่ muscular layers ของ vessels (ภาพประกอบ 22f)



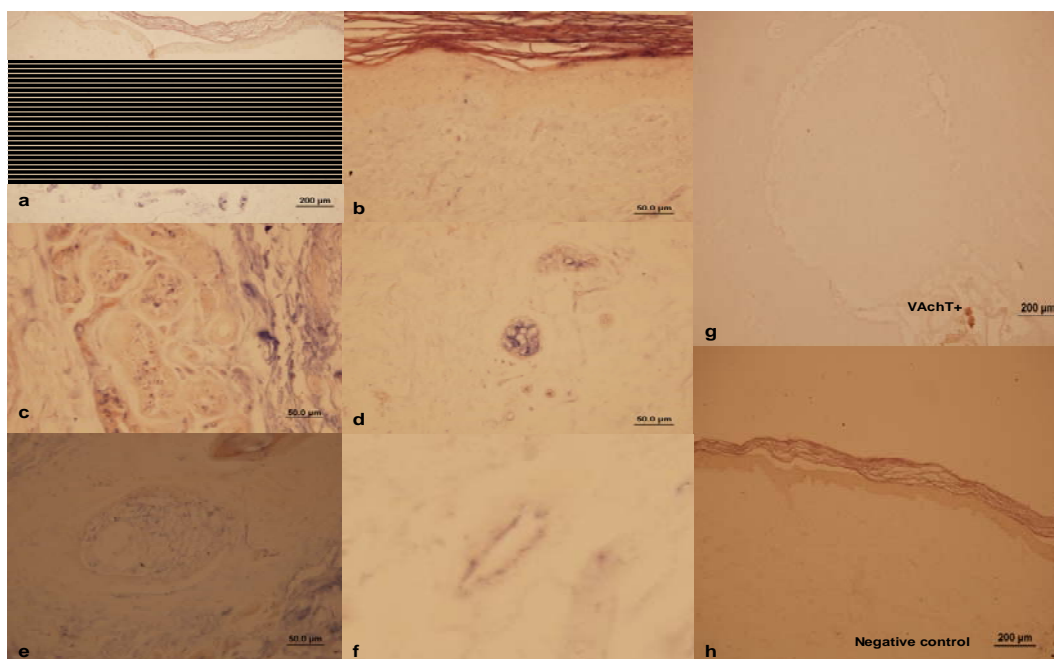
ภาพประกอบ 22 การแสดงออกของ AchE ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในผิวหนังปกติของผู้ป่วยโรคต่างชา

(a,b) ที่ชั้น epidermis (10x, 40x). (c,d) ที่ sweat glands (10x, 40x). (e) ที่ sebaceous glands.

(f) ที่ vessels. (g) Rat brain (positive control). (h) Negative control.

(10x, bar=200 μm; 40x, bar=50 μm)

ในกลุ่มผิวหนังปกติของผู้ป่วยโรคต่างชาพบว่าการแสดงออกของ VAChT (ภาพประกอบ 23) จะพบน้อยมากในชั้น epidermis (ภาพประกอบ 23a, 23b) แต่ยังคงพบมากที่ sweat glands ทั้งในส่วน glandular cells และ sweat ducts บริเวณ apical site (ภาพประกอบ 23c, 23d) โดยจะมีการแสดงออกที่ sebaceous glands น้อย (ภาพประกอบ 23e) และที่ vessels จะพบในส่วน endothelial แต่ไม่พบที่ muscular layers ของ vessels (ภาพประกอบ 23f)



ภาพประกอบ 23 การแสดงออกของ VAChT ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในผิวหนังปกติของผู้ป่วยโรคต่างชา

(a,b) ที่ชั้น epidermis (10x, 40x). (c,d) ที่ sweat glands (10x, 40x). (e) ที่ sebaceous glands.

(f) ที่ vessels. (g) Rat brain (positive control). (h) Negative control.

(10x, bar=200 µm; 40x, bar=50 µm)

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผล

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ เพื่อศึกษาถึงการแสดงออกของระบบโคลิเนอร์จิกคือ ChAT Enzyme, AchE Enzyme และ VAChT Protein ในผิวหนังชั้นต่างๆของรอยโรคต่าง ๆ จากการศึกษาทบทวนวรรณกรรมพบว่าระบบโคลิเนอร์จิก จะแบ่งเป็น 2 ระบบตามการตรวจพบคือ ระบบโคลิเนอร์จิกที่สร้างมาจากระบบประสาทคือ neuronal cholinergic system และระบบโคลิเนอร์จิกที่สร้างมาจากอวัยวะอื่นนอกเหนือระบบประสาทคือ non-neuronal cholinergic system อิทธิพลของระบบโคลิเนอร์จิกจากฤทธิ์ของสาร Ach ที่ผิวหนังผ่านทาง nicotinic และ muscarinic receptors ทำให้แต่ละเซลล์ของแต่ละอวัยวะมีหน้าที่แตกต่างกันเช่นการเจริญ การแบ่งตัว การเคลื่อนที่ apoptotic secretion โดยมีผลให้เซลล์เคอราติโนไซต์ เคลื่อนตัวจากชั้น stratum granulosum ไปที่ชั้น stratum corneum (Nguyen, Ndoye; et al. 2001) การป้องกันและความแข็งแรงของเซลล์ การหลั่งเหงื่อ และกระตุ้นการผลิตไขมัน และควบคุมระบบการไหลเวียนโลหิต โดยอาจมีปัจจัยอื่นๆมาเกี่ยวข้อง เช่น calcium ions, vitamin A หรือ D, growth hormones หรือ cytokines (Fuchs. 1990; Presland ;& Jurevic. 2002) โดยที่ผิวหนังจะมีทั้ง 2 ระบบ ยกตัวอย่างเช่น ที่ eccrine sweat glands จะได้รับสาร Ach จาก cholinergic nerve fiber (Landis. 1999) และ keratinocytes หรือ melanocytes ที่บริเวณ epidermis จะมีการสร้าง หลั่ง และกระบวนการทำลายสาร Ach (Grando, Kist; et al. 1993; Grando. 1997; Ndoye, Buchli; et al. 1998; Nguyen, Ndoye; et al. 2001) โดยขบวนการสังเคราะห์ การนำพาและการทำลายสาร Ach ซึ่งอาศัย ChAT Enzyme, AchE Enzyme และ VAChT Protein ตามลำดับ ไม่แตกต่างจากขบวนการใน neuronal cholinergic system

โรคต่าง ๆ เป็นโรคที่เกิดจากการลดลงของการสร้างเม็ดสีหรือมีการทำลายของเมลานินไซท์จาก epidermis หรือ hair follicles มีหลายทฤษฎีที่อธิบายการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น ทฤษฎีด้านพันธุกรรม (Finco, Cuccia; et al. 1991; Ando, Chi; et al. 1993; Zamani, Spaepen; et al. 2001) ทฤษฎีออกโตอิมมูน (Ortonne ;& Bose. 1993) ทฤษฎีความเป็นพิษต่อเมลานินไซท์ (Lerner ;& Nordlund. 1978) ทฤษฎีของระบบประสาท (Barnes. 1988) ทฤษฎีทำลายตัวเอง (Lerner. 1971) และ ทฤษฎีด้านชีวเคมี (Schallreuter, Lemke; et al. 1994) ในปี 1966 โมเลอร์ และ เลอเนอร์ (Moller ;& Lerner. 1966) เชื่อว่าสาร Ach จะยับยั้งการตอบสนองเฉพาะที่ของ melanocytes ต่อ α -MSH

ในปี 1989 เยนจาร์ (Iyengar. 1989) ได้ศึกษาในผู้ป่วยโรคต่าง ๆ 52 ราย พบระดับของ เอนไซม์ AchE ในรอยโรคดำหรือเทาจะไม่มี (และกลับมาปกติเมื่อมี repigmentation) เป็นผลให้มีระดับของ

สาร Ach สูงขึ้น ซึ่งจะมีผลในการยับยั้งฤทธิ์ของเอนไซม์ tyrosinase (aerobic dopa oxidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นในการสร้างเม็ดสีของเมลานินไซต์ ต่อมาปี 2001 ชารอยเตอร์ และวูด (Schallreuter ;& Wood. 2001) ค้นพบว่ามีความเครียด oxidase stress ทำให้ระดับของสาร H_2O_2 เพิ่มขึ้นโดย H_2O_2 จะไปเปลี่ยนโครงสร้างของเอนไซม์ AchE มีผลทำให้ระดับของสาร Ach เพิ่มขึ้น ซึ่งสาร Ach จะยับยั้งฤทธิ์ของ tyrosinase enzyme ทำให้เกิดรอยต่างขาว (Iyengar. 1989)

การแสดงออกของ Cholinergic system ที่ผิวหนัง

การแสดงออกของ ChAT Enzyme และ VAChT Protein ที่ผิวหนัง

มีการศึกษาพบว่า ChAT และ VAChT จะมาจากยีนเดียวกันโดยพบว่า VAChT gene จะอยู่บน chromosome 10 (10q11.2) (Erickson, Varoqui; et al. 1994) ซึ่งเป็นยีนเดียวกับที่สร้าง ChAT gene เรียกว่า cholinergic gene locus (Eiden. 1998) ซึ่งส่วนของ VAChT gene ทั้งหมดจะอยู่ในส่วนของ intron ของ ChAT gene (Cervini, Houhou; et al. 1995) ดังนั้นการแสดงออกของ ChAT และ VAChT มักจะอยู่บริเวณเดียวกัน

VAChT เป็น amine-handling cell ใน mammals อยู่ในกลุ่ม vesicular amine transporters เช่น VAMT1, VAMT2 และ VAChT ซึ่งมีหน้าที่สร้าง เก็บ และหลั่งสาร Ach หรือ biogenic amines อื่น เช่น dopamine, norepinephrine, epinephrine, histamine หรือ serotonin โดยจะถูกกระตุ้นจากฮอร์โมนที่จำเพาะ autocrine หรือ paracrine factors และ neurotransmitters ซึ่ง VAChT ในระบบประสาทส่วนกลางจะพบที่ cholinergic neurons และ ในระบบประสาทส่วนปลายจะพบที่ระบบประสาทอัตโนมัติ sympathetic และ parasympathetic โดยจะไม่พบที่ sensory nervous system

มีการค้นพบ ChAT ที่ผิวหนังทั้งใน epidermis และ dermis (Grando, Kist; et al. 1993; Grando. 1997; Klapproth, Reinheimer; et al. 1997; Wessler, Reinheimer; et al. 2003) ต่อมาพบการแสดงออกของ ChAT (Nguyen, Ndoye; et al. 2001) และ VAChT (Elwary, Chavan; et al. 2006) ใน keratinocytes และ melanocytes ในชั้น epidermal layers และยังพบตามอวัยวะที่มีปลายประสาท cholinergic neurons มาเลี้ยงเช่น dermal blood vessels ที่ endothelial และ muscular layers ผ่านทาง sensory และ autonomic nerve fibers (Kirkpatrick, Bittinger; et al. 2001) sweat glands บริเวณ acini และ duct , motor endplates ของ skeletal muscles (Haberberger, Pfeil; et al. 2002), nerve fibers bundles, nerve plexus ที่มาเลี้ยง inner epithelial layer ของ hair follicles, glands ใน subcutis (Haberberger, Pfeil; et al. 2002), sebaceous glands (Wessler, Reinheimer; et al. 2003) และใน sensory fibers ก็มีการแสดงออกของ ChAT และ VAChT (Botchkarev, Botchkarev; et al. 1998)

การแสดงออกของ ChAT ที่ epidermis

ปี 1993 แกรนด์และคณะ (Grando, Kist ;et al. 1993) ได้ค้นพบ ChAT Enzyme ที่ epidermal layers โดยพบว่า ChAT activity ใน keratinocytes 20 pmol Ach/mg protein/min โดยที่ Keratinocyte 1 เซลล์ สร้าง Ach เฉลี่ย 2×10^{-17} mol และหลั่ง Ach เฉลี่ย 7×10^{-19} mol of Ach/min ต่อมา มีการยืนยันการตรวจพบ mRNA ของ ChAT ใน keratinocytes โดยพบว่า ChAT มีการแสดงออกตลอดทั้งชั้นของ epidermis (Nguyen, Ndoye; et al. 2001) มีการศึกษาใน keratinocyte cell culture พบว่า cell ที่มี highly differentiation จะมีการแสดงออกของ ChAT มากขึ้นโดยจะเพิ่มมากขึ้นตามชั้นของ epidermis ที่มีการแบ่งตัว จนถึงสุดที่ stratum corneum สอดคล้องกับการแสดงออกของ VAChT ซึ่งขบวนการนี้จะเกี่ยวข้องกับขบวนการเกิด Apoptotic secretion ที่ถูกควบคุมโดย cholinergic signaling (Nguyen, Ndoye; et al. 2001) และจะเกี่ยวข้องกับการเกิด exfoliation ของเส้นผม โดยจะมีการแสดงออกของ ChAT มากขึ้นใน internal root sheath ทำให้เกิด terminal differentiation ใน anagen phase ในกระบวนการการหลุดร่วงของเส้นผม (Barajon, Rumio; et al. 2001)

การแสดงออกของ VAChT ที่ epidermis

มีการศึกษาพบการแสดงออกของ VAChT ทั้งใน epidermal melanocytes และ keratinocytes โดยพบในส่วนของ perinuclear distribution โดยบางส่วนพบที่ nucleus และ dendrite ของ melanocytes ซึ่ง VAChT จะเก็บสาร ACh ไว้ติดกับ myosin Va fibers โดยสาร ACh ที่ถูกนำพาโดย VAChT อาจจะทำให้การเคลื่อนที่ของ melanosomes ดีขึ้น โดยการแสดงออกที่ epidermal layers จะพบมากในชั้น stratum granulosum มากกว่าในชั้น stratum basale โดยการแสดงออกเป็นแบบ homogeneous distribution ตลอดทั้ง epidermis (Elwary, Chavan; et al. 2006) ซึ่งการแสดงออกจะเพิ่มขึ้นตามการ differentiation ของ keratinocytes ตาม epidermal layer มากขึ้นและสิ้นสุดก่อนถึง stratum corneum (Nguyen, Ndoye; et al. 2001) นอกจากนี้ยังพบที่ peripheral lymphocytes ใน cutaneous nerves บริเวณ dermal epidermal junction (Tayebati, El-Assouad; et al. 2002)

การแสดงออกของ ChAT และ VAChT ที่ sweat glands

จากการศึกษาใน Rat embryo เกี่ยวกับการเจริญและการทำหน้าที่ของ sweat glands ในระยะแรกจะอาศัย catecholamine ที่มาจาก sympathetic neurons หลังจากเจริญได้ประมาณ 3 สัปดาห์ sympathetic neurons จะทำหน้าที่เป็น cholinergic neurons กระตุ้น sweat glands ซึ่งต่อมากการพัฒนา การเจริญและการทำหน้าที่ของ sweat glands จะอาศัยสาร Ach (Grant, Francis;

et al. 1995) กระตุ้นผ่านทาง muscarinic receptors (Langley. 1922; Hayashi ;& Nakagawa. 1963; Stevens ;& Landis. 1987; Vilches, Navarro; et al. 1995) ซึ่งการแสดงออกของ ChAT และ VAChT ที่ sweat glands จะมาจาก cholinergic nerve fibers (Landis ;& Keefe. 1983; Leblanc ;& Landis. 1986; Weihe, Tao-Cheng; et al. 1996) และที่หลอดเลือดที่มาเลี้ยง eccrine sweat glands ใน deeper dermis (Guidry ;& Landis. 1998; Zancanaro, Merigo; et al. 1999)

การแสดงออกของ ChAT และ VAChT ที่ sebaceous glands

มีการศึกษาทาง immunohistochemistry พบ ChAT และ VAChT ตาม nerve fiber ที่มาเลี้ยง sebaceous glands (Wessler, Kirkpatrick; et al. 1999)

การแสดงออกของ ChAT และ VAChT ที่ vessels

เชื่อว่าระบบ cholinergic จะควบคุม การไหลเวียนโลหิตของผิวหนัง (Low ;& Westerman. 1989; Muck-Weymann, Albrecht; et al. 1996) พบว่าการไหลเวียนโลหิต การฉีกขาดของหลอดเลือด และแรงดันเลือดเฉพาะที่มีผลต่อ endothelial acetylcholine ซึ่งเป็น mediator ที่สำคัญกระตุ้น การหลั่ง Nitric oxide (NO) ทำให้เกิดการขยายหลอดเลือด

มีการศึกษาเกี่ยวกับระบบ cholinergic ใน endothelial cell ของ human aorta พบว่ามีการแสดงออกของ α_3 nicotinic receptors, ChAT และ VAChT ใน pulmonary endothelial cells (Macklin, Maus; et al. 1998) โดยยืนยันการตรวจพบ mRNA ของ ChAT ที่ endothelial cells และมีการสร้าง Ach กระจายตาม vascular wall (Haberberger, Bodenbenner; et al. 2000) และ VAChT ใน endothelial cells ของ dermal blood vessels (Kirkpatrick, Bittinger; et al. 2001)

การแสดงออกของ AchE Enzyme

ในระบบ non-neuronal cholinergic system ที่ผิวหนังนอกจากจะมีการค้นพบ ChAT Enzyme VAChT Protein และสาร Ach ตามที่กล่าวข้างต้นแล้วยังมีการแสดงออกของ AchE Enzyme ในผิวหนัง ปี 1993 แกรนด์และคณะ(Grando, Kist; et al. 1993) ศึกษาพบว่าใน keratinocytes จะมี AchE activity ประมาณ 1.13 U/mg protein ต่อมามีการยืนยันการตรวจพบ mRNA ของ AchE ใน keratinocytes และพบว่า AchE จะมีการแสดงออกตลอดทั้งชั้นของ epidermis โดยพบมากที่สุดที่ชั้น basal layer (Nguyen, Ndoeye; et al. 2001) นอกจากนี้ยังมีการแสดงออกที่ Acrosyngia,

sebaceous glands และ sweat glands ทั้งบริเวณ sweat ducts และ coils ตาม nerve fibers ที่มาเลี้ยง sweat glands และบริเวณ endothelial และ muscular layer ของ vessels (Hagforsen, Einarsson; et al. 2000)

อภิปรายข้อมูลทั่วไป

จากผลการวิจัยพบว่าผู้ป่วยที่นำมาศึกษาจะมีลักษณะเป็นเพศหญิงมากกว่าชาย โดยทั้งหมดไม่ได้เป็นมาแต่กำเนิด มีอายุตั้งแต่ 7 ถึง 70 ปี มีเพียง 2 รายที่มีประวัติโรคต่างขาตภายในครอบครัว โดยมีความสัมพันธ์แบบ first และ second relationship ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะเป็นโรคต่างขาตชนิด vulgaris type และ mixed type คือ acrofacial และ vulgaris type โดยมีเพียง 2 รายที่มีอายุเท่ากัน คือ 10 ปี เป็น segmental type โดยทั้ง 2 รายนี้เราเชื่อว่า melanocytes มีต้นกำเนิดมาจาก neural crest โดยเกี่ยวข้องกับระบบประสาท (Dupin ;& Le Douarin. 2003) และสอดคล้องกับสมมุติฐานเกี่ยวกับ neurochemical mediators คือสาร Ach ที่หลังจากปลายประสาทมีการทำลายเมลานินไซต์นำไปสู่การเกิดโรคต่างขาตชนิด segmental vitiligo ที่เกี่ยวกับความผิดปกติใน cholinergic sympathetic nerves (Taieb. 2000) โดยผู้ป่วยแต่ละรายไม่มีความสัมพันธ์กับโรคอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องในการเกิดโรคต่างขาต และหยุดการรักษามาเป็นระยะเวลาช้านานก่อนเริ่มศึกษา ดังนั้นในกลุ่มที่นำมาศึกษาจะเป็นกลุ่มที่เป็นโรคต่างขาตที่เกิดขึ้นมาเองภายหลังโดยไม่มีโรคอื่น ๆ ที่จะป้จจัยกระตุ้นให้เป็นโรคต่างขาต ซึ่งกลุ่มที่นำมาศึกษาจะเหมาะสมในการศึกษาความผิดปกติของระบบ cholinergic system ซึ่งเป็นอาจเป็นสาเหตุให้เกิดโรคต่างขาตขึ้นมาเองทีหลัง (acquired disorder)

อภิปรายผลการทดลอง

การแสดงออกของ ChAT Enzyme

ผลการทดลอง

ในผิวหนังที่ปกติของอาสาสมัคร จะมีการแสดงออกของ ChAT มากที่บริเวณชั้น s.granulosum, s.spinosum และ s.basale โดยที่ sweat glands จะมีการแสดงออกมากที่ sweat ducts แต่ทั้ง 3 รายไม่มีการแสดงออกที่ glandular cells โดยในรอยต่างขาตและผิวหนังปกติของผู้ป่วยโรคต่างขาตจะมีการแสดงออกของ ChAT ใกล้เคียงกัน และมีแนวโน้มลดลงที่บริเวณชั้น s.granulosum, s.spinosum และ s.basale และพบที่ sweat ducts ลดลง แต่ยังพบที่ glandular cells เมื่อเทียบกับผิวหนังที่ปกติของอาสาสมัคร โดยที่ มีการแสดงออกของ ChAT น้อยที่ sebaceous glands

จากผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของ ChAT ลดลงในผิวหนังของผู้ป่วยโรคต่างชาวทั้งจาก depigmentation และ repigmentation โดยขัดแย้งจากการศึกษาในปี 2004 ของซารอยเตอร์และวูด (Schallreuter ;& Wood. 2001) ที่ศึกษาระดับ ChAT activity ในรอยต่างชาว โดยพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งการศึกษาของซารอยเตอร์มีการวัดระดับ ChAT activity ในรอยโรคซึ่งระดับ ChAT activity อาจจะไม่เปลี่ยนแปลงหรือยังคงมีปริมาณที่ยังปกติที่ได้รับมาจากปลายประสาทที่มาเลี้ยงผิวหนัง โดยไม่ได้ศึกษาถึง morphological pattern ซึ่งอาจมีการเปลี่ยนแปลงไปแล้ว ในขณะที่ ChAT activity ยังคงปกติและการทดลองนี้ยังพบว่าผิวหนังของผู้ป่วยทั้งจาก depigmentation และ repigmentation มีการแสดงออกลดลงที่ sebaceous glands และ sweat glands สอดคล้องกับการศึกษาในปี 1997 เอลวาเร่ และคณะ (Elwary, Headley; et al. 1997) พบว่าในผู้ป่วยโรคต่างชาว จะมีการหลั่งเหงื่อลดลงทั้งจาก lesional และ non-lesional skin โดยพบว่า sweat glands จะมีการตอบสนองต่อ cholinergic response โดยใช้ cholinergic drugs คือ pilocarpine ลดลง จึงเชื่อได้ว่า นอกจากการตอบสนองของ sweat glands ต่อ cholinergic response ลดลงแล้วอาจเกี่ยวข้องกับระบบ cholinergic อื่นเช่นอาจมีการทำลาย ChAT จาก external oxidative stress ผ่านมาทาง UV light ทำลาย melanocytes และ keratinocytes หรือ internal oxidative stress ผ่านทาง cholinergic neurons ที่มาเลี้ยง sweat glands และ sebaceous glands

การแสดงออกของ VAChT Protein

ผลการทดลอง

ในผิวหนังที่ปกติของอาสาสมัครจะมีการแสดงออกของ VAChT ที่บริเวณชั้น s.granulosum, s.spinosum และ s.basale โดยทั้ง 3 รายจะมีการแสดงออกมากที่ ducts และ glandular cells ของ sweat glands และมีการแสดงออกที่ sebaceous glands 1 ราย (33.3%) โดยที่รอยต่างชาวและผิวหนังปกติของผู้ป่วยโรคต่างชาวจะมีการแสดงออกของ VAChT มีแนวโน้มลดลงที่บริเวณชั้น s.granulosum, s.spinosum และ s.basale เมื่อเทียบกับอาสาสมัคร เนื่องจากยังไม่เคยมีการศึกษาถึงการแสดงออกของ VAChT ในผู้ป่วยโรคต่างชาวมาก่อน ดังนั้นเมื่อสอดคล้องกับ ChAT แสดงว่าการแสดงออกของ VAChT และ ChAT ลดลงในชั้น epidermal layers ทั้งจาก depigmentation และ repigmentation อาจจะมีการทำลายหรือทำให้การสร้างลดลงโดย oxidative stress หรือ biochemical agents อื่นๆ โดยอาจจะมี genetic susceptibility ในผู้ป่วยแต่ละราย หรือมีการเปลี่ยนแปลงของยีนที่ใช้สร้าง ChAT Enzyme และ VAChT Protein แต่การแสดงออกที่ sebaceous gland และ sweat glands ทั้ง sweat ducts และ glandular cells ยังคงใกล้เคียงกับผิวหนังที่ปกติของ

อาสาสมัคร แสดงว่าผลของ external หรือ internal oxidative stress อาจมีผลต่อการแสดงออกของ VAChT Protein ที่มาทาง cholinergic neurons น้อยกว่า

การแสดงออกของ AchE Enzyme

ผลการทดลอง

ในผิวหนังที่ปกติของอาสาสมัคร จะมีการแสดงออกของ AchE มากที่บริเวณชั้น s.granulosum, s.spinsum และ s.basale โดยที่ sweat glands ทั้ง 3 รายจะมีการแสดงออกมากที่ sweat ducts และมี 1 รายมีการแสดงออกที่ glandular cells โดยที่ในรอยต่างขาและผิวหนังปกติของผู้ป่วยโรคต่างขาจะมีการแสดงออกของ AchE มีแนวโน้มลดลงที่บริเวณชั้น s.granulosum และ s.basale แต่ในผิวหนังที่ปกติของผู้ป่วยโรคต่างขายังมีการแสดงออกที่ s.spinsum ใกล้เคียงกับผิวหนังของอาสาสมัครและการแสดงออกที่ sweat glands ทั้ง sweat ducts และ glandular cells ใกล้เคียงกับผิวหนังที่ปกติของอาสาสมัคร โดยที่มีการแสดงออกของ AchE น้อยที่ sebaceous glands จากผลการทดลองแสดงว่า AchE ในผู้ป่วยโรคต่างขาทั้งจากรอยต่างขาและผิวหนังที่ยังคงมี pigmentation ลดลงในแง่ morphological โดยการแสดงออกจะลดลงทุกชั้นของ epidermal layers เนื่องจากอาจจะมีการทำลายหรือทำให้การสร้างลดลงโดย oxidative stress หรือ biochemical agents อื่นๆ โดยสอดคล้องกับการศึกษา ในปี 1989 เยนจาร์ (Iyengar. 1989) พบว่าระดับของ AChE activity ต่ำในรอยต่างขา โดย AChE จะตรวจไม่พบใน marginal dendritic melanocytes ในรอยต่างขาแต่ยังตรวจพบในผิวหนังปกติในผู้ป่วยโรคต่างขา ซึ่งสาร Ach จะยับยั้ง dopa oxidase activity ในบริเวณ marginal melanocytes ในรอยต่างขา ต่อมาปี 2006 ชาจิลและเบจุม (Shajil ;& Begum. 2006) เชื่อว่ามี systemic oxidative stress ทำลาย AChE ได้ศึกษาระดับของ AChE activity และระดับ systemic oxidative stress ในเลือดของ vitiligo patients ในเมือง Baroda ของอินเดีย พบว่ามีระดับ AChE activity ต่ำและมีการเพิ่มของ lipid peroxidation levels และไม่มี ความแตกต่างกันของ AChE activity ระหว่าง segmental และ non-segmental types และ ใน active และ stable types ของ vitiligo ดังนั้น AChE น่าจะถูกทำลายโดย high systemic oxidative stress ในคนไข้กลุ่มนี้ โดยระดับของสาร Ach ที่สะสมเพิ่มขึ้นจะทำลาย melanocytes ทำให้เกิดรอยต่างขาในผู้ป่วย (Shajil ;& Begum. 2006) ดังนั้นจากทั้ง 2 การศึกษาพบว่ามี AChE activity ต่ำทั้งในกระแสเลือดและในรอยต่างขา

ดังนั้นจากผลการทดลองการลดลงของ AChE ในชั้น epidermal layers เป็นไปได้ว่าอาจมีการทำลายจาก external หรือ internal oxidative stress แต่จากการทดลองยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ sweat glands และ sebaceous glands เป็นไปได้ว่าผลกระทบอาจจะเกิดจาก external cause

มากกว่า internal cause ที่ผ่านมาจาก cholinergic neurons ที่มาเลี้ยง sweat glands และ sebaceous glands หรืออาจจะต้องเก็บตัวอย่างมากกว่านี้โดยที่การแสดงออกของ ChAT, AchE และ VAChT ที่ vessels ไม่มีความแตกต่างกันทั้งในผิวหนังของผู้ป่วยโรคต่างชาวมะเร็งและอาสาสมัคร

สรุป

โรคต่างชาวมะเร็งเป็นโรคทาง systemic เชื่อว่าสาเหตุส่วนหนึ่งของโรคต่างชาวมะเร็งที่เกิดขึ้นมาเอง ภายหลังจากจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ cholinergic system โดยสาเหตุเกิดจากการมี external oxidative stress เช่นจากแสง UV light อาหารบางชนิดหรือ internal oxidative stress จากสารเคมี ฮอโมน หรือสารเมตาโบไลต์ต่างๆ และ/หรือร่วมกับการมีอิทธิพลของพันธุกรรม สอดคล้องในการอธิบายเกี่ยวกับ ทฤษฎีด้าน genetic model โดยจะเกี่ยวข้องกันกับอายุที่เริ่มเป็นโรค (Arcos-Burgos, Parodi; et al. 2002) เช่นใน dominant model จะอธิบายในคนไข้ที่เกิดโรคต่างชาวมะเร็งก่อนอายุ 30 ปี แต่ในคนที่เกิดโรคต่างชาวมะเร็งหลังอายุ 30 ปี มักถ่ายทอดพันธุกรรมแบบ multilocular recessive model ซึ่งในคนกลุ่มนี้มักจะมีประวัติการสัมผัสต่อสารเคมีในสิ่งแวดล้อม จึงอาจทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือทำลาย ChAT, AchE และ VAChT ที่ keratinocytes และ melanocytes หรือจาก cholinergic neurons ที่บริเวณ dermoepidermal junction หรือที่มาเลี้ยง sweat glands หรือ sebaceous glands ทำให้มีการแสดงออกในผิวหนังทั้งรอยต่างชาวมะเร็งและผิวหนังปกติของผู้ป่วยลดลง โดยที่การทำลายของ AchE อาจมากกว่า ChAT และ VAChT จึงทำให้ยังคงมีฤทธิ์ของสาร Ach มากกว่าปกติ และยังคงต้องมีการศึกษาต่อว่ากลไกในการลดลงของโปรตีนทั้ง 3 ชนิดใน cholinergic system เกี่ยวข้องอย่างไรในโรคต่างชาวมะเร็ง โดยผิวหนังที่ยังไม่เกิดรอยต่างชาวมะเร็งนั้นได้มีการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลแล้ว จากการวิจัยนี้อาจเป็นแนวทางนำไปสู่การคิดค้นการรักษาในรูปแบบ systemic ซึ่งอาจจะต้องมีการเก็บตัวอย่างมากขึ้นเพื่อแสดงให้เห็นถึงความแตกต่าง หรือทำการวิจัยถึงหน้าที่ต่างๆ ของโปรตีนแต่ละชนิดต่อแต่ละส่วนต่างๆ ของผิวหนังและศึกษาวิจัยเกี่ยวกับรีเซพเตอร์ใน cholinergic system ให้สมบูรณ์ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษานี้เห็น sebaceous gland มีจำนวนน้อยเกินไปและควรศึกษาต่อใน skin appendage อื่นๆ เช่นในส่วนประกอบของ hair และ neurocutaneous nerve, collagen bundle, elastic tissue และ muscle

2. จำนวนผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมควรจะมีมากกว่านี้ เพื่อที่จะสามารถนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติให้งานวิจัยมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น

3. จากผลที่ได้สอดคล้องกับทฤษฎีของ biochemical theory เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงในระบบ cholinergic system ที่อาจเกิดจากภาวะ oxidative stress ทำให้มีการแสดงออกของ ChAT, AchE และ VACHT ลดลงโดยเฉพาะที่ชั้นของ epidermal layers โดยอาจจะเป็นสาเหตุในการเกิดโรคต่างขาที่เกิดขึ้นเองภายหลัง (acquire disorder)

4. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการรักษาโรคต่างขาในรูปของ systemic therapy ซึ่งน่าจะทำให้การรักษาโรคต่างขามีประสิทธิภาพมากขึ้น

5. ควรที่จะศึกษาถึงการแสดงออก muscarinic และ nicotinic receptors ตามชั้นต่างๆของผิวหนังเพื่อศึกษาถึงระบบ non-neuronal cholinergic system ให้สมบูรณ์ขึ้น

6. มีงานวิจัยที่ศึกษาถึง catecholamine กระตุ้นการสร้าง melanogenesis โดยกระตุ้น α_1 และ β_1 adrenoreceptors โดยผ่านทาง IP3, diacylglycerol, protein kinase และ cAMP cascade ใน melanocyte โดยจะทำให้เพิ่ม dendrite ของ melanocyte และ กระตุ้นการสร้าง melanin (Peacocke, Yaar ;et al. 1988; Gordon, Mansur; et al. 1989; Gilchrest, Zhai; et al. 1993) ความสำคัญของ catecholamine และโรคต่างขา พบว่าการเพิ่มขึ้นของ β_2 adrenoreceptors density ใน keratinocytes ของรอยต่างขา (Schallreuter, Wood; et al. 1993) เชื่อว่าทำให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับ bipterin (Schallreuter, Buttner; et al. 1994) โดยพบว่าการเกิด oxidation ของ bipterin จะทำให้มีการเพิ่มของ 6BH₄

ต่อมาพบว่าใน pigmented และ repigmented ใน epidermis ของผู้ป่วยโรคต่างขา จะมีระดับของ cofactor 6BH₄ จากการเพิ่มของ GTP-cyclohydrolase I enzyme activities มากขึ้น (Schallreuter, Buttner; et al. 1994; Schallreuter. 1999) โดยพบว่าขบวนการ สังเคราะห์ 6BH₄ ผ่านทาง GTP-cyclohydrolase I enzyme จะกระตุ้น signal ต่างๆเช่น TNF- α , IL-2, INF- γ และ H₂O₂

ซึ่งสารเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคต่างขา (Schallreuter, Buttner; et al. 1994; Moretti, Spallanzani; et al. 2002) และต่อมาพบว่า PAH activity ต่ำลงในรอยต่างขา (Schallreuter, Buttner; et al. 1994) เชื่อว่าการเพิ่มขึ้นของ 6BH₄ และการลดลงของ PAH activity จะลดระดับของ tyrosine ในรอยต่างขา ดังนั้นควรมีการศึกษาเกี่ยวกับระบบที่เกี่ยวข้องกับ catecholamine ควบคู่ไปกับ cholinergic system เพราะมีความเชื่อมต่อกันของสาเหตุการเกิดโรคต่างขา

7. เราเชื่อว่า oxidative stress จาก H₂O₂ เป็นสาเหตุการเกิดโรคต่างขาผ่านทางสาร metabolites หลายๆชนิดที่มีผลต่อ melanocytes พบว่า narrow-band UVB_{311nm} จะกระตุ้น

pseudocatalase ช่วยกำจัด H_2O_2 ออกจาก epidermis ได้ และสามารถหยุดการเกิดรอยต่างขาวและช่วยให้มีสีผิวกลับคืนมา (Schallreuter. 1999; Kurzen ;& Schallreuter. 2004) ดังนั้นจากการทดลองจึงยืนยันการใช้ narrow-band UVB_{311nm} ในการรักษาโรคต่างขาว

8. ในปี 1966 โมเลอร์และเลเนอร์ (Moller ;& Lerner. 1966) ได้ศึกษาจาก bioassays พบว่าสาร Ach ทำให้สีของ frog skin จางลงและสามารถยับยั้งได้ด้วย Atropine ต่อมาปี 1992 นากาอิชิ และคณะ (Nagaishi; et al. 1992) พบว่าเมื่อกำจัดฤทธิ์ของ mAChR ด้วย Atropine หรือ muscarinic antagonist อื่นๆ ทำให้เกิดการสร้างเม็ดสีได้ ในปี 2004 คูเซ่นและซารอยเตอร์ (Kurzen ;& Schallreuter. 2004) พบว่าเมื่อ Ach จับกับ M2 และ M4 subtype ของ mAChR จะมีผลยับยั้ง tyrosinase enzyme โดยจะเกี่ยวข้องกับ α -MSH และ melanocortin-1 receptor และ catecholamine/ β 2-adrenergic response ใน melanocytes ดังนั้นจึงอาจเป็นแนวทางในการรักษาโรคต่างขาวในอนาคตผ่านทาง cholinergic receptors

9. การแสดงออกของ VAChT ที่ sweat glands, sebaceous glands และ vessels จะติดสีชัดกว่า ChAT เนื่องจากเทคนิคทาง immunohistochemistry ที่ผ่าน paraffin embedded sections จะพบ cholinergic nerve terminal ได้ไม่ชัดเจน (Schafer. 1998)

10. ปัจจุบันเราพบว่าสาเหตุการเพิ่มของ H_2O_2 จาก oxidative stress เกิดจาก oxidative metabolism ของ estrogen และ aromatic steroids อื่นๆ โดยพบว่า estrogen จะเพิ่ม H_2O_2 ที่ epidermis และ lymphocytes และมีการทำลายของ DNA ใน peripheral lymphocytes (Schallreuter, Chiuchiarelli; et al. 2006) ดังนั้นในผู้ป่วยโรคต่างขาวควรลดการใช้ estrogen

11. H_2O_2 จะทำลาย epidermal AchE และ BchE มีการศึกษาพบว่าถ้าให้ topical pseudo-catalase K.U. จะเพิ่มระดับของ epidermal และ systemic AchE และ BchE ทำให้เกิด repigmentation ในโรคต่างขาวได้ (Schallreuter, Chiuchiarelli; et al. 2006) ดังนั้นการใช้ topical pseudo-catalase K.U. น่าจะมีประโยชน์มากขึ้นในการรักษาผู้ป่วยโรคต่างขาว

12. จากการศึกษาการวัดระดับ non-neuronal Acetylcholine ของ skin ด้วยวิธี dermal microdialysis โดยการใช้สาร botulinum toxin กำจัดฤทธิ์ของสาร Ach ที่มาจาก nerve fiber ทำให้สามารถวัดระดับสาร Ach ที่มาจาก skin ได้ (Schleret; et al. 2006) จึงอาจนำสาร botulinum toxin มาใช้เพื่อศึกษาระบบ non-neuronal cholinergic system เฉพาะที่ได้

13. การใช้ Clostridium botulinum type toxin A (BoTx) อาจได้ประโยชน์ในการรักษาโรคต่างขาวเฉพาะที่เนื่องจากมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งของสาร Ach จาก presynaptic nerve terminals ที่บริเวณ peripheral neuromuscular junctions และจาก cholinergic sympathetic และ parasympathetic neurons (Ray. 1993) แต่ยังไม่มียืนยันว่าสามารถควบคุมระดับของสาร Ach ที่มาจาก melanocytes

และ keratinocytes หรือ non-neuronal cholinergic system ขึ้นได้และฤทธิ์ของ local injections จะทำให้กล้ามเนื้ออ่อนแรงและสามารถควบคุมการหลั่งสารคัดหลั่งจาก glands ที่เลี้ยงโดย cholinergic neurones (Munchau ;& Bhatia. 2000) และอาจจะยังทำให้การหลั่งเหงื่อในผู้ป่วยโรคต่างชาวลดลง และโรคต่างชาวมักเป็นโรคทาง systemic การใช้สาร Botulinum toxin ไม่น่าจะได้ผล

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- Al'Abadie, M. S., H. J. Senior ;et al. (1994). "Neuropeptide and neuronal marker studies in vitiligo." Br J Dermatol **131**(2): 160-5.
- Anderson, R. G. (1998). "The caveolae membrane system." Annu Rev Biochem **67**: 199-225.
- Ando, I., H. I. Chi; et al. (1993). "Difference in clinical features and HLA antigens between familial and non-familial vitiligo of non-segmental type." Br J Dermatol **129**(4): 408-10.
- Arcos-Burgos, M., E. Parodi; et al. (2002). "Vitiligo: complex segregation and linkage disequilibrium analyses with respect to microsatellite loci spanning the HLA." Hum Genet **110**(4): 334-42.
- Arvidsson, U., M. Riedl; et al. (1997). "Vesicular acetylcholine transporter (VACHT) protein: A novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems." J Comp Neurol **378**(4): 454-67.
- Barajon, I., C. Rumio; et al. (2001). "Pattern of expression of c-Myc, Max and Bin1 in human anagen hair follicles." Br J Dermatol **144**(6): 1193-203.
- Barnes, L. (1988). "Vitiligo and the Vogt-Koyanagi-Harada syndrome." Dermatol Clin **6**(2): 229-39.
- Beutner, E. H. (1983). "Introduction: The nature of defined immunocytochemical studies." Ann N Y Acad Sci **420**: 9-12.
- Bleehen, S. S., M. A. Pathak; et al. (1968). "Depigmentation of skin with 4-isopropylcatechol,

- mercaptoamines, and other compounds." J Invest Dermatol 50(2): 103-17.
- Blomhoff, A., E. H. Kemp; et al. (2005). "CTLA4 polymorphisms are associated with vitiligo, in patients with concomitant autoimmune diseases." Pigment Cell Res 18(1): 55-8.
- Botchkarev, V. A., N. V. Botchkarev; et al. (1998). "Neurotrophin-3 involvement in the regulation of hair follicle morphogenesis." J Invest Dermatol 111(2): 279-85.
- Bravo, D. ;& S. M. Parsons (2002). "Microscopic kinetics and structure-function analysis in the vesicular acetylcholine transporter." Neurochem Int 41(5): 285-9.
- Brockdorff, N., A. Ashworth; et al. (1991). "Conservation of position and exclusive expression of mouse Xist from the inactive X chromosome." Nature 351(6324): 329-31.
- Brostoff, J. (1969). "Autoantibodies in patients with vitiligo." Lancet 2(7613): 177-8.
- Brown, A. C., Z. L. Olkowski; et al. (1977). "Alopecia areata and vitiligo associated with Down's syndrome." Arch Dermatol 113(9): 1296.
- Buchli, R., A. Ndoeye; et al. (2001). "Identification and characterization of muscarinic acetylcholine receptor subtypes expressed in human skin melanocytes." Mol Cell Biochem 228(1-2): 57-72.
- Bystryn, J. C. (1997). "Immune mechanisms in vitiligo." Clin Dermatol 15(6): 853-61.
- Bystryn, J. C. ;& G. K. Naughton (1985). "The significance of vitiligo antibodies." J Dermatol 12(1): 1-9.
- Casp, C. B., J. X. She; et al. (2003). "Genes of the LMP/TAP cluster are associated with the human autoimmune disease vitiligo." Genes Immun 4(7): 492-9.

- Cervini, R., L. Houhou; et al. (1995). "Specific vesicular acetylcholine transporter promoters lie within the first intron of the rat choline acetyltransferase gene." J Biol Chem 270(42): 24654-7.
- Cooper, E., S. Couturier; et al. (1991). "Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor." Nature 350(6315): 235-8.
- Cui, J., Y. Arita; et al. (1993). "Cytolytic antibodies to melanocytes in vitiligo." J Invest Dermatol 100(6): 812-5.
- Denda, M., A. Tomitaka; et al. (2003). "Altered distribution of calcium in facial epidermis of aged adults." J Invest Dermatol 121(6): 1557-8.
- Dessy, C., R. A. Kelly; et al. (2000). "Dynamin mediates caveolar sequestration of muscarinic cholinergic receptors and alteration in NO signaling." Embo J 19(16): 4272-80.
- Dupin, E. ;& N. M. Le Douarin (2003). "Development of melanocyte precursors from the vertebrate neural crest." Oncogene 22(20): 3016-23.
- Durham-Pierre, D. G., C. S. Walters; et al. (1995). "Natural killer cell and lymphokine-activated killer cell activity against melanocytes in vitiligo." J Am Acad Dermatol 33(1): 26-30.
- Eiden, L. E. (1998). "The cholinergic gene locus." J Neurochem 70(6): 2227-40.
- Elwary, S. M., B. Chavan; et al. (2006). "The vesicular acetylcholine transporter is present in melanocytes and keratinocytes in the human epidermis." J Invest Dermatol 126(8): 1879-84.

- Elwary, S. M., K. Headley; et al. (1997). "Calcium homeostasis influences epidermal sweating in patients with vitiligo." Br J Dermatol **137**(1): 81-5.
- Erickson, J. D., H. Varoqui; et al. (1994). "Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus." J Biol Chem **269**(35): 21929-32.
- Fain, P. R., K. Gowan; et al. (2003). "A genomewide screen for generalized vitiligo: Confirmation of AIS1 on chromosome 1p31 and evidence for additional susceptibility loci." Am J Hum Genet **72**(6): 1560-4.
- Finco, O., M. Cuccia; et al. (1991). "Age of onset in vitiligo: relationship with HLA supratypes." Clin Genet **39**(1): 48-54.
- Fischer, K. F., P. D. Lukasiewicz; et al. (1998). "Age-dependent and cell class-specific modulation of retinal ganglion cell bursting activity by GABA." J Neurosci **18**(10): 3767-78.
- Fuchs, E. (1990). "Epidermal differentiation." Curr Opin Cell Biol **2**(6): 1028-35.
- Gilchrest, B. A., S. Zhai; et al. (1993). "Treatment of human melanocytes and S91 melanoma cells with the DNA repair enzyme T4 endonuclease V enhances melanogenesis after ultraviolet irradiation." J Invest Dermatol **101**(5): 666-72.
- Gilhar, A., B. Zelickson; et al. (1995). "In vivo destruction of melanocytes by the IgG fraction of serum from patients with vitiligo." J Invest Dermatol **105**(5): 683-6.
- Gilmor, M. L., N. R. Nash; et al. (1996). "Expression of the putative vesicular acetylcholine transporter in rat brain and localization in cholinergic synaptic vesicles." J Neurosci **16**(7): 2179-90.

- Gordon, P. R., C. P. Mansur; et al. (1989). "Regulation of human melanocyte growth, dendricity, and melanization by keratinocyte derived factors." J Invest Dermatol 92(4): 565-72.
- Goudie, B. M., C. Wilkieson; et al. (1983). "A family study of vitiligo patterns." Scott Med J 28(4): 338-42.
- Grando, S. A. (1997). "Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors." J Investig Dermatol Symp Proc 2(1): 41-8.
- Grando, S. A. (2006). "Cholinergic control of epidermal cohesion." Exp Dermatol 15(4): 265-82.
- Grando, S. A., A. M. Crosby; et al. (1993). "Agarose gel keratinocyte outgrowth system as a model of skin re-epithelization: requirement of endogenous acetylcholine for outgrowth initiation." J Invest Dermatol 101(6): 804-10.
- Grando, S. A., D. A. Kist; et al. (1993). "Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine." J Invest Dermatol 101(1): 32-6.
- Grando, S. A., B. D. Zelickson; et al. (1995). "Keratinocyte muscarinic acetylcholine receptors: immunolocalization and partial characterization." J Invest Dermatol 104(1): 95-100.
- Grant, M. P., N. J. Francis; et al. (1995). "The role of acetylcholine in regulating secretory responsiveness in rat sweat glands." Mol Cell Neurosci 6(1): 32-42.
- Grichnik, J. M., W. N. Ali; et al. (1996). "KIT expression reveals a population of precursor melanocytes in human skin." J Invest Dermatol 106(5): 967-71.

- Grimes, P. E. (1993). "Vitiligo. An overview of therapeutic approaches." Dermatol Clin **11**(2): 325-38.
- Grimes, P. E., M. Ghoneum; et al. (1986). "T cell profiles in vitiligo." J Am Acad Dermatol **14**(2 Pt 1): 196-201.
- Guidry, G. L. ;& S. C. Landis (1998). "Developmental regulation of neurotransmitters in sympathetic neurons." Adv Pharmacol **42**: 895-8.
- Haberberger, R. V., M. Bodenbenner; et al. (2000). "Expression of the cholinergic gene locus in pulmonary arterial endothelial cells." Histochem Cell Biol **113**(5): 379-87.
- Haberberger, R. V., U. Pfeil; et al. (2002). "Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the neuronal and non-neuronal cholinergic system of human and rat skin." J Invest Dermatol **119**(4): 943-8.
- Hafez, M., L. Sharaf; et al. (1983). "The genetics of vitiligo." Acta Derm Venereol **63**(3): 249-51.
- Hagforsen, E., A. Einarsson; et al. (2000). "The distribution of choline acetyltransferase- and acetylcholinesterase-like immunoreactivity in the palmar skin of patients with palmoplantar pustulosis." Br J Dermatol **142**(2): 234-42.
- Halder, R. M. (1997). "Childhood vitiligo." Clin Dermatol **15**(6): 899-906.
- Hann, S. K. ;& H. J. Lee (1996). "Segmental vitiligo: clinical findings in 208 patients." J Am Acad Dermatol **35**(5 Pt 1): 671-4.
- Harning, R., J. Cui; et al. (1991). "Relation between the incidence and level of pigment cell antibodies and disease activity in vitiligo." J Invest Dermatol **97**(6): 1078-80.

- Hayashi, H. ;& T. Nakagawa (1963). "Functional Activity of the Sweat Glands of the Albino Rat." J Invest Dermatol 41: 365-7.
- Hedin, C. A. ;& A. Larsson (1986). "In vitro activation of amphibian dermal melanocytes by nicotine." Scand J Dent Res 94(1): 57-65.
- Heeschen, C., M. Weis; et al. (2002). "A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors." J Clin Invest 110(4): 527-36.
- Horikawa, T., D. A. Norris; et al. (1995). "Melanocyte mitogens induce both melanocyte chemokinesis and chemotaxis." J Invest Dermatol 104(2): 256-9.
- Hu, B. R., M. Park; et al. (1998). "Assembly of proteins to postsynaptic densities after transient cerebral ischemia." J Neurosci 18(2): 625-33.
- Iyengar, B. (1989). "Modulation of melanocytic activity by acetylcholine." Acta Anat (Basel) 136(2): 139-41.
- Kirkpatrick, C. J., F. Bittinger; et al. (2001). "The non-neuronal cholinergic system in the endothelium: evidence and possible pathobiological significance." Jpn J Pharmacol 85(1): 24-8.
- Klapproth, H., T. Reinheimer; et al. (1997). "Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 355(4): 515-23.
- Kurzen, H. (2004). "[The extraneuronal cholinergic system of the skin. Basic facts and clinical relevance]." Hautarzt 55(5): 453-9.

- Kurzen, H., H. Berger; et al. (2004). "Phenotypical and molecular profiling of the extraneuronal cholinergic system of the skin." J Invest Dermatol **123**(5): 937-49.
- Kurzen, H. ;& K. U. Schallreuter (2004). "Novel aspects in cutaneous biology of acetylcholine synthesis and acetylcholine receptors." Exp Dermatol **13 Suppl 4**: 27-30.
- Landis, S. C. (1999). "Development of muscarinic receptors and regulation of secretory responsiveness in rodent sweat glands." Life Sci **64**(6-7): 381-5.
- Landis, S. C. ;& D. Keefe (1983). "Evidence for neurotransmitter plasticity in vivo: Developmental changes in properties of cholinergic sympathetic neurons." Dev Biol **98**(2): 349-72.
- Langley, J. N. (1922). "The secretion of sweat: Part I. Supposed inhibitory nerve fibres on the posterior nerve roots. Secretion after denervation." J Physiol **56**(1-2): 110-9.
- Le Poole, I. C., P. K. Das; et al. (1993). "Review of the etiopathomechanism of vitiligo: a convergence theory." Exp Dermatol **2**(4): 145-53.
- Le Poole, I. C., R. M. van den Wijngaard; et al. (1994). "Catechol-O-methyltransferase in vitiligo." Arch Dermatol Res **286**(2): 81-6.
- Leblanc, G. ;& S. Landis (1986). "Development of choline acetyltransferase (CAT) in the sympathetic innervation of rat sweat glands." J Neurosci **6**(1): 260-5.
- Lei, X. D., C. D. Woodworth; et al. (1997). "Expression of 4alpha-carbinolamine dehydratase in human epidermal keratinocytes." Biochem Biophys Res Commun **238**(2): 556-9.
- Lerner, A. B. (1959). "Vitiligo." J Invest Dermatol **32**(2, Part 2): 285-310.

Lerner, A. B. (1971). "On the etiology of vitiligo and gray hair." Am J Med 51(2): 141-7.

Lerner, A. B. ;& J. J. Nordlund (1978). "Vitiligo. What is it? Is it important?" Jama 239(12): 1183-7.

Longmore, J., C. M. Bradshaw; et al. (1985). "Effects of locally and systemically administered cholinergic antagonists on the secretory response of human eccrine sweat glands to carbachol." Br J Clin Pharmacol 20(1): 1-7.

Low, A. ;& R. A. Westerman (1989). "Neurogenic vasodilation in the rat hairy skin measured using a laser Doppler flowmeter." Life Sci 45(1): 49-57.

Macklin, K. D., A. D. Maus; et al. (1998). "Human vascular endothelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors." J Pharmacol Exp Ther 287(1): 435-9.

Majumder, P. P., S. K. Das; et al. (1988). "A genetical model for vitiligo." Am J Hum Genet 43(2): 119-25.

Mason, D. Y. ;& R. Sammons (1978). "Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents." J Clin Pathol 31(5): 454-60.

Millar, N. S. (2003). "Assembly and subunit diversity of nicotinic acetylcholine receptors." Biochem Soc Trans 31(Pt 4): 869-74.

Moller, H. ;& A. B. Lerner (1966). "Melanocyte stimulating hormone inhibition by acetylcholine and noradrenaline in the frog skin bioassay." Acta Endocrinol (Copenh) 51(1): 149-60.

Monck, J. R. ;& J. M. Fernandez (1994). "The exocytotic fusion pore and neurotransmitter

release." Neuron 12(4): 707-16.

Moretti, S., A. Spallanzani; et al. (2002). "Vitiligo and epidermal microenvironment: possible involvement of keratinocyte-derived cytokines." Arch Dermatol 138(2): 273-4.

Muck-Weymann, M. E., H. P. Albrecht; et al. (1996). "Respiratory-dependent laser-Doppler flux motion in different skin areas and its meaning to autonomic nervous control of the vessels of the skin." Microvasc Res 52(1): 69-78.

Munchau, A. ;& K. P. Bhatia (2000). "Uses of botulinum toxin injection in medicine today." Bmj 320(7228): 161-5.

Nada, S., M. Okada; et al. (1991). "Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src." Nature 351(6321): 69-72.

Nakane, P. K. ;& G. B. Pierce, Jr. (1967). "Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens." J Cell Biol 33(2): 307-18.

Nath, S. K., P. P. Majumder; et al. (1994). "Genetic epidemiology of vitiligo: Multilocus recessivity cross-validated." Am J Hum Genet 55(5): 981-90.

Naughton, G. K., M. Eisinger; et al. (1983). "Antibodies to normal human melanocytes in vitiligo." J Exp Med 158(1): 246-51.

Naughton, G. K., D. Reggiardo; et al. (1986). "Correlation between vitiligo antibodies and extent of depigmentation in vitiligo." J Am Acad Dermatol 15(5 Pt 1): 978-81.

Ndoye, A., R. Buchli; et al. (1998). "Identification and mapping of keratinocyte muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human epidermis." J Invest Dermatol 111(3):

410-6.

Nguyen, V. T., A. Ndoye; et al. (2001). "Programmed cell death of keratinocytes culminates in apoptotic secretion of a humectant upon secretagogue action of acetylcholine." J Cell Sci 114(Pt 6): 1189-204.

Nordlund, J. J. ;& P. P. Majumder (1997). "Recent investigations on vitiligo vulgaris." Dermatol Clin 15(1): 69-78.

Norris, D. A., T. Horikawa; et al. (1994). "Melanocyte destruction and repopulation in vitiligo." Pigment Cell Res 7(4): 193-203.

Ortonne, J. P. ;& A. Alario (1978). "T and B lymphocytes in vitiligo." Arch Dermatol Res 261(2): 147-51.

Ortonne, J. P. ;& S. K. Bose (1993). "Vitiligo: where do we stand?" Pigment Cell Res 6(2): 61-72.

Parsad, D., R. Pandhi; et al. (2004). "Clinical study of repigmentation patterns with different treatment modalities and their correlation with speed and stability of repigmentation in 352 vitiliginous patches." J Am Acad Dermatol 50(1): 63-7.

Peacocke, M., M. Yaar; et al. (1988). "Induction of nerve growth factor receptors on cultured human melanocytes." Proc Natl Acad Sci U S A 85(14): 5282-6.

Presland, R. B. ;& R. J. Jurevic (2002). "Making sense of the epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues." J Dent Educ 66(4): 564-74.

Ray, P. (1993). "Botulinum toxin A inhibits acetylcholine release from cultured neurons in

vitro." In Vitro Cell Dev Biol Anim **29A**(6): 456-60.

Reedy, M. V., C. D. Faraco; et al. (1998). "Specification and migration of melanoblasts at the vagal level and in hyperpigmented Silkie chickens." Dev Dyn **213**(4): 476-85.

Riley, P. A. (1969). "Hydroxyanisole depigmentation: in-vivo studies." J Pathol **97**(2): 185-91.

Rokos, H., W. D. Beazley; et al. (2002). "Oxidative stress in vitiligo: photo-oxidation of pterins produces H₂O₂ and pterin-6-carboxylic acid." Biochem Biophys Res Commun **292**(4): 805-11.

Sando, G. N., H. Zhu; et al. (2003). "Caveolin expression and localization in human keratinocytes suggest a role in lamellar granule biogenesis." J Invest Dermatol **120**(4): 531-41.

Schafer, M. K., L. E. Eiden; et al. (1998). "Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter. II. The peripheral nervous system." Neuroscience **84**(2): 361-76.

Schafer, M. K., E. Weihe; et al. (1995). "Human and monkey cholinergic neurons visualized in paraffin-embedded tissues by immunoreactivity for VACHT, the vesicular acetylcholine transporter." J Mol Neurosci **6**(4): 225-35.

Schafer, T., A. Nienhaus; et al. (2001). "Epidemiology of acne in the general population: the risk of smoking." Br J Dermatol **145**(1): 100-4.

Schallreuter, K. U. (1999). "A review of recent advances on the regulation of pigmentation in the human epidermis." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **45**(7): 943-9.

Schallreuter, K. U. (1999). "Successful treatment of oxidative stress in vitiligo." Skin

Pharmacol Appl Skin Physiol 12(3): 132-8.

Schallreuter, K. U., G. Buttner; et al. (1994). "Cytotoxicity of 6-biopterin to human melanocytes." Biochem Biophys Res Commun 204(1): 43-8.

Schallreuter, K. U., G. Chiuchiarelli; et al. (2006). "Estrogens can contribute to hydrogen peroxide generation and quinone-mediated DNA damage in peripheral blood lymphocytes from patients with vitiligo." J Invest Dermatol 126(5): 1036-42.

Schallreuter, K. U., S. M. Elwary; et al. (2004). "Activation/deactivation of acetylcholinesterase by H₂O₂: more evidence for oxidative stress in vitiligo." Biochem Biophys Res Commun 315(2): 502-8.

Schallreuter, K. U., K. R. Lemke; et al. (1995). "Catecholamines in human keratinocyte differentiation." J Invest Dermatol 104(6): 953-7.

Schallreuter, K. U., R. Lemke; et al. (1994). "Vitiligo and other diseases: coexistence or true association? Hamburg study on 321 patients." Dermatology 188(4): 269-75.

Schallreuter, K. U., J. Moore; et al. (1999). "In vivo and in vitro evidence for hydrogen peroxide (H₂O₂) accumulation in the epidermis of patients with vitiligo and its successful removal by a UVB-activated pseudocatalase." J Investig Dermatol Symp Proc 4(1): 91-6.

Schallreuter, K. U. ;& J. M. Wood (2001). "Thioredoxin reductase - its role in epidermal redox status." J Photochem Photobiol B 64(2-3): 179-84.

Schallreuter, K. U., J. M. Wood; et al. (1996). "Increased monoamine oxidase A activity in the epidermis of patients with vitiligo." Arch Dermatol Res 288(1): 14-8.

- Schallreuter, K. U., J. M. Wood; et al. (1993). "Increased in vitro expression of beta 2-adrenoceptors in differentiating lesional keratinocytes of vitiligo patients." Arch Dermatol Res **285**(4): 216-20.
- Scott, A. (1962). "Acetylcholine in normal and diseased skin." Br J Dermatol **74**: 317-22.
- Shajil, E. M. ;& R. Begum (2006). "Antioxidant status of segmental and non-segmental vitiligo." Pigment Cell Res **19**(2): 179-80.
- Smith, E. W., K. A. Smith; et al. (1992). "The local side effects of transdermally absorbed nicotine." Skin Pharmacol **5**(2): 69-76.
- Soubiran, P., S. Benzaken; et al. (1985). "Vitiligo: Peripheral T-cell subset imbalance as defined by monoclonal antibodies." Br J Dermatol **113 Suppl 28**: 124-7.
- Stevens, L. M. ;& S. C. Landis (1987). "Development and properties of the secretory response in rat sweat glands: Relationship to the induction of cholinergic function in sweat gland innervation." Dev Biol **123**(1): 179-90.
- Taieb, A. (2000). "Intrinsic and extrinsic pathomechanisms in vitiligo." Pigment Cell Res **13 Suppl 8**: 41-7.
- Tayebati, S. K., D. El-Assouad; et al. (2002). "Immunochemical and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes." J Neuroimmunol **132**(1-2): 147-55.
- Tint, I., T. Slaughter; et al. (1998). "Acute inactivation of tau has no effect on dynamics of microtubules in growing axons of cultured sympathetic neurons." J Neurosci **18**(21): 8660-73.

- Tursen, U., T. I. Kaya; et al. (2002). "Association between catechol-O-methyltransferase polymorphism and vitiligo." Arch Dermatol Res **294**(3): 143-6.
- Vilches, J. J., X. Navarro; et al. (1995). "Functional sudomotor responses to cholinergic agonists and antagonists in the mouse." J Auton Nerv Syst **55**(1-2): 105-11.
- Weihe, E., J. H. Tao-Cheng; et al. (1996). "Visualization of the vesicular acetylcholine transporter in cholinergic nerve terminals and its targeting to a specific population of small synaptic vesicles." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(8): 3547-52.
- Wessler, I., C. J. Kirkpatrick; et al. (1999). "The cholinergic 'pitfall': Acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans." Clin Exp Pharmacol Physiol **26**(3): 198-205.
- Wessler, I., T. Reinheimer; et al. (2003). "Increased acetylcholine levels in skin biopsies of patients with atopic dermatitis." Life Sci **72**(18-19): 2169-72.
- Yu, H. S., C. H. Kao; et al. (1993). "Coexistence and relationship of antikeratinocyte and antimelanocyte antibodies in patients with non-segmental-type vitiligo." J Invest Dermatol **100**(6): 823-8.
- Zamani, M., M. Spaepen; et al. (2001). "Linkage and association of HLA class II genes with vitiligo in a Dutch population." Br J Dermatol **145**(1): 90-4.
- Zancanaro, C., F. Merigo; et al. (1999). "Immunohistochemical evidence suggests intrinsic regulatory activity of human eccrine sweat glands." J Anat **194** (Pt 3): 433-44

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ข้อมูลเบื้องต้นของผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัย

ตาราง แสดงข้อมูลเบื้องต้นของผู้ป่วยทุกคนที่มาเข้าร่วมการวิจัยตามลำดับก่อน-หลัง

ลำดับที่/ เพศ	อายุ / ระยะเวลา	ชนิดต่างขา	ตำแหน่งรอยโรคที่ ตัดชิ้นเนื้อ	ตำแหน่งปกติ ที่ตัดชิ้นเนื้อ
1 /				
2 /				
3 /				
4 /				
5 /				
6 /				
7 /				
8 /				
9 /				
10 /				
11 /				

ตาราง แสดงข้อมูลเบื้องต้นของอาสาสมัครที่เข้าร่วมการวิจัยตามลำดับก่อน-หลัง

ลำดับที่/เพศ	อายุ	โรคประจำตัว	ตำแหน่งที่ตัดชิ้นเนื้อ
1/			
2/			
3/			

....2. ไม่เคย

11. ชนิดของต่างขาวจำแนกตามการกระจายตัวของรอยโรค

Type

....1. Focal

....4. Vulgaris

....2. Segmental

....5. Universal

....3. Acrofacial

....6. Mixed

12. จำแนกชนิดของสีผิวตาม Fitzpatrick skin type

Type

Skin Type 1 2. 3 4. 5 6

ภาคผนวก ค

ข้อมูลสำหรับผู้ป่วยและใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย

ข้อมูลสำหรับผู้ป่วย (Inform Consent)

การวิจัยเรื่อง การแสดงออกและการกระจายตัวในระดับเซลล์ของเอนไซม์โคลีนอะเซทิลทรานสเฟอเรส เอนไซม์อะเซทิลโคลีน เอสเทอเรส และ โปรตีนเวสิคิวลาอะเซทิลโคลีนทรานสปอร์เตอร์ ในโรคต่างขา

เรียน อาสาสมัครทุกท่าน

ท่านเป็นผู้ได้รับเชิญจากแพทย์ให้เข้าร่วมการศึกษาวิจัยทางคลินิกเพื่อศึกษาถึงการแสดงออกของเอนไซม์โคลีนอะเซทิลทรานสเฟอเรส (Choline Acetyltransferase Enzyme) เอนไซม์อะเซทิลโคลีน เอสเทอเรส (Acetylcholine Esterase Enzyme) และโปรตีนเวสิคิวลาอะเซทิลโคลีนทรานสปอร์เตอร์ (Vesicular Acetylcholine transporter protein) ในโรคต่างขา

ก่อนที่ท่านจะตกลงเข้าร่วมการศึกษาดังกล่าวขอเรียนให้ท่านผู้ปกครองและผู้ป่วยทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยครั้งนี้ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับท่านในการให้ความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย

การรักษาโรคต่างขายังเป็นปัญหาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ยังไม่เป็นที่ทราบสาเหตุที่แน่ชัดของการเกิดโรคต่างขาในระดับชีวโมเลกุล การรักษาในปัจจุบันจะให้ความสำคัญกับสาเหตุที่น่าจะเกี่ยวข้อง เช่นสาเหตุทางระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยต่อเซลล์สร้างเม็ดสีซึ่งประสิทธิภาพในการรักษายังได้ผลแค่ในระดับหนึ่ง จากความก้าวหน้าทางด้านการศึกษาและวิจัยถึงสาเหตุการเกิดโรคต่างขาในปัจจุบันได้มีการค้นพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับสารสื่อประสาทที่เรียกว่าอะเซทิลโคลีน ซึ่งยังมีการศึกษาถึงขบวนการที่เกี่ยวข้องกับสารนี้น้อยมาก

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกและการกระจายตัวในระดับเซลล์ของเอนไซม์โคลีนอะเซทิลทรานสเฟอเรส เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส และ โปรตีนเวสิคิวลาอะเซทิลโคลีนทรานสปอร์เตอร์ ในโรคต่างขาซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการทราบถึงกลไกในการเกิดโรคมากขึ้นและเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาและวิจัยร่วมกับการพัฒนาการรักษาที่มีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

แพทย์จะแจ้งให้ท่านทราบและยินดีตอบคำถามต่างๆที่ท่านสงสัยโดยละเอียดหากท่านตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษาวิจัยนี้ จะมีข้อปฏิบัติร่วมดังต่อไปนี้

1. ท่านไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการศึกษาหรือการทำทดสอบ

2. แพทย์จะให้ใบแบบสอบถามกับท่านขอความกรุณากรอกข้อความเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

การเข้าร่วมการศึกษานี้เป็นไปโดยสมัครใจท่านอาจจะปฏิเสธที่จะเข้าร่วมหรือถอนตัวจากการศึกษานี้ได้ทุกเมื่อ โดยไม่กระทบต่อการดูแลรักษาที่ท่านจะได้รับจากแพทย์

ประการสำคัญที่ท่านควรทราบคือผลการศึกษานี้ใช้สำหรับวัตถุประสงค์ทางวิชาการเท่านั้น โดยข้อมูลต่างๆจะถูกเก็บไว้ในคอมพิวเตอร์และมีได้มีการแพร่กระจายสู่สาธารณชน ขอรับรองว่าจะไม่มีการเปิดเผยชื่อของท่านตามกฎหมาย

ขอขอบคุณในความร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

แบบแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการ

ข้าพเจ้า.....

ได้ศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับวัตถุประสงค์และวิธีการวิจัยเรื่องการแสดงออกและการกระจายตัวในระดับเซลล์ของเอนไซม์โคลีนอะเซทิลทรานสเฟอเรส เอนไซม์อะเซทิลโคลีน เอสเทอเรส และ โพรตีนเวสคิวลาอะเซทิลโคลีนทรานสปอร์เตอร์ในโรคต่างขาและได้ซักถามข้อสงสัยกับแพทย์ผู้วิจัยแล้ว

ข้าพเจ้า ยินยอม ไม่ยินยอม เข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้

ลงชื่อ.....

()

วัน เดือน ปี

ภาคผนวก ง

ตัวอย่างตารางบันทึกข้อมูลทาง Immunohistochemistry ของผู้ป่วยและอาสาสมัคร

ตำแหน่งของผิวหนัง		Internal control	0	+1	+2	+3	+4
ChAT							
Stratum corneum							
Stratum granulosum							
Stratum spinosum							
Stratum lucidum							
Basal cell layer							
Sebaceous gland							
Sweat gland	Duct						
	Glandular						
Vessel	Endothelial						
	Muscular						

ตำแหน่งของผิวหนัง		Internal control	0	+1	+2	+3	+4
AchE							
Stratum corneum							
Stratum granulosum							
Stratum spinosum							
Stratum lucidum							
Basal cell layer							
Sebaceous gland							
Sweat gland	Duct						
	Glandular						
Vessel	Endothelial						
	Muscular						

ตำแหน่งของผิวหนัง		Internal control	0	+1	+2	+3	+4
VAChT							
Stratum corneum							
Stratum granulosum							
Stratum spinosum							
Stratum lucidum							
Basal cell layer							
Sebaceous gland							
Sweat gland	Duct						
	Glandular						
Vessel	Endothelial						
	Muscular						

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	เรืออากาศโทนายแพทย์ อาชวิน สดางค์มงคล
วันเดือนปีเกิด	17 พฤศจิกายน พ.ศ. 2517
สถานที่เกิด	จังหวัดน่าน
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	108/8 หมู่ที่ 11 หมู่บ้านลัดดารมย์ Elegance รามคำแหง แขวง สะพานสูง เขตบึงกุ่ม จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นิสิตปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาตจวิทยา
สถานที่ทำงานในปัจจุบัน	ศูนย์ผิวหนัง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2530-2532	จากโรงเรียนวัดราชบพิธ
พ.ศ. 2532-2536	จากโรงเรียนบางกะปิ
พ.ศ. 2536-2542	จากคณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2549-ปัจจุบัน	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาตจวิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ