



## โครงการ

### การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ      การดำเนินของโรคเอสแอลอีที่สัมพันธ์กับนิเวศจุลชีพในลำไส้ของหนูทดลอง

ชื่อนิสิต            นางสาวธันยา เขียวฉลาด                      เลขประจำตัว      5832326023

ภาควิชา              จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา        2561

**คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**  
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

หัวข้อโครงการ

การดำเนินของโรคเอสแอลอีที่สัมพันธ์กับนิเวศจุลชีพในลำไส้  
ของหนูทดลอง

โดย

นางสาวธัญญา เฉียบฉลาด รหัสบัณฑิต 5832326023

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. นราพร สมบูรณ์นะ

ปีการศึกษา

2561

---


ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์

  
หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิช)

คณะกรรมการสอบโครงการ

  
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. นราพร สมบูรณ์นะ)

  
กรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

  
กรรมการ  
(อาจารย์ ดร. ศิดา วีรกุล)

ชื่อโครงการ การดำเนินของโรคเอสแอลอีที่สัมพันธ์กับนิเวศจุลชีพในลำไส้ของหนูทดลอง

นิสิตเสนอโครงการ นางสาวธัญญา เขียวฉลาด

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. นราพร สมบูรณ์นะ

ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2561

### บทคัดย่อ

นิเวศจุลชีพในลำไส้มีบทบาทสำคัญต่อสารอาหารของร่างกายและระบบภูมิคุ้มกัน ความหลากหลายของนิเวศจุลชีพในลำไส้สามารถเป็นตัวบ่งชี้ถึงสถานะของสุขภาพ การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของนิเวศจุลชีพในลำไส้จึงมีความสัมพันธ์ต่ออาการและการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคอ้วน โรคลำไส้อักเสบ และโรคภูมิคุ้มกันทำลายตนเอง เช่น โรคเบาหวานชนิดที่ 1 โรคปลอกประสาทอักเสบ รวมทั้งโรคเอสแอลอี ซึ่งเป็นโรคที่ยังไม่ทราบกลไกแน่ชัด และยังไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ นอกจากนี้การรักษาสมดุลของนิเวศจุลชีพในลำไส้ (homeostasis) ก็อาจนำไปสู่การมีสุขภาพที่ดีขึ้นได้ โครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของนิเวศจุลชีพในลำไส้ของหนูทดลองสายพันธุ์ C57BL/6 ที่สุขภาพดีกับหนูทดลอง C57BL/6 ที่เป็นโรคเอสแอลอีที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยสารเคมี (pristane) และที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรม ( $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ ) โดยวิเคราะห์ระดับความรุนแรงของโรคจากปริมาณ anti-dsDNA, ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ, IL-6, TNF- $\alpha$  และ IL-10 กับการเปลี่ยนแปลงของนิเวศจุลชีพในลำไส้ จากมูลของหนูทดลองให้เป็นตัวแทนของจุลินทรีย์ในลำไส้ที่ระยะเวลา 2, 4, 6, 8 และ 10 เดือน โดยเทคนิคเมตาจีโนมิกส์ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ จากนั้นวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ ด้วยโปรแกรม Mothur พบว่าการดำเนินของอาการในโรคเอสแอลอีมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของนิเวศจุลชีพในลำไส้ โดยกลุ่ม pristane มีอาการของโรคที่อายุ 6 เดือนและมีการเพิ่มความหลากหลายของ OTUs แต่กลุ่ม knockout จะเริ่มมีอาการตั้งแต่เล็กน้อยที่อายุ 4 เดือนและเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่ไม่มีการเพิ่มขึ้นของ OTUs และพบว่ามีชนิดของแบคทีเรียที่มีการเปลี่ยนแปลงที่อายุ 4 เดือนทั้งสองกลุ่มได้แก่ มีการลดลงของ *Lachnospiraceae*, *Oscillospira* และ *Clostridium methylpentosum* ส่วนที่มีการเพิ่มขึ้นได้แก่ มีการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียในคลาส *Mollicutes* ตั้งแต่ที่อายุ 6 เดือน

TITLE	Progression of systemic lupus erythematosus is related to gut microbiota composition in mouse model
INVESTIGATOR	Miss Thanya Cheibchalard
ADVISOR	Associate Professor Dr. Naraporn somboonna
DEPARTMENT	Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn university

### Abstract

Gut microbiota play an importance role in nutritional health and immunological system. Maintaining the balance of microbiological ecology in the intestine (homeostasis) may lead to better health. Dysbiosis of gut microbiota and diversity can be related to the health and associated with many diseases, including systemic lupus erythematosus (SLE), which is chronic autoimmune disease. However, mechanism is unclear and this disease cannot be cured. Many previous studies have shown that healthy and SLE group have different gut microbiota. Therefore, this project studied the association of SLE progression and changes of gut microbiota; comparing between wild-type C57BL/6 mice and C57BL/6 mice that were caused SLE by different factors, Pristane and genetic knockout (FcγRIIB<sup>-/-</sup>), along the progression of symptoms from anti-dsDNA, urine protein, IL-6, TNF-α and IL-10, at 2, 4, 6, 8 and 10 months. The fecal samples representative of intestinal microorganisms, and were analyzed using metagenomics combined with sequence analyze var region 4 of 16S ribosomal RNA gene. Bioinformatic analyses using Mothur program highlighted that the changes of gut microbiota were associated with the occurrence of SLE symptoms. Pristane mice had increased markedly symptoms and OTUs at 6 months of age, while FcγRIIB<sup>-/-</sup> knockout mice had symptoms at 4 months of age but OTUs were not changed. Both pristane and knockout mice at 4 months of family *Lachnospiraceae*, *Oscillospira* and *Clostridium methylpentosum* decreased, yet *Mollicutes* increased slightly at 6 months of age.

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิทยาศาสตร์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยดีเนื่องมาจากความกรุณาเป็นอย่างสูงของ รองศาสตราจารย์ ดร. นราพร สมบูรณ์นะ อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัยซึ่งเป็นกรุณาให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่แก่ผู้วิจัยโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาคจุลชีวะวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ที่ให้การประสิทธิ์ประสาทความรู้

ขอบคุณนางสาวภริญา ฉัฐธนาธรและพี่ๆ ทุกคนในห้องวิจัย 2016 อาคารมหาวชิรมหิต ที่ช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ แก้ไขปัญหาอุปสรรคต่างๆ และกำลังใจ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดาและมารดา ที่ให้การดูแล สนับสนุน และกำลังใจในการศึกษา ทำวิจัยมาโดยตลอด

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
บทนำ	1
อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	9
วิธีดำเนินการวิจัย	11
ผลการทดลอง	16
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	31
เอกสารอ้างอิง	34
ภาคผนวก	37

## บทที่ 1

### บทนำ

#### โรคเอสแอลอี (systemic lupus erythematosus)

โรคเอสแอลอี (systemic lupus erythematosus, SLE) หรือชื่อในภาษาไทยเรียกว่า โรคพุ่มพวง คือโรคภูมิคุ้มกันของร่างกายทำลายเนื้อเยื่อตนเอง (autoimmune disease) เกิดจากการอักเสบเรื้อรังโดย ไม่ทราบสาเหตุ โดยมีความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งปกติทำหน้าที่ต่อต้านสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกแต่กลับต่อต้านหรือทำลายเซลล์ของเนื้อเยื่อในร่างกายตนเองและสร้างแอนติบอดีต่อต้านตนเอง (autoantibodies) ส่งผลให้เกิดการอักเสบและความเสียหายในหลายระบบของร่างกาย

โรคเอสแอลอีมีการดำเนินของโรคทั้งระยะสงบ (remission) คือไม่มีการแสดงอาการของโรค และระยะกำเริบ (active) โดยระยะแรกผู้ป่วยมีอาการทั่วไป เช่น อ่อนเพลีย เป็นไข้ ปวดเมื่อยตามร่างกาย เบื่ออาหาร น้ำหนักลด ต่อมาจะมีความรุนแรงและการดำเนินของโรคแตกต่างกันในแต่ละบุคคล เช่น ผื่นหรือแผลที่ผิวหนังบริเวณต่างๆ ผื่นผีเสื้อที่แก้มทั้งสองข้าง (butterfly rash) แผลบริเวณผิวหนังที่มีเยื่อเมือก ภาวะไตอักเสบ (lupus nephritis) ข้อต่อวมอักเสบมีลักษณะผิดรูป (rheumatoid arthritis) เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (pericarditis) ภาวะเยื่อหุ้มปอดอักเสบ (pleuritis) ปอดอักเสบ (pneumonia) ม้ามโต (splenomegaly) เป็นต้น ซึ่งการกำเริบของโรคเป็นสาเหตุสำคัญในการเสียชีวิตของผู้ป่วยเอสแอลอีเป็นอันดับสอง รองจากการติดเชื้อ

เอสแอลอีเป็นโรคที่พบได้ทั่วโลกและเกือบทุกช่วงอายุ โดยในปัจจุบันมีผู้ป่วยโรคนี้นี้มากกว่า 5 ล้านคน และมีรายงานผู้ป่วยใหม่ 16,000 รายต่อปี โอกาสเกิดในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย ในอัตราส่วน 9 ต่อ 1 โดยเฉพาะในผู้หญิงอายุน้อย 15-45 ปี โดยในอเมริกาเหนืออุบัติการณ์การเกิดโรค (incidence) 23.2 ราย ต่อประชากร 100,000 รายต่อปี และมีความชุก 241 ต่อ 100,000 ราย (Rees et al., 2017) ในคนเอเชียมีอุบัติการณ์การเกิดโรค 0.9-3.1 ต่อประชากร 100,000 รายต่อปี มีความชุก 4.3-45.3 ต่อ 100,000 ราย (Mok et al., 2015)

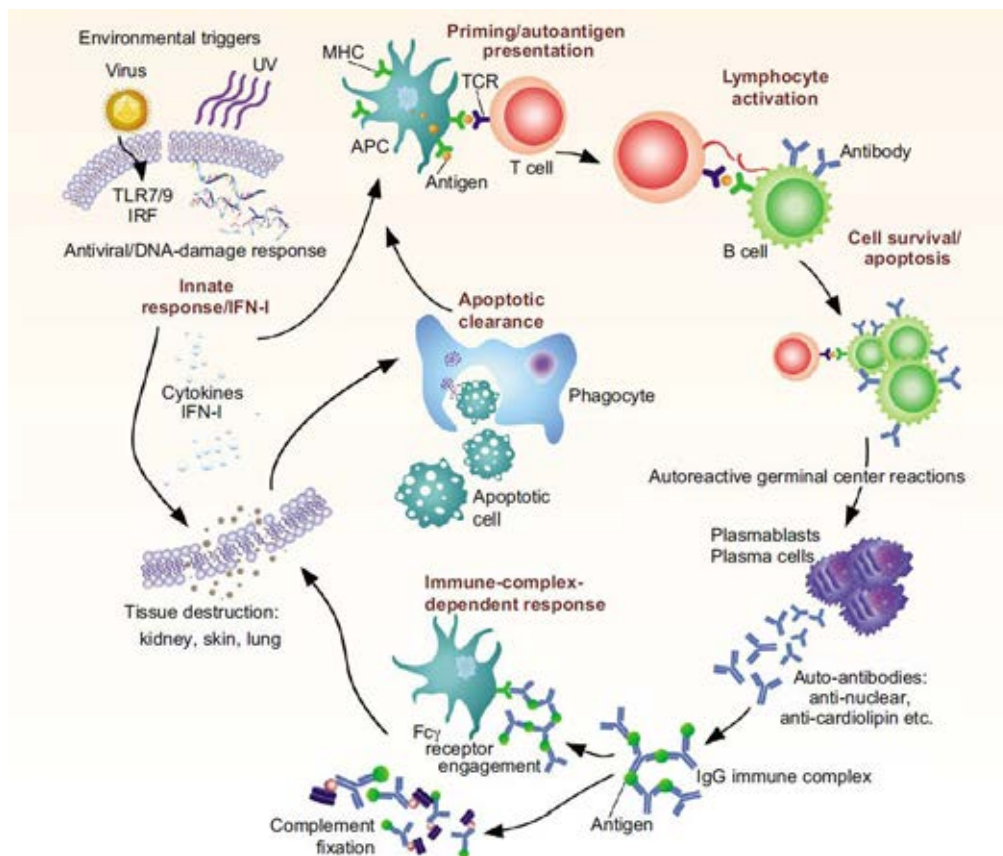
ปัจจุบันยังคงไม่ทราบสาเหตุและกลไกของการเกิดโรคที่แน่ชัด แต่คาดว่าอาจมีความสัมพันธ์กับปัจจัยทางพันธุกรรมและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต การติดเชื้อไวรัส การฉายาและสารเคมี รวมทั้งสภาพแวดล้อมที่มีมลภาวะมากขึ้นในปัจจุบัน อาจเป็นสิ่งที่กระตุ้นให้ผู้ป่วยมีโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นโรคเอสแอลอีมากยิ่งขึ้น โดยผู้ที่มียีนไวต่อการเป็นโรคเมื่อได้รับการกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อมทำให้

เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอจึงไปกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) โดยจะเกิดการผลิตอินเตอร์เฟียร์อนชนิดที่ 1 (type 1 interferon) และไซโตไคน์ (cytokines) หลายชนิด ซึ่งทำให้เกิดการตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันต่างๆ รวมทั้งเกิดการอักเสบ ส่งผลให้เนื้อเยื่อถูกทำลายจึงเกิดกระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) ในผู้ป่วยโรคเอสแอลอี พบว่ามีความผิดปกติต่อการกำจัด apoptotic cell ทำให้เนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่เกิดการตายจะกลายเป็น autoantigen ซึ่งจะถูกนำเสนอผ่าน dendritic cell ให้แก่เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่ร่างกายสร้างขึ้นใหม่ (adaptive immunity) คือ เม็ดเลือดขาวชนิด T cell จากนั้นจึงกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด B cell ให้เกิดการเพิ่มจำนวนและสร้างแอนติบอดีต่อ autoantigen เรียกว่า autoantibodies ซึ่งเมื่อไหลเวียนไปตามกระแสเลือดและจับกับเนื้อเยื่อตนเองเป็น immune complex และกระตุ้นระบบ complement ทำให้เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันมายังบริเวณดังกล่าว เกิดการอุดตันในหลอดเลือดซึ่งทำให้เนื้อเยื่อเกิดความเสียหายและการอักเสบดังรูปที่ 1.1 (Crampton et al., 2014)

โรคเอสแอลอีสามารถวินิจฉัยได้โดยใช้เกณฑ์ของ American College of Rheumatology (ACR) ในการวิเคราะห์ลักษณะอาการทางคลินิกร่วมกับการตรวจทางห้องปฏิบัติการ 11 ข้อ ได้แก่ ผื่นรูปผีเสื้อ ผื่นนูนแดงเป็นสะเก็ด การแพ้แสง ช่องปากและคอเป็นแผล ปวดตามข้อ การอักเสบของเยื่อหุ้มปอด และ เยื่อหุ้มหัวใจ ความผิดปกติของไต ความผิดปกติของระบบประสาท ความผิดปกติของเม็ดเลือด การตรวจพบ antinuclear antibodies ในเลือด และการตรวจพบ anti-DNA (Deoxyribonucleic Acid) หรือ anti-Sm (small nuclear ribonucleoproteins) โดยถ้ามีอาการอย่างน้อย 4 จาก 11 ข้อนี้ จะถูกวินิจฉัยว่าเป็นโรค เอสแอลอี (Kaul et al., 2016)

ปัจจุบันยังไม่สามารถรักษาโรสดังกล่าวให้หายขาดได้ ทำได้เพียงประคับประคองอาการไม่ให้กำเริบ และรักษาภาวะสงบของโรค ยาที่ใช้ในการรักษาหรือควบคุมอาการโรคเอสแอลอีขึ้นอยู่กับอาการและความรุนแรงของโรค การรักษาส่วนใหญ่นิยมใช้ยาในกลุ่มคอร์ติโคสเตียรอยด์ (corticosteroid) ซึ่งเป็นสารที่มีพิษต่อเซลล์และมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยอย่างมาก โดยพบรายงานการติดเชื้อจากการใช้ยาชนิดนี้ ซึ่งสาเหตุการติดเชื้อเป็นสาเหตุหลักในการเสียชีวิตของผู้ป่วยเอสแอลอีมากที่สุด นอกจากนี้การรักษายังมีค่าใช้จ่ายสูง 500,000 บาทต่อคนต่อปี ซึ่งผู้ป่วยจำเป็นต้องรับการรักษาต่อเนื่องไปตลอดชีวิต





รูปที่ 1.1 ภูมิคุ้มกันของร่างกายทำลายตนเองและการถูกทำลายของเนื้อเยื่อ  
(Crampton et al., 2014)

## นิเวศจุลชีพในลำไส้ (gut microbiota)

นิเวศจุลชีพ (microbiota) คือกลุ่มประชากรของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่อาศัยอยู่บริเวณหนึ่ง ประกอบด้วยแบคทีเรีย อาร์เคีย ไวรัส และยูคาริโอต นิเวศจุลชีพที่สำคัญที่สุดในร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอยู่ในระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal tract, gut) ซึ่งเป็นส่วนที่สามารถปฏิสัมพันธ์กันที่ใหญ่ที่สุดแห่งหนึ่ง (250-400 ตารางเมตร) ระหว่างเจ้าบ้านกับสิ่งแวดล้อม (Thursby et al., 2017) ในลำไส้ของมนุษย์จึงเป็นบริเวณที่มีนิเวศจุลชีพหนาแน่นที่สุด มีจำนวนมากถึง 10-100 ล้านล้านเซลล์ คิดเป็น 95% ของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่อยู่ในร่างกาย จุลินทรีย์เหล่านี้อยู่ร่วมกับลำไส้ของมนุษย์แบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) ทำให้มีบทบาทที่สำคัญต่อการทำงานของลำไส้ ได้แก่ การสร้างวิตามินเค และวิตามินบี การย่อยสลายอาหารบางชนิดที่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้ เช่น oligosaccharides ให้กลายเป็นกรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acids; SCFAs) เช่น butyrate, propionate และ acetate ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่ทำให้เกิด ประโยชน์ต่อร่างกาย โดยจุลินทรีย์ *Bacteroides*, *Roseburia*,

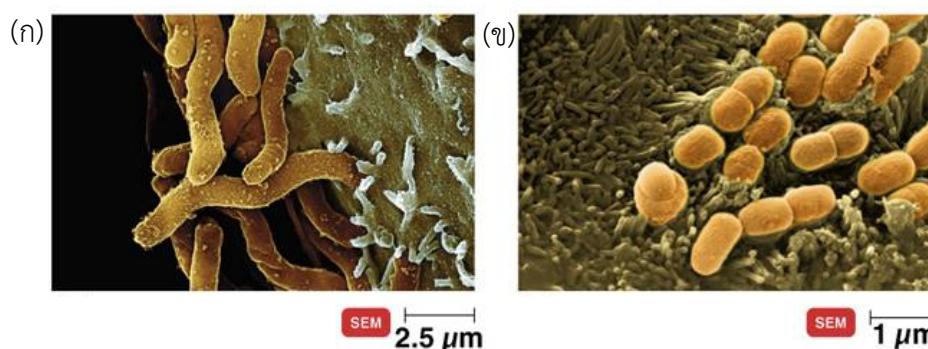
*Bifidobacterium*, *Fecalibacterium* และ *Enterobacteria* เป็นต้น (Jandhyala et al., 2015) การป้องกันเชื้อก่อโรคในการแย่งพื้นที่และอาหารของเชื้อก่อโรค การกระตุ้นการตอบสนองและการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยจากการศึกษาในสัตว์ทดลองที่เกิดและเจริญเติบโตในภาวะปลอดเชื้อ (germ-free animals) เปรียบเทียบกับสัตว์ทดลองที่เลี้ยงในภาวะปกติ พบว่าสัตว์ที่เลี้ยงในภาวะปลอดเชื้อ มีต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ด้านในเนื้อเยื่อของลำไส้เล็ก (Peyer's patch) ขนาดเล็กกว่า มีจำนวน CD4<sup>+</sup> T cells ในชั้น Lamina propria ของเยื่อบุทางเดินอาหารน้อยกว่า การสร้าง IgA ในลำไส้ลดลงและมีระดับแกมมาอิมมูโนโกลบูลิน (IgG) ในเลือดต่ำกว่าสัตว์ทดลองที่เลี้ยงในภาวะปกติ

นิเวศจุลชีพในลำไส้ของแต่ละบุคคลมีความแตกต่างกันตั้งแต่กำเนิด โดยทารกที่คลอดปกติทางช่องคลอดจะได้รับจุลินทรีย์ที่อยู่ในช่องคลอดของมารดา เช่น *Lactobacillus* spp., *Prevotella* spp., *Atopobium* spp. และ *Sneathia* spp. ทารกที่คลอดด้วยการผ่าตัดทางหน้าท้องจะได้รับเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณผิวหนังของมารดา เช่น *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. และ *Propionibacterium* spp. (Sprockett et al., 2018) ต่อมาจะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของนิเวศจุลชีพในลำไส้แตกต่างกันไปตามน้ำนมและสารอาหารที่ได้รับ เช่น ทารกที่ดื่มนมมารดาจะได้รับจุลินทรีย์จำพวก *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., และ *Bifidobacterium* spp. เป็นต้น (Kundu et al., 2017) โดยเมื่ออายุ 2.5 ปี นิเวศจุลชีพในลำไส้จะมีความคล้ายคลึงกับผู้ใหญ่ปกติ (Thursby et al., 2017) และมีความแตกต่างกันในแต่ละบุคคล โดยส่วนใหญ่ประกอบด้วยแบคทีเรียซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียเฟิร์มิกูตา Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria และ Bacteroidetes ประมาณ 93.5%

ปัจจัยที่ทำให้มีความหลากหลายและการเปลี่ยนแปลงของนิเวศจุลชีพในลำไส้ ได้แก่ ปัจจัยภายใน เช่น พันธุกรรม เพศ และอายุ ปัจจัยภายนอก เช่น วิธีการดำเนินชีวิต ยาปฏิชีวนะ และอาหาร เป็นต้น ความหลากหลายของนิเวศจุลชีพในลำไส้จึงมีความเกี่ยวข้องหรือเป็นดัชนีชี้วัดสุขภาพของแต่ละบุคคลอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งหากมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของนิเวศจุลชีพในลำไส้หรือเสียสมดุลจะทำให้การทำงานของระบบทางเดินอาหารผิดปกติ และทำให้เกิดพยาธิสภาพนอกเหนือจากบริเวณทางเดินอาหารด้วย

จากงานวิจัยก่อนหน้ามีรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบของจุลินทรีย์ในลำไส้ที่เปลี่ยนแปลงไปกับการเกิดโรคต่างๆ ทั้งโรคในลำไส้และนอกลำไส้ เช่น โรคอ้วน โดยจะพบปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Bacteroidetes ลดลง และแบคทีเรียกลุ่ม Firmicutes เพิ่มมากขึ้น จุลินทรีย์ในลำไส้ที่เปลี่ยนแปลงไปส่งผลให้ร่างกายได้รับพลังงานมากขึ้นจากการย่อยอาหารได้สมบูรณ์ อีกทั้งยังส่งเสริมการนำพลังงานส่วนเกินที่ได้ไปเก็บสะสมในรูปไขมันในร่างกาย โรคที่เกิดจากภูมิคุ้มกันทำลายตนเอง เช่น โรคเบาหวาน

ชนิดที่ 1 (type 1 diabetes) เกิดจากตับอ่อนถูกทำลายจากภูมิคุ้มกันของตนเอง ทฤษฎีหนึ่งที่ว่า อาจเกี่ยวข้อง คือการเปลี่ยนแปลงสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ทำให้เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ผิดปกติขึ้น และยังมีงานวิจัยที่ศึกษานิเวศจุลชีพจากอุจจาระของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1 เปรียบเทียบกับผู้ที่มีสุขภาพดีพบว่ามีความสมดุลของนิเวศจุลชีพที่แตกต่างกัน พบว่าผู้ป่วยจะมีจุลินทรีย์บางชนิดที่มีปริมาณน้อยกว่า ได้แก่ *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Blautia coccooides*, *Eubacterium rectal*, *Prevotella* และมีจุลินทรีย์ที่มีปริมาณมากกว่า ได้แก่ *Clostridium*, *Bacteroides*, *Veillonella* (Murri et al., 2013) สำหรับการศึกษาโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Rheumatoid arthritis) พบว่าหนูสายพันธุ์ K/BxN ที่มี T cell ที่สามารถตอบสนองต่อเปปไทด์ของตนเอง เมื่อมีแบคทีเรีย SFB (segmented filamentous bacteria) ที่อยู่บริเวณผิวหนังนอกของลำไส้จะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โดยทำให้เกิดการตอบสนองของ T<sub>H</sub>17 (T helper 17) ที่อยู่อีกด้านของลำไส้ ผลิต pro-inflammatory cytokine ชนิด IL-17 (Interleukin 17) ที่ทำให้เกิดการอักเสบ และเดินทางไปยังต่อมน้ำเหลือง เพื่อกระตุ้น B cell ในม้ามให้เกิดการพัฒนาและผลิตแอนติบอดีต่อเนื้อเยื่อตนเอง จากนั้นก็จะไหลเวียนออกไปยังบริเวณข้อก็จะทำให้แอนติบอดีที่สร้างนั้นจับกับเนื้อเยื่อของตนเองที่บริเวณข้อ และเกิดการอักเสบได้ (Wu et al., 2012) และมีงานวิจัยที่ศึกษานิเวศจุลชีพจากอุจจาระของผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ เปรียบเทียบกับผู้ที่มีสุขภาพดีพบว่ามีความสมดุลของนิเวศจุลชีพที่แตกต่างกัน โดยมีจุลินทรีย์ที่มีปริมาณน้อยกว่า ได้แก่ *Bifidobacteria* และ *Bacteroides fragilis* (Zhang et al., 2015) ส่วนการศึกษาโรคปลอกประสาทอักเสบเสื่อมแข็ง (Multiple sclerosis) พบความสัมพันธ์ของหนูทดลองสายพันธุ์ experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) ที่มีการอักเสบของระบบประสาท กับแบคทีเรีย SFB แต่ยังไม่ทราบกลไกแน่ชัดในการเคลื่อนที่ของระบบภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อเนื้อเยื่อตนเองไปยังระบบประสาทส่วนกลาง (Kamada et al., 2013)



© 2013 Pearson Education, Inc.

รูปที่ 1.2 ภาพได้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดของแบคทีเรียที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร

(ก) กระจเพาะอาหาร (ข) ลำไส้เล็ก

## หนูทดลองที่ใช้ในการศึกษาโรคเอสแอลอี

หนูทดลองสายพันธุ์ C57BL/6 หรือ C57 black 6 หรือ B6 เป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้ในการศึกษาทดลองและดัดแปลงพันธุกรรมในการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ เนื่องจากเป็นหนูสายพันธุ์แรกที่มีการนำมาศึกษาวิเคราะห์จีโนม (genome) หรือข้อมูลทางพันธุกรรมทั้งหมด โดยปกติหนูสายพันธุ์ C57BL/6 มีช่วงชีวิตที่ยาว และมีความไวต่อการเป็นโรคมะเร็งต่ำ (The Jackson Laboratory)

จากรายงานการเกิดโรคคาดว่าปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคเอสแอลอี ซึ่งมีงานวิจัยจำนวนมากศึกษาการเกิดโรคเอสแอลอีด้วยการใช้สารเคมีเหนี่ยวนำให้หนูทดลองเกิดอาการของโรคเอสแอลอี เช่น การใช้สาร pristane (2,6,10,14-tetramethylpentadecane, TMPD) (Freitas et al., 2017) ซึ่งเป็นน้ำมันไฮโดรคาร์บอนชนิดหนึ่งที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ สามารถใช้กระตุ้นเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ เมื่อใช้ในปริมาณน้อย (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข) โดยในการเหนี่ยวนำให้หนูชนิดนี้มีอาการของโรคเอสแอลอี จะฉีดสาร pristane ที่เข้าที่ช่องท้อง (abdominal cavity) ของหนูทดลองสายพันธุ์ C57BL/6 ทำให้เกิดการผลิตแอนติบอดีต่อตนเอง (autoantibodies) การผลิต cytokines ชนิดที่ทำให้เกิดการอักเสบ (pro-inflammatory cytokines) และมีอาการคล้ายโรคเอสแอลอี ได้แก่ ผื่นหลอดเลือดในปอดอักเสบ (pulmonary vasculitis) ภาวะเลือดออกในปอด (pulmonary haemorrhage) (Richard et al., 2017) มีการสร้าง autoantibodies ต่างๆ เช่น anti-RNP, anti-Sm, anti-dsDNA antibodies และ cytokines ชนิด Interferons เป็นต้น (Celhar et al., 2017)

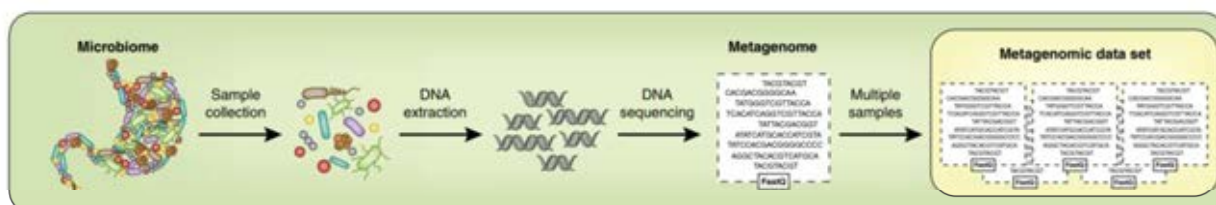
นอกจากนี้ยังสามารถทำให้หนูทดลองปกติเกิดอาการคล้ายโรคเอสแอลอีจากการดัดแปลงพันธุกรรม โดยมีงานวิจัยที่พบว่า FcγRIIB เป็นโปรตีนตัวรับ (receptor) ของอิมมูโนโกลบูลินชนิดจี (IgG) โดยอยู่บนผิวเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ B cell, monocyte, dendritic cell, macrophage, neutrophil, basophil และ mast cell พบได้ทั้งในมนุษย์และในหนู ซึ่งมีโครงสร้างและหน้าที่เหมือนกัน โดยทำหน้าที่ยับยั้ง B cell ที่มีการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของร่างกาย (autoreactive) โดยการส่งสัญญาณทำให้เซลล์นั้นเกิดการ apoptosis นอกจากนี้ยังมีหน้าที่สำคัญต่อการกำจัด immune complex ที่สะสมบริเวณเนื้อเยื่อ โดยกระตุ้น phagocytes เช่น macrophage และทำให้เกิดการหลั่ง cytokines ที่ทำให้เกิดอาการอักเสบหลากหลายชนิด ดังนั้นหนูทดลองที่ทำให้ปราศจาก FcγRIIB (FcγRIIB<sup>-/-</sup>) ก็จะทำให้เกิดความบกพร่องในการกำจัด immune complex ทำให้สะสมในเนื้อเยื่อ เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต่างๆ เกิดการอุดตันและการอักเสบต่อเนื้อเยื่อบริเวณต่างๆ ในร่างกาย โดยหนูทดลองสายพันธุ์ C57BL/6 ที่ปราศจาก FcγRIIB จะมีอาการคล้ายโรคเอสแอลอี เช่น เช่น ไตอักเสบ มีการสร้าง anti-dsDNA antibodies เป็นต้น

## เมตาจีโนมิกส์ (metagenomics)

เมตาจีโนมิกส์เป็นวิธีการที่ใช้ในการศึกษาจีโนม (genome) หรือข้อมูลทางพันธุกรรมทั้งหมดของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีในบริเวณหนึ่ง (community) โดยศึกษาจากสารพันธุกรรมของตัวอย่างที่ต้องการศึกษาโดยตรง ไม่ต้องทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นวิธีเมตาจีโนมิกส์จึงครอบคลุมไปถึงการศึกษาจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (unculturable microbes) ซึ่งพบว่ามีมากถึงร้อยละ 99 ของจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างธรรมชาติ จากฐานข้อมูลเมตาจีโนม (metagenomic library) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธีหลักคือ การอ้างอิงจากคุณสมบัติจำเพาะที่ต้องการศึกษา (function-based screening) หรืออ้างอิงจากลำดับเบสของยีนที่ต้องการ (sequence-based screening) (อัชมา และคณะ, 2013) โดยในการศึกษาจุลินทรีย์นิยมใช้ยีน 16S ribosomal RNA (16S rRNA) จากสารพันธุกรรมที่สกัดได้ เนื่องจากยีนนี้อยู่ในแบคทีเรีย และอาร์เคียทุกชนิด มีหน้าที่ที่แน่นอนคือ ผลิตโปรตีนเพื่อความอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ และพบว่ามี การเปลี่ยนแปลงน้อยมากในแต่ละช่วงวิวัฒนาการ แบ่งออกเป็น 9 ตำแหน่ง ได้แก่ V1-V9 (hypervariable regions) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความจำเพาะและมีความแตกต่างกัน ทำให้สามารถจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ได้ (วิชัย และคณะ, 2010) วิธีเมตาจีโนมิกส์จึงเป็นเครื่องมือที่สำคัญและจำเป็นที่ใช้ในการศึกษานิเวศจุลชีพในลำไส้ เนื่องจากวิธีการเพาะเลี้ยง ไม่สามารถจำลองสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ในลำไส้ได้จริง เช่น ภาวะความเป็นกรดหรือด่าง (pH) แหล่งคาร์บอนหรือออกซิเจน และความเข้มข้นของสารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต ซึ่งการศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ด้วยวิธีเมตาจีโนมิกส์ อาจจะนำไปสู่การรักษาหรือป้องกันโรคต่างๆ ได้ (อัชมา และคณะ, 2013)

เทคโนโลยีที่มีบทบาทสำคัญต่อการศึกษาเมตาจีโนมิกส์ คือ การศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส (sequencing) โดยมี 3 เทคโนโลยีที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ Roche/454 Genome sequencer, Illumina/Solexa และABI/ SOLiD สิ่งที่แตกต่างกันของเทคโนโลยีเหล่านี้คือ การตรึงดีเอ็นเอต้นแบบให้อยู่กับที่ (template immobilization) วิธีสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ อัตราความผิดพลาด (error rate) และความยาวของ reads ที่ได้จากการอ่านลำดับเบส โดย Illumina เป็นเทคโนโลยีที่นิยมใช้มากที่สุด เนื่องจากมีประสิทธิภาพและมีราคาไม่สูงมาก มีหลักการคือ ติดฉลากเบสด้วยสารเรืองแสง (fluorescent reversible terminators) ของทั้งสี่เบส และเพิ่มปริมาณของสายดีเอ็นเอเชื่อมต่อเป็นสะพานบนสถานะของแข็ง (solid-phase bridge amplification) ได้กลุ่มของสายดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน โดยเครื่อง Illumina นี้สามารถอ่าน ความยาวได้ถึง 100 คู่เบส และในการหาลำดับเบสหนึ่งครั้งจะได้จำนวนของเบสมากถึง  $600 \times 10^9$  เบส และความถูกต้องของเบสที่ได้มากกว่าร้อยละ 99.5 (อลิษา และคณะ, 2012)

จากนั้นนำข้อมูลทางเมตาจีโนมิกส์มาวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ (bioinformatics) เพื่อจัดการข้อมูลที่ได้จากเครื่องอ่านลำดับเบส ในการจัดเรียงและเชื่อมต่อลำดับเบส เทียบข้อมูลกับฐานข้อมูลเพื่อระบุชนิดจุลินทรีย์ และวิเคราะห์ทางสถิติต่างๆ โดยปัจจุบันโปรแกรมที่นิยมใช้ คือ โปรแกรม Mothur



รูปที่ 1.3 ขั้นตอนเบื้องต้นของเทคนิคเมตาจีโนมิกส์

## บทที่ 2

### อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

#### 2.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

ตู้ปลอดเชื้อ (laminar cabinet) (Boss Tech, Inc.)

Spectrophotometer และคิวเวท (cuvette)  $\mu$ Cuvette<sup>®</sup> (Eppendorff, Hamburg, Germany)

ตู้แช่เย็น -20 องศาเซลเซียส (SANYO, Osaka, Japan)

Agarose Gel Electrophoresis System Mupid<sup>®</sup>-exU (ADVANCE, Japan)

UV transilluminator (Labnet international, Inc., New Jersey, USA)

เครื่องส่องและถ่ายภาพเจล (Gel documentary system) (Boi-Rad, Auckland, New Zealand)

Thermal Cycler (SCILOGEX, LLC.)

Qubit<sup>®</sup> 3.0 Fluorometer (Invitrogen, Massachusetts, USA)

เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับหลอดทดลองขนาดเล็ก 1.5 มิลลิลิตร (microcentrifuge)

ไมโครเวฟ (Sharp, Bangkok, Thailand)

ใบมีด

Micropipette

Gel documentation (Boi-Rad, Auckland, New Zealand)

เครื่องให้ความร้อน (heat block)

เครื่องปั่นผสมสาร (vortex mixer) (DAIHAN Scientific, Seoul, Korea)

## 2.2 สารเคมี

0.5xTBE buffer (Tris-borate-EDTA)

เอทานอลเข้มข้น 70%

Double distilled water (ddH<sub>2</sub>O)

ดีเอ็นเอมาตรฐาน One Mark 100 (GeneDireX, Inc.)

ผงอากาโรสเจล (agarose powder) (Vivantis Inc., USA)

Ethidium bromide (AMRESCO, Ohio, USA)

DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen, Inc.)

EmeraldAmp<sup>®</sup> GT PCR Master Mix (TAKARA BIOTECHNOLOGY CO., LTD., DALIAN, China)

PCR Clean-Up & Gel Extraction Kit (GeneDireX, Inc.)

Qubit<sup>®</sup> dsDNA HS Assay kit (Invitrogen, Massachusetts, USA)



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 ศึกษาและแบ่งกลุ่มตัวอย่างหนูทดลอง

##### 3.1.1 ทำการทดลองในหนูทดลอง 3 กลุ่มคือ

1. หนูปกติที่ไม่เป็นโรคเอสแอลไอสายพันธุ์ C57BL/6 หรือ C57 black 6 หรือ B6 (wild-type; WT) มีลักษณะทั่วไปคือ ขนสีดำและเป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้ในศึกษาทดลอง ซึ่งเป็นหนูที่สุขภาพดี ใช้เป็นกลุ่มควบคุมการทดลอง

2. หนูปกติสายพันธุ์ C57BL/6 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคเอสแอลไอโดยการใช้สารเคมี pristane (pristane; PT) ซึ่งจะกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันสร้าง autoantibodies ทำให้หนูปกติเกิดอาการของโรคเอสแอลไอ และอาการอักเสบที่บริเวณต่าง ๆ เช่น ไตอักเสบ โลหิตจาง และมีการสร้าง anti-dsDNA antibodies เป็นต้น (Zhang et al., 2015) โดยจะฉีดสาร pristane ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เข้าที่ช่องท้องของหนูทดลองปกติเมื่ออายุ 2 เดือน ทำให้เริ่มมีอาการของโรคเอสแอลไอเมื่ออายุประมาณ 6 เดือน

3. หนูปกติสายพันธุ์ C57BL/6 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคเอสแอลไอโดยการตัดแปลงทางพันธุกรรมให้เกิดความผิดปกติที่ยีน FcγRIIB (knockout; KO) ซึ่ง FcγRIIB เป็น receptor ของอิมมูโนโกลบูลินชนิดจี (IgG) ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันเกิดความผิดปกติ โดยสร้าง autoantibodies ทำลายเนื้อเยื่อ และเกิดอาการอักเสบที่บริเวณต่าง ๆ เช่น ไตอักเสบ และมีการสร้าง anti-dsDNA antibodies เป็นต้น โดยจะเริ่มมีอาการของโรคเอสแอลไอเมื่อมีอายุประมาณ 6 เดือน (Bolland et al., 2000)

##### 3.1.2 เก็บตัวอย่างเชื้อจากหนูทดลอง

หนูทดลองจะถูกเลี้ยงและเก็บตัวอย่างมูลโดยคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยจะเก็บตัวอย่างมูลของหนูทดลอง 3 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว ที่เลี้ยงในสภาพที่ถูกควบคุมตัวแปรต่าง ๆ เช่น อาหาร และสภาพแวดล้อมที่อาศัย เป็นต้น เมื่อหนูมีอายุ 2, 4, 6, 8 และ 10 เดือน จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.1 กลุ่มตัวอย่างทั้งหมด

เดือน (M)	wild-type (WT)			pristane (PT)			knockout (KO)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
2	WT2M1	WT2M2	WT2M3	PT2M1	PT2M2	PT2M3	KO2M1	KO2M2	KO2M3
4	WT4M1	WT4M2	WT4M3	PT4M1	PT4M2	PT2M3	KO4M1	KO4M2	KO4M3
6	WT6M1	WT6M2	WT6M2	PT6M1	PT6M2	PT2M3	KO6M1	KO6M2	KO6M3
8	WT4M1	WT4M2	WT4M3	PT8M1	PT8M2	PT2M3	KO8M1	KO8M2	KO8M3
10	WT4M1	WT4M2	WT4M3	PT10M1	PT10M2	PT10M3	KO10M1	KO10M2	KO10M3

หมายเหตุ ในโครงการนี้จะเลือกทำที่ซ้ำที่ 1

### 3.2 วิเคราะห์ความหลากหลายของนิเวศจุลชีพในลำไส้

3.2.1 สกัดสารพันธุกรรมทั้งหมดจากมูลของหนูทดลองโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ PowerSoil® DNA Isolation Kit เริ่มจากนำตัวอย่าง 0.25 กรัม ใส่ลงในหลอดที่มีเม็ดบีดส์ เติมน้ำ solution C1 60 ไมโครลิตร และปั่นให้เซลล์แตกเพื่อทำให้สารพันธุกรรมออกมาจากเซลล์ ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนใสด้านบนใส่ลงใน collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำ solution C2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำส่วนใสด้านบนมาใส่ใส่ลงใน collection tube ใหม่ เติมน้ำ solution C3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำ solution C4 ปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร ผสมด้วยเครื่อง vortex นาน 5 วินาที แล้วเติมน้ำลงใน MB spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง 10,000 x g 1 นาที แล้วเติมน้ำ solution C5 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง 10,000 x g 30 วินาที จากนั้นใส่ MB spin column ลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำ solution C6 ซึ่งเป็น elution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง 10,000 x g 30 วินาที จะได้สารพันธุกรรมที่สกัดออกมา และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20

3.2.2 ทดสอบเชิงคุณภาพและปริมาณของสารพันธุกรรมที่สกัด โดยใช้ solution C6 จากชุดสกัด PowerSoil® DNA Isolation Kit เป็น blank และใช้ไมโครปิเปตดูดสารพันธุกรรมที่สกัดได้ ปริมาตร 3 ไมโครลิตรหยดบริเวณกลาง eppendorf µCuvette™ G1.0 แล้วนำไปวัดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

3.2.3 นำสารพันธุกรรมทั้งหมดมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และสร้างห้องสมุดยีน 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่ติดบาร์โค้ดเพื่อระบุชื่อตัวอย่าง และติด adapter สำหรับเครื่อง Next-generation sequencing (NGS) ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 primer สำหรับ 16S rRNA

primer	ลำดับเบสของ primer
515F	5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'
806R	barcoded-5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'

สำหรับสภาวะของการเพิ่มจำนวนยีนด้วยเครื่อง Thermal cycler (Scilogex, LLC.) มีดังนี้

Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	3 นาที	} 25-30 รอบ
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	45 วินาที	
Annealing	50 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1.30 นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	10 นาที	
End	4 องศาเซลเซียส		

3.2.4 ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธีแยกด้วยไฟฟ้า (gel electrophoresis) โดยใช้ agarose gel ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.75 และ OneMARK 100 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ใช้แรงดันไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 35 – 40 นาที โดยดีเอ็นเอเป้าหมายที่ได้มีขนาด 381 คู่เบส จากนั้นตัดชิ้นส่วนเจลที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยใบมีดปลอดเชื้อภายใต้เครื่อง UV transilluminator

3.2.5 สกัดดีเอ็นเอเป้าหมายจากอากาศโรสเจล ด้วยชุดสกัด PCR Clean-Up & Gel Extraction Kit โดยนำ ชิ้นเจลที่ตัดมาน้ำหนักไม่เกิน 300 มิลลิกรัมใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม buffer B ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยระหว่างบ่มพลิกหลอดผสมให้เข้ากัน 2-3 ครั้ง ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมลงใน PG Column ที่ใส่ใน collection tube แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที ที่ส่วนของเหลวที่ลงมาใน collection tube เติม buffer W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตรใน PG column ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที ที่ส่วนของเหลวที่ลงมาใน collection tube เติม buffer W2 ปริมาตร 600 ไมโครลิตรลงใน PG column ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที ที่ส่วนของเหลวที่ลงมาใน collection tube จากนั้นใส่ PG column ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม buffer E ลงบริเวณ

ตรงกลางแผ่นกรองของ PG column ที่ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 x g 2 นาที จะได้ดีเอ็นเอเป้าหมายที่บริสุทธิ์ และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.6 วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วย Qubit® dsDNA Assay Kit โดยเตรียม Qubit® working solution ที่ผสม Qubit dsDNA HS buffer 199 ไมโครลิตร ต่อ Qubit dsDNA HS reagent 1 ไมโครลิตร ตามจำนวนตัวอย่างที่ใช้ลงในหลอดเอเพนดรอปขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำ Qubit working solution 190 ไมโครลิตร มาผสมกับ Qubit dsDNA HS standard 1 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จำนวน 1 หลอดและ Qubit dsDNA HS standard 2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร 1 หลอด จากนั้นนำ Qubit dsDNA HS buffer ที่ผสม Qubit dsDNA HS reagent แล้ว 199 ไมโครลิตร ผสมกับ 1 ไมโครลิตร ของตัวอย่างที่ต้องการวัด ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex แล้วบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที นำไปวัดด้วยเครื่อง Qubit® fluorometer จากนั้นรวมดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 180 - 200 นาโนกรัม ส่งวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่อง Illuminar MiSeq ที่ศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์และชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.2.7 วิเคราะห์ผลเชิงชีวสารสนเทศ

นำข้อมูลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสมาวิเคราะห์ผลเชิงสารสนเทศด้วยคอมพิวเตอร์ โดยใช้โปรแกรม Mothur เริ่มจากการต่อลำดับเบสของ forward reads และ reverse reads ในตัวอย่างเดียวกันเข้าด้วยกัน จากนั้นตัดสายลำดับเบสที่มีความยาวน้อยกว่า 100 คู่เบส ซึ่งเป็นส่วนที่เกิดจากความผิดพลาด ตัดลำดับเบสที่มีความกำกวม จากนั้นกำหนดลำดับเบสเริ่มต้นและสุดท้ายให้อยู่ช่วงลำดับเบสที่ต้องการ แล้วจึงจัดกลุ่มสายลำดับเบสที่เหมือนกันให้อยู่กลุ่มเดียวกัน ตัดช่องว่างและลำดับเบสที่ผิดปกติ นำลำดับเบสที่ได้ไป alignment เพื่อระบุชนิดของจุลินทรีย์โดยเทียบกับฐานข้อมูล SILVA และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพของนิเวศจุลชีพ operational taxonomic unit (OTUs) เปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างของแต่ละกลุ่ม ความสัมพันธ์กับระดับการดำเนินของโรค ระบุชนิดแบคทีเรียหรือกลุ่มของแบคทีเรียที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

### 3.3 วิเคราะห์การดำเนินของโรคเอสแอลอี

วิเคราะห์การดำเนินและความรุนแรงของโรคจากหนูทดลองแต่ละกลุ่ม โดยคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้แก่ การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ การวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดี ต่อ double-stranded DNA (anti-dsDNA) วิเคราะห์ปริมาณไซโตไคน์ (cytokines) ชนิด TNF- $\alpha$ , IL-6 และ IL-10 เพื่อเปรียบเทียบกับผลวิเคราะห์เชิงสารสนเทศ ซึ่งจะช่วยให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของการดำเนินโรคเอสแอลอีกับนิเวศจุลชีพในลำไส้

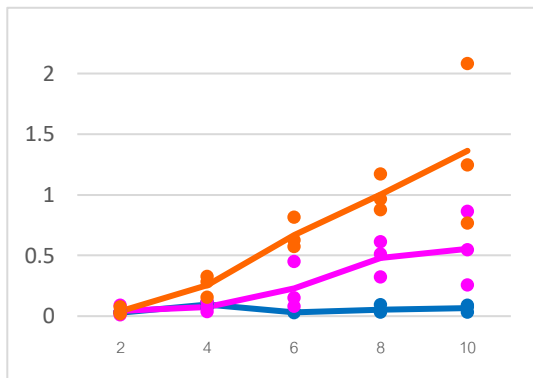
## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

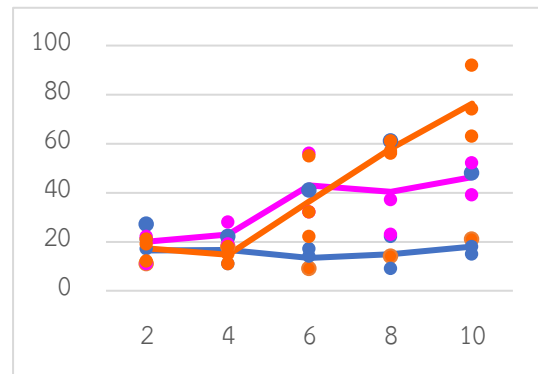
#### 4.1 การวิเคราะห์การดำเนินและความรุนแรงของโรคจากหนูทดลอง

ตารางที่ 4.1 ผลวิเคราะห์ anti-dsDNA, โปรตีนในปัสสาวะ, interleukin-6, TNF- $\alpha$  และ interleukin-10

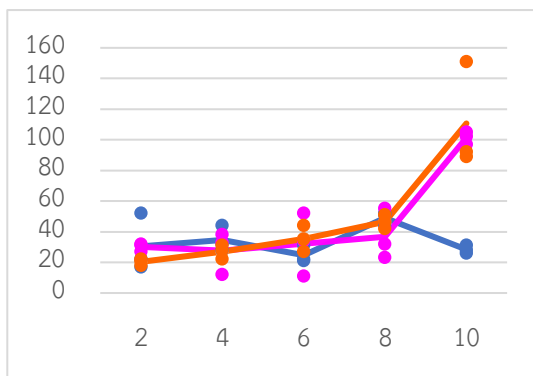
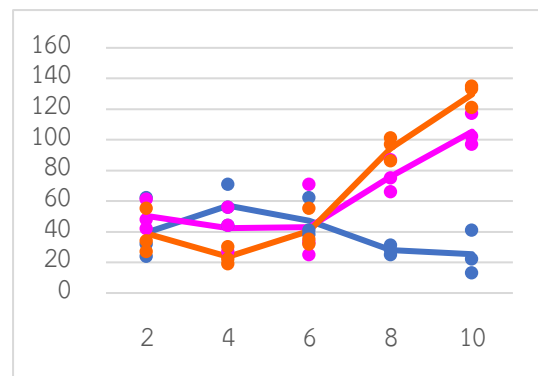
samples	month	anti-dsDNA	urine protein	IL-6 (pg/ml)	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
Wild-type (WT)	2	0.02929	17	17	62	53
	4	0.07157	11	32	56	46
	6	0.03355	17	31	62	51
	8	0.09352	22	44	25	56
	10	0.089363	18	31	13	68
Pristane (PT)	2	0.011	27	27	61	67
	4	0.036	22	33	27	52
	6	0.0812	41	34	33	42
	8	0.612	61	55	87	78
	10	0.547	52	105	97	108
Knockout (KO)	2	0.02979	12	21	34	72
	4	0.1543	11	28	30	39
	6	0.812	22	35	35	55
	8	1.17	57	42	101	97
	10	0.765	63	151	97	107

(ก) anti-dsDNA ( $\times 10^{-1}$  of OD 450nm)

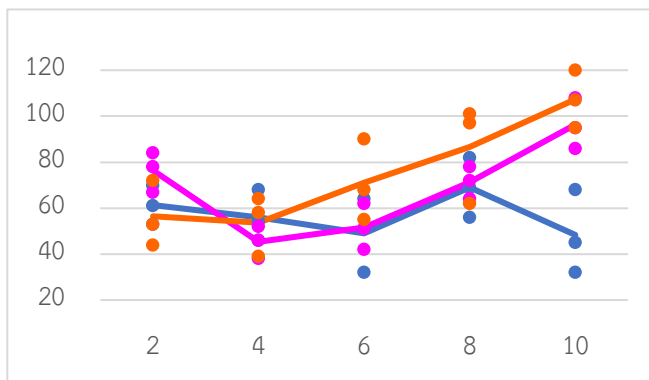
(ข) urine protein creatinine index



(ค) IL-6 (pg/ml)

(ง) TNF- $\alpha$  (pg/ml)

(จ) IL-10 (pg/ml)



เดือน

—WT  
—PT  
—KO

รูปที่ 4.1 กราฟแสดงการดำเนินของ (ก) anti-dsDNA, (ข) โปรตีนในปัสสาวะ, (ค) Interleukin-6, (ง) TNF- $\alpha$  และ (จ) Interleukin-10 ของหนูสายพันธุ์ C57BL/6 กลุ่ม wild-type, กลุ่ม pristane และ กลุ่ม knockout ที่แต่ละช่วงอายุคือ 2, 4, 6, 8 และ 10 เดือน

จากผลของ anti-dsDNA, urine protein, IL-6, TNF- $\alpha$  และ IL-10 เป็นตัวบ่งชี้ของการเป็นโรค เอสแอลอี พบว่ากลุ่ม wild-type ไม่มีการเพิ่มขึ้นของ anti-dsDNA และโปรตีนในปัสสาวะ มีการเปลี่ยนแปลงของ IL-16, IL-10 และ TNF- $\alpha$  เล็กน้อย กลุ่ม pristane (สีชมพู) มีการเพิ่มขึ้นของ anti-dsDNA, โปรตีนในปัสสาวะ, IL-16 และ IL-10 ที่อายุ 6 เดือน และ TNF- $\alpha$  ที่อายุ 8 เดือน กลุ่ม knockout (สีส้ม) มีการเพิ่มขึ้นของ anti-dsDNA และ IL-6 ที่อายุ 4 เดือน โปรตีนในปัสสาวะและ IL-10 ที่อายุ 6 เดือน และ TNF- $\alpha$  ที่อายุ 8 เดือน และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม pristane และกลุ่ม knockout พบว่ากลุ่ม knockout มีปริมาณต่างๆดังกล่าวมากกว่ากลุ่ม pristane ที่อายุตั้งแต่ 6 เดือน ดังรูปที่ 4.1

#### 4.2 การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ

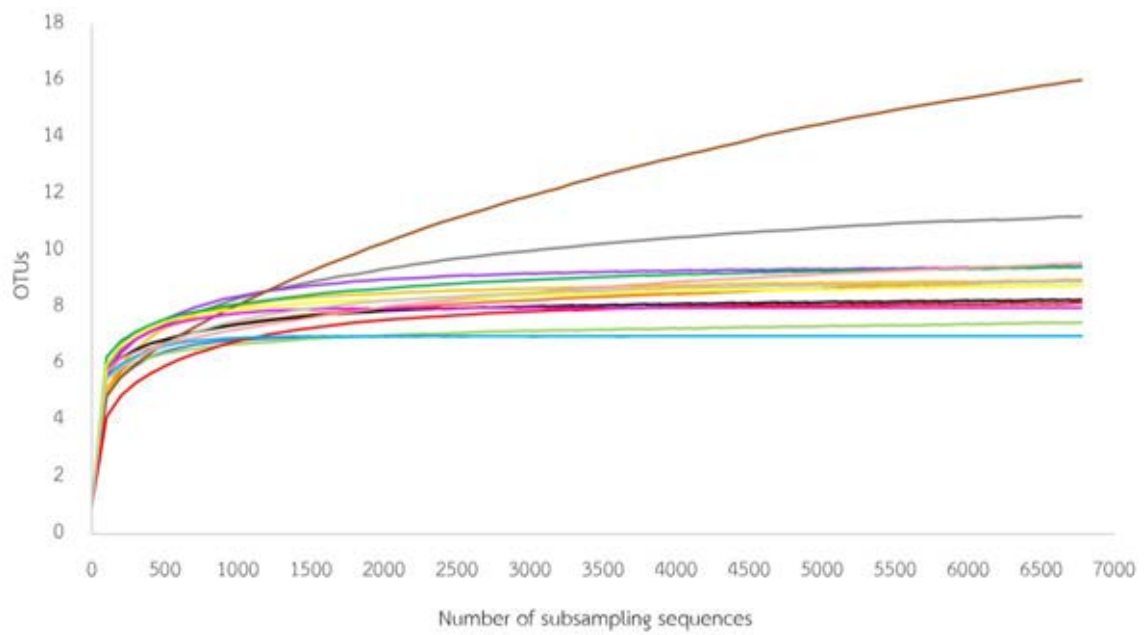
จากข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากเครื่อง Illumina Miseq และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Mothur ได้จำนวนสายลำดับเบส (reads) ทั้งหมด 862777 reads (pre-processing) จากนั้นจัดเรียงลำดับเบส โดยต่อลำดับเบสของ forward reads และ reverse reads ในตัวอย่างเดียวกันเข้าด้วยกัน ต่อมาตัดสายลำดับเบสที่มีความยาวน้อยกว่า 100 คู่เบส ตัดลำดับเบสที่มีความกำกวม และเบสที่มีการเชื่อมต่อกันได้จำนวน reads คือ 581940 ดังตารางที่ 4.2 และลดทอนจำนวน reads ให้มีค่าเท่ากับ 6773 reads (Pre-processing) จากนั้นตรวจสอบจาก rarefaction curve เพื่อดูว่ามีความครอบคลุมทั้งหมดในนิเวศจุลชีพ จะเห็นได้ว่าเมื่อมีจำนวนเบสมากขึ้นก็จะมี operational taxonomic unit (OTUs) เพิ่มมากขึ้น และเริ่มมีแนวโน้มคงที่ตั้งแต่ประมาณ 1000 reads ทั้งในระดับไฟลัม (phylum) และระดับจีนัส (genus) ดังรูปที่ 4.2 (ก) และ 4.2 (ข) ตามลำดับ นอกจากนี้ ข้อมูลยังมีค่า coverage เป็นตัวชี้วัดการครอบคลุม หากมีค่ามากกว่า 97% ตัวอย่างมีความครอบคลุมนิเวศจุลชีพในลำไส้ ซึ่งผลในทุกตัวอย่างมีค่า coverage มากกว่า 99% ทั้งในระดับ phylum และระดับ genus แสดงว่า การลดทอนที่ 6773 ครอบคลุมเพียงพอต่อการศึกษาความหลากหลายของนิเวศจุลชีพในลำไส้



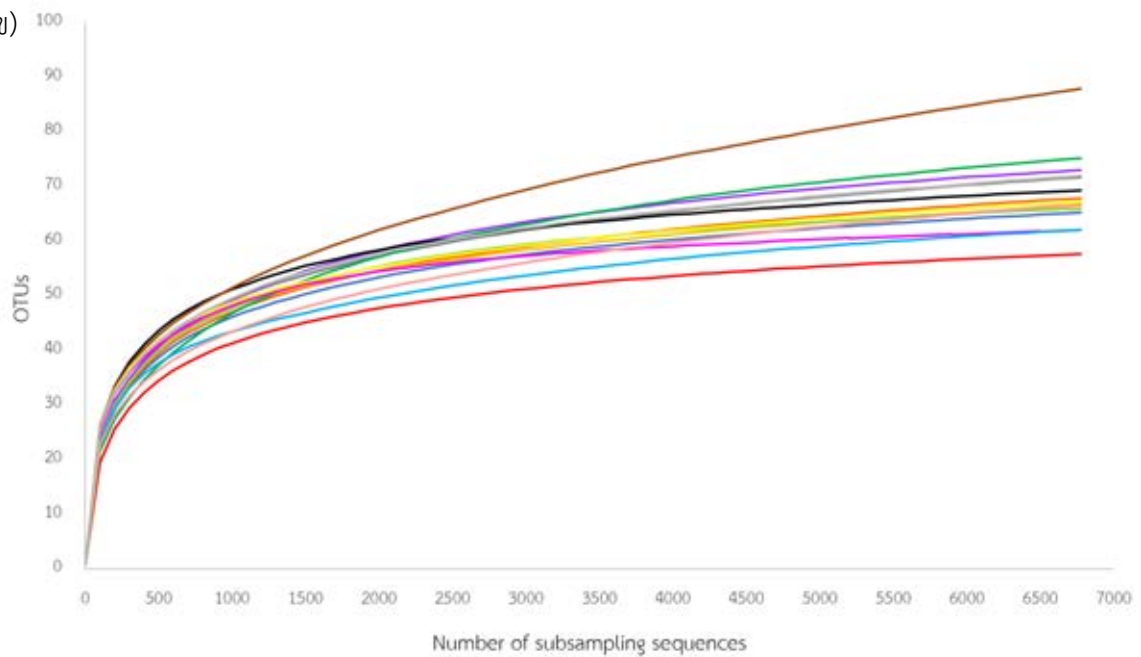
ตารางที่ 4.2 Number of reads before and after data preprocessing

Samples	Number of reads	
	Pre-processing	Post-processing
WT2M1	20540	15369
PT2M1	17818	14352
KO2M1	8067	6773
WT4M1	18624	13486
PT4M1	32143	24015
KO4M1	14874	13450
WT6M1	15410	12782
PT6M1	18588	14887
KO6M1	12616	9716
WT8M1	16356	12782
PT8M1	46922	35022
KO8M1	42055	35573
WT10M3	307914	205856
PT10M3	205326	100879
KO10M3	85524	66998

(ก)



(ข)



รูปที่ 4.2 (ก) rarefaction curve of 16S sequences at phylum level

(ข) rarefaction curve of 16S sequences at genus level

## 4.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพ

ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่ากลุ่ม wild-type มีจำนวน OTUs ที่ระดับไฟลัมระหว่าง 7 – 11 ระดับจิ้นัส 51 – 72 กลุ่ม pristane มีจำนวน OTUs ระดับไฟลัมระหว่าง 7 – 16 ระดับจิ้นัส 57 – 88 และกลุ่ม knockout มีจำนวน OTUs ระดับไฟลัมระหว่าง 7 – 10 ระดับจิ้นัส 62 – 72 โดยไฟลัมของแบคทีเรียที่พบเป็นส่วนใหญ่ คือ Bacteroidetes, Firmicutes และ Proteobacteria ดังรูปที่ 4.4 และจิ้นัสที่พบส่วนใหญ่ คือ แบคทีเรียในวงศ์ S24-7, *Lachnospiraceae* และในไฟลัม Proteobacteria ดังรูปที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงของจำนวน OTUs ตั้งแต่ที่อายุ 2 – 10 เดือน พบว่ากลุ่ม wild-type มีจำนวน OTUs ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก กลุ่ม pristane มีจำนวน OTUs ที่เพิ่มขึ้นมากอย่างเห็นได้ชัดที่อายุ 6 เดือน และกลุ่ม knockout มีจำนวน OTUs ไม่เพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 4.3 (ข)

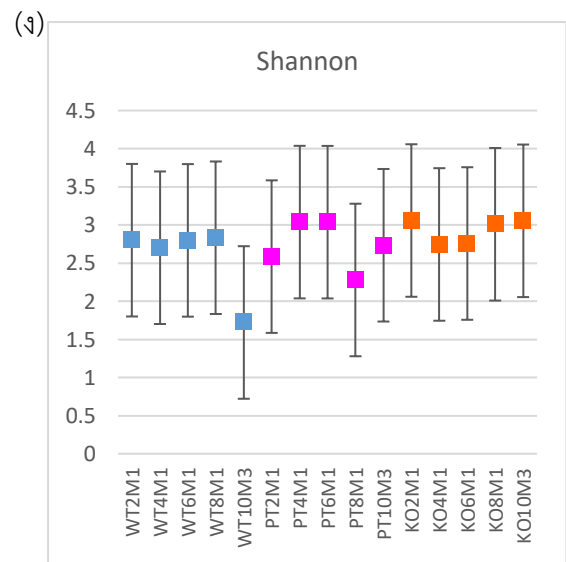
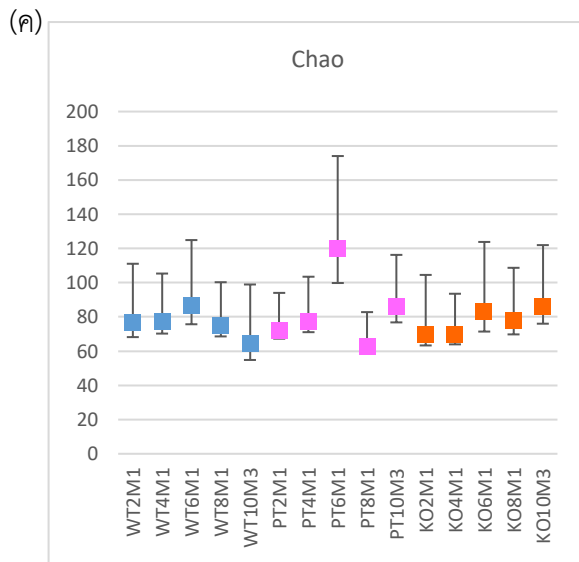
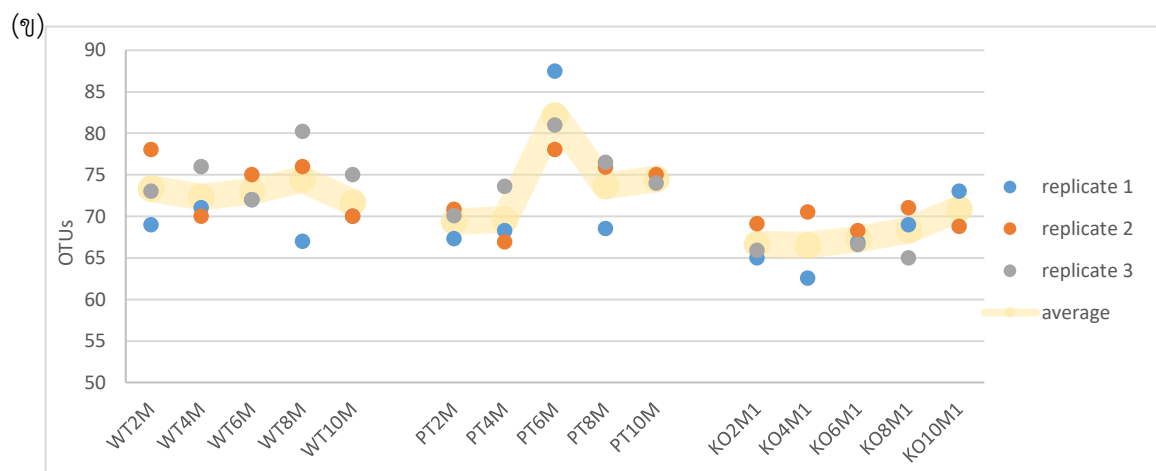
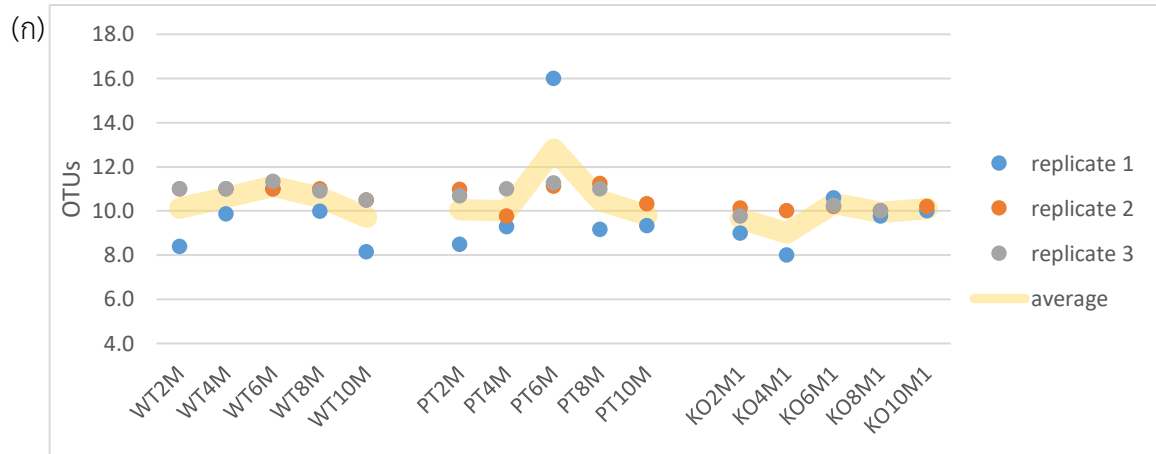
จากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพที่ดัชนีอัลฟา ด้วย Chao, Inverse – Simpson index และ shannon - Weiner index โดยโปรแกรม Mothur โดยจากค่า Chao สามารถแสดงถึงจำนวนชนิดที่แตกต่างกัน (richness) เป็นค่าที่พิจารณาจากจำนวนชนิดทั้งหมดที่พบในตัวอย่าง ส่วน Simpson บ่งชี้การกระจายตัวของชนิด (evenness) และ Shannon แสดงถึงความหลากหลายของแบคทีเรีย (diversity) โดยพิจารณาทั้งจำนวนชนิดที่แตกต่างกัน (richness) ปริมาณของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น (evenness) และพบว่ามีความครอบคลุม (coverage) พบว่า Inverse – Simpson index และ shannon - Weiner index ไม่มีความแตกต่างกันมาก ค่า Chao ของกลุ่ม pristane มีการเพิ่มขึ้นที่อายุ 4 เดือน แสดงว่ามีจำนวนชนิดของแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น ดังรูปที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 operational taxonomic units (OTUs) และความหลากหลายทางชีวภาพในแต่ละตัวอย่างโดยดัชนี alpha (alpha diversity) ในระดับไฟลัม (phylum)

phylum level					
sample	coverage	OTUs	Alpha diversity		
			chao	invsimpson	shannon
WT2M1	1	7	7	3.005875	1.214127
WT4M1	0.999846	9	9.2735	2.744498	1.188937
WT6M1	0.999809	11	11.65567	2.622826	1.168457
WT8M1	0.999973	9	8.952	2.05007	0.985684
WT10M3	0.999854	9	8.833333	1.593855	0.668809
PT2M1	0.999931	7	7.465	2.34464	1.059315
PT4M1	0.999956	8	8.296	3.474552	1.390879
PT6M1	0.999263	16	20.0551	3.23411	1.307396
PT8M1	0.999965	8	8.204	2.10489	0.893008
PT10M3	0.99993	9	9.3895	3.484831	1.470095
KO2M1	1	8	8	2.907165	1.241849
KO4M1	1	7	7	3.385953	1.405277
KO6M1	0.999822	10	9.941	2.841932	1.279912
KO8M1	0.999948	9	8.762	2.629141	1.227251
KO10M3	0.999935	9	9.008	2.908791	1.308315

ตารางที่ 4.4 operational taxonomic units (OTUs) และความหลากหลายทางชีวภาพในแต่ละตัวอย่างโดยดัชนี alpha (alpha diversity) ในระดับจีโนส (genus)

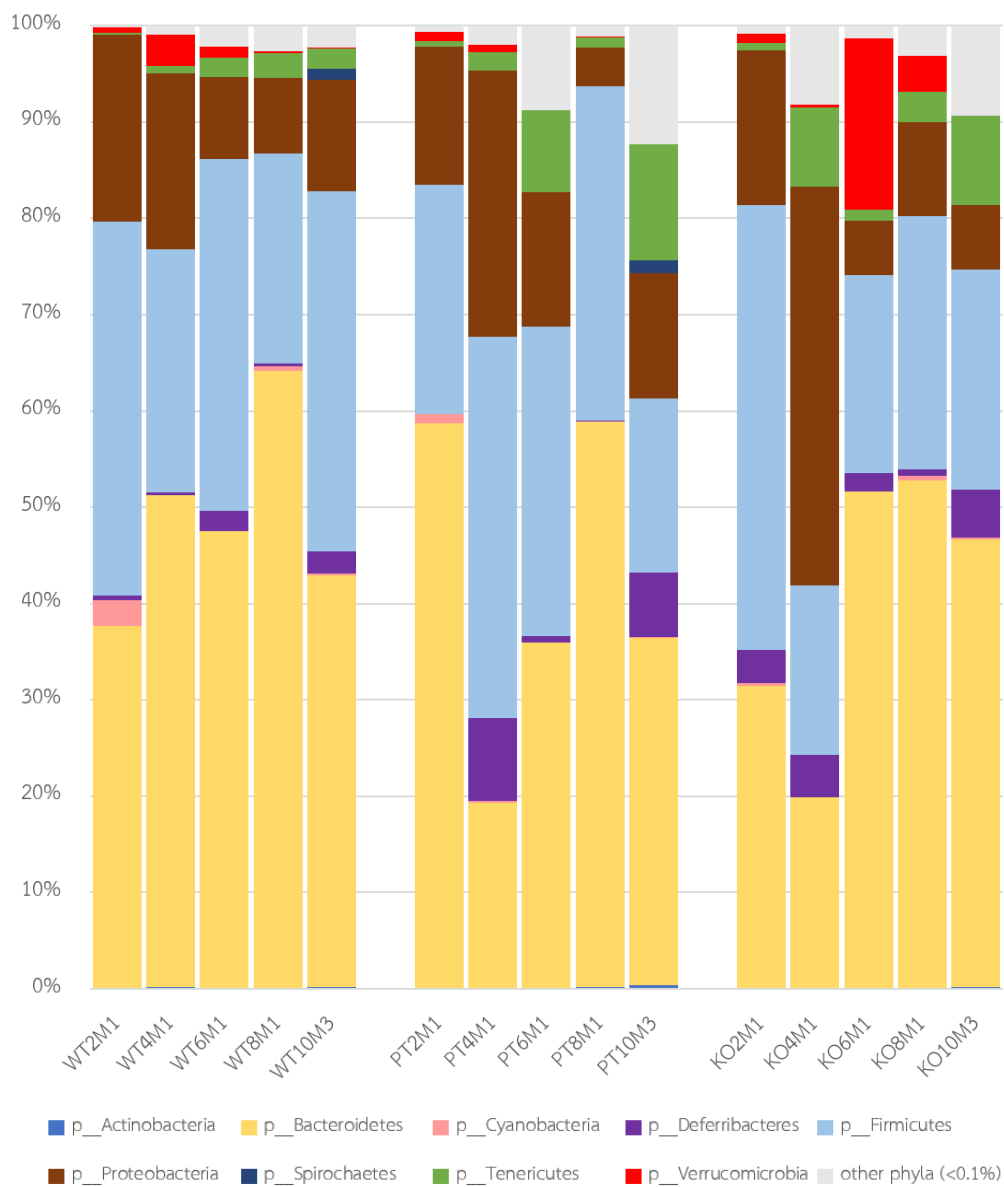
genus level					
sample	coverage	OTUs	Alpha diversity		
			chao	invsimpson	shannon
WT2M1	0.998227	69	76.609347	10.090067	2.800448
WT4M1	0.998074	71	77.287541	8.007631	2.701402
WT6M1	0.997873	72	86.235126	7.603236	2.797953
WT8M1	0.998573	67	74.800203	8.932157	2.832792
WT10M3	0.998404	51	64.432995	3.584435	1.721366
PT2M1	0.998439	66	71.904669	5.611738	2.584945
PT4M1	0.998487	69	76.96654	12.78271	3.037601
PT6M1	0.996567	88	119.903923	12.156575	3.036612
PT8M1	0.998596	57	62.636613	4.560053	2.278649
PT10M3	0.997817	73	85.760448	10.702831	2.733931
KO2M1	0.998857	62	69.5	14.455683	3.058313
KO4M1	0.998202	62	69.702732	8.899321	2.744485
KO6M1	0.998156	67	83.06826	8.949955	2.757068
KO8M1	0.998163	67	77.462362	11.971712	3.008867
KO10M3	0.997905	72	85.927406	13.368932	3.054295



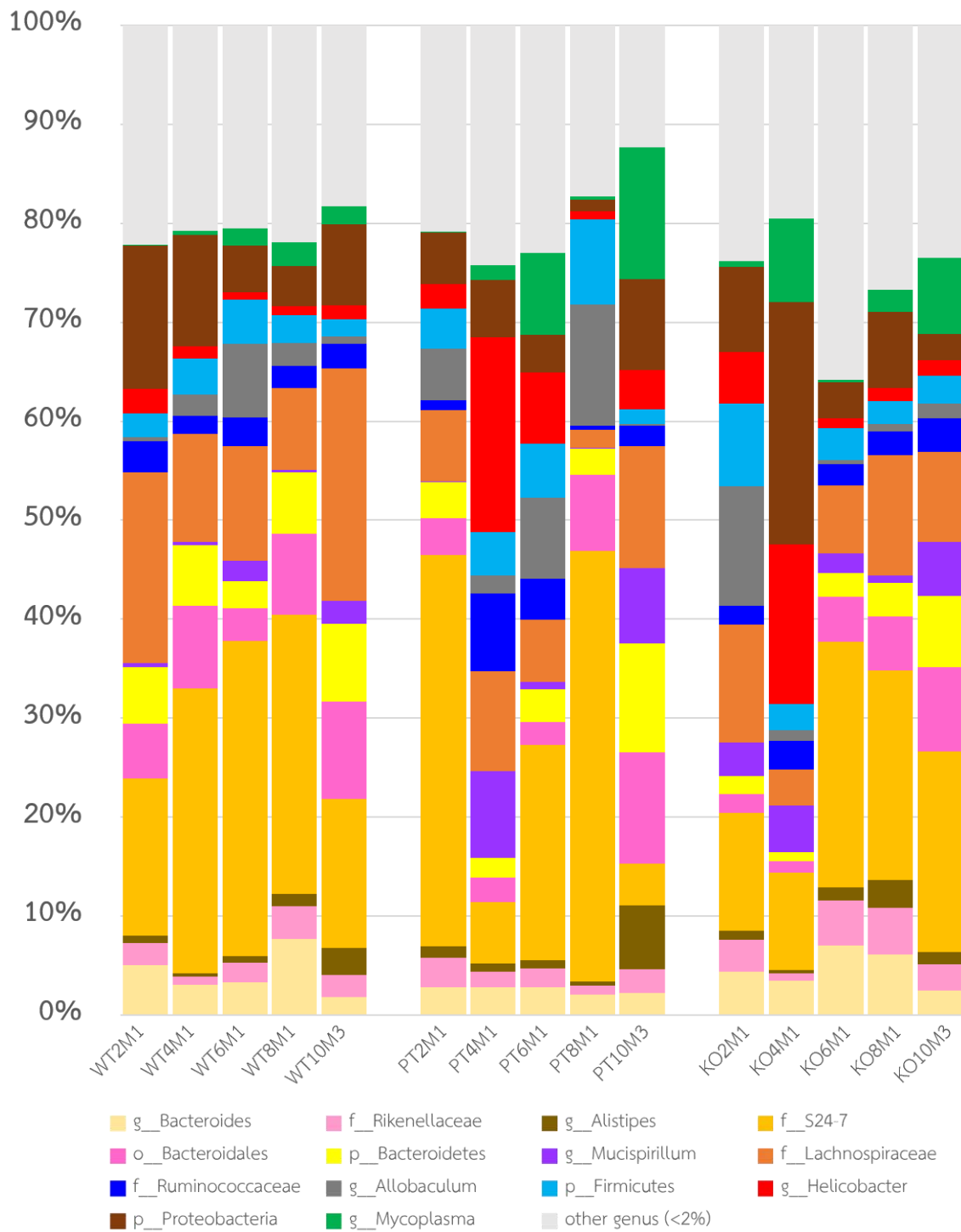
รูปที่ 4.3 ระดับไฟลัม (ก) OTUs ระดับจีโนม (ข) OTUs (ค) Chao (ง) Shannon index

### 4.3 การเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของนิเวศจุลชีพในลำไส้

วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของนิเวศจุลชีพในลำไส้ที่แต่ละระยะเวลา แสดงให้เห็นว่า ทั้งสามกลุ่มมีการเปลี่ยนแปลงตามอายุและระดับความรุนแรงของโรค กลุ่ม wild-type มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ส่วนกลุ่ม pristane และ knockout มีการเปลี่ยนแปลงที่คล้ายกันโดยมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมาก ดังรูปที่ 4.6 โดยมีไฟลัมที่เพิ่มมากขึ้น ได้แก่ Deferribacteres Proteobacteria Tenericutes และ Verrucomicrobia และจีโนมที่เพิ่มมากขึ้น ได้แก่ *Helicobacter* และจีโนมที่ลดลงได้แก่ จีโนมวงศ์ Lachnospiraceae เป็นต้น

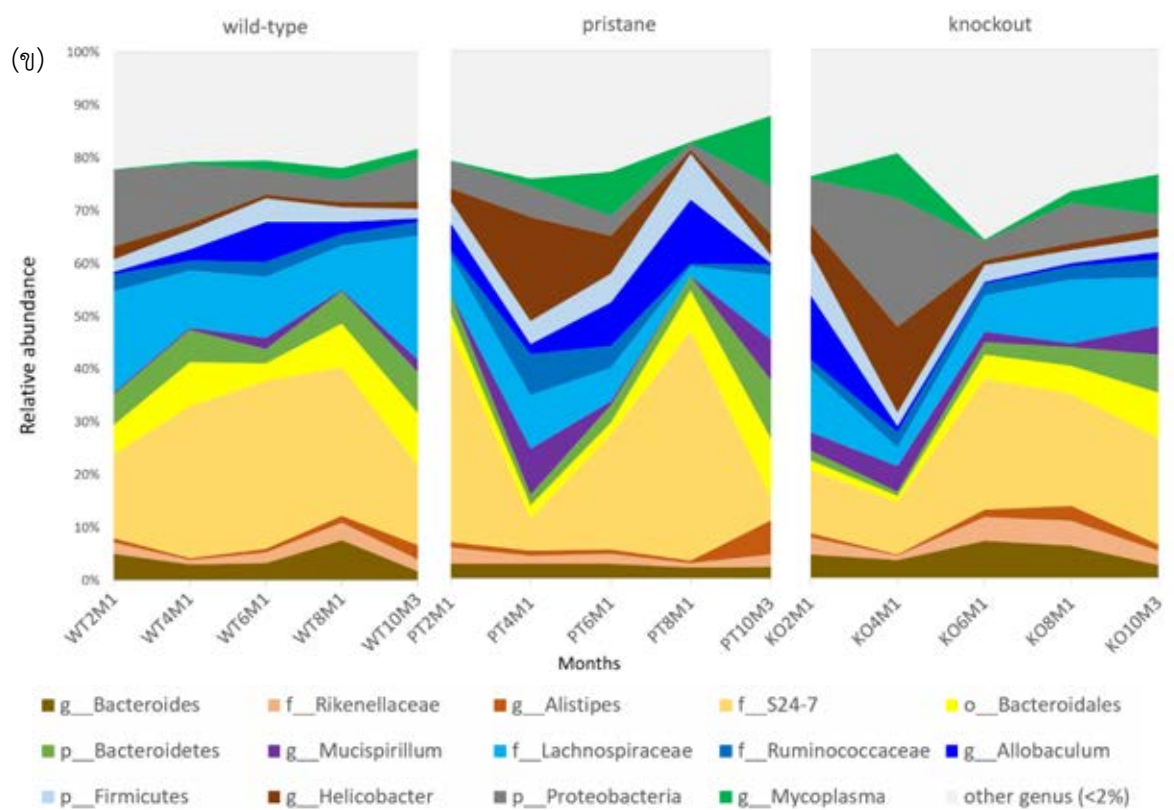
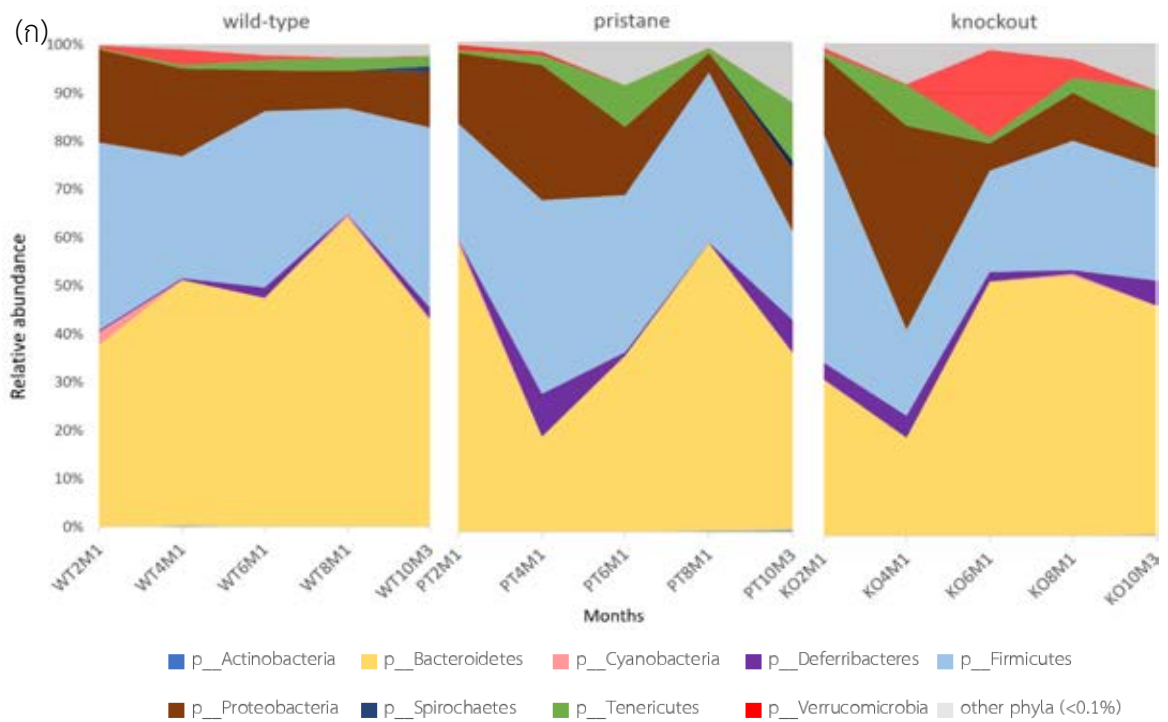


รูปที่ 4.4 อนุกรมวิธานของนิเวศจุลชีพในลำไส้ที่ระดับไฟลัม



รูปที่ 4.5 อนุกรมวิธานของนิเวศจุลชีพในลำไส้ที่ระดับจีแนส (genus)

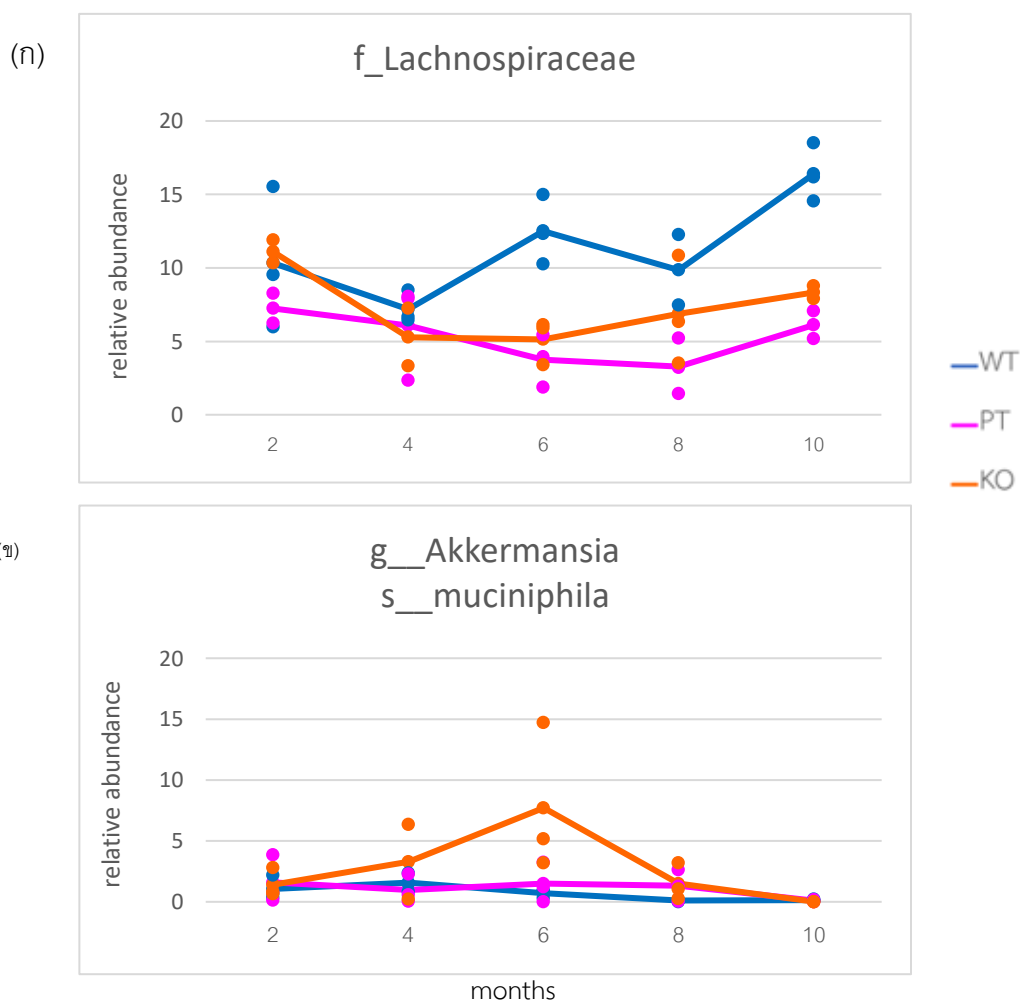




รูปที่ 4.6 Time - dependent changes of fecal microbiota

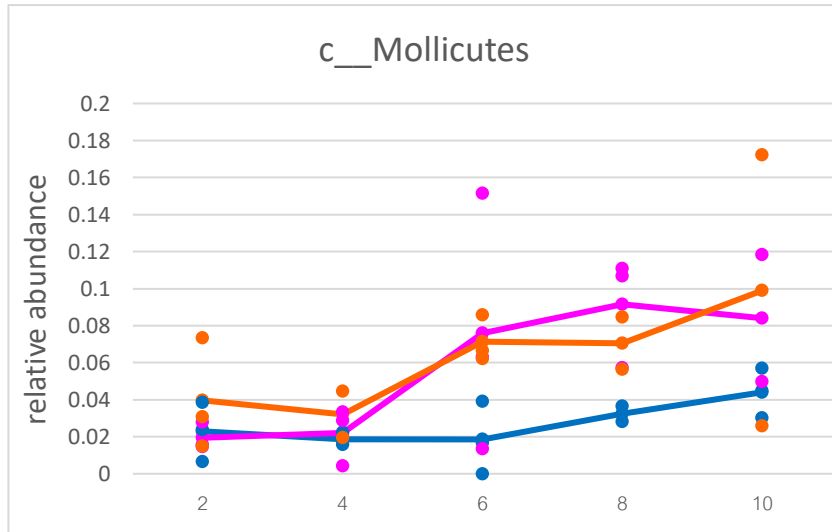
(ก) ระดับไฟลัม (ข) ระดับจีโนส

จากการศึกษาแบคทีเรียแต่ละชนิดเมื่อเทียบกับกลุ่ม wild-type พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของนิเวศจุลชีพในกลุ่ม pristane และกลุ่ม knockout ได้แก่ มีการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียในคลาส *Mollicutes* (รูปที่ 4.8 (ก)) ตั้งแต่ที่อายุ 6 เดือน และมีการลดลงของ *Oscillospira* และ *Clostridium methylpentosum* (รูปที่ 4.8 (ข) และ (ค) ตามลำดับ) ที่ตั้งแต่อายุ 4 เดือน นอกจากนี้ยังพบ *Lachnospiraceae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบส่วนมากในระดับจีโนมของกลุ่ม pristane และกลุ่ม knockout มีปริมาณ ลดลงตั้งแต่อายุ 4 เดือน ดังรูปที่ 4.7 (ก) ส่วนกลุ่ม knockout มีการเพิ่มขึ้นของ *Akkermansia muciniphila* เพิ่มขึ้นที่อายุ 4 – 6 เดือน ดังรูปที่ 4.7 (ข) นอกจากนี้ Firmicutes และ Bacteroidetes ซึ่งเป็นไฟลัมหลักในนิเวศจุลชีพในลำไส้ พบว่าอัตราส่วนของ Firmicutes ต่อ Bacteroidetes ในกลุ่ม pristane และกลุ่ม knockout มีการเพิ่มขึ้นที่อายุ 4 เดือน และลดลงที่อายุ 6 เดือน เช่นเดียวกับ Proteobacteria และ *Helicobacter* ดังรูปที่ 4.9

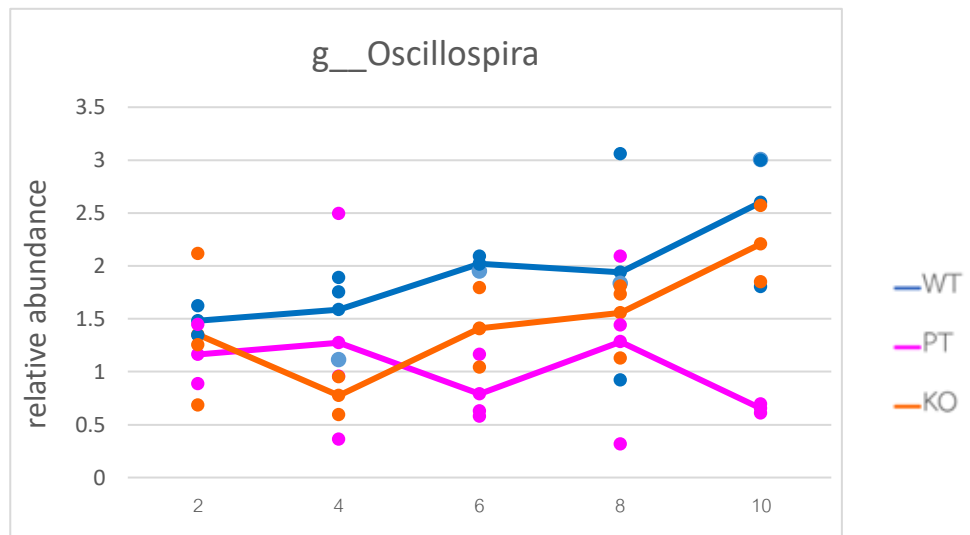


รูปที่ 4.7 Relative abundance ของ (ก) *Lachnospiraceae* (ข) *Akkermansia muciniphila*

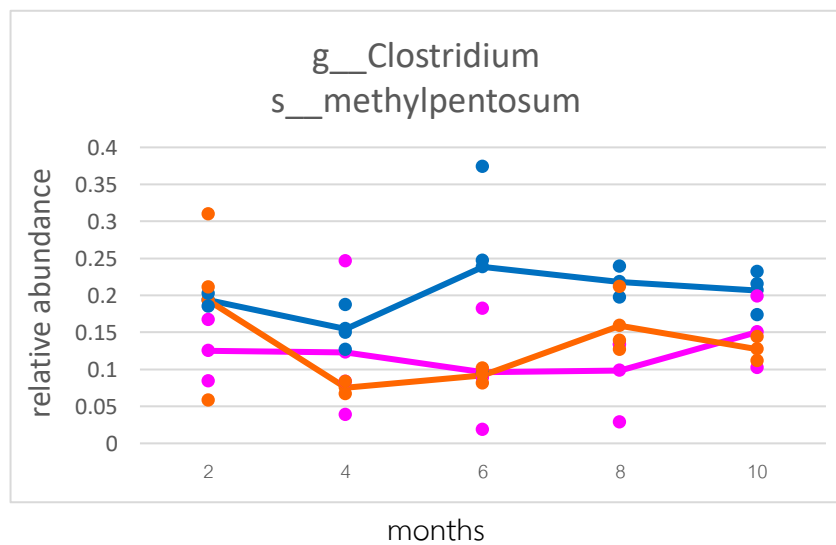
(ก)



(ข)

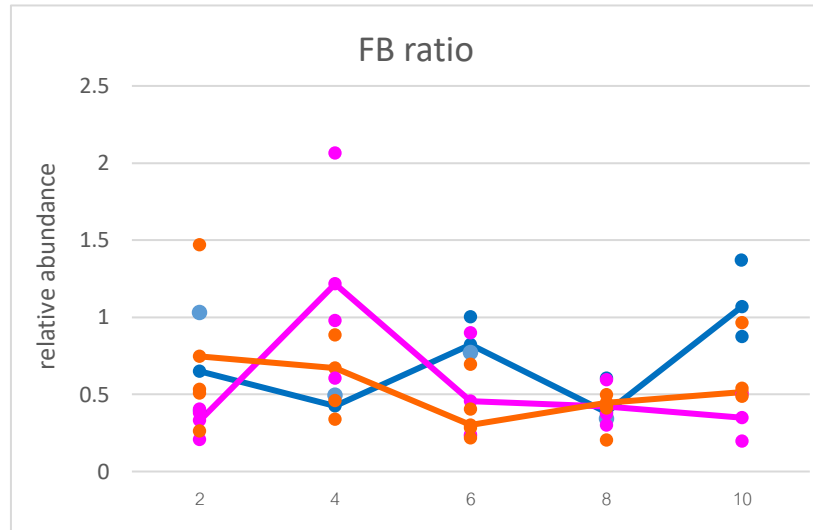


(ค)

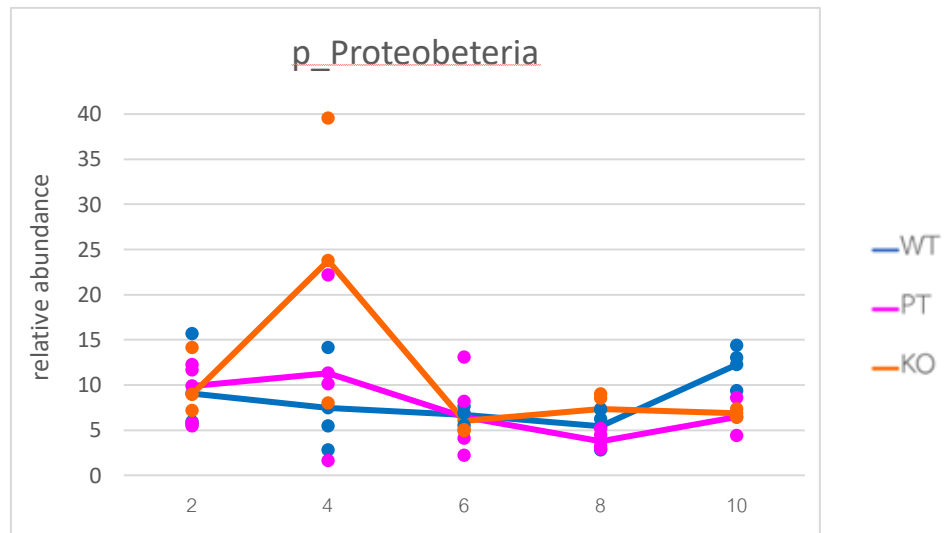


รูปที่ 4.8 relative abundance (ก) *Mollicutes* (ข) *Oscillospira*  
(ค) *Clostridium methylpentosum*

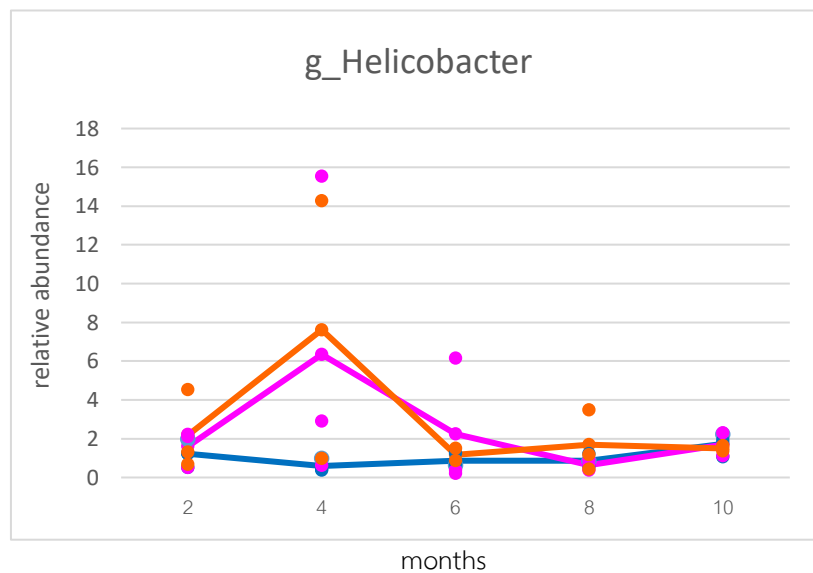
(ก)



(ข)



(ค)



รูปที่ 4.9 (ก) อัตราส่วนของ Firmicutes ต่อ Bacteroidetes และ relative abundance ของ (ข) Proteobacteria (ค) *Helicobacter*

## บทที่ 5

### สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

#### 5.1 วิเคราะห์การดำเนินและความรุนแรงของโรคจากหนูทดลอง

จากผลของ anti-dsDNA, ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ, IL-6, TNF- $\alpha$  และ IL-10 เป็นตัวบ่งชี้ของการเป็นโรคเอสแอลอี โดย anti-dsDNA เป็นแอนติบอดีต่อ double stranded DNA ของร่างกาย ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะแสดงถึงประสิทธิภาพการทำงานของไตในการกรองโปรตีน หากได้มีการถูกทำลายหรืออักเสบทำให้มีประสิทธิภาพในการกรองลดลง และมีปริมาณโปรตีนในปัสสาวะเพิ่มขึ้น IL-6 เป็นไซโตไคน์ที่ไปกระตุ้น naive cell ให้พัฒนาไปเป็น Th17 ซึ่งมีหน้าที่ผลิต IL-17 ที่ทำให้เกิดการอักเสบ (pro-inflammatory cytokines) ส่วน TNF- $\alpha$  เป็นไซโตไคน์ชนิดที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) และการอักเสบ และ IL-10 เป็น anti-inflammatory cytokines ที่สามารถยับยั้งการทำหน้าที่ของ T cell ชนิดอื่น แสดงให้เห็นว่าหนูกลุ่ม wild-type ไม่มีอาการของโรคเอสแอลอี คือไม่มีการเพิ่มขึ้นของ anti-dsDNA, โปรตีนในปัสสาวะ, IL-6, TNF- $\alpha$  และ IL-10 เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม pristane และ knockout ซึ่งสามารถสังเกตอาการของโรคได้ตั้งตั้งแต่ 6 เดือน จาก anti-dsDNA และปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ เนื่องจากเป็นเกณฑ์หนึ่งในการวินิจฉัยโรคเอสแอลอีในมนุษย์ โดยกลุ่ม pristane ที่ถูกฉีดด้วยสาร pristane ที่อายุ 2 เดือน จะมีอาการของโรครุนแรงน้อยกว่าเล็กน้อย และจะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงชัดเจนที่อายุ 6 เดือน ส่วนกลุ่ม knockout จะเริ่มมีอาการตั้งแต่น้อยที่อายุ 4 เดือน และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยมีอาการชัดเจนที่อายุ 6 เดือน โดยพิจารณาจาก anti-dsDNA และปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ ซึ่งในหนูกลุ่ม wild-type ไม่มีการเพิ่มขึ้นของ anti-dsDNA และปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ

#### 5.2 วิเคราะห์ความหลากหลายของนิเวศจุลชีพในลำไส้

จากการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศเทียบกับฐานข้อมูลชนิดของแบคทีเรียแสดงให้เห็นว่ากลุ่ม pristane และกลุ่ม knockout คือที่อายุ 2 ยังไม่เกิดอาการของโรคและมีนิเวศจุลชีพไม่ต่างจากกลุ่ม wild-type แต่เมื่อมีอาการของโรคก็พบว่ามี การเปลี่ยนแปลงของนิเวศจุลชีพ โดยพบว่าเกิดความไม่สมดุลของนิเวศจุลชีพในลำไส้ (dysbiosis) การลดลงของ normal flora บางชนิด ทำให้มีแบคทีเรียชนิดที่ไม่ดีเพิ่มขึ้นได้ โดยกลุ่มที่ถูกฉีดด้วยสาร pristane ที่อายุ 2 เดือน มีการเพิ่มขึ้นของ OTUs ของแบคทีเรีย ที่อายุ 6 เดือน ซึ่งมีการเพิ่มขึ้นของ anti-dsDNA และ IL-6 ส่วนกลุ่ม knockout มีการเพิ่มขึ้นของ anti-dsDNA และ IL-6 เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่อายุ 4 เดือน แต่มีการเพิ่มขึ้นของ OTUs ของ

แบคทีเรียเพียงเล็กน้อย เมื่อศึกษาจากแบคทีเรียแต่ละชนิดเทียบกับกลุ่ม wild-type พบว่าทั้งกลุ่ม pristane และ knockout มีการเปลี่ยนแปลงของชนิดแบคทีเรียบางชนิดใกล้เคียงกัน เช่น Firmicutes และ Bacteroidetes ซึ่งเป็นไฟลัมที่พบมากที่สุดตามลำดับ พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของอัตราส่วน Firmicutes ต่อ Bacteroidetes ที่อายุ 4 เดือน สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าในผู้ป่วยโรค เอสแอลอีมีอัตราส่วน Firmicutes ต่อ Bacteroidetes ลดลงเมื่อเทียบกับคนสุขภาพดี (Hevia A et al., 2014) ซึ่งจากการศึกษาข้อมูลพบว่าเป็นแบคทีเรียที่ช่วยในการควบคุมสมดุลของ regulatory T cell และ T cell effector ส่วนในระดับจีโนมพบว่าแบคทีเรียที่พบเป็นส่วนมากได้แก่ *Lachnospiraceae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในไฟลัม Firmicutes และ S24-7 เป็นแบคทีเรียในไฟลัม Bacteroidetes จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ส่วนมากพบว่า กลุ่มที่เป็นโรคจะมี *Lachnospiraceae* เพิ่มขึ้น แต่ก็มีงานวิจัยที่พบว่าบางจีโนมของ *Lachnospiraceae* ลดลงได้ เช่น *Anaerostipes* (Luo XM et al., 2017) ซึ่งในผลการทดลองมี *Lachnospiraceae* ลดลงที่อายุ 4 เดือน นอกจากนี้ที่อายุ 4 เดือนยังพบว่าการเพิ่มขึ้นของ *Helicobacter* ซึ่งอยู่ในไฟลัม Proteobacteria จากข้อมูลของงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า *Helicobacter* มีบทบาทสำคัญต่อโรคลำไส้อักเสบเรื้อรัง (Berry D et al., 2015) รวมทั้งเป็นแบคทีเรีย ที่สามารถผลิต urease ที่กระตุ้นการสร้าง autoantibody ทำให้เกิดการอักเสบทั้งระบบนำไปสู่อาการของภูมิคุ้มกันทำลายตนเองและโรคเอสแอลอีได้ (Radic M., 2014) และกลุ่ม knockout ที่อายุ 6 เดือน มีการเพิ่มขึ้นของ *Akkermansia muciniphila* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในไฟลัม Verrucomicrobia ที่สามารถย่อยเยื่อเมือก ไกลโคโปรตีน (mucin) ที่หลั่งออกมาจากเยื่อบุกระเพาะอาหารและลำไส้ใน การป้องกันเชื้อก่อโรค (Chelakkot C et al., 2016) โดยเชื่อกันว่าช่วงต้นพบการเปลี่ยนแปลงที่ช่วงเวลาหนึ่ง ต่อมาเมื่อมีแนวโน้มที่เปลี่ยนแปลงกลับมาเหมือนเดิม อย่างไรก็ตามพบว่ามีเชื้อบางกลุ่มที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างถาวร หลังจากเกิดอาการของโรค ได้แก่ มีการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียในคลาส Mollicutes ตั้งแต่อายุ 6 เดือน โดยแบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่ไม่มีผนังเซลล์ อาศัยอยู่ในลำไส้แบบภาวะปรสิต (Roediger W et al., 2002) และมีการลดลงของ *Oscillospira* และ *Clostridium methylpentosum* ที่ตั้งแต่อายุ 4 เดือน จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า *Oscillospira* เป็นแบคทีเรียที่ช่วยลำไส้ในการย่อยและหมักแป้ง (Lin A et al., 2013) และยังพบว่าการลดลงของแบคทีเรียชนิดนี้ในผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเรื้อรังอีกด้วย (Kaakoush N et al., 2012) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการเปลี่ยนของนิเวศจุลชีพในลำไส้ของหนูที่เป็นโรคไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงชั่วคราว แต่มีการเปลี่ยนแปลงต่อเนื่องตามระดับความรุนแรงของโรค นอกจากนี้ จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียแกรมลบ (Bacteroidetes, Proteobacteria และ Verrucomicrobia) ซึ่งมี Lipopolysaccharide (LPS) สามารถส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันบริเวณลำไส้ได้ จึงสรุปได้ว่าในหนูทดลองสายพันธุ์ C57BL/6 มีการดำเนินของโรคเอสแอลอีที่สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของนิเวศจุลชีพในลำไส้ และหนูทดลองสายพันธุ์ C57BL/6 ที่มีการเป็นโรค

จากปัจจัยที่แตกต่างกัน (pristine และ knockout) มีการเกิดอาการของโรคที่ต่างกันทำให้มีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของนิเวศจุลชีพที่แตกต่างกัน

### 5.3 ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศและความหลากหลายทางชีวภาพ โดยเมื่อนำมาเปรียบเทียบแต่ละซ้ำ พบว่ามีความใกล้เคียงกัน แต่ก็มีบางตัวอย่างมีความแตกต่างไปจากอีก 2 ซ้ำอย่างมาก ดังนั้นในการทำวิจัยควรมีการทำซ้ำถึงจะให้ผลที่มีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น และหากวิเคราะห์จากค่าเฉลี่ยของทั้ง 3 ซ้ำ จะเห็นแนวโน้มที่ชัดเจนกว่า ดังนั้นผลในโครงการนี้บางส่วนจึงนำข้อมูลของอีก 2 ซ้ำมาวิเคราะห์ด้วย

## รายการอ้างอิง

- Bolland S and Ravetch JV. “Spontaneous Autoimmune Disease in FcγRIIB-Deficient Mice Results from Strain-Specific Epistasis”. *Immunity* 13, August (2000): 277-285.
- Celhar T and Fairhurst AM. “Modelling clinical systemic lupus erythematosus: similarities, differences and success stories”. *Rheumatology* 56. April (2017).
- Crampton SP, Morawski PA and Bolland S. “Linking susceptibility genes and pathogenesis mechanisms using mouse models of systemic lupus erythematosus”. *Disease Models & Mechanisms* 7, September (2014): 1033-1046.
- Geerlings SY, Kostopoulos I, Willem M. de Vos and Clara Belzer C. “*Akkermansia muciniphila* in the Human Gastrointestinal Tract: When, Where, and How?”. *Microorganisms* 75(6), July(2018).
- Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M and Nageshwar Reddy D. “role of the normal gut microbiota”. *World Journal Gastroenterol* 21(29), August (2015): 8787-8803.
- Johnson BM, Gaudreau, MC, AL-Gadban MM, Gudi R and Vasu C. “Impact of dietary deviation on disease progression and gut microbiome composition in lupus-prone SNF1 mice”. *Clin Exp Immunol* 181(2), August (2015): 323-37.
- Freitas EC, de Oliveira MS and Monticeli OA. “Pristane-induced lupus: considerations on this experimental model”. *Clin Rheumatol* 36(11). November (2017).
- Hevia A, Milani C, López P, et al. “Intestinal Dysbiosis Associated with Systemic Lupus Erythematosus”. *mBio* 5(5). September/October (2014).
- Kaakoush NO, Day AS, Huinao KD, Leach ST, Lemberg DA, Dowd SE and Mitchell HM. “Microbial Dysbiosis in Pediatric Patients with Crohn's Disease”. *J Clin Microbiol* 50(10). October (2012).
- Kamada N, Seo SU, Chen GY, and Núñez G. “Role of the gut microbiota in immunity and Inflammatory disease”. *Nature reviews immunology* 13(5), May (2013): 321-325.



- Kaul A, Gordon C, Crow MK, Touma Z, Urowitz MB, Vollenhoven R, Ruiz-Irastorza G and Hughes G. "Systemic lupus erythematosus". *Nature Reviews Disease Primers* 2, June (2016). Kundu P, Blacher E, Elinav E and Pettersson S. "Our Gut Microbiome: The Evolving Inner Self". *Cell* 171(7), December (2017): 1481-1493.
- Lin A, Bik EM, Costello EK, Dethlefsen L, Haque R, Relman DA, Upinder Singh U. "Distinct Distal Gut Microbiome Diversity and Composition in Healthy Children from Bangladesh and the United States". *PLoS One* 8(1), January (2013)
- Luo XM, Edwards MR, Mu Q, et al. "Gut Microbiota in Human Systemic Lupus Erythematosus and a Mouse Model of Lupus". *Applied and Environmental Microbiology* 84(4), February (2018).
- Murri M, Leiva I, Gomez-Zumaquero JM, Tinahones FJ, Cardona F, Soriguer F and Queipo-Ortuño MI. "Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study". *BMC Medicine*. February (2013).
- Mok CC. "Special issue on systemic lupus erythematosus in Asia". *International Journal of Rheumatic Diseases* 18(2). February (2015).
- Radić M. "Role of *Helicobacter pylori* infection in autoimmune systemic rheumatic diseases". *World journal of gastroenterology*, 20(36), 12839–12846. (2014).
- Rees F, Dohert M, Grainge MJ, Lanyon P and Zhang W. "The worldwide incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: a systematic review of epidemiological studies". *Rheumatology* 56(11). November (2017): 1945-1961.
- Richard ML and Gilkeson G. "Mouse models of lupus: what they tell us and what they don't". *Lupus Science & Medicine* 5(1). January (2018).
- Roediger WE and Macfarlane GT. "A role for intestinal mycoplasmas in the aetiology of Crohn's disease". *J Appl Microbiol* 92(3). August (2002): 377-81.
- Sprockett D, Fukami T and Relman DA. "Role of priority effects in the early-life assembly of the gut microbiota". *Gastroenterology & Hepatology* 15(4), April (2018): 197-205.

Thursby E and Juge N. “Introduction to the human gut microbiota” *Biochemical Journal*.  
March (2017): 1823–1836.

Wu HJ and Wu E. “The role of gut microbiota in immune homeostasis and  
autoimmunity”. *Gut Microbes* 3(1). January-February (2012).

Zhang H, Liao X, Sparks JB, Luo XM. “Dynamics of Gut Microbiota in Autoimmune  
Lupus”. *Applied and Environmental Microbiology* 80(24), December (2014): 7551–  
7560.

Zhang H, Szeto C, Han S, Yang L and Reeves WH. “Animal Models of Interferon Signature  
Positive Lupus.” *Frontiers in Immunology* 6, June (2015): 291.

Zhang YJ, Li S, Gan RY, Zhou T, Xu DP and Li HB. “Impacts of Gut Bacteria on Human  
Health and Diseases”. *International Journal of Molecular Sciences* 16(4), April  
(2015): 7493-7519.

## ภาคผนวก

### การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด

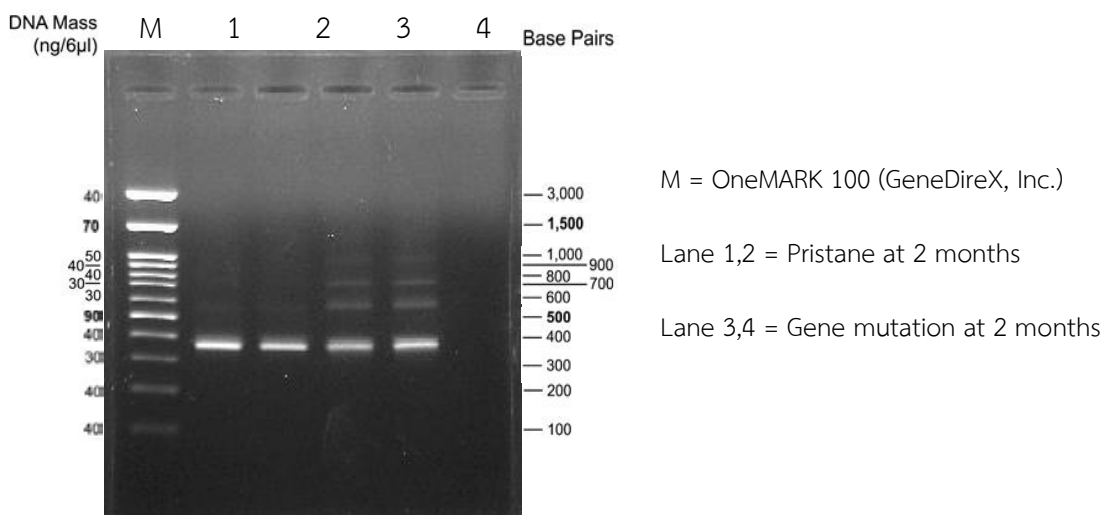
ความเข้มข้นและคุณภาพของสารพันธุกรรมทั้งหมดที่สกัดได้

fecal samples	Wild-type		pristane		gene mutation	
	Conc.	A <sub>260/280</sub>	Conc.	A <sub>260/280</sub>	Conc.	A <sub>260/280</sub>
2 months	19.3	1.74	7.9	1.75	5.5	2.47
4 months	9.0	2.06	3.1	2.90	4.1	3.37
6 months	6.0	3.64	8.7	1.97	24.9	1.87
8 months	119.3	1.76	97.9	1.77	237.6	1.78
10 months	31.1	1.69	37.2	1.78	95.5	1.55

conc. = DNA concentration (ng/μl)

A<sub>260/280</sub> คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรของดีเอ็นเอและ 280 นาโนเมตรของโปรตีน

### การตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายจากการพีซีอาร์ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส



ภาพดีเอ็นเอเป้าหมาย (16s rRNA gene) agarose gel เจลใต้เครื่อง UV transilluminator พบว่าดีเอ็นเอเป้าหมายมีขนาด 381 คู่เบส และมีปริมาณความเข้มข้นเมื่อเทียบกับ marker ได้ที่แต่ละแถวคือ 100 ng, 100 ng, 80 ng และ 90 ng ตามลำดับ

## การวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของยีน 16s rRNA ด้วย Qubit

Samples	PCR Cycles	Qubit results (ng/ul)	DNA elute volume (ul)	Total DNA conc. (ng)	Using volume (200 ng = x ul)	ng of DNA	200 ng
WT2M1	27 - 28	7.62	48	365.76	26.25	200.00	200.00
PT2M1	27 - 28	9.68	48	464.64	20.66	200.00	200.00
KO2M1	27 - 28	13.80	48	662.40	14.49	200.00	200.00
WT4M1	26	11.70	48	561.60	17.09	200.00	200.00
PT4M1	26 - 27	9.00	48	432.00	22.22	200.00	200.00
KO4M1	26	8.84	48	424.32	22.62	200.00	200.00
WT6M1	26	10.20	48	489.60	19.61	200.00	200.00
PT6M1	26	9.32	48	447.36	21.46	200.00	200.00
KO6M1	26	7.86	48	377.28	25.45	200.00	200.00
WT8M1	26	20.80	48	998.40	9.62	200.00	200.00
PT8M1	26	7.14	48	342.72	28.01	200.00	200.00
KO8M1	26	18.60	48	892.80	10.75	200.00	200.00
KO10M3	28	8.84	48	424.32	22.62	200.00	200.00